



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de doctorado “Ciencias Veterinarias y de los Alimentos”

“Caracterización y control de la resistencia a antimicrobianos y de los biofilms en bacterias patógenas de interés en la Industria Alimentaria: hacia el enfoque Una Salud”

Memoria que presenta la Graduada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Cristina Rodríguez Melcón

Para optar al Grado de Doctora por la Universidad de León

Dirigida por:

Dra. Rosa María Capita González

Catedrática del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

Dr. Carlos Alonso Calleja

Catedrático del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

León, enero de 2022



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de doctorado “Ciencias Veterinarias y de los Alimentos”

“Caracterización y control de la resistencia a antimicrobianos y de los biofilms en bacterias patógenas de interés en la Industria Alimentaria: hacia el enfoque Una Salud”

“Characterization and control of antimicrobial resistance and biofilms in pathogenic bacteria of interest in the Food Industry: towards the One Health approach”

Cristina Rodríguez Melcón

León, 2022

El trabajo recogido en la presente memoria de Tesis Doctoral ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (INIA; RTA2014-00045-C03-02), el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-098267-R-C33) y la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Proyectos LE164G18 y LE018P20). Cristina Rodríguez Melcón es beneficiaria de una de las ayudas destinadas a financiar la contratación predoctoral de personal investigador, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo, de la Junta de Castilla y León (ORDEN EDU/574/2018, de 28 de mayo de 2018).

*“Nada en este mundo debe ser temido...
solo entendido. Ahora es el momento de comprender
más, para que podamos temer menos”*

Maria Salomea Skłodowska-Curie (1867 – 1934)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Rosa Capita González y el Dr. Carlos Alonso Calleja el haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral. Sin vuestra paciencia, ayuda incondicional, empatía y consejos, esto no hubiera sido posible. Gracias por la confianza que habéis depositado en mí y por hacerme crecer no solo profesionalmente, sino como persona. Me quedo sin duda con los buenos ratos, con todos los consejos de cada tarde tras la jornada laboral, con las sesiones de ánimo y de pensar que todo con calma sale mejor y, por supuesto, con Lola. Gracias por ser mis maestros, por la enorme cantidad de tiempo invertido en las investigaciones, en las publicaciones y en la corrección de esta Tesis Doctoral, por enseñarme a amar tanto mi trabajo y por haber creído y apostado por mí desde el primer momento.

A la Dra. Alexandra Esteves, tutora durante mi estancia predoctoral en la Universidad de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), en Vila-Real (Portugal). Gracias por darme esta oportunidad, por tu tiempo, tu paciencia y por hacer que me sintiese como en casa. También agradecer a mis compañeras de laboratorio portuguesas, Ana y Elena, por todo lo aprendido. Sin duda, una gran experiencia.

A todos los miembros del Grupo de Investigación SEGURALI, del que estoy tremendamente orgullosa de formar parte: Carlos, Rosa, Félix, Alicia, David, Camino, Ana, María, Emilia, Laura, Lucía, Carol, Víctor y Sarah. Gracias por tanto apoyo y consejos, tanto compañerismo, ánimo, cariño y comprensión. Sois una pieza importante de este trabajo.

A los compañeros del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), donde he realizado la mayor parte de mis investigaciones: Javier, Eugenia, Rosana, Eva, Eutiquio, Ignacio, Félix, Elba, María... y a su directora, Dra. Camino García-Fernández, por brindarme su apoyo y hacer el trabajo más llevadero, recibéndome siempre con una sonrisa. Sin duda, el ICTAL se ha convertido estos años en mi segunda casa y no he podido ser más feliz.

Al Servicio de Microscopía de la Universidad de León, a su director, Paulino, y a Antonio, por la paciencia infinita enseñándome a utilizar todos los equipos que han sido clave para muchas de mis investigaciones.

A todos los miembros del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos y, en especial, a los que fueron mis profesores durante mi etapa como estudiante de Grado y Máster. Gracias a vosotros puedo afirmar sin ninguna duda que he adquirido una base sólida de conocimientos que han sido clave para llegar hasta aquí.

Esta Tesis se la dedico a:

Mis padres, Jesús y Cristina, y mi hermana, Estefanía. No tengo suficientes palabras de agradecimiento para vosotros. Gracias por vuestra infinita paciencia, por ayudarme siempre a conseguir mis sueños, por haberme acompañado en todos mis logros, por el apoyo sin medida que me dais cada día. Por enseñarme a ser humilde y a valorar que todo se gana con esfuerzo, dedicación y paciencia. Soy lo que soy gracias a vosotros.

Mi familia, especialmente a mis abuelos: Benito, Laudelina, Fernando y Etelvina. Estéis lejos o cerca, sé que estaréis muy orgullosos de mí; a mi tía Begoña y a mi prima Jennyfer, por ser como mi segunda madre y hermana mayor, respectivamente, y por último a mi casi familia política, Mercedes, Miguel, Irene, Lorena y sobre todo a Luis, por su gran ayuda y apoyo.

Mis amigos y amigas, con mención especial a Virginia, Inés, Beatriz, Leticia y Rosa, y con los que comparto profesión: Raisa, Cristina Sánchez, Tomás, Elena, Silvia... Gracias por brindarme el mayor de los apoyos en esta etapa, tengo mucha suerte de teneros.

Daniel, por ser mi amigo, mi compañero de profesión y de vida. Por el apoyo incondicional y diario sin pedir nada a cambio, por luchar conmigo para ayudarme a conseguir todo lo que me propongo. Gracias por creer y confiar en mí desde hace casi 10 años, por darme energía y positividad en los momentos que no puedo más, por querer compartir tu camino conmigo, en las duras y en las maduras. Por hacer que juntos seamos el mejor equipo y por demostrarme cada día que es contigo con quien quiero compartir mi vida. Gracias por estar siempre.

A mis padres, Jesús y Cristina

A mi hermana, Estefanía

A mi compañero de vida, Daniel

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN/ABSTRACT	1
ABREVIATURAS	21
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	33
1. PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE CARNE DE AVE.....	35
1.1. Producción y consumo mundial de carne de ave	35
1.2. Producción y consumo de carne de ave en el ámbito europeo: España y Portugal	37
2. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS.....	42
2.1. Epidemiología de las enfermedades transmitidas por alimentos.....	42
2.1.1. Epidemiología en el mundo	42
2.1.2. Epidemiología en la Unión Europea (UE)	45
2.1.3. Epidemiología en España.....	48
2.2. Microorganismos patógenos de importancia en las industrias alimentarias	49
2.2.1. <i>Listeria</i> spp.	49
2.2.2. Otros microorganismos	51
2.2.2.1. <i>Salmonella</i> spp.	51
2.2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilina (MRSA).....	52
2.2.2.3. <i>Enterococcus faecium</i> resistente a la vancomicina (VRE)	53
2.2.3. Métodos de detección y cuantificación de microorganismos patógenos	54
3. BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	56
3.1. Concepto y etapas de formación de las biopelículas.....	56
3.2. Estructura de las biopelículas	59
3.2.1. Factores que influyen en la estructura: biofilms mixtos	59
3.2.2. Heterogeneidad fisiológica y fenotípica.....	60
3.3. Comunicación intra-biofilm.....	61
3.3.1. <i>Quorum Sensing</i>	61
3.3.2. Capacidad adaptativa (estado viable no cultivable).....	62
3.4. Estudio de los biofilms mediante técnicas de microscopía.....	63
4. SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS COMÚNMENTE UTILIZADAS EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS	64
4.1. Biocidas	64
4.1.1. Uso de biocidas en las industrias alimentarias	64
4.1.2. Biocidas comúnmente utilizados para la limpieza y desinfección de superficies	65
4.1.2.1. <i>Hipoclorito de sodio (HS)</i>	65
4.1.2.2. <i>Cloruro de benzalconio (CB)</i>	67
4.1.2.3. <i>Ácido peracético (AP)</i>	67
4.1.3. Adaptación de las bacterias a los biocidas	68
4.2. Antibióticos	72
4.2.1. Mecanismos de resistencia a antibióticos	74
4.2.2. Presencia de bacterias resistentes a antibióticos en la cadena de producción	

de alimentos.....	76
4.2.3. Técnicas rápidas para determinar la susceptibilidad a antibióticos	77
4.3. Aditivos alimentarios	78
4.3.1. Nitrito sódico	78
4.3.2. Nisina	79
4.3.3. Ácido láctico	80
4.4. Alternativas al uso de sustancias químicas	81
4.4.1. Bacteriófagos como agentes desinfectantes	81
4.4.2. Materiales y recubrimientos	83
5. EL ENFOQUE UNA SALUD (ONE HEALTH).....	86
OBJETIVOS.....	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
CAPÍTULOS	107
CAPÍTULO I. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de 12 antimicrobianos (biocidas y antibióticos) en 8 cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>.....	109
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	111
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	114
2.1. Cepas y condiciones de cultivo	114
2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).....	114
2.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (MBC)	115
2.4. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular (CHS)	115
2.5. Análisis estadístico	116
3. RESULTADOS.....	117
3.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de biocidas	117
3.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de antibióticos.....	118
3.3. Relación entre las MICs y las MBCs de los biocidas y antibióticos	121
3.4. Hidrofobicidad de la superficie celular.....	121
4. DISCUSIÓN.....	126
4.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de biocidas	126
4.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de antibióticos.....	128
4.3. Relación entre las MICs y las MBCs de los biocidas y antibióticos	130
4.4. Hidrofobicidad de la superficie celular.....	130
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
CAPÍTULO II: Efecto de dosis bajas de biocidas sobre la susceptibilidad de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enterica</i> a varios antibióticos de importancia clínica	143
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	145
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	147
2.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo	147
2.2. Desinfectantes	147

2.3.	Cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias	147
2.4.	Adaptación de las cepas a los biocidas utilizados.....	148
2.5.	Pruebas de sensibilidad a antibióticos	149
2.6.	Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular (CHS).....	149
2.7.	Análisis estadístico	150
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	151
3.1.	Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y adaptación	151
3.2.	Susceptibilidad a antibióticos.....	153
3.3.	Hidrofobicidad de la superficie celular	157
4.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	162
CAPÍTULO III. Susceptibilidad a biocidas de uso alimentario en bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas. Efecto de dosis subinhibitorias de los biocidas sobre la resistencia a antibióticos		
167		
1.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	169
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	172
2.1.	Cepas utilizadas y condiciones de cultivo	172
2.2.	Desinfectantes.....	172
2.3.	Cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs).....	172
2.4.	Cálculo de las concentraciones mínimas bactericidas (MBCs)	173
2.5.	Pruebas de sensibilidad a antibióticos	173
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	175
3.1.	Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y concentraciones mínimas bactericidas (MBCs) de los biocidas.....	175
3.2.	Susceptibilidad a antibióticos.....	176
4.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	182
CAPÍTULO IV. Efecto de la exposición a dosis bajas de biocidas sobre la adaptación cruzada a otros biocidas y la resistencia a antibióticos en cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>.....		
189		
1.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	191
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	194
2.1.	Cepas utilizadas y condiciones de cultivo	194
2.2.	Desinfectantes.....	194
2.3.	Cálculo de la concentración mínima inhibitoria (MIC)	194
2.4.	Cálculo de la concentración mínima bactericida (MBC).....	195
2.5.	Adaptación de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> a los biocidas.....	195
2.6.	Cálculo de las MIC de las cepas adaptadas a biocidas	196
2.7.	Cálculo de las MBC de las cepas adaptadas a biocidas	196
2.8.	Pruebas de susceptibilidad a antibióticos	197
3.	RESULTADOS.....	198
3.1.	Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de las cepas de <i>L. monocytogenes</i>	198
3.2.	Pruebas de susceptibilidad a antibióticos	205
4.	DISCUSIÓN.....	208
4.1.	Determinación de la MIC y MBC antes y después de la adaptación de <i>L. monocytogenes</i>	208

4.2. Resistencia a antibióticos	208
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	211
CAPÍTULO V. Estimación por citometría de flujo de los porcentajes de supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> tras el tratamiento con tetraciclina en células previamente expuestas o no expuestas a diferentes biocidas	215
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	217
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	220
2.1. Cepa y desinfectantes	220
2.2. Cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs).....	220
2.3. Exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas.....	220
2.4. Exposición a la tetraciclina.....	221
2.5. Tinción de las muestras	221
2.6. Visualización y cuantificación por citometría de flujo.....	222
2.7. Análisis estadístico	223
3. RESULTADOS.....	224
3.1. Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y adaptación a concentraciones crecientes de los biocidas	224
3.2. Porcentajes de supervivencia a la tetraciclina de las células previamente expuestas y no expuestas a los biocidas	224
4. DISCUSIÓN.....	235
4.1. Adaptación de <i>L. monocytogenes</i> a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas	235
4.2. Porcentajes de supervivencia a la tetraciclina de las células previamente expuestas y no expuestas a los biocidas.....	236
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	241
CAPÍTULO VI. Cuantificación de células totales y viables y determinación de patrones de resistencia a antibióticos de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne de ave ..	247
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	249
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	252
2.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo	252
2.2. Recuentos microbianos indicadores de calidad higiénica	252
2.3. Aislamiento e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	253
2.4. Detección y cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> por q-PCR.....	254
2.5. Pruebas de sensibilidad a antibióticos	257
2.6. Análisis estadístico	258
3. RESULTADOS.....	259
3.1. Niveles de microorganismos indicadores de calidad higiénica.....	259
3.2. Prevalencia y niveles de <i>L. monocytogenes</i>	260
3.3. Susceptibilidad a antibióticos de <i>L. monocytogenes</i>	263
4. DISCUSIÓN.....	268
4.1. Niveles de microorganismos indicadores de calidad higiénica.....	268
4.2. Prevalencia y niveles de <i>Listeria monocytogenes</i>	270
4.3. Susceptibilidad a antibióticos	273
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	276

CAPÍTULO VII. Efecto de diferentes aditivos alimentarios sobre la prevalencia y los perfiles de resistencia a antibióticos de <i>Listeria monocytogenes</i> presente de forma natural en carne de pollo.....	285
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	287
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	290
2.1. Toma de muestras.....	290
2.2. Procesado de las muestras	290
2.3. Determinaciones microbiológicas	290
2.4. Identificación de las presuntas cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> aisladas	291
2.5. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos	293
2.6. Análisis estadístico	293
3. RESULTADOS.....	294
3.1. Recuentos microbianos	294
3.2. Prevalencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	294
3.3. Susceptibilidad a antibióticos.....	296
4. DISCUSIÓN.....	304
4.1. Recuentos microbianos	304
4.2. Prevalencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	305
4.3. Susceptibilidad a antibióticos.....	306
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	308
CAPÍTULO VIII. Estructura y viabilidad de las biopelículas formadas durante 24 y 72 h por cuatro bacterias patógenas en superficies de contacto de poliestireno y vidrio.....	319
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	321
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	323
2.1. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano	323
2.2. Formación de biopelículas y análisis de imágenes	323
2.3. Análisis estadístico	324
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	326
3.1. Arquitectura y parámetros estructurales de las biopelículas	326
3.2. Viabilidad celular de biopelículas	331
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	333
CAPÍTULO IX. Arquitectura y viabilidad de las biopelículas formadas por nueve cepas de <i>Listeria</i> en varios materiales hidrofóbicos e hidrofílicos.....	337
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	339
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	342
2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	342
2.2. Formación de biopelículas	342
2.3. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular.....	344
2.4. Análisis estadístico	344
3. RESULTADOS.....	345
3.1. Determinación de las biopelículas	345
3.2. Hidrofobicidad de la superficie celular	348
4. DISCUSIÓN.....	350
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	353

CAPÍTULO X. Biovolumen y distribución espacial de bacterias patógenas Gram-negativas y Gram-positivas transmitidas por alimentos en biofilms mono especie y mixtos	359
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	361
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	364
2.1. Cepas bacterianas.....	364
2.2. Formación de biopelículas	364
2.3. Estudio de las biopelículas	365
2.4. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular (CSH).....	366
2.5. Análisis estadístico	366
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	367
3.1. Biopelículas mono especie	367
3.2. Biopelículas de dos especies.....	368
3.3. Distribución espacial de las bacterias en la biopelícula.....	374
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	379
CAPÍTULO XI. Susceptibilidad de cultivos planctónicos y biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i> a hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio	387
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	389
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	391
2.1. Cepas de <i>L. monocytogenes</i> y condiciones de cultivo	391
2.2. Biocidas	391
2.3. Determinación de MIC y MBC.....	391
2.4. Formación de biofilms.....	392
2.5. Tratamiento de biopelículas.....	392
2.6. Análisis de imagen.....	393
2.7. Análisis estadístico	394
3. RESULTADOS.....	395
3.1. Susceptibilidad de los cultivos planctónicos a HS y CB	395
3.2. Capacidad de <i>L. monocytogenes</i> para formar biopelículas	395
3.3. Efecto del hipoclorito sódico y del cloruro de benzalconio sobre los parámetros estructurales y la viabilidad de las biopelículas formadas por <i>L. monocytogenes</i>	400
4. DISCUSIÓN.....	403
4.1. Susceptibilidad de los cultivos planctónicos a hipoclorito sódico y cloruro de benzalconio	403
4.2. Capacidad de <i>L. monocytogenes</i> para formar biopelículas.....	404
4.3. Efecto del hipoclorito sódico y del cloruro de benzalconio sobre los parámetros estructurales y la viabilidad de los biofilms formados por <i>L. monocytogenes</i>	405
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	407
CAPÍTULO XII. Efecto de dosis bajas de desinfectantes sobre la capacidad de formación de biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i>	411
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	413
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	415
2.1. Cepas bacterianas.....	415

2.2.	Desinfectantes.....	415
2.3.	Determinación de las MIC.....	415
2.4.	Formación y análisis de los biofilms.....	416
2.5.	Análisis estadístico	417
3.	RESULTADOS.....	418
3.1.	Efecto de los desinfectantes usados a 0,5MIC	418
3.2.	Efecto de los desinfectantes usados a 1MIC o 1,5MIC	419
4.	DISCUSIÓN.....	422
4.1.	Efecto de los desinfectantes a concentraciones inferiores a la MIC	422
4.2.	Efecto de los desinfectantes a concentraciones de 1MIC o 1,5MIC.....	424
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	425
CAPÍTULO XIII. Efecto del bacteriófago P100 a diferentes concentraciones sobre los parámetros estructurales de las biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i>.....		429
1.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	431
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	433
2.1.	Cepa de <i>L. monocytogenes</i> y preparación de los bacteriófagos	433
2.2.	Formación de biofilm, tratamiento y análisis de imagen.....	433
2.3.	Análisis estadístico	434
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	435
4.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	441
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....		445
ANEXO I: PUBLICACIONES		455

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Panorama de la producción mundial de carne (Fuente: FAO, 2020b).....	36
Tabla 2. Resultados de análisis de alimentos por agente zoonótico en 2019 (Fuente: adaptado de AESAN, 2021b).....	48
Tabla 3. Actividad antimicrobiana de algunos desinfectantes (Fuente: Moreno García, 2006)	65
Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de varios grupos de desinfectantes utilizados en las industrias alimentarias (Fuente: Moreno García, 2006).....	66
Tabla 5. Variables que influyen en la fijación celular y la formación de biopelículas (Fuente: adaptada de Donlan, 2002).....	84
Tabla I.1. Especies del género <i>Listeria</i> (Fuente: adaptado de Nwaiwu, 2020).....	112
Tabla I.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) y concentración mínima bactericida (MBC, ppm) de tres biocidas en ocho cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	117
Tabla I.3. Concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) y concentración mínima bactericida (MBC, ppm) para nueve antibióticos de interés clínico en ocho cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	119
Tabla I.4. Coeficientes de correlación entre los valores MIC (concentración mínima inhibitoria) de 12 biocidas y antibióticos en ocho cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> ...	123
Tabla I.5. Coeficientes de correlación entre los valores MBC (concentración mínima bactericida) de 12 biocidas y antibióticos en ocho cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	124
Tabla I.6. Coeficientes de correlación entre los valores de MIC (concentración mínima inhibitoria) y MBC (concentración mínima bactericida) de 12 antimicrobianos en ocho cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	125
Tabla I.7. Coeficientes de correlación entre los valores de hidrofobicidad y MIC (concentración mínima inhibitoria) o MBC (concentración mínima bactericida) de 12 biocidas y antibióticos en ocho cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	125
Tabla II.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración máxima de biocida que permite el crecimiento microbiano después de la adaptación de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i>	151
Tabla II.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) de 10 antibióticos en cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> expuestas y no expuestas a dosis bajas de biocidas	154
Tabla II.3. Concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) de 10 antibióticos en cepas de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Agona expuestas y no expuestas a dosis bajas de biocidas	156
Tabla III.1. Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) y concentración mínima bactericida (MBC, ppm) de cuatro biocidas en las diferentes cepas de microorganismos patógenos estudiados	175

Tabla III.2. Patrones de resistencia a antibióticos en diferentes cepas control o previamente expuestas a dosis bajas de biocidas.....	178
Tabla IV.1. Valores de MIC (concentración mínima inhibitoria, ppm), de MBC (concentración mínima bactericida, ppm) y de concentración máxima que permitió el crecimiento microbiano tras la adaptación de las cepas de <i>L. monocytogenes</i>	198
Tabla IV.2. Valores de MIC (concentración mínima inhibitoria, ppm) y MBC (concentración mínima bactericida, ppm) de hipoclorito sódico (HS) en cepas de <i>L. monocytogenes</i> previamente adaptadas a diferentes biocidas	199
Tabla IV.3. Valores de MIC (concentración mínima inhibitoria, ppm) y MBC (concentración mínima bactericida, ppm) de ácido peracético (AP) en cepas de <i>L. monocytogenes</i> previamente adaptadas a diferentes biocidas	201
Tabla IV.4. Valores de MIC (concentración mínima inhibitoria, ppm) y MBC (concentración mínima bactericida, ppm) de cloruro de benzalconio (CB) en cepas de <i>L. monocytogenes</i> previamente adaptadas a diferentes biocidas.....	203
Tabla IV.5. Patrones de resistencia a antibióticos en cepas de <i>L. monocytogenes</i> de diferentes serotipos.....	206
Tabla V.1. Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y concentraciones máximas de biocidas que permitieron el crecimiento microbiano tras la adaptación para <i>L. monocytogenes</i> NCTC 11994	224
Tabla V.2. Porcentaje (%) de células supervivientes tras el tratamiento con tetraciclina (se ensayaron diferentes concentraciones y tiempos de exposición) en cepas de <i>L. monocytogenes</i> previamente expuestas y no expuestas (control) a concentraciones subinhibitorias de biocidas	234
Tabla VI.1. Medios de cultivo, condiciones de incubación y referencias para cada grupo microbiano estudiado	252
Tabla VI.2. Genes y cebadores utilizados para la identificación por PCR de los aislamientos de <i>Listeria monocytogenes</i>	253
Tabla VI.3. Recuentos microbianos (\log_{10} ufc/g) obtenidos en muestras de carne picada de pollo procedentes de España y de Portugal	259
Tabla VI.4. Resultados transformados de la cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> en muestras de carne picada de pollo por q-PCR.....	262
Tabla VI.5. Patrones de resistencia a los antibióticos mostrados por 70 aislamientos de <i>Listeria monocytogenes</i> de muestras de carne de pollo picada de origen español y portugués.....	265
Tabla VII.1. Medios de cultivo utilizados, temperaturas y tiempos de incubación empleados	291
Tabla VII.2. Genes y cebadores utilizados para identificar las presuntas cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR.....	292
Tabla VII.3. Recuentos microbianos (\log_{10} ufc/g) obtenidos en muestras de carne picada no tratadas y tratadas con diferentes aditivos	294

Tabla VII.4. Patrones de resistencia a antibióticos de <i>L. monocytogenes</i> en carne de pollo picada de origen español y portugués	302
Tabla IX.1. Tinciones y parámetros del microscopio láser confocal de barrido utilizados en el estudio de las biopelículas de <i>Listeria</i> spp.....	343
Tabla X.1. Biovolumen en el campo de observación de 14.161 μm^2 de biopelículas de una y dos especies de bacterias patógenas formadas sobre poliestireno durante 240 horas de incubación a 10 °C	370
Tabla XI.1. Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) y concentración mínima bactericida (MBC, ppm) de hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio para cuatro cepas de <i>L. monocytogenes</i>	395
Tabla XI.2. Valores de biovolumen (μm^3) en el campo de observación (14.161 μm^2) obtenidos para las biopelículas de cuatro cepas de <i>L. monocytogenes</i> después de la exposición durante 10 minutos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio o cloruro de benzalconio.....	398
Tabla XI.3. Valores de porcentaje de superficie cubierta (%) en el campo de observación (14.161 μm^2) obtenidos para las biopelículas de cuatro cepas de <i>L. monocytogenes</i> después de la exposición durante 10 minutos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio o cloruro de benzalconio.....	398
Tabla XI.4. Valores de altura máxima (μm) obtenidos para las biopelículas de cuatro cepas de <i>L. monocytogenes</i> después de la exposición durante 10 minutos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio o cloruro de benzalconio.....	399
Tabla XI.5. Valores de rugosidad obtenidos para las biopelículas de cuatro cepas de <i>L. monocytogenes</i> después de la exposición durante 10 minutos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio o cloruro de benzalconio	399

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Consumo mundial de carne de pollo expresado en miles de toneladas (Fuente: MAPA, 2021b).....	36
Figura 2. Producción bruta de carne de ave en diferentes países de la Unión Europea (Fuente: MAPA, 2020b)	37
Figura 3. Evolución del comercio exterior en el sector de la carne de ave en la UE (Fuente: MAPA, 2020b)	38
Figura 4. Evolución de las exportaciones de carne de ave realizadas por diferentes países de la Unión Europea (Fuente: MAPA, 2020b).....	38
Figura 5. Evolución de las importaciones de carne de ave realizadas por diferentes países de la Unión Europea (Fuente: MAPA, 2020b).....	39
Figura 6. Producción de carne de ave en España y Portugal (Fuente: MAPA, 2020b).....	40
Figura 7. Consumo de carne de ave en España y Portugal (Fuente: Instituto Nacional de Estadística-INE-, 2020a, b)	40
Figura 8. Subregiones y mortalidad asociada (Fuente: WHO, 2019).....	43
Figura 9. Carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria por subregiones (DALYs por cada 100.000 habitantes) causada por peligros entéricos en 2010 (Fuente: adaptada de WHO, 2019).....	45
Figura 10. Número de casos relacionados con brotes de enfermedades de transmisión alimentaria en la UE en los últimos 5 años (Fuente: datos de EFSA, 2021).....	46
Figura 11. Casos confirmados de los principales agentes zoonóticos responsables de infecciones alimentarias en diferentes países de la Unión Europea en el año 2019 (Fuente: EFSA, 2021)	47
Figura 12. Etapas de formación de un biofilm bacteriano (Fuente: adaptada de Aumeran <i>et al.</i> , 2020).....	58
Figura 13. Esquema de detección del <i>quorum sensing</i> (QS) y desarrollo de dos tipos de estados bacterianos: células planctónicas (izquierda) y biofilms (derecha) (Fuente: adaptada de Cunningham <i>et al.</i> , 2008)	62
Figura 14. Bomba de expulsión de compuestos antimicrobianos (Fuente: adaptada de Blair <i>et al.</i> , 2015).....	70
Figura 15. Bombas de expulsión presentes en las células bacterianas (Fuente: Pardo Hernández, 2014)	72
Figura 16. Cronología de la evolución de los antibióticos (Fuente: adaptada de Hutchings <i>et al.</i> , 2019)	73
Figura 17. Objetivos del antibiótico (sitios diana) y mecanismos de resistencia (Fuente: Buzón-Durán, 2017).....	75
Figura 18. Esquema propuesto para la evaluación de la resistencia a antibióticos en bacterias adicionadas a los alimentos y los piensos (Fuente: Capita González, 2013)	77

Figura 19. Estructura química del nitrito sódico.....	79
Figura 20. Estructura molecular de la nisina.....	80
Figura 21. Estructura molecular del ácido láctico	81
Figura 22. Principales tratamientos basados en fagos para la eliminación de biopelículas (Fuente: adaptada de Ferriol-González y Domingo-Calap, 2020).....	83
Figura 23. Esquema de la adhesión bacteriana y las propiedades del material de contacto (Fuente: adaptada de Song <i>et al.</i> , 2015).....	85
Figura 24. Algunos aspectos del enfoque Una Salud, en relación con las zoonosis y la resistencia a los antibióticos	87
Figura I.1. Porcentaje de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> resistentes (R), intermedias (I, con susceptibilidad reducida) o susceptibles (S) a cada uno de los nueve antibióticos estudiados	120
Figura I.2. Número de antibióticos a los que cada cepa de <i>L. monocytogenes</i> fue resistente, intermedia (con susceptibilidad reducida) o susceptible.....	121
Figura I.3. Valores de hidrofobicidad de la superficie celular (CHS) observados en cultivos de ocho cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	122
Figura II.1. Valores de hidrofobicidad de la superficie celular en células de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> (LM6) control o previamente adaptadas a diferentes compuestos químicos	159
Figura II.2. Valores de hidrofobicidad de la superficie celular en células de <i>S. enterica</i> serotipo Agona (SA) control o previamente adaptadas a diferentes compuestos químicos	160
Figura IV.1. MICs (concentraciones mínimas inhibitorias) y MBCs (concentraciones mínimas bactericidas) de hipoclorito sódico (HS) en cepas patrón de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> no adaptadas (control) o adaptadas a hipoclorito sódico (HS), ácido peracético (AP) o cloruro de benzalconio (CB).....	200
Figura IV.2. MICs (concentraciones mínimas inhibitorias) y MBCs (concentraciones mínimas bactericidas) de ácido peracético (AP) en cepas patrón de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> no adaptadas (control) o adaptadas a hipoclorito sódico (HS), ácido peracético (AP) o cloruro de benzalconio (CB).....	202
Figura IV.3. MICs (concentraciones mínimas inhibitorias) y MBCs (concentraciones mínimas bactericidas) de cloruro de benzalconio (CB) en cepas patrón de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> no adaptadas (control) o adaptadas a hipoclorito sódico (HS), ácido peracético (AP) o cloruro de benzalconio (CB).....	204
Figura V.1. Citogramas de los controles de <i>L. monocytogenes</i> : A, control de células muertas, con un 98,15% de inactivación en la región 2 (R2); B, control de células vivas, con un 98,7% de viabilidad en la región 1 (R1)	225
Figura V.2. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 0 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.....	227

Figura V.3. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 250 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.....	228
Figura V.4. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 500 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.....	229
Figura V.5. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 750 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.....	230
Figura V.6. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 1.000 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.....	231
Figura V.7. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 1.250 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.....	232
Figura V.8. Porcentaje de supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> (LM) adaptada a cloruro de benzalconio (CB), hipoclorito sódico (HS), ácido peracético (AP), o no adaptada (control) tras la exposición a diferentes concentraciones de tetraciclina (TE, ppm) durante 24 h, 48 h o 72 h a 30 °C	233
Figura VI.1. Recta patrón, realizada con concentraciones conocidas de ADN de <i>Listeria monocytogenes</i> (abscisas) y número de ciclos (q-PCR) correspondiente a cada una de esas concentraciones (ordenadas)	256
Figura VI.2. Definición y cálculo de la sensibilidad, especificidad, eficiencia, valor predictivo y coeficiente <i>kappa</i> de la q-PCR para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne picada de pollo	257
Figura VI.3. Gráfica de amplificación de muestras de <i>L. monocytogenes</i> por q-PCR. Se incluyen las 20 muestras de carne picada de pollo, un control negativo y el valor de fluorescencia umbral	260
Figura VI.4. Porcentajes de pruebas resistentes, con susceptibilidad reducida o susceptibles en las cepas de <i>L. monocytogenes</i> de España y Portugal.....	263
Figura VI.5. Porcentaje de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> aisladas de carne picada de pollo resistentes, con susceptibilidad reducida o susceptibles a cada uno de los antibióticos ensayados. Gráfica superior, cepas de origen español; gráfica inferior, cepas de origen portugués.....	267

Figura VII.1. Geles de electroforesis que muestran las bandas de amplificación del gen <i>lmo1030</i> (509 pb) en cepas de <i>L. monocytogenes</i>	295
Figura VII.2. Porcentajes medios de resistencia, susceptibilidad reducida (intermedia) o susceptibilidad en cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de muestras de carne picada española (A) y portuguesa (B) en función del tratamiento recibido. NS, nitrito sódico; NI, nisina; AL, ácido láctico	296
Figura VII.3. Porcentajes medios de susceptibilidad a cada antibiótico ensayado en cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de muestras de carne de pollo picada de origen español tratadas con aditivos y no tratadas.....	298
Figura VII.4. Porcentajes medios de susceptibilidad a cada antibiótico ensayado en cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de muestras de carne de pollo picada de origen portugués tratadas con aditivos y no tratadas	300
Figura VIII.1. Biovolumen de las biopelículas formadas por <i>Salmonella</i> Hadar (SH174), <i>Listeria monocytogenes</i> (LM6), <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina (MRSA125) y <i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina (VRE61s) sobre superficies de poliestireno y vidrio a las 24 h y a las 72 h de incubación a 37 °C.....	326
Figura VIII.2. Porcentaje de superficie cubierta, altura máxima y rugosidad de las biopelículas formadas por <i>Salmonella</i> Hadar (SH174), <i>Listeria monocytogenes</i> (LM6), <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina (MRSA125) y <i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina (VRE61s) en superficies de poliestireno y vidrio tras 24 h y 72 h de incubación a 37 °C.....	329
Figura IX.1. Proyecciones tridimensionales de las estructuras de biopelículas formadas por nueve cepas de <i>Listeria</i> spp. en cuatro materiales (vidrio, poliestireno, revestimiento monocapa de grafeno y revestimiento de resina epoxi).....	346
Figura IX.2. Diagramas de cajas y bigotes que muestran la distribución de los valores de biovolumen observados para ocho cepas de colección de <i>L. monocytogenes</i> (LM) y una cepa de <i>L. ivanovii</i> (LI)	347
Figura IX.3. Valores de hidrofobicidad de la superficie celular observados para cultivos de ocho cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> (LM) y una cepa de <i>Listeria ivanovii</i> (LI)...	349
Figura X.1. Biovolumen en el campo de observación de 14.161 μm^2 de las biopelículas monoespecie formadas por bacterias patógenas sobre poliestireno durante 240 horas de incubación a 10 °C	367
Figura X.2. Biovolumen en el campo de observación de 14.161 μm^2 de biopelículas de dos especies formadas por bacterias patógenas sobre poliestireno durante 240 horas de incubación a 10 °C	371
Figura X.3. Biovolumen en el campo de observación de 14.161 μm^2 de biopelículas formadas por cuatro bacterias patógenas sobre poliestireno durante 240 horas de incubación a 10 °C	372
Figura X.4. Proyecciones tridimensionales de estructuras de las biopelículas de una y dos especies formadas por cuatro bacterias patógenas sobre poliestireno. Las biopelículas se estudiaron a lo largo de 240 horas de incubación a 10 °C	375
Figura X.5. Proyecciones tridimensionales de un biofilm mixto formado por <i>Salmonella</i> Agona (teñida de azul con colorante DAPI) y <i>Enterococcus faecium</i> resistente a	

vancomicina (VRE, teñido de rojo con colorante Texas Red®-X) tras 120 horas de incubación a 10 °C. La imagen se obtuvo mediante microscopía laser confocal de barrido (CLSM) y se reconstruyó utilizando el software IMARIS.	376
Figura XI.1. Proyecciones tridimensionales de las estructuras de las biopelículas formadas por cuatro aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> después del tratamiento durante 10 minutos con hipoclorito de sodio (HS) o cloruro de benzalconio (CB) a diferentes concentraciones. Las imágenes (119 × 119 µm), obtenidas por microscopía laser confocal de barrido, se reconstruyeron utilizando el software IMARIS, con las proyecciones de sombra a la derecha.	397
Figura XI.2. Porcentaje de células vivas en las biopelículas de cuatro cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> antes del tratamiento (control) o después del tratamiento durante 10 minutos con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (HS) o cloruro de benzalconio (CB)	401
Figura XI.3. Biovolumen de células vivas en las biopelículas de cuatro cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> antes del tratamiento (control) o después del tratamiento durante 10 minutos con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (HS) o cloruro de benzalconio (CB)	402
Figura XII.1. Biovolumen en el campo de observación (14.161 µm ²) de biopelículas de 24 h formadas por cuatro cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> del serotipo molecular 1/2a (S2-1, S2-2, CDL 69 y S2 ^{BAC}) en ausencia de desinfectantes (control) o en presencia de HS o CB a 0,5MIC, 1MIC o 1,5MIC.....	420
Figura XII.2. Porcentaje de superficie cubierta, espesor máximo y rugosidad de biopelículas de 24 h formadas por cuatro cepas de <i>L. monocytogenes</i> de serotipo molecular 1/2a (S2-1, S2-2, CDL 69 y S2 ^{BAC}) en ausencia de desinfectantes (control) o en presencia de HS o CB a 0,5MIC, 1MIC o 1,5MIC.....	421
Figura XIII.1. Biovolumen de biopelículas de 24 h de maduración formadas por <i>Listeria monocytogenes</i> en poliestireno y expuestas durante 24 h más a varias concentraciones del bacteriófago P100 o de tampón fosfato salino (PBS; control)	436
Figura XIII.2. Porcentaje de superficie cubierta, rugosidad, altura máxima y altura media de biopelículas de 24 h de maduración formadas sobre poliestireno por <i>Listeria monocytogenes</i> , después de la exposición durante 24 horas adicionales a diversas concentraciones de bacteriófago P100 o PBS (control)	438

RESUMEN / ABSTRACT

RESUMEN

CAPÍTULO I

A la hora de seleccionar dosis efectivas de antimicrobianos, ya sean biocidas o antibióticos, es esencial conocer las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y las concentraciones mínimas bactericidas (MBCs) de dichas sustancias. En este trabajo de investigación se determinaron las MICs y las MBCs de tres biocidas, hipoclorito sódico (HS), cloruro de benzalconio (CB) y ácido peracético (AP), y nueve antibióticos en ocho cepas de *Listeria monocytogenes* de varios serotipos. Se observaron importantes diferencias intraespecíficas por lo que respecta a la resistencia de esta bacteria a los biocidas y antibióticos. Las MICs (ppm) de los biocidas oscilaron entre 1.750 y 4.500 en el caso del HS, entre 0,25 y 20,00 para el CB, y entre 1.050 y 1.700 para el AP. Las MBCs (ppm) oscilaron entre 2.250 y 4.500 para el HS, 0,50 y 20,00 para el CB, y 1.150 y 1.800 para el AP. Las MICs (ppm) de los antibióticos oscilaron entre 1 y 15 para la ampicilina, 8 y 150 para la cefalotina, 20 y 170 para la cefoxitina, 0,05 y 0,20 para la eritromicina, 4 y 50 para el cloranfenicol, 3 y 100 para la gentamicina, 2 y 15 para la tetraciclina, 2 y 80 para la vancomicina, y 160 y 430 para la fosfomicina. Las correspondientes MBCs (ppm) estuvieron en el rango de 5 a 20 para la ampicilina, 9 a 160 para la cefalotina, 70 a 200 para la cefoxitina, 4 a 5 para la eritromicina, 9 a 70 para el cloranfenicol, 5 a 100 para la gentamicina, 3 a 30 para la tetraciclina, 3 a 90 para la vancomicina, y 160 a 450 para la fosfomicina. Hay que señalar que la eritromicina presentó una eficacia considerable, demostrada por los bajos valores observados tanto para la MIC como para la MBC. En base a los criterios EUCAST y CLSI, todas las cepas fueron susceptibles a la eritromicina. El 100% de las cepas fueron resistentes a la cefalotina, la cefoxitina, la gentamicina y la fosfomicina. Otros porcentajes de resistencia fueron 87,50% para la ampicilina y la vancomicina, 75,00% para la tetraciclina y 62,50% para el cloranfenicol. Esta elevada prevalencia de resistencia a antibióticos es un hallazgo preocupante. Se encontró una correlación positiva entre la MIC y la MBC para la mayoría de los biocidas y antibióticos. A mayor hidrofobicidad de la superficie celular, mayor susceptibilidad a los biocidas, hecho que sugiere que las características de las cubiertas celulares influyen en la resistencia a estos compuestos.

CAPÍTULO II

El uso de biocidas a concentraciones subinhibitorias en los entornos de procesamiento de alimentos requiere especial atención, por estar relacionado con un potencial aumento

de la resistencia a los antibióticos. En este estudio se determinó el efecto de la exposición a dosis bajas de cuatro desinfectantes (hipoclorito sódico, HS; cloruro de benzalconio, CB; ácido peracético, AP; fosfato trisódico, FTS) en la resistencia a 10 antibióticos y en la hidrofobicidad de la superficie celular de una cepa de *Listeria monocytogenes* serotipo 1/2a (LM) y una cepa de *Salmonella enterica* serotipo Agona (SA), ambas de origen cárnico. Los cultivos se expusieron a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas, comenzando por la mitad de la concentración mínima inhibitoria (MIC/2) e incrementando 1,5 veces la concentración hasta que dejó de observarse crecimiento, calculándose las MIC de los antibióticos antes (cultivos control) y después de la exposición a los biocidas. Por lo que respecta a LM, los cultivos expuestos presentaron, respecto a los cultivos control, un incremento de la resistencia (paso de susceptibilidad a susceptibilidad reducida, de susceptibilidad a resistencia o de susceptibilidad reducida a resistencia) a la eritromicina (cepas expuestas a CB, AP y FTS), el cloranfenicol (todos los compuestos), la tetraciclina (CB) y la fosfomicina (todos los compuestos). Por su parte, tras la exposición, SA vio incrementada su resistencia a la gentamicina (todos los compuestos) y la enrofloxacin (CB, AP y FTS). La hidrofobicidad de la superficie celular aumentó (LM expuesta a AP y FTS; SA expuesta a CB) o disminuyó (SA expuesta a AP) tras el contacto con los biocidas. Estos hallazgos sugieren que el empleo de biocidas a concentraciones subinhibitorias puede contribuir al aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos, a la vez que modifica la hidrofobicidad de la superficie celular, aspecto que se encuentra relacionado con la capacidad de las bacterias para formar biofilm.

CAPÍTULO III

Los biocidas (aditivos, descontaminantes y desinfectantes) son compuestos muy utilizados a lo largo de la cadena de producción de alimentos para el control de los microorganismos patógenos y alterantes. Por otro lado, la presencia en los alimentos de bacterias resistentes a los antibióticos es un problema de Salud Pública, de importancia creciente, debido a la posibilidad de infección por ingestión o contacto. El objetivo de este estudio ha sido determinar el efecto de concentraciones subinhibitorias de cuatro biocidas (hipoclorito sódico, HS; cloruro de benzalconio, CB; ácido peracético, AP; ácido láctico, AL) en la resistencia a 30 antibióticos de cuatro cepas de microorganismos patógenos de origen cárnico (*Listeria monocytogenes*, LM; *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, MRSA; *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina, VRE; *Salmonella enterica* serotipo Hadar, SH). Antes de la exposición a los biocidas, las cepas presentaron resistencia a 19 (LM), 24 (MRSA), 16 (VRE) y 11 (SH) antibióticos diferentes. Este elevado

número de resistencias es preocupante en el contexto de la Salud Pública y la Seguridad Alimentaria. El efecto de la exposición a los biocidas en la reducción de la susceptibilidad a los antibióticos estuvo relacionado con la cepa (MRSA y VRE fueron las que sufrieron mayores modificaciones), el biocida (el HS y el AP provocaron el mayor efecto) y la familia de antibióticos, siendo los más afectados los glucopéptidos (destacando vancomicina), los beta-lactámicos (ampicilina-sulbactam), las fluoroquinolonas (ciprofloxacina y moxifloxacina), las cefalosporinas (ceftacídima) y la nitrofurantoína. Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que el empleo de biocidas a concentraciones subinhibitorias podría contribuir a la emergencia de resistencia a antibióticos en diferentes grupos microbianos, hecho preocupante en el contexto de la Salud Pública.

CAPÍTULO IV

El objetivo de esta parte del trabajo fue determinar si la exposición a dosis subinhibitorias de desinfectantes (hipoclorito sódico, cloruro de benzalconio y ácido peracético) provoca un incremento de la tolerancia a dichos compuestos, así como la adaptación cruzada a otros biocidas, en cinco cepas de *Listeria monocytogenes*. Se pretendió, asimismo, comprobar si esta exposición está relacionada con un incremento de la resistencia de las cepas a 30 antibióticos de importancia clínica. Las cepas expuestas presentaron concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y concentraciones mínimas bactericidas (MBCs) más elevadas que las cepas control (no expuestas), para la mayoría de los compuestos, si bien se observaron importantes diferencias entre cepas. Por otro lado, se observó que, tras la exposición, los cultivos pasaron de la categoría de susceptibles (o con susceptibilidad reducida) a resistentes en numerosas ocasiones, especialmente en el caso del HS. Estos hallazgos vienen a confirmar la importancia de evitar la aplicación de concentraciones subletales de desinfectantes, tanto en la Industria Alimentaria como en el Sistema Sanitario.

CAPÍTULO V

En determinadas circunstancias los desinfectantes se emplean a concentraciones subinhibitorias. El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar si el contacto de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 con concentraciones subinhibitorias de tres desinfectantes de amplio uso en los entornos de procesado de alimentos, cloruro de benzalconio (CB), hipoclorito sódico (HS) y ácido peracético (AP), puede provocar la adaptación de la cepa a los biocidas e incrementar su resistencia a la tetraciclina (TE). Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC; ppm) fueron 2,0 (CB), 3.500,0 (HS) y

1.050,0 (AP). Tras su exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas, las concentraciones máximas (ppm) de los compuestos que permitieron el crecimiento de la cepa fueron (ppm) 8,5 (CB), 3.935,5 (HS) y 1.125,0 (AP). Tanto las células control (no expuestas) como las expuestas a dosis bajas de biocidas se expusieron a varias concentraciones de TE (0 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, 1.000 ppm y 1.250 ppm) durante 24, 48 o 72 horas, determinándose los porcentajes de supervivencia mediante citometría de flujo, tras tinción con SYTO9 y yoduro de propidio. Las células previamente expuestas a AP mostraron porcentajes de supervivencia superiores ($P < 0,05$) al resto de células para la mayoría de concentraciones de TE y tiempos de tratamiento ensayados. Estos resultados son preocupantes, ya que la TE se emplea con frecuencia para el tratamiento de la listeriosis, y ponen de manifiesto la importancia de evitar el empleo de desinfectantes a dosis subinhibitorias. Asimismo, los hallazgos de este estudio sugieren que la citometría de flujo es una técnica útil para obtener datos cuantitativos, de manera rápida y sencilla, de la resistencia bacteriana a los antibióticos.

CAPÍTULO VI

Se analizaron 20 muestras de carne picada de pollo adquirida en diferentes carnicerías de León (España; 10 muestras) y Vila Real (Portugal; 10 muestras). Se encontraron niveles microbianos (\log_{10} ufc/g) de $7,53 \pm 1,02$ (microbiota aerobia viable), $7,13 \pm 1,07$ (microorganismos psicrotrofos) y $4,23 \pm 0,88$ (enterobacterias). Se observaron diferencias entre países ($P < 0,05$) únicamente en el caso de los microorganismos psicrotrofos, con valores de $7,56 \pm 0,86 \log_{10}$ ufc/g (España) y $6,64 \pm 1,10 \log_{10}$ ufc/g (Portugal). El método de detección descrito en la norma UNE-EN ISO 11290-1 (basado en el aislamiento de las colonias a partir del medio selectivo OCLA) con confirmación mediante la reacción en cadena de la polimerasa -PCR- (OCLA-PCR), puso de manifiesto la presencia de *Listeria monocytogenes* en 14 muestras (70% del total), 9 de origen español y 5 de Portugal ($P > 0,05$). Los niveles de células de *L. monocytogenes* viables e inactivadas en las 20 muestras de carne picada estudiadas se determinaron mediante q-PCR, usando propidio monoazida (PMAxx) como marcador de viabilidad. Siete muestras fueron positivas tanto mediante OCLA-PCR como con q-PCR, con concentraciones estimadas de entre 2,15 y 2,94 \log_{10} ufc/g. Tres muestras fueron negativas usando ambos métodos de análisis. Siete muestras resultaron positivas mediante OCLA-PCR, pero negativas con q-PCR, y tres muestras fueron negativas por OCLA-PCR y positivas con q-PCR. El porcentaje de células viables, respecto del total, osciló entre 9,25% y 88,48%. El coeficiente kappa (concordancia entre

ambos métodos, OCLA-PCR y q-PCR) fue de 0,00. Se ensayó la susceptibilidad de 70 aislamientos de *L. monocytogenes* (5 de cada muestra positiva) a 15 antibióticos de interés clínico. Las cepas presentaron resistencia a entre 3 y 8 antibióticos. El número medio de resistencias fue mayor ($P < 0,001$) en las cepas aisladas de muestras adquiridas en España ($6,20 \pm 1,08$), que en las de Portugal ($5,00 \pm 1,08$). En ambos grupos de cepas se observó una prevalencia de resistencia superior al 95% para la oxacilina, la cefoxitina, la cefotaxima y la cefepima. La considerable prevalencia y concentración de *L. monocytogenes* en la carne picada de pollo, junto con las elevadas tasas de resistencia a antibióticos encontrada, sugiere que este alimento constituye un riesgo potencial para los consumidores. La dudosa calidad higiénica y sanitaria de la carne picada de pollo pone de manifiesto la necesidad de seguir unas correctas prácticas higiénicas durante la manipulación de este alimento, para evitar eventos de contaminación cruzada e insuficiente cocinado, y reducir así el riesgo para el consumidor. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que una combinación del método clásico (con aislamiento en medio OCLA e identificación por PCR) y la q-PCR se complementan para la detección en alimentos de células de *L. monocytogenes* en diferentes estados fisiológicos.

CAPÍTULO VII

Se estudió la eficacia antimicrobiana de tres aditivos (nitrito sódico-NS, nisina-NI y ácido láctico-AL) en carne picada de pollo. Los aditivos se aplicaron a concentraciones del 100 ppm (NS), 10 ppm (NI) y 3.000 ppm (AL) durante 24 horas. Los recuentos microbianos oscilaron entre $5,51 \pm 1,05 \log_{10}$ ufc/g (muestras tratadas con AL) y $7,49 \pm 1,05 \log_{10}$ ufc/g (muestras control, no tratadas) en el caso de la microbiota aerobia viable (MAV), entre $5,59 \pm 1,14 \log_{10}$ ufc/g (AL) y $7,12 \pm 1,05 \log_{10}$ ufc/g (control) para los microorganismos psicrotrofos y entre $2,33 \pm 0,51 \log_{10}$ ufc/g (AL) y $4,23 \pm 0,88 \log_{10}$ ufc/g (control) en el caso de las enterobacterias. Únicamente el AL consiguió reducir ($P < 0,05$) los niveles microbianos respecto a las muestras no tratadas. Los tratamientos aplicados influyeron en la prevalencia de *Listeria monocytogenes*, que se detectó en el 70% de las muestras control, en el 60% de las muestras tratadas con NS, en el 65% de las tratadas con NI y en el 50% de las tratadas con AL. Se observó una concordancia del 100% entre el método de detección UNE-EN ISO 11290-1 (basado en la detección de *L. monocytogenes* en medio cromogénico -OCLA-) y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; detección del gen *Imo1030*). En las muestras tratadas se observó, respecto a las muestras control, un incremento en el porcentaje de aislamientos con resistencia a antibióticos.

CAPÍTULO VIII

Se examinaron los biofilms formados por *Salmonella* Hadar (SH174), *Listeria monocytogenes* (LM6), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA125) y *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (VRE61s) en poliestireno y vidrio, al cabo de 24 horas y 72 horas de incubación a 37 °C. Los biofilms se visualizaron mediante microscopía láser confocal de barrido tras tinción con SYTO9 y yoduro de propidio (YP). Se observó un menor biovolumen medio ($P < 0,05$) en el caso de los biofilms de SH174 ($73.073,61 \pm 52.365,90 \mu\text{m}^3$ en el campo de observación de $14.161 \mu\text{m}^2$) que para LM6 ($180.804,50 \pm 32.554,62 \mu\text{m}^3$), MRSA125 ($208.605,34 \pm 57.534,93 \mu\text{m}^3$) y VRE61s ($212.543,91 \pm 39.718,62 \mu\text{m}^3$). SH174 presentó el mayor ($P < 0,05$) biovolumen en vidrio, en comparación con poliestireno. Los biofilms de LM6, MRSA125 y VRE61s presentaron biovolúmenes similares en ambas superficies de contacto. Tras 24 h, SH174 formó pequeños grupos de células dispersas, aumentando ($P < 0,05$) el biovolumen de los biofilms al cabo de 72 h. Por el contrario, LM6, MRSA125 y VRE61s formaron biofilms compactos rápidamente (24 h) en ambas superficies de contacto. Los biofilms de 72 horas presentaron los mayores valores de biovolumen de células muertas o dañadas (teñidas con YP), excepto en el caso de MRSA125 (poliestireno) y VRE61s (poliestireno y vidrio). Los resultados de este trabajo indican que para prevenir la formación de biofilms por bacterias patógenas se requiere una desinfección adecuada de las superficies de contacto con alimentos inmediatamente tras su uso.

CAPÍTULO IX

Los biofilms son un factor clave en la persistencia de *Listeria* en los entornos de procesado de alimentos, representando una fuente potencial de contaminación de los productos. En este trabajo se estudiaron, mediante microscopía láser confocal de barrido, los biofilms de 9 cepas de *Listeria* (8 de *Listeria monocytogenes* y una de *Listeria ivanovii*) formados en vidrio, poliestireno, grafeno y resina tras 120 horas de incubación a 12 °C. Se investigó también la relación entre la hidrofobicidad de la superficie celular y la formación de biofilm. Al comparar los datos de las cepas en su conjunto, el biovolumen fue similar ($P > 0,05$) en vidrio (valores medios de $3,39 \pm 1,69 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) y grafeno ($2,93 \pm 1,14 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), observándose valores mayores ($P < 0,05$) en poliestireno ($4,39 \pm 4,14 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). Los biofilms de mayor ($P < 0,01$) biovolumen se observaron en resina ($7,35 \pm 1,45 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), que también presentaron el menor porcentaje de células inactivadas ($0,38 \pm 0,37 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ vs $1,20 \pm 1,12 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ para el resto de superficies; P

< 0,001). No se observó relación entre la hidrofobicidad de la superficie celular y la capacidad para formar biofilm.

CAPÍTULO X

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar los biofilms formados por *Salmonella enterica* serotipo Agona, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (VRE) tras 12, 48, 72, 120 y 240 h de incubación a 10 °C. Los biofilms con una única especie, junto con los biofilms mixtos en los que se combinó *S. enterica* con una bacteria Gram-positiva, se formaron en poliestireno y se evaluaron por microscopía láser confocal de barrido. Todas las cepas fueron capaces de formar biofilm en las condiciones ensayadas. La mayor biomasa en el campo de observación de 14.161 μm^2 se obtuvo a las 72 h en el caso de los biofilms mono-especie, donde los biovolúmenes fueron de 94.409,0 $\mu\text{m}^3 \pm 2.131,0 \mu\text{m}^3$ (*S. enterica*), 58.418,3 $\mu\text{m}^3 \pm 5.944,9 \mu\text{m}^3$ (*L. monocytogenes*), 68.020,8 $\mu\text{m}^3 \pm 5.812,3 \mu\text{m}^3$ (MRSA) y 59.280,0 $\mu\text{m}^3 \pm 4.032,9 \mu\text{m}^3$ (VRE). En comparación con los biofilms mono-especie, el biovolumen de *S. enterica* fue mayor en presencia de MRSA o VRE al cabo de 48, 72 y 120 h. En los biofilms mixtos, las bacterias presentaron una distribución en dos capas, situándose *S. enterica* en la capa superior y las bacterias Gram-positivas en la inferior. Esta distribución espacial de las bacterias en los biofilms mixtos debería tenerse en cuenta cuando se diseñan estrategias efectivas de desinfección.

CAPÍTULO XI

Se estudió la susceptibilidad de cuatro cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de carne de cerdo al hipoclorito sódico (HS) y al cloruro de benzalconio (CB). Se obtuvieron valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 3.500 ppm (HS), o de entre 3 ppm y 13 ppm (CB). La concentración mínima bactericida (MBC) osciló entre 3.500 ppm y 4.500 ppm (HS), y entre 3 ppm y 14 ppm (CB). Se determinó, por microscopía láser confocal de barrido, tras tinción con colorantes fluorescentes de células vivas (SYTO9) e inactivadas (yoduro de propidio), el efecto del HS y el CB en la arquitectura y viabilidad celular de biofilms de 24 horas formados por dichas cepas en poliestireno. Las cuatro cepas formaron biofilm en las condiciones ensayadas (los valores de biovolumen en el campo de observación de 14.161 μm^2 oscilaron entre 103.928,3 $\pm 6.730,2 \mu\text{m}^3$ y 276.030,9 $\pm 42.291,9 \mu\text{m}^3$). El tratamiento de los biofilms durante 10 minutos con HS (1MIC o 1,5MIC) o CB (0,5MIC, 1MIC o 1,5MIC) redujo el

biovolumen de las células vivas (potencialmente peligrosas). El HS redujo la viabilidad celular de los biofilms en más del 90%. Por otro lado, el CB permitió la eliminación de la mayor parte de la biomasa del biofilm (células vivas e inactivadas), pero redujo la viabilidad celular en un bajo grado, lo que sugiere que este desinfectante provoca un marcado desprendimiento del biofilm y la diseminación de células vivas.

CAPÍTULO XII

Este estudio se realizó para investigar el efecto del contacto, durante el proceso de formación del biofilm (24 horas), con concentraciones próximas a la concentración mínima inhibitoria (MIC; 0,5, 1, y 1,5 MIC; la MIC de las células planctónicas se determinó usando el método de microdilución en caldo) de hipoclorito sódico (HS) y cloruro de benzalconio (CB) sobre la arquitectura y la viabilidad de los biofilms formados por 4 cepas de *Listeria monocytogenes* del serotipo molecular 1/2a. Se ensayaron las cepas S2-1 (susceptible a CB; MIC_{CB} = 3,0 ppm), S2-2 (resistente al CB *qacH* positiva; MIC_{CB} = 13 ppm), CDL 69 (resistente al CB *bcrABC* positiva; MIC_{CB} = 10 ppm), y S2^{BAC} (mutante de laboratorio de la cepa S2-1 resistente al CB, con un fenotipo de multirresistencia; MIC_{CB} = 9 ppm). Las imágenes se examinaron por microscopía láser confocal de barrido tras la tinción con SYTO9 y yoduro de propidio. Los valores de biovolumen en el campo de observación (14.161 μm²) en ausencia de biocidas osciló entre 103.928,3 ± 6.730,2 μm³ (S2^{BAC}) y 276.030,9 ± 42.291,9 μm³ (S2-1). La exposición al HS a 0,5 MIC redujo ($P < 0,05$) el biovolumen de los biofilms formados por S2-1 y S2^{BAC} y no modificó ($P > 0,05$) el biovolumen de los biofilms formados por S2-2 y CDL 69. La exposición a concentraciones sub-MICs de CB redujo ($P < 0,05$; S2-1) o incrementó ($P < 0,05$; S2-2, CDL 69 y S2^{BAC}) el desarrollo de los biofilms. La exposición a los biocidas a concentraciones de 1MIC o 1,5MIC inhibió la formación de biofilm. Este estudio demostró que el CB a sub-MICs puede potenciar la capacidad de formación de biofilm de las cepas de *L. monocytogenes* resistentes al CB. Puesto que los biofilms contribuyen a la persistencia de las bacterias en la cadena de producción de alimentos y representan una fuente importante de contaminación de los alimentos, nuestros hallazgos sugieren la importancia de evitar concentraciones subinhibitorias de desinfectantes en los entornos de procesado de alimentos.

CAPÍTULO XIII

El control y eliminación de *Listeria monocytogenes* es un desafío importante para la Industria Alimentaria, puesto que la listeriosis es la enfermedad transmitida por alimentos asociada a una mayor tasa de letalidad. En este trabajo se utilizaron biofilms de 24 horas de *L. monocytogenes* formados en poliestireno, que se expusieron durante 24 horas adicionales a 12 concentraciones diferentes (de 10^0 a 10^{11} ufp/ml) del bacteriófago P100 (Listex P100). Se estudiaron los parámetros estructurales de los biofilms mediante microscopía láser confocal de barrido y análisis digital de imagen. El biovolumen en el campo de observación ($14.121 \mu\text{m}^2$) de los biofilm control (no tratados) fue de $237.333,1 \pm 2.692,6 \mu\text{m}^3$. La biomasa de los biofilms tratados osciló entre $164,7 \pm 89,0 \mu\text{m}^3$ (biofilms expuestos a 10^{10} ufp/ml) y $231.170,5 \pm 15.142,0 \mu\text{m}^3$ (10^0 ufp/ml). La menor biomasa se obtuvo tras el tratamiento con 10^8 ufp/ml, no obteniéndose reducciones adicionales al incrementar la concentración del fago. Se observó una fuerte correlación ($P < 0,001$) entre la concentración de fagos (unidades logarítmicas) y el biovolumen (- 0,965), porcentaje de superficie cubierta (- 0,939), rugosidad (0,976), altura máxima (- 0,853) y altura media (- 0,965) de los biofilms. Los resultados de este trabajo de investigación sugieren que el bacteriófago P100 a concentraciones iguales o superiores a $8 \log_{10}$ ufp/ml elimina satisfactoriamente los biofilms de *L. monocytogenes* formados en superficies de poliestireno.

ABSTRACT

CHAPTER I

When selecting effective doses of antimicrobials, be they biocides or antibiotics, it is essential to know the minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) of these substances. The present research determined the MICs and MBCs for three biocides, sodium hypochlorite (SHY), benzalkonium chloride (BZK), and peracetic acid (PAA), and nine antibiotics in eight strains of *Listeria monocytogenes* of varying serotypes. Marked intra-species differences were observed in the resistance of *L. monocytogenes* to the biocides and antibiotics. The MICs (ppm) for the biocides ranged between 1,750 and 4,500 for SHY, 0.25 and 20.00 for BZK, and 1,050 and 1,700 for PAA. Their MBCs (ppm) ranged from 2,250 to 4,500 for SHY, 0.50 to 20.00 for BZK, and 1,150 to 1,800 for PAA. The MICs (ppm) for antibiotics lay between 1 and 15 for ampicillin, 8 and 150 for cephalothin, 20 and 170 for cefoxitin, 0.05 and 0.20 for erythromycin, 4 and 50 for chloramphenicol, 3 and 100 for gentamicin, 2 and 15 for tetracycline, 2 and 80 for vancomycin, and 160 and 430 for fosfomycin. The corresponding MBCs (ppm) were from 5 to 20 for ampicillin, 9 to 160 for cephalothin, 70 to 200 for cefoxitin, 4 to 5 for erythromycin, 9 to 70 for chloramphenicol, 5 to 100 for gentamicin, 3 to 30 for tetracycline, 3 to 90 for vancomycin, and 160 to 450 for fosfomycin. Notably, erythromycin showed considerable efficacy, demonstrated by the low values for both MIC and MBC. Based on EUCAST and the CLSI criteria, all strains were susceptible to erythromycin. All strains were resistant to cephalothin, cefoxitin, gentamicin, and fosfomycin. Further values for resistance were 87.50% for ampicillin and vancomycin, 75.00% for tetracycline, and 62.50% for chloramphenicol. The high prevalence of antibiotic resistance is a matter for concern. A positive correlation was found between MIC and MBC values for most of the biocides and antibiotics. The higher the hydrophobicity of the cell surface, the higher the susceptibility to biocides, suggesting that surface characteristics of bacterial cells influence resistance to these compounds.

CHAPTER II

The use of subinhibitory concentrations of biocides in food processing environments requires special attention because it is related to potential increases in antibiotic resistance. In this study, we determine the effect of exposure to low doses of four disinfectants (sodium hypochlorite, SHY; benzalkonium chloride, BZK; peracetic

acid, PAA; trisodium phosphate, TSP) on the resistance to 10 antibiotics and on the hydrophobicity of the cellular surface of a strain of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2b (LM) and a strain of *Salmonella enterica* serotype Agona (SA), both of meat origin. The cultures were exposed to increasing subinhibitory concentrations of the biocides, starting with half the minimum inhibitory concentration (MIC/2) and incrementing by 1.5 times the concentration until growth was no longer observed, calculating the MIC of the antibiotics before (control cultures) and after exposure to the biocides. Regarding LM, the cultures presented increased resistance (from susceptibility to reduced susceptibility, susceptibility to resistance, or reduced susceptibility to resistance) to erythromycin (strains exposed to BZK, PAA and TSP), chloramphenicol (all compounds), tetracycline (BZK) and fosfomicin (all compounds). Regarding SA, after exposure its resistance to gentamicin (all compounds) and enrofloxacin (BZK, PAA and TSP) increased. The cell surface hydrophobicity increased (LM exposed to PAA and TSP; SA exposed to BZK) or decreased (SA exposed to PAA) after contact with the biocides. These findings suggest that the use of biocides at subinhibitory concentrations can contribute to the increase in bacterial resistance to antibiotics, in addition to modifying the hydrophobicity of the cellular surface, which is related to the capacity of bacteria to form biofilm.

CHAPTER III

Biocides (additives, decontaminants and disinfectants) are commonly used compounds throughout the food production chain to control pathogenic and spoilage microorganisms. On the other hand, the presence of antibiotic resistant bacteria in foods is an increasingly worrying public health problem due to the possibility of infection through ingestion or contact. The objective of this study was to determine the effect of subinhibitory concentrations of four biocides (sodium hypochlorite, SHY; benzalkonium chloride, BZK; peracetic acid, PAA; lactic acid, LA) on the resistance to 30 antibiotics in four strains of pathogenic microorganisms of meat origin (*Listeria monocytogenes*, LM; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA; vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, VRE; *Salmonella enterica* serotype Hadar, SHY). Before exposure to the biocides, the strains presented resistance to 19 (LM), 24 (MRSA), 16 (VRE) and 11 (SH) different antibiotics. This high number of resistances is worrying in the context of public health and food safety. The effect of exposure to the biocides in reducing susceptibility to the antibiotics was related to the strain (MRSA and VRE underwent the most modifications), the biocide (HSY and PAA had the greatest effect) and the family of antibiotics, the most affected being glycopeptides (especially vancomycin), beta-lactams (ampicillin-sulbactam), fluoroquinolones (ciprofloxacin and moxifloxacin), cephalosporines

(ceftazidime) and nitrofurantoin. The results of this study show that the use of biocides at subinhibitory concentrations can contribute to the emerging resistance to antibiotics in different microbial groups, which is a huge concern in the context of public health.

CHAPTER IV

The objective of this part of the study was to determine if exposure to subinhibitory doses of disinfectants (sodium hypochlorite, benzalkonium chloride and peracetic acid) causes an increase in tolerance to these compounds and cross-adaptation to other biocides in five strains of *Listeria monocytogenes*. A further aim was to test whether this exposure is related to an increase in resistance of the strains to 30 clinically important antibiotics. The exposed strains presented higher minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericide concentrations (MBCs) than the control strains (not exposed) for most of the compounds, with important differences observed between strains. Furthermore, it was observed that after exposure the cultures frequently passed from the susceptible category (or the reduced susceptibility category) to the resistant category, especially in the case of sodium hypochlorite. These findings confirm the importance of avoiding applying sublethal concentrations of disinfectants in both the food industry and the health system.

CHAPTER V

In certain circumstances, disinfectants are used at sublethal concentrations. The aim of this research work was to determine whether contact of *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 with subinhibitory concentrations of three disinfectants widely used in food processing environments, benzalkonium chloride (BZK), sodium hypochlorite (SHY) and peracetic acid (PAA), can cause the adaptation of the strain to the biocides and increase its resistance to tetracycline (TE). The minimum inhibitory concentrations (MIC; ppm) were 2.0 (BZK), 3,500.0 (SHY) and 1,050.0 (PAA). On exposure to increasing subinhibitory concentrations of the biocides, the maximum concentrations (ppm) of the compounds that allowed the strain to grow were (ppm) 8.5 (BZK), 3,935.5 (SHY) and 1,125.0 (PAA). Both the control cells (non-exposed) and the cells that had been in contact with low doses of biocides were exposed to different concentrations of TE (0 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, 1,000 ppm and 1,250 ppm) for 24, 48 and 72 hours, and the survival percentages determined using flow cytometry, following dying with SYTO9 and propidium iodide. The cells previously exposed to PAA presented higher

survival percentages ($P < 0.05$) than the rest of the cells for most of the concentrations of TE and treatment intervals trialled. These results are worrying because TE is often used to treat listeriosis, highlighting the importance of avoiding the use of disinfectant at subinhibitory doses. Furthermore, the findings suggest that flow cytometry is a fast and simple technique to obtain quantitative data on bacterial resistance to antibiotics.

CHAPTER VI

Twenty samples of minced chicken meat procured from butcher's shops in León (Spain; 10 samples) and Vila Real (Portugal; 10 samples) were analysed. Microbial concentrations (\log_{10} cfu/g) of 7.53 ± 1.02 (viable aerobic microbiota), 7.13 ± 1.07 (psychrotrophic microorganisms), and 4.23 ± 0.88 (enterobacteria) were found. There were differences ($P < 0.05$) between the two countries only in respect of psychrotrophic microorganisms, with values of 7.56 ± 0.86 (Spain) and 6.64 ± 1.10 (Portugal). The detection method described in the UNE-EN ISO 11290-1 standard (based on isolation from chromogenic medium -OCLA-) with confirmation by polymerase chain reaction (PCR), revealed *Listeria monocytogenes* in fourteen samples (70% of the total), nine of Spanish origin and five of Portuguese ($P > 0.05$). The levels of viable and inactivated *L. monocytogenes* in the 20 samples of minced meat investigated were determined with q-PCR using propidium monoazide (PMAxx) as a viability marker. Seven samples tested positive both with OCLA-PCR and with q-PCR, with estimated concentrations varying between 2.15 and 2.94 \log_{10} cfu/g. Three samples tested negative both with OCLA-PCR and with q-PCR. Seven samples were positive with OCLA-PCR but negative with q-PCR, and three samples tested negative with OCLA-PCR and positive with q-PCR. The percentage of viable cells relative to the total ranged between 9.25% and 88.48%. The kappa coefficient (agreement between the two methods) was 0.00. The susceptibility of 70 isolates of *L. monocytogenes* (five from each positive sample) to 15 antibiotics of clinical interest was tested. The strains presented resistance to between 3 and 8 antibiotics. The average number of resistances was greater ($P < 0.001$) among strains isolated from Spanish samples (6.20 ± 1.08), than in those from Portugal (5.00 ± 1.08). In both groups of strains, a prevalence of resistance higher than 95% was observed for oxacillin, cefoxitin, cefotaxime and cefepime. The considerable prevalence and concentration of *L. monocytogenes* in minced chicken, together with the high rates of resistance to antibiotics found, suggest that this foodstuff constitutes a potential risk for consumers. This highlights the need to handle it correctly, taking care to cook it sufficiently and to avoid cross-contamination, so as to reduce the danger of listeriosis. A combination of the classic method, using isolation and of q-PCR, offers complementary

routes for the detection in food of cells of *L. monocytogenes* in various different physiological states.

CHAPTER VII

The antimicrobial effectiveness of three additives (sodium nitrite -SN, nisin-NI and lactic acid-LA) in minced chicken was studied. The additives were applied in concentrations of 100 ppm (SN), 10 ppm (NI) and 3,000 ppm (LA) for 24 hours. The microbial counts oscillated between $5.51 \pm 1.05 \log_{10}$ cfu/g (samples treated with LA) and $7.49 \pm 1.05 \log_{10}$ cfu/g (untreated, control samples) for viable aerobic bacteria, between $5.59 \pm 1.14 \log_{10}$ cfu/g (LA) and $7.12 \pm 1.05 \log_{10}$ cfu/g (control) for psychrotrophic microorganisms, and between $2.33 \pm 0.51 \log_{10}$ cfu/g (LA) and $4.23 \pm 0.88 \log_{10}$ cfu/g (control) for enterobacteria. Only LA managed to reduce ($P < 0.05$) the microbial levels with respect to the untreated samples. The treatments applied influenced the prevalence of *Listeria monocytogenes*, which was detected in 70% of the control samples, 60% of the samples treated with SN, 65% of those treated with NI, and 50% of those treated with LA. There was a concordance of 100% between the method of detection UNE-EN ISO 11290-1 (based on the detection of *L. monocytogenes* in chromogenic medium - OCLA-) and the polymerase chain reaction technique (PCR; detection of the gene *lmo1030*). In the samples treated, an increase in the percentage of isolates with antibiotic resistance was observed with respect to the control samples.

CHAPTER VIII

The biofilms formed by *Salmonella* Hadar (SH174), *Listeria monocytogenes* (LM6), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA125) and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE61s) on polystyrene and glass after 24 hours and 72 hours of incubation at 37 °C were examined by confocal laser scanning microscopy (CLSM) after staining with SYTO9 and propidium iodide (PI). A lower average biovolume ($P < 0.05$) was observed for SH174 biofilms ($73,073.61 \pm 52,365.90 \mu\text{m}^3$ in the observation field of $14,161\mu\text{m}^2$) than for LM6 ($180,804.50 \pm 32,554.62 \mu\text{m}^3$), MRSA125 ($208,605.34 \pm 57,534.93 \mu\text{m}^3$) and VRE61s ($212,543.91 \pm 39,718.62 \mu\text{m}^3$) biofilms. SH174 showed the greatest ($P < 0.05$) biovolume on glass, as compared with polystyrene. Biofilms of LM6, MRSA125 and VRE61s were produced at comparable levels on both contact surfaces. After 24 h, SH174 formed small scattered cell clusters, and biovolume of biofilms increased ($P < 0.05$) after 72 h. By contrast, LM6, MRSA125 and VRE61s formed compact biofilms quickly (24 h) on both contact surfaces. Seventy-two-hour-old

biofilms showed the largest biovolumes of dead or damaged (PI-stained) cells, except for MRSA125 (polystyrene) and VRE61s (polystyrene and glass). Appropriate procedures for the disinfection of food processing surfaces immediately after use are required to prevent the formation of biofilm by pathogenic bacteria.

CHAPTER IX

Biofilms are a key factor in the persistence of *Listeria* in food processing plants, representing a potential source of foodstuff contamination. Nine *Listeria* strains (eight *Listeria monocytogenes* and one *Listeria ivanovii*) were studied by confocal laser scanning microscopy (CLSM) for their ability to form biofilm on glass, polystyrene, graphene and resin after 120 h of incubation at 12 °C. The relationship between cell surface hydrophobicity and biofilm formation was also investigated. On comparing the data for all the strains, similar ($P > 0.05$) biovolume values were obtained on glass (average $3.39 \pm 1.69 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) and graphene ($2.93 \pm 1.14 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), while higher ($P < 0.05$) values were observed for polystyrene ($4.39 \pm 4.14 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). The highest ($P < 0.01$) biovolume levels were found in the biofilms formed on resin ($7.35 \pm 1.45 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), which also had the smallest biomass of inactivated cells ($0.38 \pm 0.37 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ vs. $1.20 \pm 1.12 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ on the remaining surfaces; $P < 0.001$). No relationship was noted between cell surface hydrophobicity and biofilm-forming ability.

CHAPTER X

The objective of this study was to characterize the biofilms formed by *Salmonella enterica* serotype Agona, *Listeria monocytogenes*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) after 12, 48, 72, 120 and 240 hours of incubation at 10 °C. Biofilms containing a single species, together with dual-species biofilms in which *S. enterica* and a Gram-positive bacterium existed in combination, were formed on polystyrene and evaluated by using confocal laser scanning microscopy. All strains were able to form biofilm. The greatest biovolume in the observation field of $14,161 \mu\text{m}^2$ was observed for mono-species biofilms after 72 hours, where biovolumes of $174,150.1 \mu\text{m}^3 \pm 21,062.3 \mu\text{m}^3$ (*S. enterica*), $58,418.3 \mu\text{m}^3 \pm 5,944.9 \mu\text{m}^3$ (*L. monocytogenes*) were observed, $68,020.8 \mu\text{m}^3 \pm 5,812.3 \mu\text{m}^3$ (MRSA) and $59,280.0 \mu\text{m}^3 \pm 4,032.9 \mu\text{m}^3$ (VRE) were obtained. In comparison with single-species biofilms, the biovolume of *S. enterica* was higher in the presence of MRSA or VRE after 48, 72 and 120 hours. In dual-species biofilms, the bacteria showed a double-layer distribution pattern, with *S. enterica* in the top layer and Gram-positive bacteria in the

bottom layer. This spatial disposition should be taken into account when effective strategies to eliminate biofilms are being developed.

CHAPTER XI

The susceptibility of four *L. monocytogenes* isolates from pork to sodium hypochlorite (SHY) and benzalkonium chloride (BZK) was tested. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of 3,500 ppm (SHY), or between 3 ppm and 13 ppm (BZK), were found. Minimum bactericidal concentration (MBC) values ranged from 3,500 ppm to 4,500 ppm (SHY), and from 3 ppm to 14 ppm (BZK). The effect of SHY and BZK on the architecture and cellular viability of 24-hour-old biofilms formed by such strains on polystyrene was determined through confocal laser scanning microscopy (CLSM) in conjunction with fluorescent dyes for live cells (SYTO9) and dead cells (propidium iodide). Strains were able to form biofilm (biovolume values in the observation field of 14,161 μm^2 ranged between $103,928.3 \pm 6,730.2 \mu\text{m}^3$ and $276,030.9 \pm 42,291.9 \mu\text{m}^3$). Treatment of biofilms for 10 minutes with SHY (1MIC or 1.5MIC) or BZK (0.5MIC, 1MIC or 1.5MIC) decreased the biovolume of live (potentially dangerous) cells. SHY reduced the cellular viability of biofilms by more than 90%. On the other hand, BZK was able to remove most biofilm mass (live and dead cells), but decreased cellular viability only to a lesser extent, this suggesting strong biofilm detachment and dissemination of live cells.

CHAPTER XII

This study was intended to investigate the effect of contact with concentrations close to the minimum inhibitory concentration (0.5MIC, 1MIC and 1.5MIC; MIC of planktonic cells was determined using a microdilution broth method) of sodium hypochlorite (SHY) or benzalkonium chloride (BZK) during the process of formation of biofilm (24 hours), upon the architecture and viability of the biofilms formed by four *L. monocytogenes* isolates of molecular serotype 1/2a: S2-1 (BZK-susceptible strain; $\text{MIC}_{\text{BZK}} = 3.0 \text{ ppm}$), S2-2 (BZK-resistant strain *qacH* positive; $\text{MIC}_{\text{BZK}} = 13 \text{ ppm}$), CDL 69 (BZK-resistant strain *bcrABC* positive; $\text{MIC}_{\text{BZK}} = 10 \text{ ppm}$) and S2^{BAC} (BZK-resistant laboratory mutant of S2-1, with multidrug resistance phenotype; $\text{MIC}_{\text{BZK}} = 9 \text{ ppm}$). Images were examined through confocal laser scanning microscopy (CLSM) after staining with SYTO9 and propidium iodide. Biovolume values in the observation field ($14,161 \mu\text{m}^2$) in the absence of biocides ranged from $103,928.3 \pm 6,730.2 \mu\text{m}^3$ (S2^{BAC}) to $276,030.9 \pm 42,291.9 \mu\text{m}^3$ (S2-1). Exposure to SHY at 0.5MIC reduced ($P < 0.05$) the biovolume of biofilms formed by S2-1 and S2^{BAC} and did not modify ($P > 0.05$) the

biovolume of biofilms by S2-2 and CDL 69. Exposure to sub-MICs of BZK decreased ($P < 0.05$; S2-1) or enhanced ($P < 0.05$; S2-2, CDL 69 and S2^{BAC}) biofilm development. Exposure to biocides at 1MIC or 1.5MIC inhibited biofilm formation. This study provides clear evidence that benzalkonium chloride at sub-MICs can enhance the biofilm-forming ability of BZK-resistant *L. monocytogenes* strains. Because biofilms contribute to the persistence of bacteria throughout the food chain and represent a major source of food contamination, our findings suggest the importance of avoiding sub-MICs of disinfectants in food-handling environments.

CHAPTER XIII

Because listeriosis is one of the deadliest food-borne diseases, controlling and eradicating *Listeria monocytogenes* biofilms is a serious challenge for food safety. Twenty-four-hour-old biofilms formed on polystyrene by a *L. monocytogenes* strain of food origin were exposed for a further 24 hours to 12 different concentrations (from 10^0 PFU/mL to 10^{11} PFU/mL) of the bacteriophage P100 (ListexTM P100). The structural parameters of biofilms were studied using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and digital image analysis. The biovolume in the observation field ($14,121 \mu\text{m}^2$) of control (untreated) biofilms was $237,333.1 \pm 2,692.6 \mu\text{m}^3$. The biomass of treated biofilms ranged from $164.7 \pm 89.0 \mu\text{m}^3$ (biofilms exposed to 10^{10} PFU/mL) to $231,170.5 \pm 15,142.0 \mu\text{m}^3$ (10^0 PFU/mL). The lowest biomass was achieved after treatment with 10^8 PFU/mL, with no further decrease in biovolume when higher phage concentrations were used. A strong ($P < 0.001$) correlation was found between phage concentration (log units) and biovolume (-0.965), surface coverage (-0.939), roughness (0.976), maximum thickness (-0.853), and average thickness (-0.965). Findings from this research suggest that bacteriophage P100 at concentrations equal to or greater than $8 \log_{10}$ pfu/ml successfully removes *L. monocytogenes* biofilms from polystyrene surfaces.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABC, familia de casetes de unión a ATP

ADN, ácido desoxirribonucleico

AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (España)

AFR, Región de África

AK, amikacina

AL, ácido láctico

AML, amoxicilina

AMP, ampicilina

AMR, Región de las Américas

AP, ácido peracético

APVP, años potenciales de vida perdidos

AR, resistencia a antibióticos

ASTM, Comité de Pruebas y Materiales de la Sociedad Americana de Ensayos y Materiales (EE.UU.)

ATCC, *American Type Culture Collection* (Colección Americana de Cultivos Tipo, EE.UU.)

ATM, aztreonam

ATP, adenosín trifosfato

AVAD, años de vida ajustados por discapacidad

Abreviaturas

AVD, años vividos con discapacidad

BIOHAZ, *Panel on Biological Hazards* (Panel de Riesgos Biológicos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria -EFSA-, Unión Europea)

BOE, Boletín Oficial del Estado (España)

BPF, Buenas Prácticas de Fabricación (G.M.P. en inglés)

C, cloranfenicol

CAZ, ceftriaxona

CB, cloruro de benzalconio

CCAA, Comunidades Autónomas (España)

CDC, *Centers for Disease Control and Prevention* (Centros para la Prevención y Control de Enfermedades, EE.UU.)

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (España)

CHS, hidrofobicidad de la superficie celular

CIP, ciprofloxacina

CLR, claritromicina

CLSI, Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (EE.UU.)

CLSM, microscopía láser confocal de barrido

CN, gentamicina

CRO, ceftriaxona

CSH, hidrofobicidad de la superficie celular

Ct, ciclo umbral

CTX, cefotaxima

DA, clindamicina

DALYs, años de vida ajustados por discapacidad

DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol

DE, desviación estándar

DMSO, dimetil sulfóxido

dNTPs, desoxinucleósidos trifosfato

DO, densidad óptica

DOUE, Diario Oficial de la Unión Europea

E, eritromicina

ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control* (Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades, Unión Europea)

ECHA, *European Chemicals Agency* (Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas)

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético

EE.UU., Estados Unidos de América

EEE, Espacio Económico Europeo

EFSA, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (Unión Europea)

EMR, Región del Mediterráneo Oriental

Abreviaturas

ENR, enrofloxacin

EPEC, *Escherichia coli* enteropatógena

EPS, sustancias poliméricas extracelulares

ETEC, *Escherichia coli* enterotoxigénica

EUCAST, Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a Antimicrobianos

EUR, Región de Europa

F, nitrofurantoína

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (también denominada como Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), sede en Roma (Italia).

FAOSTAT, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: Estadísticas

FEP, cefepima

FERG, Grupo de Referencia sobre Epidemiología de la Carga de Morbilidad de Alimentos (O.M.S. -W.H.O.-)

FOS, fosfomicina

FOX, cefoxitina

FSC, *Forward Scatter* (desviación frontal)

FTS, fosfato trisódico

HID, hidrofobicidad

HLS, homoserina lactona

HS: hipoclorito de sodio, hipoclorito sódico

IDA, Ingesta Diaria Admisible

IDE, Entorno de Desarrollo Integrado Lazarus

IFT, *Institute of Food Technologists* (Instituto de Tecnólogos de los Alimentos, EE.UU.)

INE, Instituto Nacional de Estadística

INSHT, Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (España)

K, kanamicina

KF, cefalotina

LI, *Listeria ivanovii*

LM, *Listeria monocytogenes*

MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (España)

MAR, resistencia a múltiples antibióticos

MATE, familia de extrusión de compuestos tóxicos y de múltiples fármacos

MATS, *microbial adhesion to solvents* (prueba de adhesión microbiana a solventes)

MAV, microbiota aerobia viable (flora aerobia mesófila viable)

MBC, concentración mínima bactericida (CMB)

MC, membrana citoplasmática

MDR, *multidrug-resistant* (multirresistencia)

ME, membrana externa de la pared celular

Abreviaturas

MEM, meropenem

MFS, *Major Facilitator Superfamily*

MHA, Agar Mueller Hinton

MHB, Caldo Mueller Hinton

MIC, concentración mínima inhibitoria (CMI)

MIC/2, mitad de la concentración mínima inhibitoria (CMI/2)

MRSA, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a la metilina)

MXF, moxifloxacina

NA, ácido nalidíxico

NCTC, Colección Nacional de Cultivos Tipo (Reino Unido)

NI, nisina (aditivo E 234)

NP, nuevos productos naturales antimicrobianos

NS, nitrito sódico

OCLA, *Chromogenic Listeria Agar* (agar cromogénico de *Listeria*)

OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal (antes Organización Internacional de Epizootias)

OMS, Organización Mundial de la Salud (sede en Ginebra, Suiza); WHO en inglés

ONU, Organización de las Naciones Unidas

OX, oxacilina

P, penicilina

PBP, proteínas de unión a la penicilina

PBS, tampón fosfato salino

PCA, agar para recuento en placa

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

PDR, *pandrug-resistant* (pan-resistencia)

PL, periplasma

QAC: *quaternary ammonium compounds* (compuestos de amonio cuaternario)

qPCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

QPS, *Qualified Presumption of Safety* (Presunción Cualificada de Seguridad, EFSA)

QQ, *Quorum Quenching*

QS, *Quorum Sensing*

RASFF, Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (Unión Europea)

RD, rifampicina

RND, familia resistencia-nodulación-división

RTE, *Ready to Eat* (alimentos o productos listos para el consumo)

RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa

S, estreptomicina

SA, *Salmonella enterica*, serotipo Agona

SAM, ampicilina/sulbactam

SCENIHR, *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (Comité Científico sobre Riesgos Sanitarios Emergentes y Recientemente Identificados, Unión Europea)

SCF, Comité Científico de los Alimentos

SE, *Salmonella enterica*

SEAR, Región de Asia Sudoriental

SEIMC, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (España)

SH, *Salmonella enterica* serotipo Hadar

SMRP, *small multidrug resistance proteins* (proteínas de multirresistencia)

SSC, *side Scatter* (dispersión lateral)

STEC, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga

SXT, trimetoprim-sulfametoxazol

TAE, tampón tris acetato-EDTA

TE, tetraciclina

TLC, acetiltransferasas de cloranfenicol

TSA, agar de triptona de soja

TSB, caldo de triptona de soja

UE, Unión Europea

UFC, unidades formadoras de colonias (CFU en inglés)

UFP, unidades formadoras de placas (PFU en inglés)

UV, ultravioleta

VA, vancomicina

VBNC, estado celular viable pero no cultivable

VRBGA, agar bilis rojo neutro cristal violeta con glucosa

VRE, *vancomycin-resistant enterococci* (enterococos resistentes a la vancomicina, *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina)

VRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina

WHO, *World and Health Organization* (Organización Mundial de la Salud, sede en Ginebra - Suiza, Geneva en inglés-)

WPR, Región del Pacífico Occidental

XDR, *extensively drug-resistant* (resistencia de espectro extendido)

YE, extracto de levadura

YOPIs, *Young, Old, Pregnant and Inmunocom-promised* (niños, ancianos, mujeres embarazadas e inmunodeprimidos)

YP, yoduro de propidio

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE CARNE DE AVE

1.1. Producción y consumo mundial de carne de ave

La producción de aves de corral es una de las más extendidas en todo el mundo, siendo el pollo la especie de cría más común (Nhung *et al.*, 2017), con más de 114 millones de toneladas de carne de pollo producidas en el año 2018 (FAOSTAT, 2020). En 2017, la carne de origen avícola representó cerca del 37% de la producción mundial de carne, siendo los Estados Unidos el mayor productor mundial de carne de ave, con el 18% de la producción mundial, seguido de China y Brasil (FAO, 2020a). La Unión Europea ocupa el cuarto lugar de producción mundial, con un 12,4% del total (MAPA, 2020a).

El consumo mundial per cápita de los tres tipos de carne más consumidos en 2017 fue de 15,7, 15,2 y 9,0 kg por persona y año, para la carne de cerdo, ave y vacuno, respectivamente (FAOSTAT, 2020). La demanda mundial de carne de ave se ha incrementado en los últimos años debido, principalmente, a su versatilidad, variedad, y sus buenas propiedades nutricionales, siendo destacable su bajo contenido en grasa (Cardoso Pereira y Reis, 2013). Además, se trata de un alimento económico, se cocina fácilmente, tiene una alta calificación por sus cualidades sensoriales y es aceptado por casi todas las culturas y religiones. Uno de los tipos de carnes de ave más consumidas en el ámbito mundial es la de pollo (Figura 1). La carne de pollo destaca por su aporte proteico, así como por su contenido en ácido fólico y niacina. Además, posee elevadas cantidades de hierro y zinc, aunque su contenido es menor que en el caso de la carne roja. Asimismo, supone una fuente importante de fósforo, potasio y otros minerales, esenciales para cualquier individuo.

Los pronósticos para el año 2020 indicaban un descenso en la producción de carne en el ámbito mundial, pasando a ser de 333 millones de toneladas, con una reducción del 1,7% respecto al 2019, año del que se obtienen datos precisos (Tabla 1). Gran parte de dicha reducción se debe a la disminución de la producción mundial de carne de cerdo en los países asiáticos y de bovino, principalmente en América. Sin embargo, la previsión indicaba un aumento de la producción de carne de ovino y aves de corral, a pesar de que todos los sectores cárnicos se han visto afectados negativamente por la pandemia mundial producida por el SARS CoV-2. A su vez, también se vio afectado el crecimiento del comercio mundial de carne, que solo aumentó en un 2,4%, frente al crecimiento que experimentó en 2019, de un 6,8%. Es probable que las limitaciones en el transporte marítimo y los atrasos en los puertos hayan provocado una limitación del crecimiento en este sector. El pronóstico para la anualidad 2020-2021 es la reducción de un 0,3% en el comercio mundial de carne de ave.

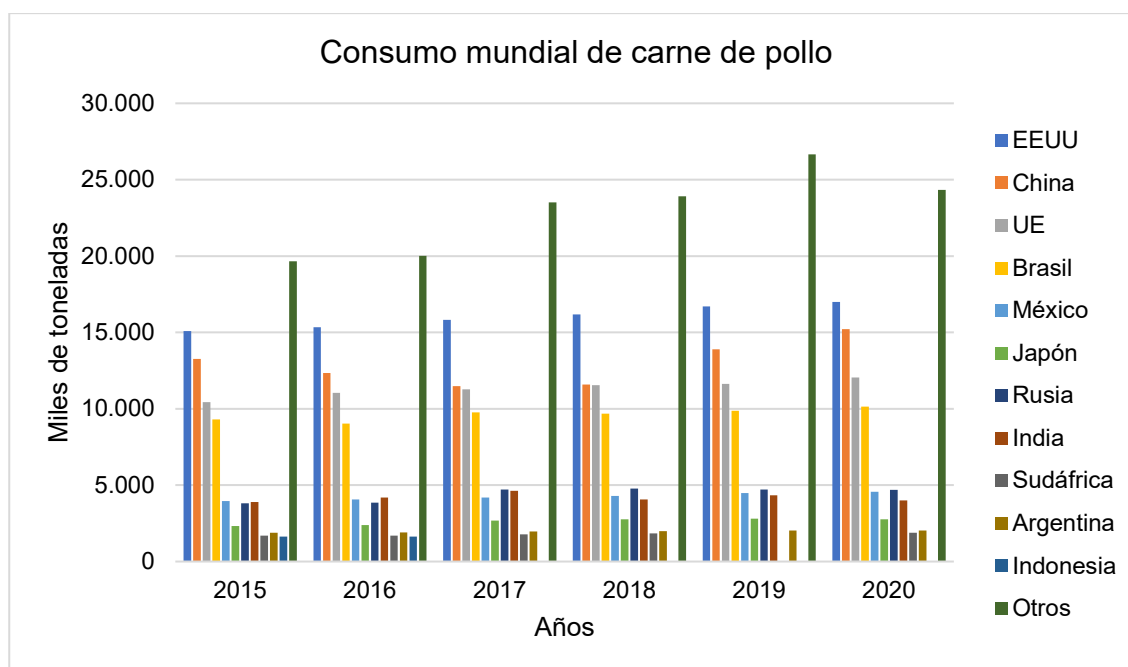


Figura 1. Consumo mundial de carne de pollo expresado en miles de toneladas (Fuente: MAPA, 2021b).

Tabla 1. Panorama de la producción mundial de carne (Fuente: FAO, 2020b).

	2018/2019 (millones de toneladas)	Estimación 2019/2020 (millones de toneladas)	Pronóstico 2020/2021 (millones de toneladas)	Variación de 2019/2020 a 2020/2021 (%)
Producción total	342,2	338,9	333,0	-1,7
Carne de bovino	71,5	72,6	72,0	-0,8
Carne de ave	127,3	133,6	136,8	2,4
Carne de cerdo	120,9	109,8	101,0	-8,0
Carne de ovino	15,8	16,0	16,2	0,9
Comercio total	33,8	36,1	37,0	2,4
Carne de bovino	10,5	11,2	11,1	-1,0
Carne de ave	13,5	13,9	13,8	-0,3
Carne de cerdo	8,4	9,5	10,6	11,2
Carne de ovino	1,0	1,0	1,0	-2,9

1.2. Producción y consumo de carne de ave en el ámbito europeo: España y Portugal

De acuerdo con los datos recopilados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) España ocupó, por detrás de Polonia, el segundo lugar en producción de carne de ave en la UE en el año 2019, con 1.426 miles de toneladas. Sin embargo, Portugal solamente produce 290 miles de toneladas, aunque ambos países han aumentado su producción a lo largo del tiempo (Figura 2).

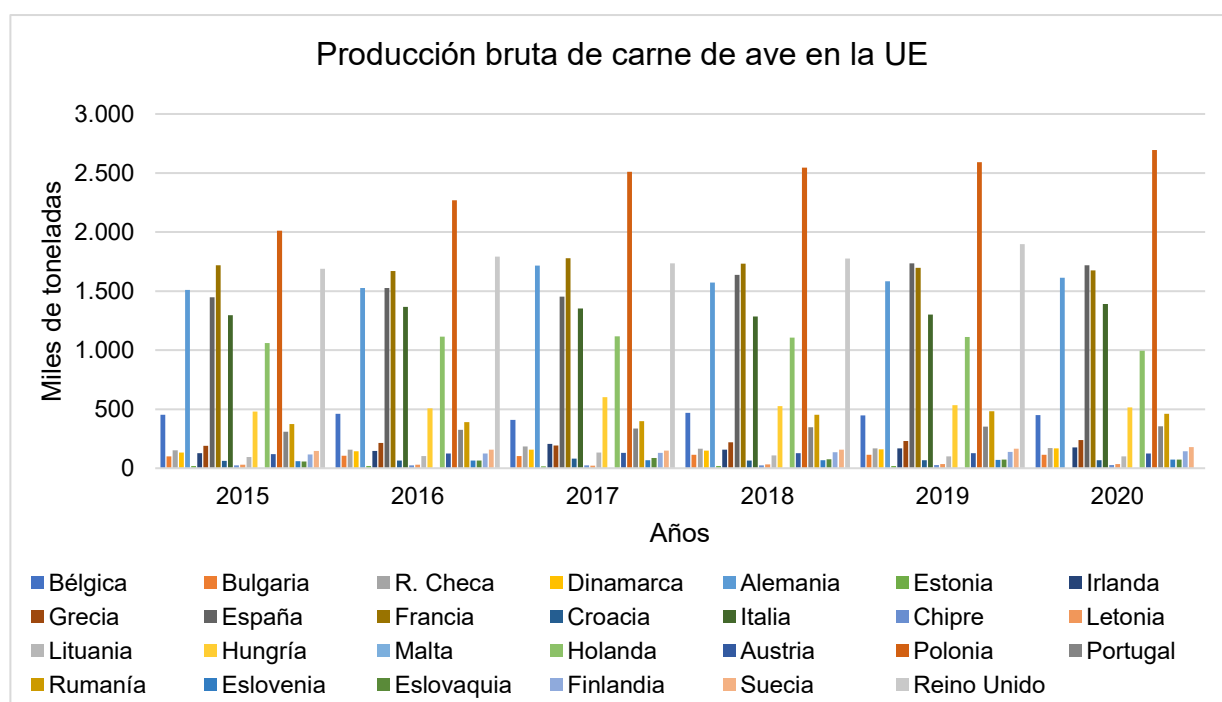


Figura 2. Producción bruta de carne de ave en diferentes países de la Unión Europea (Fuente: MAPA, 2020b).

En cuanto a la evolución del comercio exterior en la Unión Europea (Figura 3), se destacan las exportaciones de carne de ave frente a las importaciones. En cuanto a los datos de las exportaciones, se observa un ligero aumento de las mismas hasta 2019, año en que se produce un declive de 35.001 toneladas con respecto al año anterior. En cuanto a las importaciones, también se ha producido un descenso a lo largo del tiempo, pasando de 875.188 toneladas en el año 2016 a 771.178 en 2019.

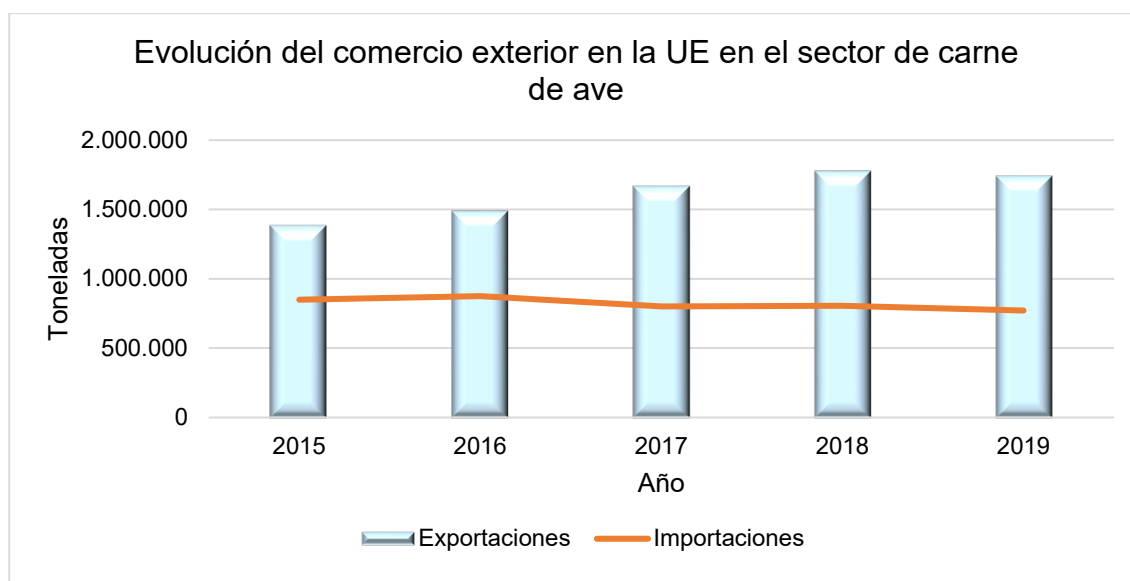


Figura 3. Evolución del comercio exterior en el sector de la carne de ave en la UE (Fuente: MAPA, 2020b).

Con respecto a la evolución de las exportaciones por países miembros de la Unión Europea, destacan como principales exportadores de carne de ave Países Bajos, con un aumento significativo desde 2015, llegando a 456.994 toneladas en 2019, seguido de Polonia, con la misma trayectoria hasta alcanzar 426.817 toneladas en ese último año. Por otro lado, España se encuentra en actual ascenso, con 84.153 toneladas exportadas, y Portugal en descenso, con 11.357 toneladas, en el año 2019 (Figura 4).

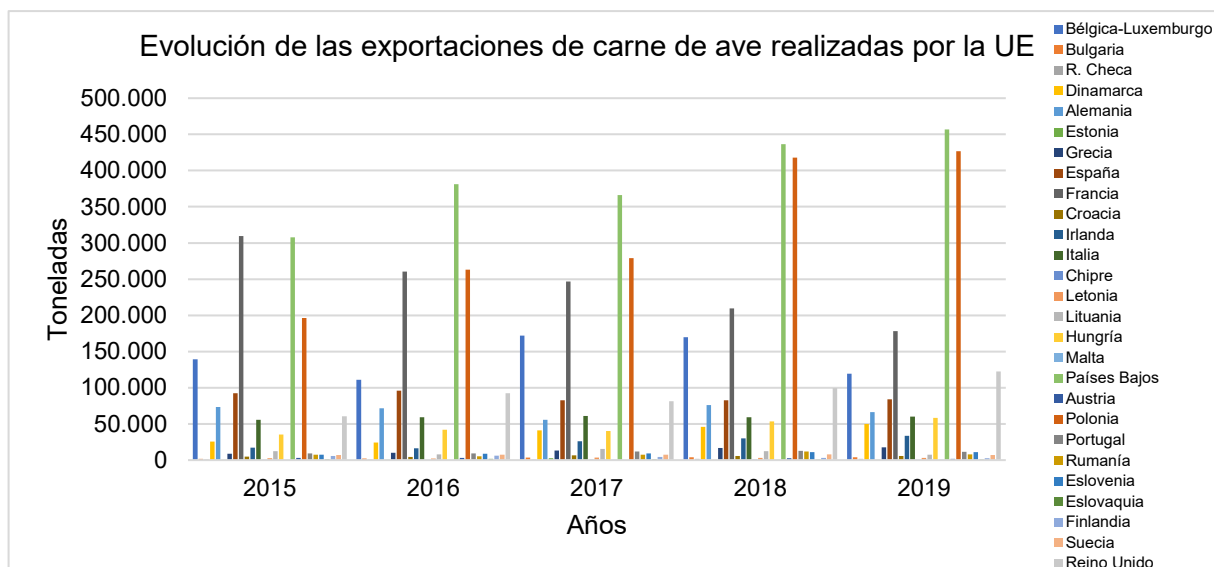


Figura 4. Evolución de las exportaciones de carne de ave realizadas por diferentes países de la Unión Europea (Fuente: MAPA, 2020b).

Atendiendo a las importaciones de carne de ave (Figura 5), destacan como países principales Países Bajos, con un marcado descenso a lo largo del tiempo, llegando a las

315.062 toneladas, y en segundo lugar Reino Unido, que presenta un ligero aumento de las importaciones con respecto a años anteriores, alcanzando las 262.204 toneladas. Por lo que respecta a España, las importaciones se encuentran en descenso, ya que en 2015 se importaban 34.876 toneladas, frente a las únicamente 22.224 toneladas de 2019. Portugal también se encuentra en declive en cuanto a importaciones de carne de ave, pasando de 175 toneladas en 2018 a solamente 79 toneladas en el año 2019.

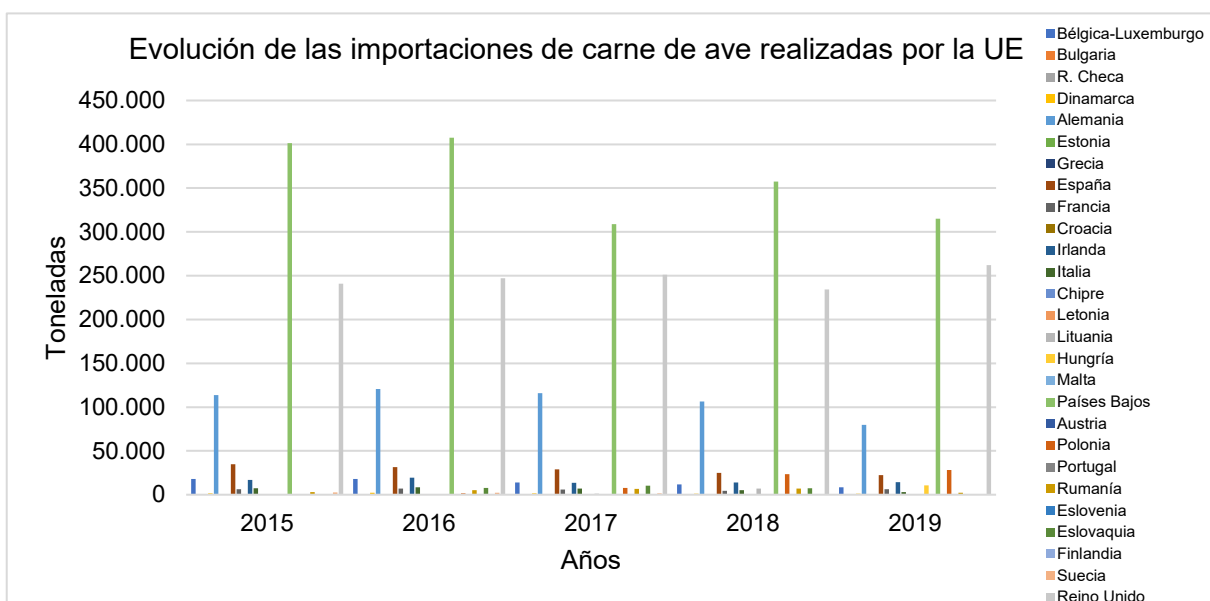


Figura 5. Evolución de las importaciones de carne de ave realizadas por diferentes países de la Unión Europea (Fuente: MAPA, 2020b).

En relación con la producción de carne de ave, en España se ha pasado de 1.203 miles de toneladas en 2015 a 1.426 miles de toneladas en el año 2019 (Figura 6). En Portugal se ha experimentado también un ligero aumento de la producción a lo largo del tiempo, finalizando en 2019 con 290 miles de toneladas.

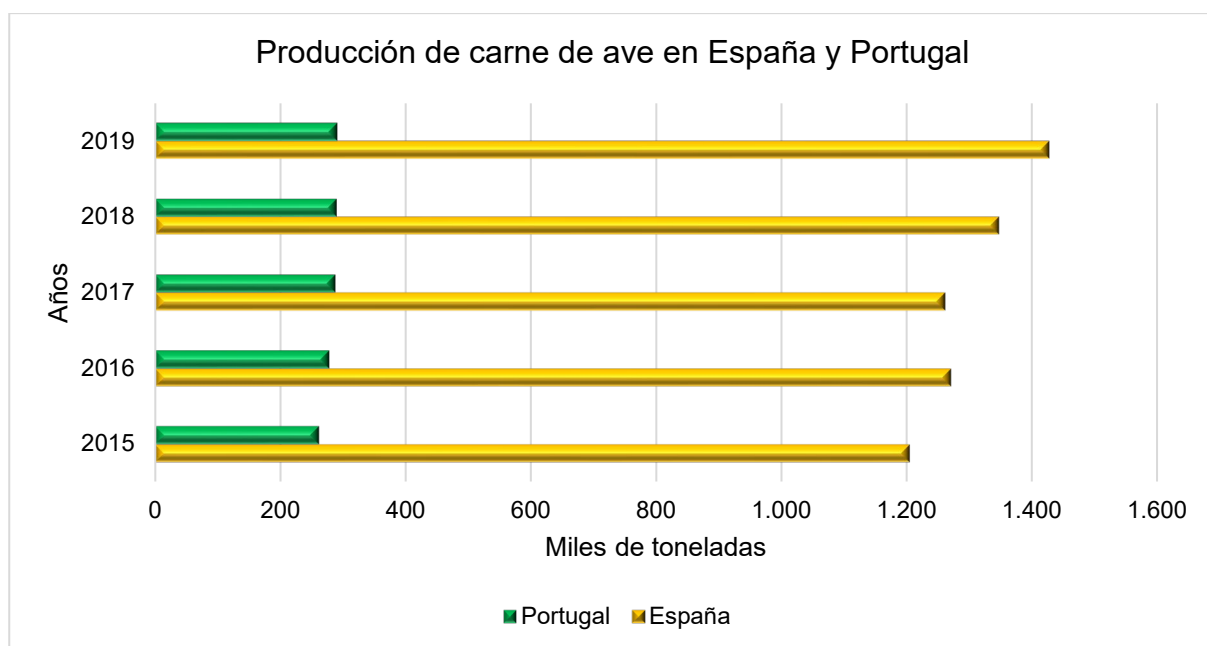


Figura 6. Producción de carne de ave en España y Portugal (Fuente: MAPA, 2020b).

Por otro lado, y haciendo alusión al consumo de carne de ave en los dos países citados, hay que destacar las mayores cifras observadas en Portugal (Figura 7). Desde 2015, se observa un aumento marcado en el país luso, comenzando con 39,1 kg por habitante y finalizando con 44,3 kg por habitante en el año 2020. Sin embargo, en España se han producido ligeras oscilaciones durante el periodo estudiado, manteniéndose en 13,7 kg de media por persona y año entre 2015 y 2020.

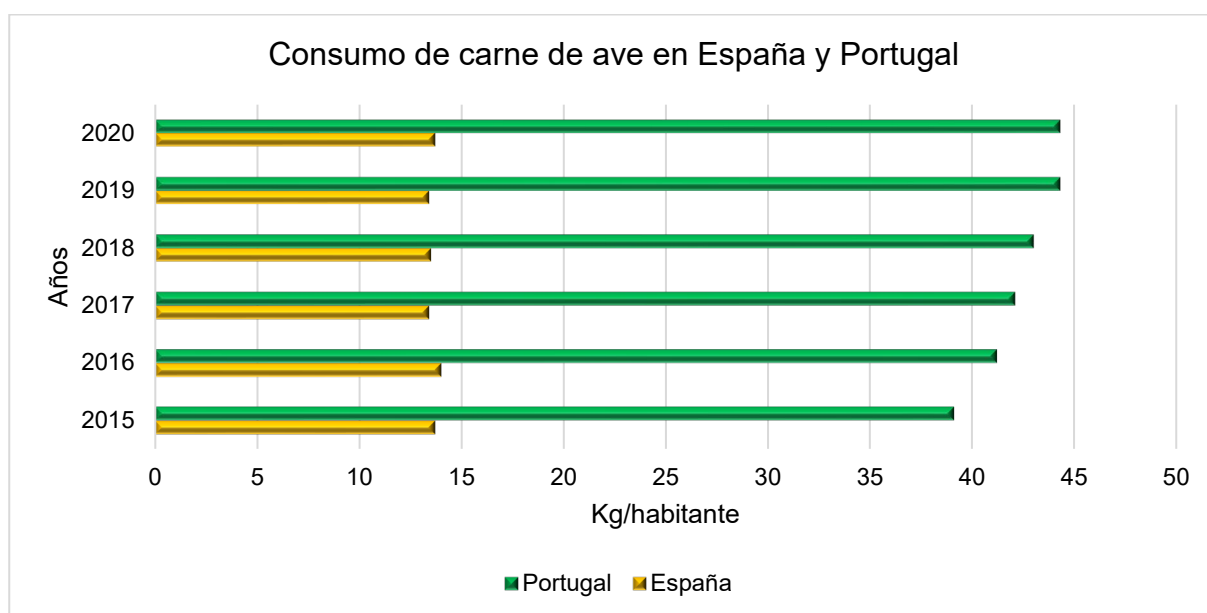


Figura 7. Consumo de carne de ave en España y Portugal (Fuente: Instituto Nacional de Estadística -INE-, 2020a, b).

España es el segundo productor europeo de carne de pollo, detrás de Reino Unido. La mayor parte de la producción se centra en cuatro comunidades autónomas: Cataluña, con un 28,7% del total nacional, la Comunidad Valenciana, con un 16,9 % del total, Andalucía, con un 15,8 %, y Galicia, con un 13,1 % (MAPA, 2020a).

Un cierto porcentaje de carne se consume en forma de preparados cárnicos. El Reglamento (CE) N° 853/2004 define los preparados cárnicos como carne fresca, incluida carne picada, a la que se le han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos o que se ha sometido a un procesado insuficiente para modificar la estructura de la fibra muscular interna de la carne y así eliminar las características de la carne fresca (Capita *et al.*, 2020). Por sus características, los preparados cárnicos se adaptan bien a las diferentes tecnologías culinarias, satisfaciendo así las demandas de los consumidores, que desean, con cada vez mayor frecuencia, productos cárnicos listos para cocinar, porque el ahorro de tiempo durante la preparación de los alimentos se ha convertido en una prioridad para la mayoría de las familias (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Selvan *et al.*, 2007).

El alto consumo de carne de ave y sus productos derivados da lugar a una gran preocupación por que los alimentos comercializados sean seguros, tengan una alta vida útil y presenten la composición y las características sensoriales adecuadas. Los productos excesivamente contaminados con microorganismos son indeseables, tanto desde el punto de vista económico como de Salud Pública (Del Río *et al.*, 2007).

2. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Las enfermedades transmitidas por alimentos (infecciones e intoxicaciones alimentarias) de origen biótico están causadas por bacterias, virus, parásitos, mohos, cianobacterias, dinoflagelados o diatomeas. Estos agentes, o sus toxinas, ingresan en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados y, en los casos más severos, pueden causar discapacidad persistente y muerte (OMS, 2020). Algunos ejemplos de alimentos insalubres o no aptos para su consumo pueden ser las frutas y verduras tratadas con aguas residuales o contaminadas con heces, los alimentos de origen animal crudos o sometidos a un tratamiento térmico insuficiente y los mariscos crudos que pueden contener biotoxinas marinas, entre otros.

2.1. Epidemiología de las enfermedades transmitidas por alimentos

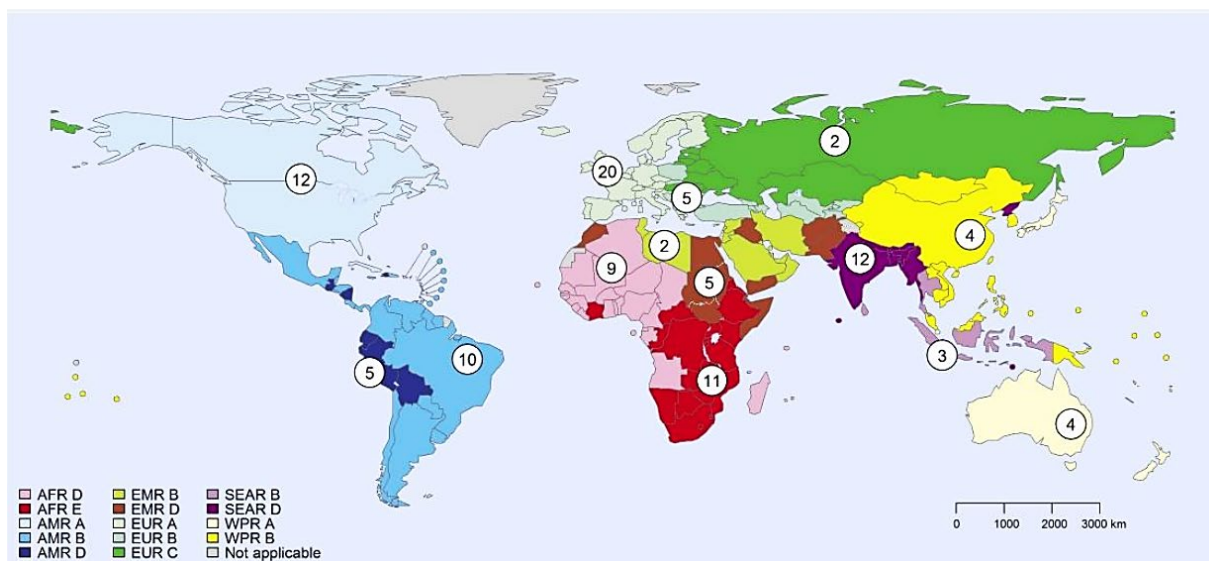
2.1.1. Epidemiología en el mundo

Los alimentos que se encuentran en condiciones inadecuadas para el consumo humano causan anualmente, en todo el mundo, aproximadamente 600 millones de casos y 420.000 muertes asociadas; de esta cifra, el 30% se corresponde con fallecimientos de niños menores de 5 años. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2021), se produce cada año una pérdida de 33 millones de años de vida de personas sanas como consecuencia de la falta de seguridad o inocuidad alimentaria.

En un estudio realizado a nivel mundial en el año 2010, se evaluaron 14 subregiones utilizadas por el Grupo de Referencia sobre Epidemiología de la Carga de Morbilidad de Alimentos (FERG) con el fin de determinar la carga mundial de enfermedades. Este régimen subregional se define sobre la base de las regiones de la OMS y de una subdivisión adicional basada en la mortalidad de los niños y los menores de 5 años y de las personas con edad igual o superior a 5 años (mortalidad adulta). Dado que se basa en la mortalidad por todas las causas, esta clasificación subregional refleja los niveles generales de desarrollo y las condiciones de agua y saneamiento, factores que también influyen en las condiciones de manipulación y almacenamiento de alimentos. Las subregiones se clasifican en una escala que va desde la A hasta la E, siendo A las asociadas con tasas de mortalidad más bajas y E con las más elevadas (Hoffmann *et al.*, 2017).

Las subregiones se definen en base a la mortalidad de niños y adultos según lo descrito por Ezzati *et al.* (2002). Estrato A: mortalidad infantil y adulta muy baja; Estrato B: baja mortalidad infantil y muy baja mortalidad de adultos; Estrato C: baja mortalidad infantil y alta mortalidad de adultos; Estrato D: alta mortalidad de niños y adultos; y Estrato E: alta

mortalidad infantil y muy alta mortalidad de adultos. AFR = Región de África; AMR = Región de las Américas; EMR = Región del Mediterráneo Oriental; EUR = Región de Europa; SEAR = Región de Asia Sudoriental; WPR = Región del Pacífico Occidental. Havelaar *et al.* (2015) proporcionan una lista de países en cada subregión. El uso del término "subregión", aquí y en los párrafos siguientes, no identifica un grupo oficial de Estados Miembros de la OMS, y las "subregiones" no están relacionadas con las seis regiones oficiales de la OMS. Los valores en círculos indican el número de expertos en paneles en cada región (Hoffman *et al.*, 2017) (Figura 8).



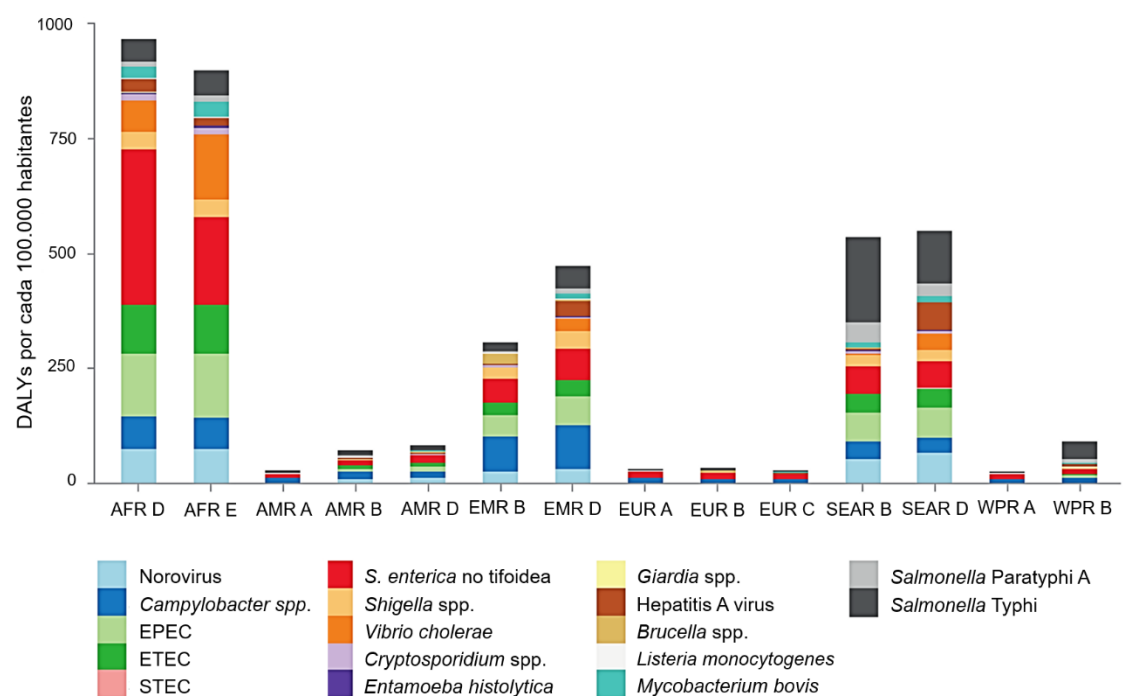
Subregiones y mortalidad asociada. AFR = Región de África; AMR = Región de las Américas; EMR = Región del Mediterráneo Oriental; EUR = Región de Europa; SEAR = Región de Asia Sudoriental; WPR = Región del Pacífico Occidental. Estrato A: mortalidad infantil y adulta muy baja; Estrato B: baja mortalidad infantil y muy baja mortalidad de adultos; Estrato C: baja mortalidad infantil y alta mortalidad de adultos; Estrato D: alta mortalidad de niños y adultos; y Estrato E: alta mortalidad infantil y muy alta mortalidad de adultos. Se incluye la distribución geográfica de expertos según la experiencia laboral (> 3 años) por subregiones. Varios expertos tenían experiencia en más de una subregión.

Figura 8. Subregiones y mortalidad asociada (Fuente: WHO, 2019).

Los años de vida ajustados por discapacidad (AVAD o DALYs) son el resultado de sumar los años potenciales de vida perdidos (APVP) más los años vividos con discapacidad (AVD). Generalmente los años de vida perdidos por cada muerte se establecen en función de la esperanza de vida a la edad del fallecimiento, obtenida a partir de tablas de vida estándar de baja mortalidad. Un DALY representa la pérdida de un año, que equivale a un año de completa salud, o equivalente a la pérdida de un año 100% saludable.

Los principales patógenos causantes de DALYs en las regiones de África (AFR) fueron *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Salmonella enterica* no

tifoidea (Figura 9). En estas zonas se produce una alta mortalidad de niños y adultos (AFR estrato D) y alta mortalidad infantil y muy alta mortalidad de adultos (AFR estrato E). Además, en esta última zona, destacan también las infecciones por *Vibrio cholerae*. En la región del mediterráneo oriental (EMR) se destacan *Campylobacter* spp., EPEC y *Salmonella enterica* no tifoidea. El estrato D destaca por la presencia de *Vibrio cholerae* y *Salmonella enterica* serotipo Paratyphi A en mayor proporción a diferencia del estrato B (baja mortalidad infantil y muy baja mortalidad en adultos). Otra de las zonas que más DALYs presenta por cada 100.000 habitantes es la región de Asia Sudoriental (SEAR). Se destacan microorganismos como Norovirus, EPEC, *Salmonella enterica* no tifoidea y *Salmonella enterica* serotipo Typhi, siendo mayor esta última en el estrato B con respecto al D. Sin embargo y para el estrato D, se destaca la presencia en mayor proporción del virus de la Hepatitis A y *Vibrio cholerae*.



AFR = Región de África; AMR = Región de las Américas; EMR = Región del Mediterráneo Oriental; EUR = Región de Europa; SEAR = Región de Asia Sudoriental; WPR = Región del Pacífico Occidental. Estrato A: mortalidad infantil y adulta muy baja; Estrato B: baja mortalidad infantil y muy baja mortalidad de adultos; Estrato C: baja mortalidad infantil y alta mortalidad de adultos; Estrato D: alta mortalidad de niños y adultos; y Estrato E: alta mortalidad infantil y muy alta mortalidad de adultos. EPEC, *Escherichia coli* enteropatógena; ETEC, *Escherichia coli* enterotoxigénica; STEC, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.

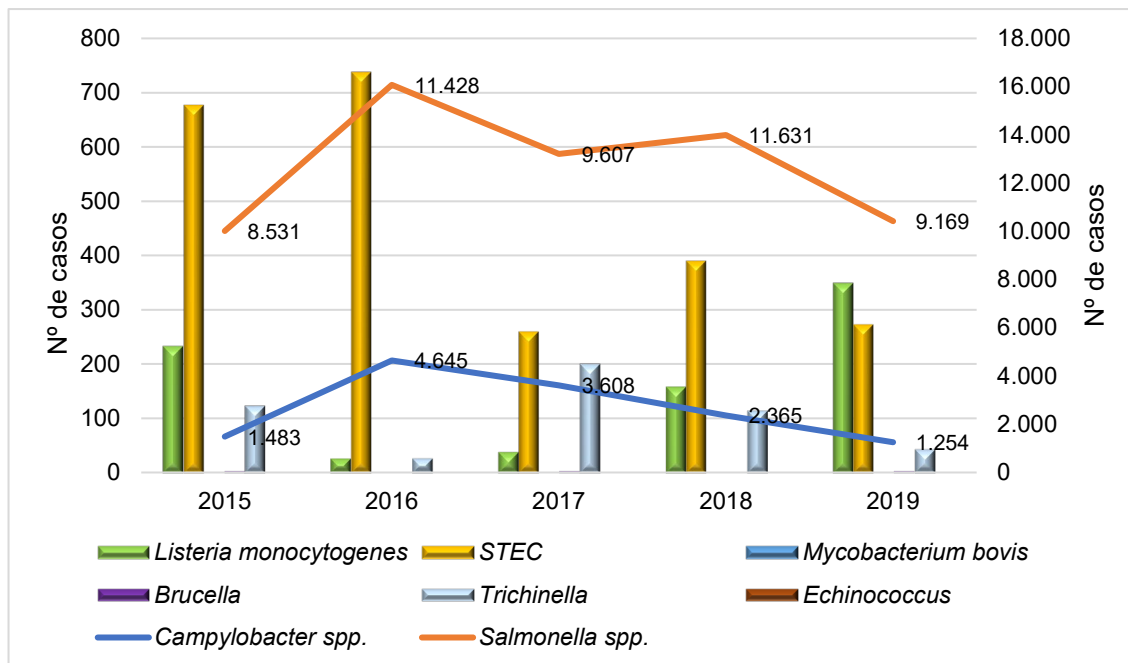
Figura 9. Carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria por subregiones (DALYs por cada 100.000 habitantes) causada por peligros entéricos en 2010 (Fuente: adaptada de WHO, 2019).

2.1.2. Epidemiología en la Unión Europea (UE)

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) son las entidades que recopilan y analizan cada año la información de todos los Estados Miembros en el Informe de Zoonosis “One Health” en la Unión Europea.

De acuerdo con lo establecido por la Lista A de la Directiva 2003/99/CE, los datos de zoonosis sobre animales, alimentos y piensos deben notificarse de forma obligatoria para los siguientes agentes zoonóticos: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC), *Mycobacterium bovis*, *Brucella*, *Trichinella* y *Echinococcus* (EFSA, 2021). En la Figura 10 se presenta el número de casos

relacionados con brotes de enfermedades transmitidas por alimentos de los agentes zoonóticos de declaración obligatoria en la UE en los últimos 5 años.



Las columnas se refieren a eje de la izquierda; las líneas se refieren al eje de la derecha.

Figura 10. Número de casos relacionados con brotes de enfermedades de transmisión alimentaria en la UE en los últimos 5 años (Fuente: datos de EFSA, 2021).

Los brotes con mayor número de casos confirmados son los provocados por *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. que presentan una tendencia descendente desde 2016, año en el que alcanzaron valores de 11.428 y 4.645 casos, respectivamente. El resto de los microorganismos no han superado, en los 5 años estudiados, los 1.000 brotes. El microorganismo que más se acercó a esta cifra fue STEC, con 737 casos en 2016, cifra que se encuentra en actual descenso, hasta los 273 casos el último año registrado. Algo similar ocurre con *Trichinella*, que alcanzó su máximo en 2017, con 199 casos, valor que ha descendido hasta 44 en 2019. Sin embargo, el único microorganismo que continúa con tendencia al alza, tras unos años con clara reducción de brotes, es *L. monocytogenes*, registrándose un total de 349 brotes en 2019, una cifra casi nueve veces superior que la registrada en el año 2017.

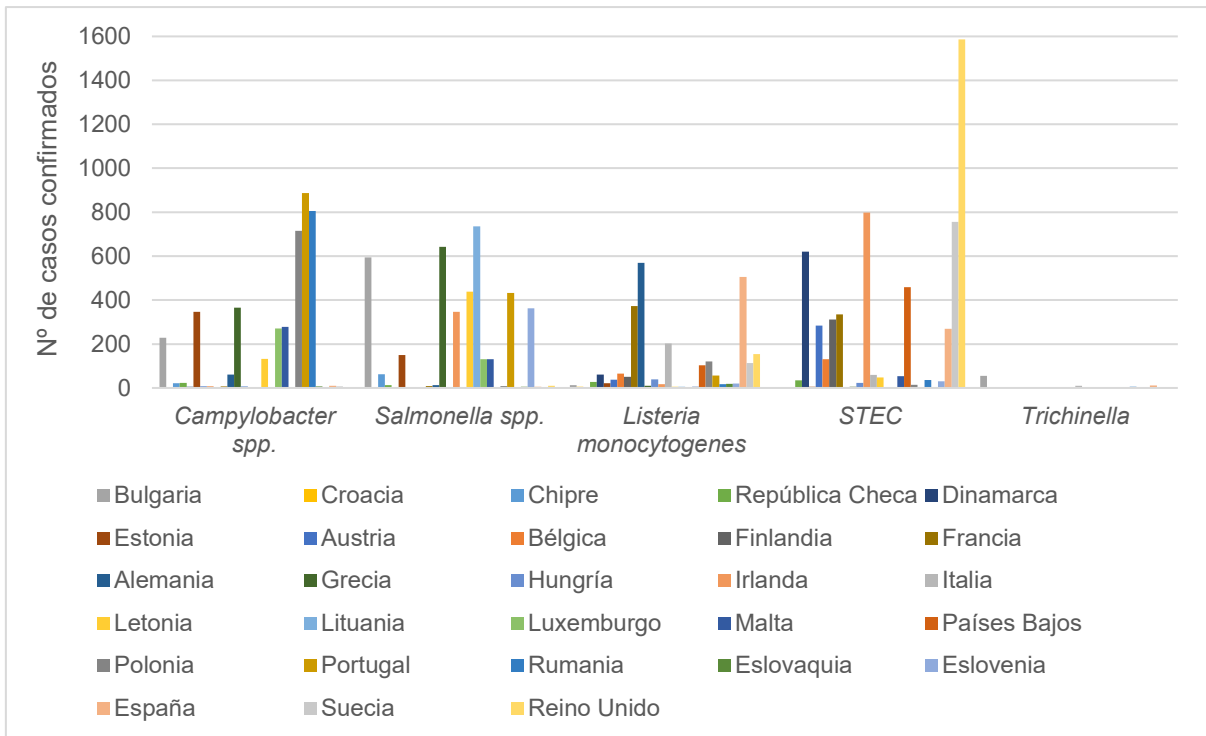


Figura 11. Casos confirmados de los principales agentes zoonóticos responsables de infecciones alimentarias en diferentes países de la Unión Europea en el año 2019 (Fuente: EFSA, 2021).

Con relación al número de casos confirmados de enfermedades transmitidas por alimentos provocadas por los principales microorganismos patógenos que han causado mayor número de brotes en los últimos 5 años, destacan para *Campylobacter spp.* países de la UE como Polonia, Portugal y Rumanía, con 715, 885 y 805 casos confirmados por cada 100.000 habitantes, respectivamente. Para *Salmonella spp.* destacan Bulgaria, con 594 casos, Letonia, con 348 casos, Lituania, con 736 casos y Portugal, con 432 casos. La mayor parte de los países presentan un número de casos confirmados inferior a 400 en relación con *L. monocytogenes*; para este microorganismo destacan en 2019 Alemania, con 570 casos, y España, con 505 casos por cada 100.000 habitantes. Para STEC, los países que superan los 400 casos confirmados fueron Dinamarca (621 casos), Irlanda (798 casos), Suecia (756 casos) y Reino Unido (1.587 casos). No se presentan países con un número de casos elevado para *Trichinella*; los datos más destacables son Bulgaria, con 55 casos, España, con 11 casos, e Italia, con 10 casos (Figura 11).

2.1.3. Epidemiología en España

De acuerdo con lo establecido en los artículos 3 y 4 del Real Decreto 1940/2004 (traspuesto de la Directiva 2003/99/CE), sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) es la autoridad competente de la Administración General del Estado en la remisión de los datos relacionados con la vigilancia de las zoonosis transmitidas por alimentos y, a su vez, se encarga de coordinar la recogida de dicha información por las Comunidades Autónomas (CCAA) y ser el punto de contacto con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para el correcto control de las zoonosis alimentarias (AESAN, 2021a). En la Tabla 2 se muestran los resultados de los análisis llevados a cabo en alimentos en 2019.

Tabla 2. Resultados de análisis de alimentos por agente zoonótico en 2019 (Fuente: adaptado de AESAN, 2021b).

Agente zoonótico	Número de muestras analizadas	Porcentaje de resultados positivos
<i>Listeria</i> spp.	10.878	5,46
<i>Salmonella</i> spp.	20.471	4,27
<i>Campylobacter</i> spp.	2.400	24,83
<i>Yersinia</i> spp.	220	26,82
STEC	1.443	12,96

El análisis detallado de la Tabla 2, por lo que respecta a las muestras positivas asociadas a cada microorganismo implicado, por categoría de alimentos, son las siguientes (AESAN, 2021b):

- *Listeria* spp.: la categoría con mayor porcentaje de muestras positivas fue la carne, concretamente la mezcla de carnes (14,75%), carne de aves (14,29%), carne de porcino (13,45%), carne de caza (9,09%) y carne de bovino (8,41%).
- *Salmonella* spp.: la categoría de alimento con mayor porcentaje de muestras positivas fue la carne de caza (50%) y la carne de pollo (17,36%). También se encontraron resultados positivos en muestras de semillas secas (29,41%) y preparados infantiles (16,30%).

- *Campylobacter* spp.: la categoría de alimento con mayor porcentaje de muestras positivas fue la carne de aves, más concretamente, la carne de pavo (44,83%) y la carne de pollo (36,93%).
- *Yersinia* spp.: la categoría de alimento que presentó un mayor porcentaje de muestras positivas a este microorganismo fue la carne de otras aves distintas a la carne de pollo y pavo (83,33%), seguido de la carne de pollo (42,31%).
- STEC: la categoría de alimento con mayor porcentaje de muestras positivas fue en carnes, concretamente en la carne de ovino (84,77%), carne de otras aves distintas de pollo y pavo (16,67%) y carne de caprino (14,29%).

2.2. Microorganismos patógenos de importancia en las industrias alimentarias

2.2.1. *Listeria* spp.

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son microorganismos con forma de bacilo corto o cocobacilo (de 0,4 µm por 1-1,5 µm, aproximadamente), Gram-positivas que tienden a formar cadenas de entre tres y cinco células, no esporuladas, sin cápsula y móviles a temperaturas de entre 10 y 25 °C por la presencia de flagelos peritricos (Madigan, 2009; Saludes *et al.*, 2015). Estas bacterias son microaerófilas (capaces de crecer en presencia de bajas concentraciones de oxígeno) y anaerobias facultativas, así como psicrotrofas (pueden crecer a temperaturas de refrigeración), productoras de la enzima catalasa pero no productoras de oxidasa (Capita González, 2009). Reaccionan positivamente a las pruebas de Voges-Proskauer y rojo de metilo. Hidrolizan la esculina, pero no lo hacen con la urea ni la gelatina, tampoco producen indol ni SH₂, pero si producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares. El contenido de guanina en su ADN es bajo, de entre 36% y 38%.

Actualmente, hay reconocidas 26 especies del género *Listeria*: 6 especies “clásicas” y 20 descritas a partir de 2010 (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2021). Dentro de las 6 especies tradicionales, *L. monocytogenes* es la responsable de la inmensa mayoría de los casos de listeriosis, tanto humana como animal.

El descubrimiento de esta bacteria data del año 1926, cuando tres microbiólogos (Murray, Webb y Swann), estudiando una epizootia que afectaba a los animales de su laboratorio en la Universidad de Cambridge, encontraron una bacteria hasta entonces desconocida, capaz de producir en los conejos un extraño trastorno caracterizado por fiebre y monocitosis. La denominaron *Bacterium monocytogenes*. Posteriormente, distintos investigadores aislaron la

misma bacteria y le dieron diferentes nombres; hasta que en 1957 el alemán Heinz Seeliger, conocido taxónomo, impuso el nombre de *Listeria monocytogenes*, en honor de Lord Lister (iniciador de la antisepsia), que se utiliza hasta hoy (Sánchez Hernández, 2016).

La listeriosis es una enfermedad que presenta una elevada tasa de mortalidad (20-30%), la más elevada del conjunto de enfermedades transmitidas por alimentos, y que afecta a sectores poblacionales de elevada susceptibilidad (Sánchez Hernández, 2016). Durante el año 2020 se notificaron 1.876 casos de listeriosis invasiva en seres humanos en la Unión Europea, con una tasa de notificación de 0,42 casos por 100.000 habitantes (EFSA y ECDC, 2021). El grupo etario más afectado por la enfermedad fue el de los mayores de 64 años, particularmente el grupo con más de 84 años. La tasa de mortalidad fue alta, de un 15,6%, lo que hace que la listeriosis sea una de las enfermedades de transmisión alimentaria más graves en la UE. Las personas que presentan alto riesgo de poder contraerla son: mujeres embarazadas, recién nacidos, inmunodeprimidos, personas con neoplasias, diabetes, enfermedades renales, SIDA, aquéllos que están en tratamiento con corticoesteroides y pacientes de edad avanzada (Sánchez Hernández, 2016).

En base a los antígenos somáticos y flagelares de *L. monocytogenes*, se han descrito 4 serogrupos (1/2, 3, 4 y 7) y 13 serovares. No obstante, la mayoría (entre el 50 y el 70%) de los brotes y casos esporádicos de enfermedad humana se deben al serovar 4b. Este hecho, unido a su escasa detección en muestras ambientales o de origen alimentario, hace pensar en una posible adaptación de este serovar al hombre. La circunstancia de que cepas del serovar 4b se aislen con frecuencia tanto del intestino de portadores asintomáticos humanos como de aguas residuales apoya la hipótesis señalada. A su vez, los serovares 1/2a y 1/2b, abundantes en muestras de origen ambiental, también se asocian con relativa frecuencia a los procesos de enfermedad humana. Los tres serovares mencionados provocan, en su conjunto, más del 90% de las listeriosis humana y animal (Ryser y Marth, 2007).

Como se ha indicado, *L. monocytogenes* es una bacteria ubicua que se puede encontrar en cualquier reservorio presente en el medio ambiente, aunque posee especial relevancia su presencia en diferentes matrices alimentarias, predominando en productos listos para el consumo (RTE, *Ready To Eat*) y, más concretamente, en productos derivados de la pesca (pescados ahumados), seguido de quesos de pasta blanda y semi-blanda, productos cárnicos listos para el consumo y otros tipos de productos lácteos (EFSA y ECDC, 2019). La presencia de dicho microorganismo en la Industria Alimentaria es un problema importante ya que, debido a su naturaleza psicrotrofa, posee una gran facilidad para multiplicarse, promoviendo la formación de biofilms en los equipos e instalaciones de los entornos de procesamiento de alimentos.

Listeria ivanovii se ha descrito en ocasiones como el agente etiológico de la listeriosis humana. Sólo se conocen 40 casos de *L. ivanovii* en humanos en el periodo 1971-2007, afectando concretamente a los grupos considerados más vulnerables, destacando en los últimos años únicamente 3 casos, asociados a personas mayores de 60 años y a una mujer embarazada. Esta especie del género *Listeria* se aísla de forma ocasional de animales o entornos ambientales, lo que sugiere su distribución limitada en la naturaleza, por lo que los casos de listeriosis provocados por *L. ivanovii* son esporádicos (Guillet *et al.*, 2010).

2.2.2. Otros microorganismos

2.2.2.1. *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* está formado por un grupo de bacterias muy diverso que colonizan el intestino de animales y humanos. Son bacilos Gram-negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, aerobios o anaerobios facultativos, móviles (presentan flagelos peritricos), fermentadores de glucosa, maltosa y manitol, pero no lactosa ni sacarosa. Poseen antígeno somático (O), antígeno flagelar (H) y pueden tener antígeno de virulencia (Vi), siendo este último un polisacárido termolábil localizado en la cápsula (Nair *et al.*, 2018; SEIMC, 2008).

Salmonella enterica tiene más de 2.300 serotipos diferentes. En el esquema de Kaufmann-White, varios serotipos de *Salmonella* se clasifican dentro de diferentes serogrupos, basados en un antígeno mayor y uno o más antígenos somáticos menores. Se han identificado 6 genogrupos (sub-especies), sin embargo, casi todos los serotipos importantes como causa de patologías infecciosas en humanos pertenecen al subgrupo 1. Los serotipos causantes de enteritis varían según la localización geográfica, siendo los más frecuentes en enfermedades transmitidas por alimentos los serotipos *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (SEIMC, 2008).

La salmonelosis es, en nuestro país, una de las enfermedades zoonóticas con mayor implicación en la salud pública, más frecuentes y de mayor impacto económico, por lo que son necesarias estrategias y programas de control para reducir la prevalencia de determinados serotipos (los de importancia en Salud Pública) en el ámbito de Sanidad Animal (MAPA, 2021).

La transmisión se efectúa por el consumo de alimentos de origen animal contaminados, fundamentalmente la carne de aves, huevos, ganado vacuno y porcino, frutas, verduras, e incluso los alimentos procesados, como las “mantequillas” de frutos secos, los pasteles de carne congelados, y los procesados de carne de aves (empanados, rellenos...), entre otros (CDC, 2020). También se puede transmitir a partir de portadores asintomáticos que manipulan

y contaminan alimentos; no es infrecuente la transmisión persona-persona, destacando guarderías y hospitales. La infección causada por este microorganismo se localiza en el íleon y colon por penetración de las células epiteliales y migración hasta la lámina propia, lo que da lugar a una respuesta inflamatoria (SEIMC, 2008). Muchas veces la infección es autolimitante, aunque, en algunos casos, puede acompañarse de bacteriemia transitoria, sobre todo en lactantes y ancianos. En los casos no complicados, la gastroenteritis por *Salmonella* tiene una duración de entre 4 y 7 días sin tratamiento con antibióticos (CDC, 2020). Sin embargo, y, debido a riesgo de complicaciones severas, se indica tratamiento antibiótico en los recién nacidos, pacientes de edad avanzada, inmunodeprimidos y portadores de prótesis artificiales (SEIMC, 2008).

La resistencia a los antibióticos en patógenos transmitidos por alimentos como *Salmonella* es una de las principales preocupaciones para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública. En los Estados Unidos se han aislado cepas de *Salmonella* no tifoidea procedentes de brotes alimentarios y se observaron múltiples resistencias a tetraciclina, ácido nalidíxico, ampicilina y estreptomina, entre otros. Todo ello indica la frecuente participación de *Salmonella* resistente a los antibióticos en la cadena alimentaria, lo que requiere la exploración de nuevas intervenciones, diferentes a los antibióticos, para contrarrestar el efecto de la multiresistencia (Nair *et al.*, 2018).

2.2.2.2. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA)

Staphylococcus aureus es un microorganismo Gram-positivo y perteneciente a la familia *Staphylococcaceae*. Presenta forma de coco y puede aparecer en parejas, cadenas cortas o en forma de racimo. Su tamaño oscila entre 0,8 y 1,5 μm de diámetro, es inmóvil y algunas cepas producen una cápsula externa mucoide que aumenta su capacidad para producir infección. En cuanto a su metabolismo, es un microorganismo anaerobio facultativo, productor de coagulasa y catalasa, oxidasa negativo y productor de ácido a partir de glucosa (INSHT, 2012; Madigan, 2009). Es una bacteria ubicua, considerada parte de la microbiota habitual del ser humano, localizada en la piel de las personas sanas. La contaminación de los alimentos tiene su origen en la manipulación de éstos. La presencia de esa bacteria en el ser humano y su hábitat (piel, nariz y garganta), facilita la contaminación, por lo que es imprescindible el uso de guantes y mascarillas por parte de los manipuladores de alimentos.

Muchas de las cepas β -hemolíticas coagulasa positivas son patógenas, y algunas elaboran una enterotoxina que produce intoxicaciones alimentarias. Una de las que se da con mayor frecuencia es la originada por la ingestión de la enterotoxina que se forma en los alimentos cuando se multiplican en éstos ciertas cepas de *S. aureus*. Entre sus efectos en el

ser humano se encuentra la producción de gastroenteritis por inflamación de la mucosa que reviste el tracto gastrointestinal. Algunos cocos productores de toxina son muy halotolerantes (toleran concentraciones de NaCl del 10% al 20%), y también toleran bastante bien los nitritos, de aquí que, si las condiciones del medio son favorables, sean capaces de crecer en las soluciones de adobado y en la superficie de las carnes en adobo o adobadas. También toleran bastante bien los azúcares disueltos. Son fermentativos y proteolíticos, aunque en la mayoría de los alimentos no suelen producir olores repugnantes ni los convierte en alimentos de aspecto desagradable. El intervalo de temperaturas dentro del cual tienen lugar la multiplicación y la producción de toxina está comprendido entre los 4 °C y 46 °C (Frazier y Westhoff, 1993).

Debido a la resistencia que presentaba *S. aureus* a algunos β -lactámicos como la bencilpenicilina, se logró en el año 1959 la síntesis de metilicina, compuesto al que la bacteria también adquirió, posteriormente, resistencia en el ámbito clínico. Esta resistencia se produjo por la expresión de una proteína adicional de unión a la penicilina (PBP2a), adquirida de otra especie, que era resistente a la acción del antibiótico y no por la producción de β -lactamasas, como era habitual. El uso de diferentes tipos de antibióticos a lo largo de los años ha llevado a la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a la metilicina (MRSA). Ahora estamos en una situación en la que, en algunos casos, el antibiótico glucopéptido vancomicina, es la única opción para la terapia antimicrobiana para combatir los casos graves de infección por MRSA (Stapleton y Taylor, 2002).

2.2.2.3. *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (VRE)

Los enterococos son bacterias Gram-positivas que forman parte de la flora intestinal normal de la mayoría de los seres humanos (Kafil y Asgharzadeh, 2014). Las bacterias del género *Enterococcus* pueden presentarse de forma individual, en pares o formando cadenas ramificadas. Son microorganismos anaerobios facultativos y presentan un rango óptimo de crecimiento entre 30 y 35 °C. Todas las especies son capaces de multiplicarse con un 6,5% de NaCl e hidrolizan la esculina en la presencia de sales biliares. Son organismos catalasa negativos, pero en algunas ocasiones pueden llegar a producir la enzima, el ácido láctico es el producto final de la fermentación de la glucosa y pueden ser alfa, beta o gamma hemolíticos (Herrera *et al.*, 1998). En las últimas 2 décadas, varios informes han documentado que dos de las especies, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, se encuentran entre las principales causas de varias infecciones humanas, incluyendo bacteremia, septicemia, endocarditis, infecciones del tracto urinario, infecciones por heridas, sepsis neonatal y meningitis (Kafil y Asgharzadeh, 2014).

Los enterococos se caracterizan por presentar resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos (β -lactámicos, lincosaminas, aminoglucósidos y trimetoprim-sulfametoxazol) y por su capacidad para adquirir nuevas resistencias (SEIMC, 2001). Para los organismos Gram-positivos se han descrito varias formas de crear resistencia a la vancomicina. Hay diferentes genes que confieren resistencia a la vancomicina, siendo *vanA* el tipo más predominante a nivel mundial. Se ha producido el desarrollo de un fenotipo *vanA* que confiere resistencia conjunta a la vancomicina y a la teicoplanina con concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) mayores o iguales a 64 μ g de compuesto activo y se asocia principalmente con *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (Herrera *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2014).

De acuerdo con lo establecido por el Reglamento UE n° 797/2013 relativo a la autorización de un preparado de *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 como aditivo en la alimentación de terneros de cría y engorde y de lechones destetados (DOUE, 2013a), se promueve el uso de estos microorganismos con fines beneficiosos, pero que pueden generar mecanismos de aparición de futuras resistencias a algunos antimicrobianos y ser por tanto un potencial peligro a nivel de Salud Pública si se producen manipulaciones incorrectas de los animales como en el faenado de las canales y una ruptura de intestinos, entre otros, que facilitan la diseminación al medio ambiente de cepas resistentes a algún antimicrobiano.

2.2.3. Métodos de detección y cuantificación de microorganismos patógenos

En Seguridad Alimentaria, todas las normas internacionales de calidad alimentaria se basan en la determinación de microorganismos patógenos utilizando métodos de cultivo tradicionales. Los métodos microbiológicos estándar que se utilizan habitualmente para el aislamiento de microorganismos patógenos en alimentos u otros materiales suelen requerir dos pasos de enriquecimiento en medios líquidos y un aislamiento adicional en un medio selectivo sólido (Barocci *et al.*, 2008; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2013). Una alternativa a los métodos convencionales de detección de patógenos transmitidos por los alimentos son las técnicas moleculares, como los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), habiéndose mostrado prometedores en el diagnóstico microbiano durante las últimas décadas debido a su rapidez y mayor precisión en comparación con los métodos tradicionales (Ryu *et al.*, 2013).

El método denominado reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utiliza una enzima ADN polimerasa termoestable de la bacteria *Thermus aquaticus*. Después de la desnaturalización térmica del ADN de doble hebra, los oligonucleótidos, denominados cebadores, se hibridan con las hebras simples de ADN y éstos determinan el punto de partida para la replicación del ADN por la enzima polimerasa. Se trata de una técnica rápida, sensible

y fiable para la amplificación de una secuencia diana de ácido nucleico (Harris y Griffiths, 1992). Recientemente, han surgido modificaciones de esta tecnología, algunas de las cuales permiten la detección rápida de múltiples patógenos en una sola prueba. Se utilizaron métodos de PCR multiplex y PCR en tiempo real para detectar, cuantificar e identificar diferentes microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos, debido a su alta sensibilidad, ahorro de tiempo y de dinero (Liu *et al.*, 2012; Ryu *et al.*, 2013).

En la PCR en tiempo real (también denominada PCR cuantitativa - qPCR; el uso de RT-PCR es inapropiado ya que esta abreviatura está dedicada a la PCR de transcripción inversa), la fluorescencia se mide después de cada ciclo y la intensidad de la señal fluorescente refleja la cantidad momentánea de amplicones de ADN en la muestra en ese momento específico. En los ciclos iniciales, la fluorescencia es demasiado baja para poder detectarse. Sin embargo, el punto en el que la intensidad de la fluorescencia aumenta por encima del nivel detectable corresponde proporcionalmente al número inicial de moléculas de ADN molde en la muestra. Este punto se denomina ciclo de cuantificación y permite la determinación de la cantidad absoluta de ADN diana en la muestra de acuerdo con una curva de calibración construida a partir de muestras estándar diluidas en serie (generalmente diluciones decimales) con concentraciones conocidas o números de copia (Kralik y Ricchi, 2017). Las principales ventajas de la qPCR son que proporciona una detección y cuantificación rápida y de alto rendimiento de las secuencias de ADN diana en diferentes matrices. El menor tiempo de amplificación se ve facilitado por la amplificación y visualización simultáneas de amplicones de ADN recién formados. Además, la qPCR es más segura en términos de evitar contaminaciones cruzadas porque no se requiere ninguna manipulación adicional con las muestras después de la amplificación. Otras ventajas de la qPCR incluyen un amplio rango dinámico para la cuantificación de un intervalo entre 7 y 8 niveles en \log_{10} (Klein, 2002).

Los ensayos de qPCR se utilizan no solo para la detección, sino también para determinar la presencia de genes y alelos específicos, por ejemplo, tipificación de cepas y aislamientos, perfiles de resistencia a los antimicrobianos, producción de toxinas, etcétera. Sin embargo, la mera presencia de genes responsables de la resistencia a los compuestos antimicrobianos o la producción de toxinas fúngicas no significa automáticamente su expresión o producción. Por lo tanto, aunque las pruebas de tipificación basadas en qPCR son más rápidas, sus resultados deben correlacionarse con pruebas fenotípicas y bioquímicas (Kralik y Ricchi, 2017; Levin, 2012; Sekyere *et al.*, 2015).

3. BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

3.1. Concepto y etapas de formación de las biopelículas

El concepto de biopelículas o biofilms ha ido evolucionando considerablemente desde su descubrimiento hasta nuestros días, de modo que aún no está del todo definido cuál sería la acepción más adecuada. El descubrimiento de este fenómeno fue descrito por primera vez por Van Leeuwenhoek, quien observó que los microorganismos se anclan y crecen de forma universal en superficies expuestas, lo que dio lugar a estudios que revelaron la presencia de microorganismos adheridos a una superficie (biopelículas). Sin embargo, autores como Heukelekian y Heller (1940) y Zobell (1943) observaron que tanto el crecimiento como la actividad bacteriana mejoran con la presencia de una superficie a la que los microorganismos puedan adherirse, siendo la población mayor en las superficies con respecto al medio circulante.

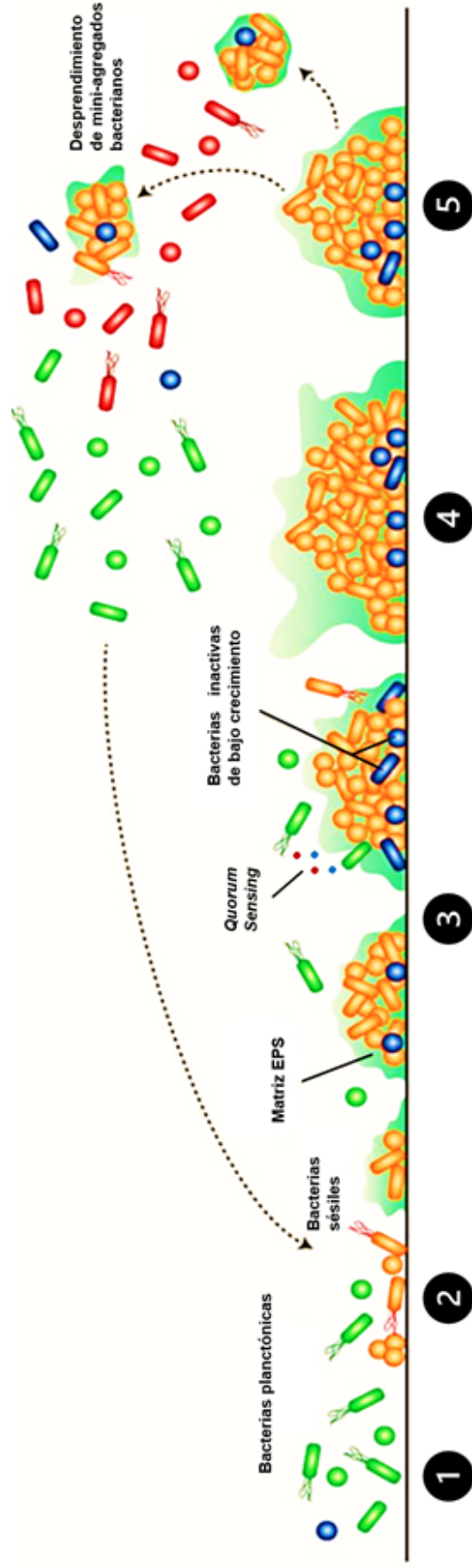
Un biofilm es un conjunto de células microbianas asociadas irreversiblemente (no se eliminan por frotado) a una superficie y embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares sintetizadas por ellas mismas y compuesta principalmente por polisacáridos, siendo éste el modo predominante de crecimiento microbiano en la naturaleza (Díez-García *et al.*, 2012; Donlan, 2002).

El crecimiento y desarrollo bacteriano formando biofilms se considera como una forma de protección en ambientes hostiles, lo que permite su supervivencia y, a su vez, la colonización de nuevos nichos por mecanismos de dispersión. Se conoce que las bacterias capaces de desarrollar biofilms pueden formar estructuras complejas con canales que permiten la circulación de nutrientes. Además, dependiendo de la región del biofilm donde se encuentren, las células bacterianas pueden presentar distintos patrones de expresión génica (Fessia y Dieser, 2018). Las bacterias que se encuentran dentro del biofilm, también denominadas bacterias sésiles, se encuentran en una fase estacionaria o latente de crecimiento y exhiben fenotipos distintos a los de las bacterias planctónicas. Esto hace que las biopelículas sean un problema importante de Salud Pública, ya que entre el 60% y el 80% de las infecciones microbianas humanas son causadas por bacterias que se desarrollan en biopelículas (Crouzet *et al.*, 2014).

Las bacterias que son capaces de crecer en estas comunidades complejas presentan características comunes: las células se encuentran unidas por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) compuesta principalmente por exopolisacáridos y proteínas, desarrollan biofilms en respuesta a señales extracelulares, tanto ambientales como del microorganismo, y se encuentran protegidas de una amplia gama de sustancias externas

nocivas para ellas, como son biocidas o antibióticos (Fessia y Dieser, 2018). Se ha demostrado que las bacterias que se presentan formando parte de las biopelículas son hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que las células de vida libre o planctónicas, y los patrones de expresión de genes y proteínas se ven alterados respecto a estas últimas (O'Toole *et al.*, 2000).

Las biopelículas pueden formarse en una amplia variedad de superficies, incluyendo tejidos vivos, dispositivos médicos, tuberías de sistemas de agua industrial o potable, o incluso sistemas acuáticos naturales (Donlan, 2002). La formación de estos biofilms es motivo de gran preocupación en las industrias alimentarias, ya que proporciona como resultado elevados costes operativos y de mantenimiento (disminución de la transferencia de calor y eficacia operativa en los equipos intercambiadores de calor, taponamientos de filtros y bloqueos de tubos en los sistemas de distribución de líquidos, aumento del consumo de energía y aceleración del deterioro de las superficies) (Capita *et al.*, 2014). La formación de biopelículas confiere muchas ventajas a las células microbianas en el entorno de la industria alimentaria, como la resistencia física (contra la desecación), la resistencia mecánica (contra las corrientes líquidas en tuberías) y la protección química (contra productos químicos, antimicrobianos y desinfectantes utilizados en la industria) (Flemming *et al.*, 2016). La presencia de biopelículas en una fábrica de alimentos supone un peligro para la salud humana. El riesgo depende de las especies bacterianas que forman esta estructura viva tridimensional. Las principales ubicaciones para el desarrollo de biopelículas dependen del tipo de fábrica, pero pueden incluir tuberías, placas de pasteurizadores, membranas de ósmosis inversa, mesas, guantes de empleados, canales de animales, superficies de contacto, silos de almacenamiento para materias primas y aditivos, tubos de dosificación, o material de embalaje, entre otros (Camargo *et al.*, 2017).



1. **Adsorción de moléculas orgánicas y acondicionamiento de la superficie:** recubrimiento de un sustrato sólido por una película de moléculas orgánicas presentes en el fluido. Las células colonizadoras generan una capa basal de microcolonias de anclaje que favorecen el desarrollo de la nueva biopelícula.

2. **Adhesión reversible:** interacción débil entre los microorganismos y la superficie. Tanto los que tienen propiedades de movilidad (presencia de flagelos o fimbrias) como los que carecen de ellos, son capaces de realizar el proceso de adhesión celular. Durante esta etapa las células presentan mayor susceptibilidad a los agentes externos (antibióticos, biocidas, etc) que en etapas posteriores. Las fuerzas hidrofóbicas, electrostáticas o de Van der Waals no son suficientes para mantener las células unidas.

3. **Adhesión irreversible.** Comunicación célula-célula y producción de la matriz EPS; se caracteriza por la presencia de la matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que actúan como adhesivos produciendo enlaces fuertes entre bacterias o bacterias-sustrato. Además, existen fuerzas de corto alcance como dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno, iónicos, covalentes e hidrofóbicos que ayudan a la adhesión irreversible. Las bacterias comienzan a formar microcolonias y a comunicarse y coordinarse entre sí mediante la capacidad para reconocer la densidad de la población a partir de la producción de moléculas señal de bajo peso molecular (*Quorum Sensing*, QS). Para su eliminación en esta etapa, se requiere del uso de potentes sustancias detergentes, desinfectantes, surfactantes, altas temperaturas, entre otras estrategias.

4. **Maduración de biofilm:** Comienza el desarrollo de una estructura organizada, aproximadamente 10 días después de la colonización del sustrato. Los microorganismos dentro de la biopelícula no se distribuyen uniformemente y aumenta el tamaño de la biopelícula debido a la deposición o fijación de los solutos orgánicos e inorgánicos. En esta etapa es cuando la biopelícula presenta mayor resistencia a los compuestos químicos de eliminación.

5. **Desprendimiento celular:** Permite que las células regresen a su forma planctónica debido al escaso acceso de algunas de ellas a los nutrientes, así como la acumulación de posibles sustancias tóxicas en la matriz, lo que conlleva a la colonización de nuevos nichos.

Figura 12. Etapas de formación de un biofilm bacteriano (Fuente: adaptada de Aumeran et al., 2020).

3.2. Estructura de las biopelículas

3.2.1. Factores que influyen en la estructura: biofilms mixtos

En la naturaleza, el modo de vida predominante de los microorganismos es en forma de biopelículas formadas habitualmente por más de una especie. Dado que se encuentran tanto en entornos clínicos como industriales, se puede suponer que las interacciones sinérgicas entre especies predominan sobre las antagónicas, particularmente las sinergias que facilitan la convivencia (Elias y Banin, 2012). La presencia de más de una especie bacteriana en un biofilm tiene importantes ventajas ecológicas porque puede facilitar la fijación de la biopelícula a una superficie. Para algunas especies, esto puede ocurrir incluso en ausencia de fimbrias especializadas (Galié *et al.*, 2018).

Entre especies que forman parte de comunidades microbianas se producen interacciones complejas. Algunas de éstas pueden ser beneficiosas para uno o todos los grupos que interactúen en el biofilm mixto, y otras pueden ser perjudiciales o no tener ninguna influencia en ninguno de los grupos bacterianos. Las interacciones entre especies pueden tener grandes impactos en las etapas iniciales de formación y desarrollo de las biopelículas. Los microorganismos residentes interactúan entre sí de forma sinérgica, neutra o competitiva, lo que puede afectar tanto a la biomasa como a la funcionalidad y resistencia de las biopelículas (Zhu *et al.*, 2020). Las biopelículas de dos especies podrían ser más estables y tener mayor biomasa que las de una sola especie debido a las interacciones entre las especies. Sin embargo, pueden existir numerosas interacciones competitivas que resultan en una disminución de la productividad del biofilm para todos o algunas especies de las que interactúan.

También se producen interacciones metabólicas cooperativas entre microorganismos. Se ha observado que algunas especies bacterianas pueden modificar el microambiente local haciéndolo más adecuado para el crecimiento de otros organismos, por ejemplo, modificando el pH o la concentración de oxígeno. Por lo tanto, los microorganismos que son capaces de utilizar el oxígeno podrían favorecer el crecimiento de microorganismos anaerobios cercanos (Stewart y Franklin, 2008).

Las interacciones competitivas comunes pueden consistir en antagonismo, para limitar las fuentes de nutrientes, oxígeno y espacio disponible para colonizar el sustrato. Un factor importante que determina la composición bacteriana de un biofilm es la disponibilidad de nutrientes. Así, numerosos datos experimentales obtenidos en el laboratorio muestran cómo diferentes microorganismos pueden superar eficazmente a otros como resultado de una mejor utilización de una fuente de energía determinada (Giaouris *et al.*, 2015). La competencia

también puede hacerse a través de la producción de compuestos (por ejemplo, bacteriocinas, ácidos orgánicos, biosurfactantes, enzimas) que pueden inactivar, inhibir el crecimiento, o prevenir la unión de otras especies o incluso provocar el desprendimiento de sus células de las estructuras de las biopelículas (Rendueles y Ghigo, 2012). Las biopelículas mixtas muestran una mayor resistencia a los desinfectantes (como los compuestos de amonio cuaternario y otros biocidas) que los biofilms formados por una sola especie (Giaouris *et al.*, 2015).

Dado que la mayoría de los microorganismos patógenos transmitidos por alimentos son capaces de formar biofilms y a su vez éstos pueden generar ciertos mecanismos de tolerancia a los biocidas, es necesaria la optimización de técnicas novedosas (alternativas a las sustancias químicas) para controlar este tipo de crecimiento bacteriano. Estas técnicas incluyen la inhibición de formación de biofilms, interrupción de su crecimiento, la tecnología de obstáculos, la tecnología basada en fagos, el agua electrolizada, los aceites esenciales, las modificaciones de las superficies de contacto, los agentes fotosensibles, las interferencias en los sistemas de comunicación bacteriana o *Quorum Quenching* (QQ) y compuestos antibiofilm, entre otros (Jahid y Ha, 2014).

3.2.2. Heterogeneidad fisiológica y fenotípica

Las biopelículas están compuestas por una gran variedad de microorganismos diferentes que, como se comentó con anterioridad, pueden ser de la misma o de distinta especie (Nivens *et al.*, 1995). En general, la microbiota dominante en las superficies de las industrias alimentarias está constituida por bacterias Gram negativas, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Psychrobacter* y *Stenotrophomonas*, especialmente en industrias con ambiente de producción húmedo, como las plantas de procesamiento de carne, pescado y productos frescos. Las bacterias Gram-positivas son más prevalentes en las industrias lácteas y entornos de producción seca, siendo las bacterias ácido-lácticas, *Staphylococcus* y *Bacillus* los grupos microbianos más comunes (Fagerlund *et al.*, 2021).

Las colonias que forman el biofilm bacteriano se encuentran separadas unas de otras por vacíos intersticiales comúnmente conocidos como canales de agua. El flujo de líquido se produce en estos canales permitiendo la difusión de nutrientes, oxígeno e incluso agentes antimicrobianos. Este concepto de heterogeneidad se ha descrito no solamente para cultivos mixtos, sino también para biofilms de cultivo puro, que se encuentran frecuentemente en dispositivos médicos y que pueden ir desde una monocapa irregular de células hasta una biopelícula de varias capas de espesor que contiene canales de agua (Donland, 2002). Algunos estudios han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y

presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm se puedan encontrar diferentes ambientes con distintas concentraciones de nutrientes, pH o nivel de oxígeno. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad del estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio (Lasa *et al.*, 2005). Los cultivos puros de una sola especie pueden presentar menor espesor que un biofilm con dos especies, lo que lleva a pensar que una especie mejora, en ocasiones, la estabilidad de la otra.

3.3. Comunicación intra-biofilm

3.3.1. Quorum Sensing

La unidad estructural básica del biofilm es la microcolonia. La proximidad de las células dentro de la microcolonia (o entre microcolonias) proporciona un entorno ideal para la creación de un gradiente de intercambio de nutrientes, genes y detección del *quorum* (Donland, 2002).

Se ha demostrado que la señalización de célula a célula desempeña un papel importante en el apego celular y el desprendimiento del biofilm (Donland, 2002). El *Quorum Sensing* (QS) es un proceso de comunicación de célula a célula que depende de las moléculas de señalización extracelulares secretadas por bacterias, llamadas autoinductoras. Todos los sistemas QS bacterianos consisten en moléculas de señalización, moléculas de detección, y proteínas reguladoras. Cuando el número de proteínas alcanza cierto umbral, las moléculas autoinductoras se unen a los receptores QS que se encuentran en la superficie bacteriana. Tras la internalización, los receptores se unen a los dominios de unión de los genes correspondientes para regular las funciones fisiológicas que las células individuales no pueden realizar de forma independiente, lo que conduce a un bucle de retroalimentación que promueve el desarrollo sincronizado de poblaciones bacterianas (Deng *et al.*, 2020; Melissa y Bonnie, 2001; Rutherford y Bassler, 2012). El QS puede dar como resultado cambios cooperativos en la expresión génica bacteriana (como puede ser la expresión de factores de virulencia) y comportamientos bacterianos (formación de biofilms) (Whiteley *et al.*, 2017).

Las bacterias que se encuentran formando parte de un biofilm se comunican entre sí utilizando una sustancia química llamada Homoserina Lactona (HLS). Si la concentración de HLS en un biofilm joven es baja, éste no será patógeno en términos generales; sin embargo, un biofilm maduro ha tenido tiempo suficiente como para engrosar su estructura, aumentar su población bacteriana y, por tanto, sus concentraciones de HLS. Una vez que las colonias bacterianas detectan que se ha alcanzado una masa crítica, se produce la activación del gen

de detección de QS. Esto sucede cuando la población bacteriana alcanza ciertos niveles de *quorum* y desencadena la activación de genes que comenzarán a expresar factores de virulencia como lipasas, proteasas y toxinas citolíticas, entre otros (Henry Perry, 2018).

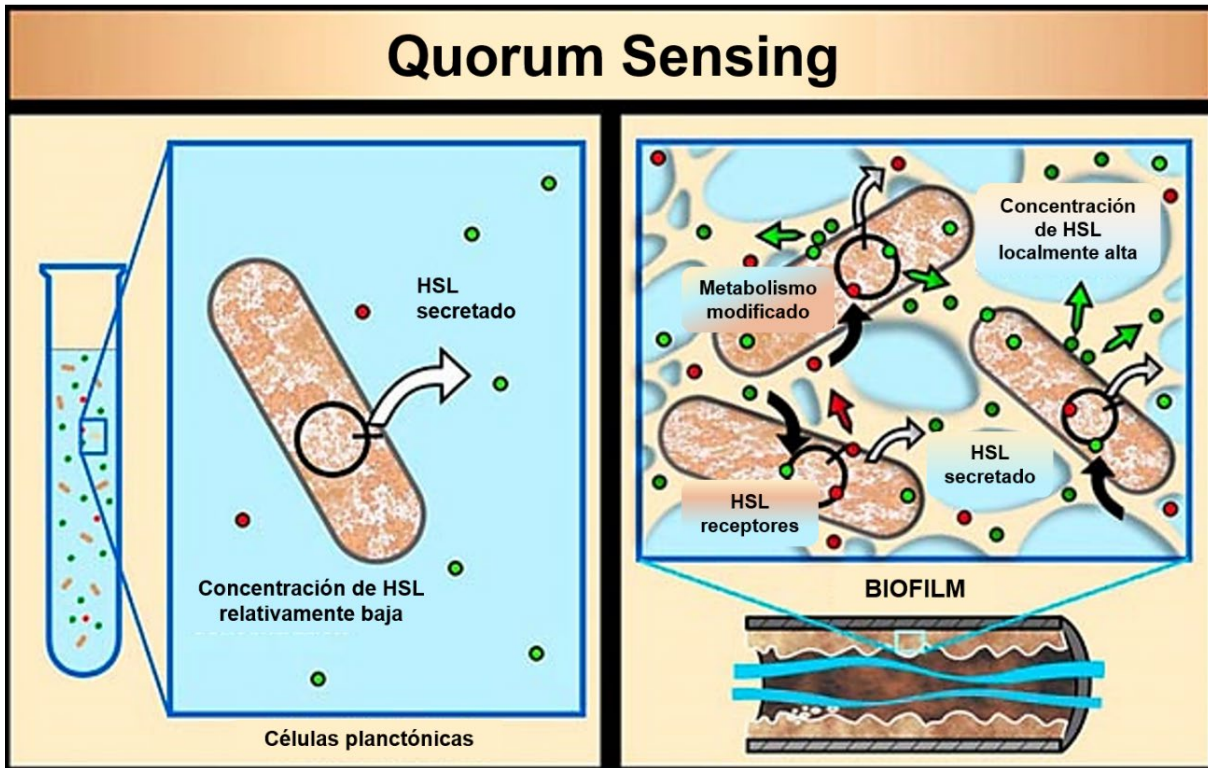


Figura 13. Esquema de detección del *quorum sensing* (QS) y desarrollo de dos tipos de estados bacterianos: células planctónicas (izquierda) y biofilms (derecha) (Fuente: adaptada de Cunningham *et al.*, 2008).

3.3.2. Capacidad adaptativa (estado viable no cultivable)

El estado celular “viable pero no cultivable” (VBNC) se describió por primera vez por Xu *et al.* (1982), quienes encontraron microorganismos (*E. coli* y *V. cholerae*) en este estado. El estado viable no cultivable ha demostrado ser la estrategia de supervivencia bacteriana en respuesta a la presión selectiva natural, incluyendo temperaturas extremas, falta de nutrientes, alta presión osmótica, o exposición a la luz visible, entre otros factores. Cuando las bacterias entran en este estado, pierden su capacidad de multiplicarse, pero conservan algunas actividades esenciales de las células, por lo que pueden recuperarse si se encuentran en las condiciones apropiadas. Las bacterias VBNC representan una amenaza potencial para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública ya que, en parte, se trata de microorganismos vivos que mantienen cierta actividad metabólica y pueden llegar a recuperar su estado fisiológico habitual (Li y Zhao, 2020; Lv *et al.*, 2021).

Existen muchas condiciones que inducen a las células a entrar en este estado para sobrevivir. Los factores físicos incluyen, principalmente, la temperatura, luz visible, presión osmótica, luz ultravioleta, entre otros; entre los factores químicos destacan el pH, iones de cobre, sustancias antibióticas, dióxido de azufre, cloro, etc. (Li y Zhao, 2020).

3.4. Estudio de los biofilms mediante técnicas de microscopía

Existen diversas técnicas para el estudio de la estructura de los biofilms, tanto mixtos como formados por una sola especie bacteriana. La técnica más útil para diferenciar células viables de una o varias especies que formen parte de un biofilm son los métodos basados en medios de cultivo selectivos. Aunque los métodos basados en cultivos son sencillos para diferenciar entre diferentes microorganismos, su desventaja es que no todos crecen en estos medios. Los microorganismos que forman parte de un biofilm pueden cambiar su fenotipo y genotipo y un estado celular viable pero no cultivable puede conducir a una mala interpretación de los resultados. Para resolver este inconveniente, la metagenómica puede ser una alternativa para el estudio de la microbiota de los biofilms. Otro método alternativo para el estudio de la composición de los biofilms es la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (q-PCR) basada en técnicas de fluorescencia SYBR GREEN con cebadores específicos para cada tipo de microorganismo que pueda formar parte de la comunidad compleja microbiana (Jahid y Ha, 2014).

La microscopía láser confocal de barrido (CLSM) es una herramienta muy útil para el estudio de biofilms. Este método tiene varias ventajas, incluyendo la obtención de imágenes del biofilm en vivo en diferentes puntos, pudiendo obtenerse información acerca de la distribución espacial de los componentes del biofilm. Además, algunos colorantes fluorescentes pueden utilizarse para identificar la composición de la matriz (Heydorn *et al.*, 2000). La tecnología CLSM junto con un software de análisis de imágenes se puede utilizar para el estudio cuantitativo de la matriz del biofilm, así como la cantidad de biomasa adherida, la localización y las cantidades relativas de cada componente de la biomasa que compone la matriz. Además, se pueden estudiar los efectos espaciotemporales de diferentes ambientes y superficies de contacto, así como la aplicación de tratamientos antimicrobianos (Reichhardt y Parsek, 2019).

4. SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS COMÚNMENTE UTILIZADAS EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS

4.1. Biocidas

4.1.1. Uso de biocidas en las industrias alimentarias

Cuando una superficie ha sido limpiada previamente con los detergentes adecuados, es preciso que sea desinfectada, es decir, que los microorganismos que quedan en ella sean inactivados en su mayor parte. Si la superficie no ha sido limpiada correctamente o se ha realizado de forma insuficiente, la eficacia del desinfectante se ve reducida (Moreno García, 2006).

A continuación, se citan una serie de propiedades que debe reunir un buen desinfectante, aunque también en este caso son, en buena medida, ideales, ya que ningún desinfectante presenta todas las características (Moreno García, 2006):

- Fuerte acción biocida frente a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, virus, esporas de mohos y esporos bacterianos.
- Razonablemente estable en presencia de residuos orgánicos y con aguas duras.
- Muy estable en forma concentrada e incluso cierta estabilidad en forma diluida.
- Facilidad de arrastre por aclarado.
- No corrosivo.
- Escasa toxicidad y no irritante.
- No teñir las superficies ni dejar olores persistentes.
- No dejar residuos después del aclarado.
- Económico.

Debido a su poder corrosivo, toxicidad y producción de olores y colores, muchos buenos desinfectantes hospitalarios no pueden utilizarse en las industrias alimentarias, como son formaldehído, compuestos fenólicos o sales de metales pesados, entre otros. A continuación, se muestra la actividad microbiana que presenta cada familia de compuestos desinfectantes comúnmente utilizados en industrias alimentarias o en mataderos (Tabla 3), así como las ventajas e inconvenientes de sus usos y aplicaciones más comunes (Tabla 4).

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de algunos desinfectantes (Fuente: Moreno García, 2006).

Desinfectante	Bacterias		Levaduras	Mohos	Virus	Toxicidad
	Gram+	Gram-				
Aldehídos	+	+	+	+	+	Alta
Cloro	+	++	++	++	++	Media
Peróxido de hidrógeno	++	++	+	+	+	Baja
Ácido peracético	++	++	++	++	++	Baja
Compuestos de amonio cuaternario	++	+	++	+	Variable	Baja

4.1.2. Biocidas comúnmente utilizados para la limpieza y desinfección de superficies

4.1.2.1. Hipoclorito de sodio (HS)

Los hipocloritos son los compuestos incluidos en la familia de desinfectantes que liberan cloro más utilizados en las industrias de alimentos, por su bajo coste, su eficacia y facilidad de uso. El más clásico es el hipoclorito sódico (NaOCl), que es una combinación inestable de cloro y de NaOH. Se trata de un líquido concentrado que contiene 10-14% de cloro libre. El efecto biocida de los hipocloritos se debe fundamentalmente al ácido hipocloroso (HOCl) que forma en contacto con el agua, de manera que este último se disocia dando lugar a H⁺ y OCl⁻. La acción de los hipocloritos también depende del pH del medio (siendo más efectivo a pHs ácidos), de la temperatura de la solución, del tiempo de contacto y de la concentración de cloro libre (con 4 ppm se consigue un 90% de reducción en los recuentos de microbiota aerobia viable en un minuto). Estos compuestos son eficaces sobre una amplia gama de microorganismos, económicos y fáciles de usar, pero como contrapartida a los aspectos señalados son compuestos corrosivos, irritantes, se ven afectados por la materia orgánica, producen oxidación de los lípidos y decoloración. El mecanismo de acción se basa en la desnaturalización de las proteínas e inactivación de enzimas (Moreno García, 2006).

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de varios grupos de desinfectantes utilizados en las industrias alimentarias (Fuente: Moreno García, 2006).

Compuestos	Ventajas	Inconvenientes
Hipocloritos	Eficaces sobre una amplia gama de microorganismos Baratos Fáciles de usar	Corrosivos Pueden restar color a los productos Pueden oxidar los lípidos Se ven afectados por la materia orgánica Sabor/olor Irritan la piel
Amonios cuaternarios	No corrosivos No irritantes Sin sabor ni olor	No eficaces frente a bacterias Gram-negativas Forman films (difíciles de arrastrar) Pueden seleccionar especies de <i>Pseudomonas</i>
Yodóforos	No corrosivos Fáciles de usar No irritantes Amplio espectro de acción	Sabor/olor, aunque escaso Forman compuestos púrpuras con el almidón Moderadamente caros

De acuerdo con lo establecido por la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA, 2019a), el hipoclorito de sodio se encuentra aprobado para su uso en el Espacio Económico Europeo (EEE) y Suiza para diversos usos entre los que se incluyen la desinfección de alimentos y zonas de contacto (tipo de producto 4). Según el Reglamento de Ejecución (UE) N° 1273/2017 de la Comisión, el cloro libre activo del hipoclorito de sodio está aprobado como principio activo para su uso en productos biocidas tipo 1 (productos biocidas de higiene humana), 2 (desinfectantes de área privada y salud pública), 3 (productos biocidas

de higiene veterinaria), 4 (desinfectantes de áreas alimentarias y de alimentación) y 5 (desinfectantes de agua potable) cuando la concentración activa de cloro en solución acuosa es $\leq 18\%$ w/w (es decir, ≤ 180.000 ppm) (Capita *et al.*, 2019).

4.1.2.2. Cloruro de benzalconio (CB)

Los compuestos derivados del amonio cuaternario (*quaternary ammonium compounds*, QAC), son sales de amonio con algunos o todos los átomos del ión NH_4^+ sustituidos por grupos alquilo o arilo, siendo el anión, generalmente, un cloruro. La parte catiónica es hidrofóbica y el anión, hidrofílico y con radicales bencil. Entre algunas de sus propiedades favorables destacan que son incoloros, inodoros e insípidos y carecen de acción corrosiva, no son irritantes, presentan mayor estabilidad en presencia de materia orgánica que los compuestos de cloro, son tensioactivos, actúan a valores de pH superiores a 5, tienen buen poder de penetración y son eficaces frente a *L. monocytogenes*, entre otros aspectos. El mecanismo de acción germicida se relaciona con la inhibición de enzimas y la pérdida o salida de constituyentes celulares. Las moléculas de estos compuestos son adsorbidas y forman una capa monomolecular sobre la superficie de la pared bacteriana, interfiriendo en la función celular (Moreno García, 2006).

El cloruro de benzalconio (ECHA, 2019b), actualmente está siendo revisado para su uso en varios tipos de productos biocidas, incluidos los desinfectantes de superficies de contacto con alimentos, en la zona del Espacio Económico Europeo (EEE) y Suiza (Capita *et al.*, 2019).

4.1.2.3. Ácido peracético (AP)

En solución, el ácido peracético (AP) se disuelve formando ácido acético y peróxido de hidrógeno. Se utiliza habitualmente a concentraciones de 50-200 ppm en superficies de contacto con alimentos, es eficiente en la eliminación de biofilms y funciona bien a temperaturas de refrigeración. Se cree que su mecanismo de acción es similar a otros agentes oxidantes, mediante la reacción con proteínas celulares y enzimas (Chauret, 2014).

Recientemente, el ácido peracético se ha convertido en un antimicrobiano alternativo eficaz en la desinfección de aguas residuales y tiene una fuerte capacidad para eliminar los contaminantes del agua potable (Cheng *et al.*, 2020). Al igual que para el hipoclorito de sodio, según la ECHA (2019c), el ácido peracético se encuentra aprobado para su uso en el EEE y Suiza para diversos usos, entre los que se incluyen la desinfección de alimentos y zonas de contacto, tipo de producto 4. De acuerdo con lo establecido por el Reglamento de Ejecución

(UE) N° 1273/2017 de la Comisión, el ácido peracético se aprobó como sustancia activa para su uso en productos biocidas para los tipos de productos 1, 2, 3, 4, 5, y 6 (conservantes no alimentarios) con sujeción a las especificaciones y condiciones establecidas en el Reglamento de Ejecución (UE) N° 672/2016 de la Comisión (Capita *et al.*, 2019).

4.1.3. Adaptación de las bacterias a los biocidas

El uso de biocidas de forma frecuente para la limpieza y desinfección de los entornos de procesado de alimentos ha generado preocupaciones como consecuencia del elevado potencial de los microorganismos para desarrollar una susceptibilidad reducida a estos compuestos como mecanismo de adaptación a las condiciones ambientales (Alonso-Calleja *et al.*, 2015). Un uso inadecuado de biocidas (como es, por ejemplo, un almacenamiento incorrecto o la presencia de residuos excesivos de materia orgánica que puede inactivar o disminuir la eficacia de los compuestos) puede generar una exposición de los microorganismos a concentraciones subletales, lo que representa un elevado riesgo para promover el desarrollo de la adaptación a los biocidas (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Dynes *et al.*, 2009).

Las bacterias interactúan con el medio ambiente a través de sus superficies, vitales para la supervivencia de los microorganismos. Así, una forma común de resistencia a los antimicrobianos se debe a la estructura y composición de las membranas bacterianas que pueden actuar como barreras a la permeabilidad, ya sea de forma natural o mediante mecanismos de resistencia adquiridos. Así, como consecuencia de la adaptación se han detectado cambios en las proteínas, composición de ácidos grasos, fosfolípidos o lipopolisacáridos en las membranas bacterianas (Alonso-Calleja *et al.*, 2015). Algunos estudios han demostrado que los cambios en la fluidez de la membrana pueden jugar un papel importante en la adaptación de microorganismos como *Listeria monocytogenes* o *Salmonella enterica*, a los descontaminantes de la carne de ave (Alonso-Hernando *et al.*, 2010).

Los diferentes modos de acción de los biocidas pertenecientes a diversas familias químicas han sido ampliamente revisados y resumidos por autores como Maillard (2002) y McDonnel y Russell (1999). Los mecanismos generales de acción de un biocida pueden definirse de acuerdo con la estructura bacteriana contra la que presentan su actividad principal. Es por ello que pueden describirse tres niveles de interacción (Ortega Morente *et al.*, 2013):

- **Interacción con componentes celulares externos:** pueden actuar con componentes celulares externos sin afectar a la viabilidad de la célula. Uno de los efectos destacables es el cambio en la hidrofobicidad de la superficie celular. Compuestos

catiónicos como el cloruro de benzalconio interactúan con cargas negativas en la pared celular y la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Otros biocidas con interacción en la pared celular son los hipocloritos, poderosos agentes oxidantes que inducen lisis en bacterias Gram-negativas.

- **Interacción con la membrana citoplasmática:** la membrana citoplasmática, compuesta esencialmente por una bicapa lipídica con proteínas, se considera a menudo como el principal sitio diana de los biocidas. El daño de la membrana puede manifestarse como una alteración física de la misma, disipación de la fuerza protón motriz o inhibición de la actividad enzimática asociada a la membrana. El término “agentes activos de membrana” se utiliza para antimicrobianos, como los QACs y alcoholes. Los compuestos como el cloruro de benzalconio pueden inducir fugas de componentes intracelulares por daño en la membrana, sobre todo en bacterias Gram-positivas.
- **Interacción con componentes citoplasmáticos:** los componentes intracelulares, probablemente, no son sitios diana primarios para los biocidas; sin embargo, pueden interactuar con ellos causando daños reversibles o irreversibles. Agentes oxidantes como halógenos, peróxido de hidrógeno, ácido peracético y ozono pueden eliminar los electrones de grupos químicos susceptibles, oxidarlos y reducirse en el proceso.

La actividad de los biocidas varía mucho entre los diferentes tipos de microorganismos, algunos de los cuales pueden ser intrínsecamente resistentes, es decir, tienen como propiedad innata controlada cromosómicamente eludir la acción de un biocida, aunque también se pueden encontrar diferencias entre distintas cepas de la misma especie. Entre los diversos grupos bacterianos, las micobacterias serían las más resistentes a los biocidas, seguidas por las bacterias Gram-negativas y dejando en último lugar a las bacterias Gram-positivas como las más sensibles. Además, se considera que la adaptación fisiológica (fenotípica) mejora la tolerancia bacteriana a los biocidas, por ejemplo, en el caso de las células contenidas en un biofilm (Brown y Gilbert, 1993).

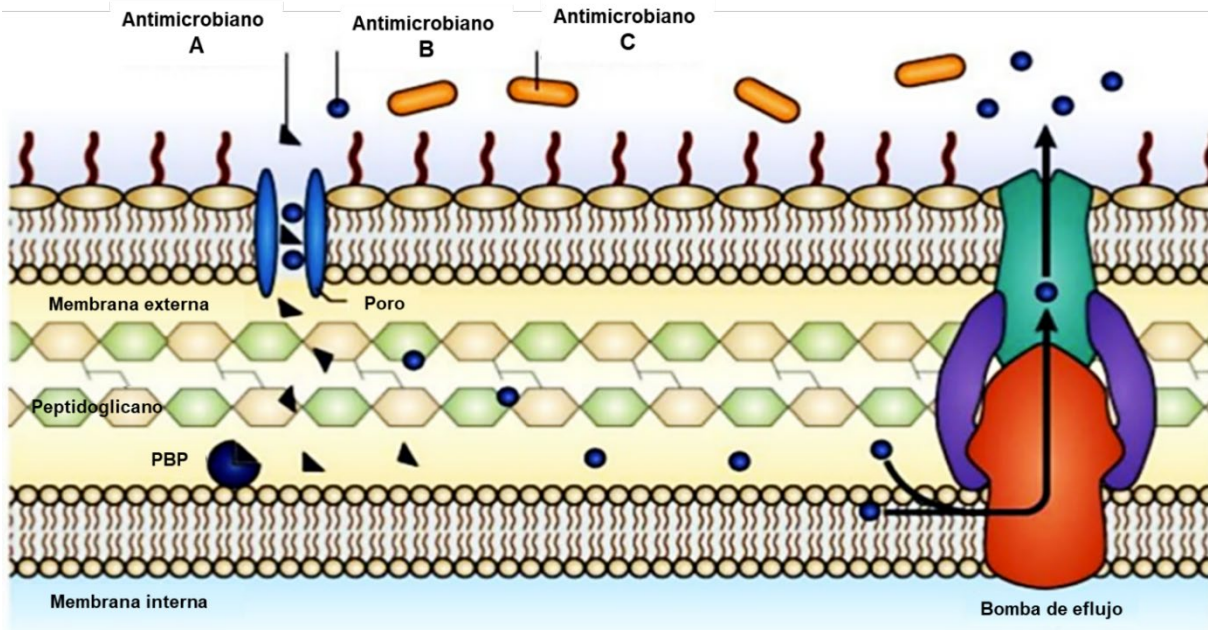


Figura 14. Bomba de expulsión de compuestos antimicrobianos (Fuente: adaptada de Blair *et al.*, 2015).

La tolerancia adquirida a los biocidas puede darse cuando las bacterias están expuestas a concentraciones gradualmente crecientes de un biocida. Este mecanismo puede aparecer a través de mutaciones, de la amplificación de un gen cromosómico endógeno o mediante la adquisición de determinados elementos genéticos extracromosómicos, como plásmidos y transposones (Andersen, 2016; Ortega Morente *et al.*, 2013):

- **Mutaciones:** las mutaciones son cambios en la secuencia de los pares de bases dentro del ADN de un gen. Un cambio en un solo par de bases puede resultar en una modificación en el aminoácido que codifica, con el consiguiente cambio en la enzima o estructura celular. Las mutaciones bacterianas pueden ocurrir de forma espontánea alrededor de 3,3 veces por cada 1.000 replicaciones de ADN, principalmente debido a errores de duplicación de éste. Estos errores se detectan y se eliminan, pero algunos no son detectados y puede dar lugar a mutaciones, aumentando su frecuencia con la exposición a biocidas.
- **Adquisición de genes:** las bacterias pueden adquirir resistencia a través de la transferencia de genes. Los genes que codifican la resistencia a los biocidas pueden transportarse en plásmidos, transposones o integrones, actuando como vectores para transferir genes entre miembros de la misma especie bacteriana o entre bacterias de

diferentes especies. Otro método de adquisición de genes es la transferencia horizontal, intercambio bacteriano en forma de transformación (transferencia de ADN entre cepas de bacterias de una célula donante a una célula receptora seguida de una recombinación en la célula receptora o adquisición de fragmentos de ADN del entorno), transducción (transferencia de ADN de una bacteria a otra a través de bacteriófagos) y conjugación (se transfiere material genético entre dos bacterias en contacto, de una célula donante a una célula receptora).

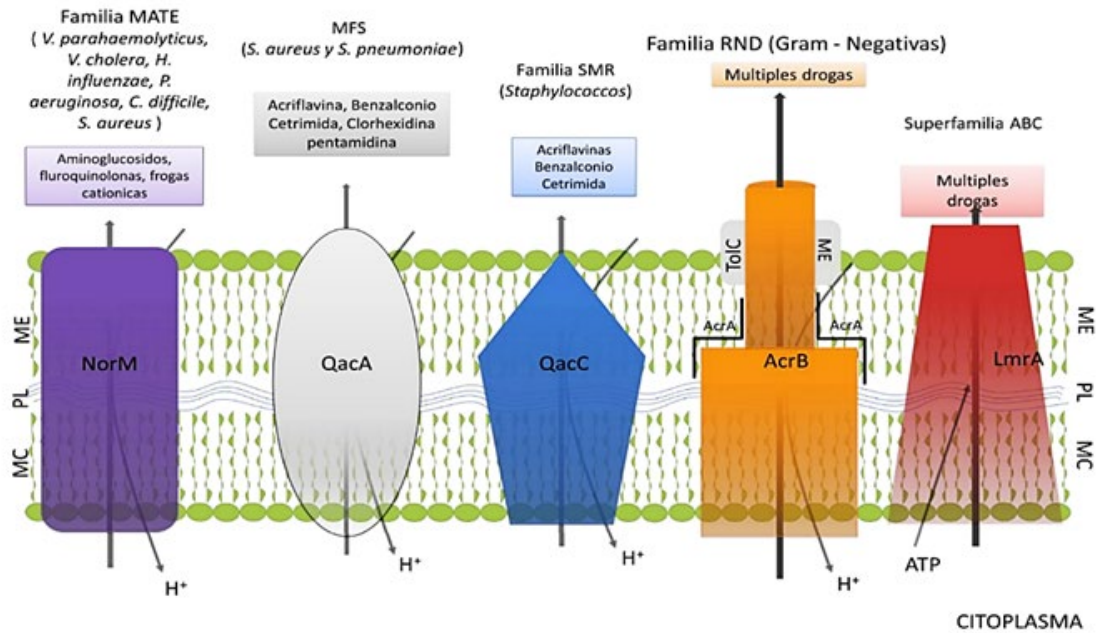
- **Impermeabilidad de la membrana:** existen estudios que sugieren que un cambio en la permeabilidad bacteriana aumenta su tolerancia a los biocidas (McDonnell y Russell, 1999), esto incluye cambios en la hidrofobicidad superficial, ultraestructura de la membrana externa y composición de proteínas y ácidos grasos de la membrana externa.

- **Alteración del sitio de unión:** la alteración del sitio de unión puede hacer que las bacterias sean menos susceptibles a un biocida. Debido a que los biocidas tienen múltiples sitios diana, este mecanismo suele ser poco frecuente.

- **Transformación enzimática:** estos mecanismos de biodegradación se han descrito para diferentes bacterias y varios componentes del medio ambiente:
 - Reducción enzimática de derivados de metales pesados (plata y cobre) a una forma oxidada menos tóxica.
 - Protección de la célula bacteriana de los efectos secundarios de los radicales libres con las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y alquilhidroperoxidasa.
 - Inactivación de aldehídos con la enzima formaldehído deshidrogenasa.

- **Bombas de expulsión:** son los mecanismos de resistencia más ampliamente descritos. Para disminuir la concentración intracelular de un biocida, las bacterias pueden usar sistemas de bombas de eflujo de múltiples fármacos para bombear el biocida fuera de la célula microbiana. Esto da como resultado una disminución de la concentración intracelular del biocida que llega al sitio objetivo y puede dar lugar a tolerancia bacteriana. Los diferentes sistemas de bombas de eflujo se pueden dividir en cinco clases principales (Figura 15):
 - La familia de extrusión de compuestos tóxicos y de múltiples fármacos (MATE).
 - La superfamilia facilitadora principal.

- La pequeña familia de resistencia a múltiples fármacos, que ahora forma parte de la superfamilia de transportadores metabólicos de fármacos.
- La familia resistencia-nodulación-división (RND).
- La familia de casetes de unión a ATP (ABC).

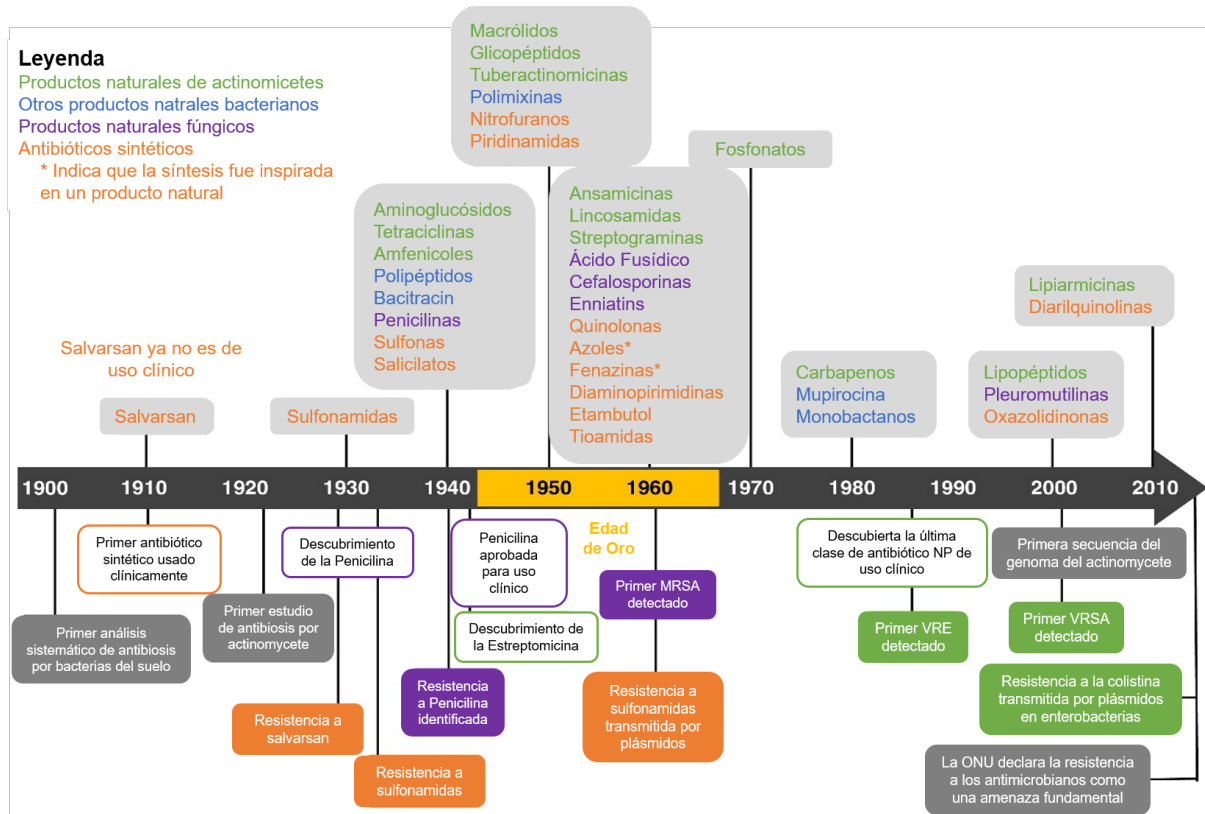


ME, membrana externa; PL, periplasma; MC, membrana citoplasmática; ATP, adenosín trifosfato.

Figura 15. Bombas de expulsión presentes en las células bacterianas (Fuente: Pardo Hernández, 2014).

4.2. Antibióticos

Los antibióticos son esenciales para tratar las infecciones graves causadas por bacterias patógenas (Figura 16). Sin embargo, su uso excesivo o incorrecto, tanto en el ámbito de la medicina humana como veterinaria, se ha vinculado con la aparición y propagación de bacterias resistentes. Esto hace que los tratamientos de enfermedades infecciosas en los animales y en el ser humano dejen de ser eficaces. Las bacterias resistentes se introducen en la cadena alimentaria en muchas ocasiones a través de los animales (OMS, 2020).



El color de los antibióticos se clasifica de acuerdo a: verde = actinomicetes, azul = otras bacterias, púrpura = hongos y naranja = sintético. En la parte inferior de la línea de tiempo se presentan fechas clave relacionadas con el descubrimiento de antibióticos y la resistencia a estos, incluyendo los primeros informes de cepas resistentes: *S. aureus* resistente a la metilina (MRSA), enterococos resistentes a la vancomicina (VRE), *S. aureus* resistente a la vancomicina (VRSA) y resistencia a la colistina transmitida por plásmidos en *Enterobacteriaceae*. NP, nuevos productos naturales antimicrobianos; ONU, Organización de las Naciones Unidas.

Figura 16. Cronología de la evolución de los antibióticos (Fuente: adaptada de Hutchings *et al.*, 2019).

La introducción de antibióticos en el ámbito clínico fue sin duda el mayor avance médico del siglo XX. Además de tratar enfermedades infecciosas, los antibióticos hicieron posibles muchos procedimientos médicos modernos, incluyendo el tratamiento del cáncer, trasplantes de órganos y cirugías a corazón abierto, entre otros. Sin embargo, el mal uso de estos compuestos ha dado lugar al rápido aumento de la resistencia a los antimicrobianos y han provocado que algunas infecciones sean actualmente intratables (Hutchings *et al.*, 2019; Katz y Baltz, 2016; Prescott, 2014).

4.2.1. Mecanismos de resistencia a antibióticos

Los antibióticos representan una de las formas de terapia más exitosas en la medicina, pero la eficiencia de éstos se ve comprometida por un número creciente de microorganismos patógenos resistentes. La resistencia a los antibióticos, que está asociada a tasas elevadas de morbilidad y mortalidad, así como en el aumento de los costes del tratamiento, se considera una de las principales amenazas para la Salud Pública (Lin *et al.*, 2015). Los sistemas de bombas de expulsión inespecíficas contribuyen significativamente al aumento de la resistencia a múltiples antibióticos en las bacterias. El desarrollo de antibióticos eficaces frente a patógenos resistentes es un desafío importante que implica identificar compuestos que puedan contrarrestar las funciones de las bombas de expulsión. La elevada cantidad de información genómica bacteriana disponible sugiere la presencia de una gran variedad de sistemas de expulsión en bacterias. Incluso una sola bacteria puede poseer múltiples transportadores de expulsión de diferentes familias.

Los antibióticos **β -lactámicos**, que inhiben la biosíntesis de la pared celular bacteriana, son los antibióticos más ampliamente disponibles y utilizados para tratar una serie de infecciones bacterianas. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos de este grupo se ha convertido en un gran problema en el ámbito mundial. La producción de β -lactamasas es un mecanismo de resistencia importante y amenazante hacia los antibióticos β -lactámicos que se da, sobre todo, en bacterias patógenas Gram-negativas como *Salmonella enterica* (Lin *et al.*, 2015). Los **aminoglucósidos** son otra clase de antibióticos clínicamente importantes para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias patógenas. Un mecanismo importante de resistencia a los aminoglucósidos es la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, como la N-acetiltransferasa tipo Ib en patógenos Gram-negativos. Además, la resistencia a los **carbapenems** es adquirida por mutaciones en las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) en bacterias Gram-positivas (Sultan *et al.*, 2018).

Para el grupo de los **fenicoles**, el cloranfenicol provoca un mecanismo de resistencia que implica la inactivación enzimática a través de la acetilación mediada por acetiltransferasas de cloranfenicol (TLC), además de la inactivación por fosfotransferasas, mutación del sitio diana, barreras de permeabilidad y bombas de expulsión (Schwarz *et al.*, 2004 y Sultan *et al.*, 2018). En el grupo de los **glucopéptidos**, la resistencia a la vancomicina es la más destacable. Se originó a partir de la producción del precursor de peptidoglicano modificado, como son el *vanA*, *vanB*, *vanD*, entre otros. Los dos primeros operones (*vanA* y *vanB*) se unen a los plásmidos y a los cromosomas, ocurriendo algo similar con la resistencia al grupo de las **quinolonas**. La resistencia al grupo de las **sulfonamidas**, sin embargo, aparece en el cromosoma a través de mutaciones en el gen *folP*. La resistencia adquirida a este grupo de antibióticos fue

identificada por primera vez en la década de 1960. Los mecanismos de resistencia a las **tetraciclinas** presentan tres estrategias clave: bombas de expulsión, proteínas de protección ribosomal e inactivación enzimática (Sultan *et al.*, 2018).

La **colistina**, también conocida como polimixina E, es un antibiótico de último recurso para bacterias Gram-negativas aerobias multirresistentes que frecuentemente representan la fuente principal de infecciones potencialmente mortales, como *Pseudomonas aeruginosa* resistente al carbapenem, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y otras enterobacterias. Algunas especies bacterianas como *Vibrio cholerae*, *Campylobacter* o *Legionella*, entre otras, presentan resistencia intrínseca a este compuesto. A mediados de la década de 1990, las polimixinas habían resurgido como un tratamiento de último recurso contra bacterias resistentes a todos los demás antibióticos disponibles, pero el uso excesivo y el mal uso de la colistina en el ámbito de la medicina humana y animal han llevado a la aparición de patógenos resistentes a la colistina a nivel mundial (Ahmed *et al.*, 2020).

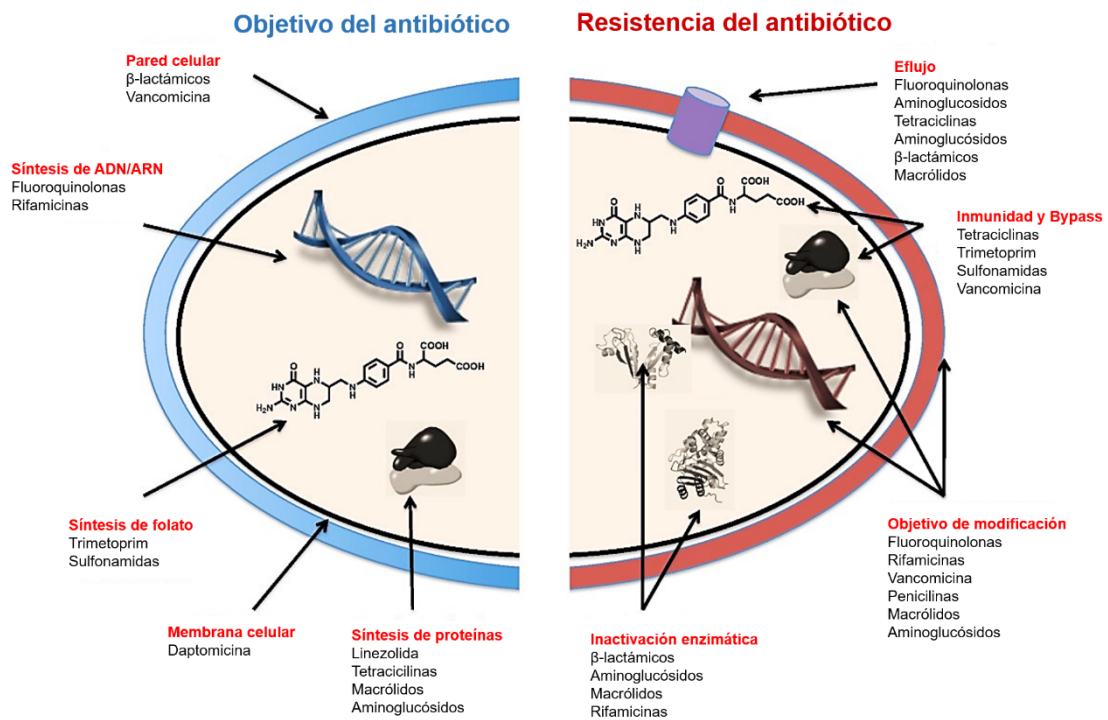


Figura 17. Objetivos del antibiótico (sitios diana) y mecanismos de resistencia (Fuente: Buzón-Durán, 2017).

4.2.2. Presencia de bacterias resistentes a antibióticos en la cadena de producción de alimentos

Las infecciones alimentarias causadas por bacterias resistentes a los antibióticos tienen connotaciones más graves para la salud que las infecciones provocadas por bacterias sensibles. Especialmente en los denominados grupos de riesgo: personas inmunodeprimidas, niños, ancianos y mujeres embarazadas. Las personas pueden quedar expuestas a las bacterias resistentes que provienen de los animales cuando manipulan o consumen alimentos de origen animal o vegetales contaminados (Capita *et al.*, 2021).

En producción animal, los antibióticos se emplean para el tratamiento, control y/o prevención de enfermedades infecciosas, así como para la promoción del crecimiento (IFT, 2006). La mayor parte de antibióticos comercializados se emplean tanto en medicina humana como en veterinaria. Es por ello que, los determinantes de resistencia generados en producción animal podrían, una vez sean transferidos a lo largo de la cadena alimentaria, disminuir la utilidad terapéutica de los antibióticos en las infecciones humanas (Capita González, 2013).

Aunque no exentas de controversia, las evidencias científicas de los últimos años sugieren que la presión selectiva ejercida por el uso de biocidas, incluyendo aquellos compuestos ampliamente usados en la Industria Alimentaria, podría contribuir a la expresión y diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos. Parece razonable asumir esta posibilidad puesto que biocidas y antibióticos pueden compartir *targets* o lugares diana en las bacterias y ambos tipos de antimicrobianos pueden desencadenar mecanismos de resistencia frente a ellos (Capita González, 2013). El uso de biocidas podría contribuir a incrementar la resistencia a antibióticos principalmente a través de cuatro mecanismos: resistencia cruzada, co-resistencia, selección de variantes clonales y respuesta SOS (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Por otro lado, los microorganismos añadidos intencionadamente a los alimentos no deben causar efectos adversos en la salud del consumidor ni a corto ni a largo plazo. En la Unión Europea los microorganismos con estatus de Presunción Cualificada de Seguridad (*Qualified Presumption of Safety*; QPS), es decir, potencialmente seguros para su empleo en piensos y alimentos, se incluyen en listados publicados y revisados anualmente por el Panel de Riesgos Biológicos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*Panel on Biological Hazards*; BIOHAZ). La adquisición de este estatus se obtiene tras un proceso de Evaluación del Riesgo en base a los datos científicos disponibles, incluyendo la posible presencia de genes de resistencia a antibióticos (Capita González, 2013).

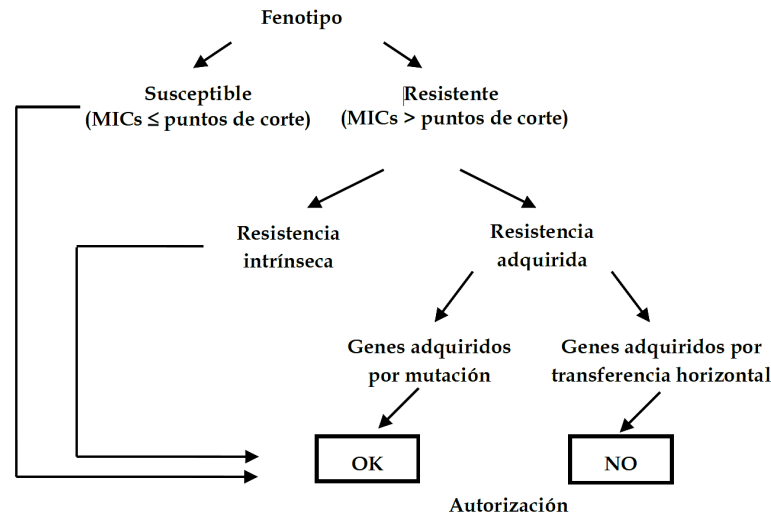


Figura 18. Esquema propuesto para la evaluación de la resistencia a antibióticos en bacterias adicionadas a los alimentos y los piensos (Fuente: Capita González, 2013).

4.2.3. Técnicas rápidas para determinar la susceptibilidad a antibióticos

Uno de los métodos clásicos para la determinación de la resistencia a los antibióticos es el de difusión por disco. Las bacterias sensibles al antibiótico no son capaces de crecer en la proximidad del disco de antibiótico, por lo que se forman halos de inhibición. Por el contrario, las bacterias resistentes crecen en toda la superficie de la placa de cultivo. Otra posibilidad para conocer la resistencia bacteriana a los antibióticos es determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) en placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos, utilizando el espectrofotómetro Bioscreen C MRB (Oy Growth Curves Ab, Helsinki -Finlandia-). Cuanto mayor sea la MIC, mayor es el grado de resistencia del microorganismo a los compuestos antimicrobianos aplicados. Además, mediante pruebas de PCR se puede estudiar la presencia en las bacterias de los genes que confieren resistencia (Capita *et al.*, 2021).

La citometría de flujo es una tecnología relativamente nueva pero muy popular que se utiliza en varios ámbitos clínicos como inmunología, oncología, microbiología o biotecnología industrial, entre otros (Akhmaltdinova *et al.*, 2017). Se trata de una técnica rápida que ofrece amplias posibilidades de detección, entre ellas, la determinación de resistencias bacterianas (Jarzembowski *et al.*, 2010). Las técnicas clásicas para evaluar los efectos antibacterianos se basan en la detección de cambios en el número de bacterias o colonias en una muestra a lo largo del tiempo; una unidad formadora de colonias (ufc) puede ser una sola célula bacteriana viable o un grupo de células viables, mientras que un citómetro de flujo puede contar el número de bacterias y/o grupos de bacterias presentes en un volumen de muestra dado (Novo *et al.*, 2000).

La estimación de la viabilidad de una población es una de las ventajas que presenta esta técnica, ya que se puede determinar perfectamente las células vivas, las células dañadas y las células muertas utilizando diferentes colorantes fluorescentes (Weaver, 1998), como el SYTO9 o el yoduro de propidio (YP). En la Industria Alimentaria se han propuesto métodos basados en citometría de flujo para evaluar la viabilidad de bacterias patógenas presentes en alimentos, así como para fermentos lácticos y probióticos. Debido a su elevada precisión, se ha sugerido que la citometría de flujo puede ser una alternativa a los cultivos microbianos en placa para el recuento celular, con un mayor grado de reproducibilidad (Matsuoka *et al.*, 2014; Raymond *et al.*, 2014).

4.3. Aditivos alimentarios

Los aditivos son sustancias utilizadas en los alimentos para mejorar sus cualidades durante el proceso de elaboración; se incluyen conservantes, colorantes, edulcorantes, saborizantes y antioxidantes, entre otros. La legislación de la UE los define como “cualquier sustancia que habitualmente no se consume como alimento en sí misma y que no sea utilizada como ingrediente característico de los alimentos o tenga un valor nutritivo”. Se utilizan con fines tecnológicos durante el proceso de fabricación, procesado, preparación, tratamiento, envasado, transporte o almacenamiento, convirtiéndose en un componente de los alimentos (European Commission, 2021). La seguridad de todos los aditivos alimentarios actualmente autorizados ha sido evaluada por el Comité Científico de los Alimentos (SCF) y/o la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Sólo los aditivos para los que se consideraron seguros los usos propuestos figuran en la lista de la UE.

4.3.1. Nitrito sódico

El nitrito de sodio (E 250; Figura 19) es un aditivo alimentario multifuncional, responsable del color y sabor característico asociado a las carnes curadas y, al mismo tiempo, presenta un papel bacteriostático: brinda protección contra el crecimiento y formación de toxinas por *Clostridium botulinum* en embutidos. A su vez, proporciona estabilidad oxidativa a la carne al prevenir la oxidación de lípidos y ayuda a controlar el desarrollo del sabor en las carnes cocidas y almacenadas. Sin embargo, la adición de nitrito de sodio a la carne y los productos cárnicos está muy regulada, debido al posible riesgo de formación de N-nitrosaminas (Austin, 2014; Boerema y Broda, 2004; Shahidi *et al.*, 2014).

Actualmente se desconoce el mecanismo exacto por el que se produce la inhibición de *Clostridium botulinum*. Su eficacia depende de las interacciones que involucran el pH, la sal,

el tratamiento térmico, la temperatura y el tiempo de almacenamiento y la composición de la matriz alimentaria (Austin, 2014).

Después del curado, casi todos los nitratos y nitritos han reaccionado con los componentes de la carne y solo queda una cantidad residual muy pequeña de nitrito (Shahidi *et al.*, 2014). De acuerdo con lo establecido con Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios, se considera que la concentración máxima de nitrito de sodio en los productos cárnicos debe ser de 150 mg/kg de producto (DOUE, 2008).

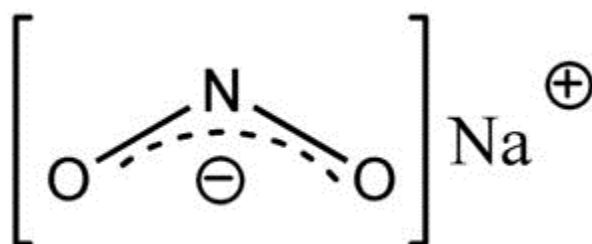


Figura 19. Estructura química del nitrito sódico.

4.3.2. Nisina

La nisina (E 234; Figura 20) es un aditivo alimentario autorizado en la UE según el anexo II del Reglamento (CE) N° 1333/2008 para su uso en varias categorías de alimentos (EFSA, 2017). Se trata de una sustancia polipeptídica producida por diferentes cepas de *Lactococcus lactis*, a partir de una fermentación en medio lácteo modificado y con una treintena de aminoácidos. Actúa frente a las bacterias Gram-positivas, como *L. monocytogenes*, es estable a pH ácido y termolábil. No es tóxica para la salud humana, ya que el organismo la degrada y no produce resistencia cruzada a antibióticos. Se emplea en la industria alimentaria principalmente en la elaboración de quesos y otros productos alimenticios, como conservante en la prevención de las posibles alteraciones y también en la protección de diversas carnes, tanto crudas como precocinadas. La nisina es una sustancia ácida, y es más estable en estas condiciones. En condiciones alcalinas, la actividad se pierde y se destruye en 30 minutos a 63 °C y pH 11. Hay una disminución parcial de actividad cuando se utiliza nisina en alimentos procesados debido al calentamiento. A las concentraciones empleadas habitualmente en la conservación de alimentos, la nisina es completamente soluble en agua y en otros líquidos de procesado, pero es insoluble en disolventes no polares (Sánchez Martín *et al.*, 2019).

El Panel de la EFSA sobre aditivos alimentarios concluyó que, sobre la base de la nueva ingesta diaria admisible (IDA) establecida para la nisina A, de 1 mg/kg de peso corporal, la concentración propuesta de uso como aditivo alimentario (E 234) no sería un problema de

Seguridad Alimentaria, ni en queso sin madurar (a un nivel máximo de 12 mg/kg) ni en productos cárnicos tratados térmicamente (a un nivel máximo de 25 mg/kg) (EFSA, 2017).

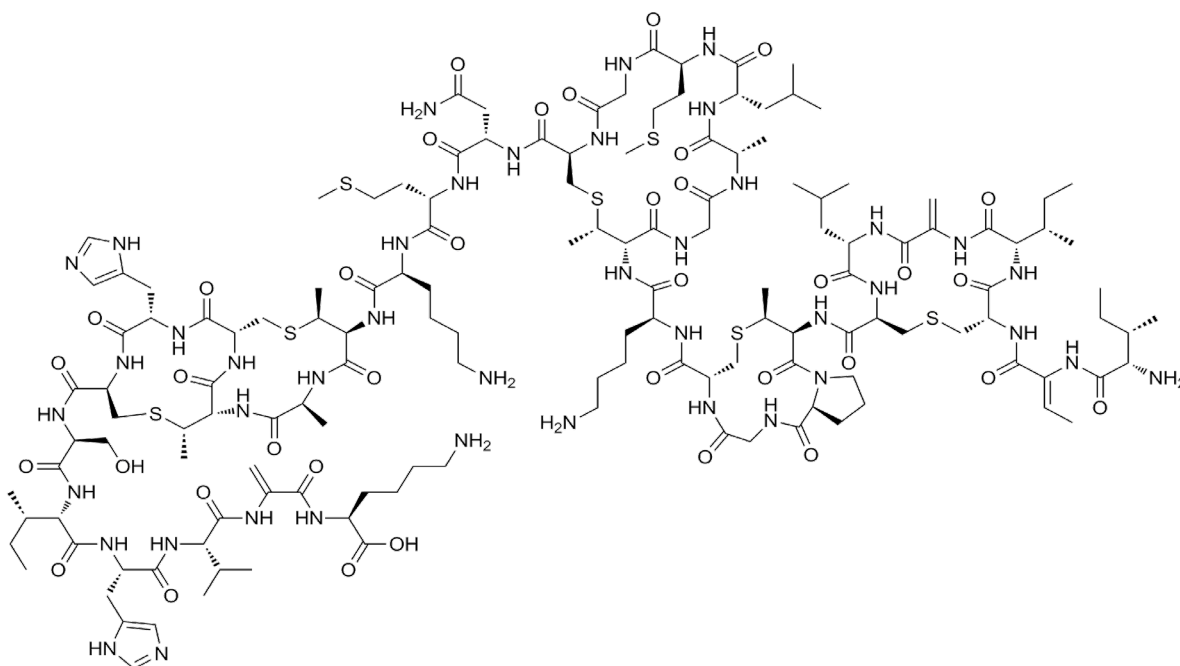


Figura 20. Estructura molecular de la nisina.

4.3.3. Ácido láctico

El ácido láctico (E 270; Figura 21) es una sustancia considerada aditivo alimentario y se encuentra regulado por el Anexo I del Real Decreto 142/2002 de 1 de febrero (BOE, 2002), por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de los colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización, y su función tecnológica en los alimentos como conservador, antioxidante y regulador de pH (AESAN, 2010). Actualmente, y de acuerdo con la legislación europea vigente que viene regulada por el Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios, no existe límite en la adición de ácido láctico como aditivo a los productos cárnicos.

Se ha evaluado la seguridad y eficacia del tratamiento con ácido láctico para la descontaminación de canales de vacuno, observándose reducciones significativas en los niveles microbianos. A su vez, se ha señalado la baja probabilidad del desarrollo de resistencia enzimática a los antimicrobianos terapéuticos como resultado de la exposición al ácido láctico, así como la posibilidad de cambios mutacionales que den lugar al desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. No se ha realizado una evaluación de riesgo ambiental, ya que la

concentración de ácido láctico antes de ingresar al sistema de tratamiento de aguas residuales se considera insignificante (EFSA, 2011). En base a estos estudios, el ácido láctico está autorizado para la descontaminación de carne de vacuno en la Unión Europea bajo ciertas condiciones de utilización (DOUE, 2013b). En estudios posteriores se evaluó la seguridad y eficacia de los ácidos láctico y acético para reducir la contaminación microbiológica de las superficies de canales de cerdo y sus cortes. Se destaca, además, la baja probabilidad de aparición de bacterias con susceptibilidad reducida a los biocidas (EFSA, 2018).

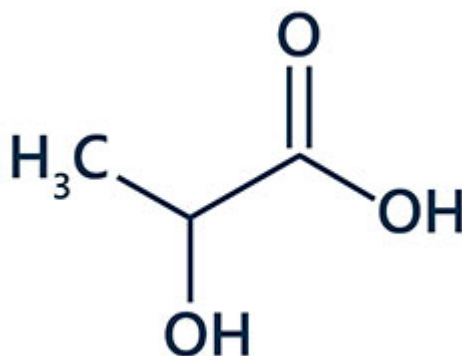


Figura 21. Estructura molecular del ácido láctico.

4.4. Alternativas al uso de sustancias químicas

4.4.1. Bacteriófagos como agentes desinfectantes

Los bacteriófagos (conocidos también como fagos), son virus naturales que infectan bacterias. No se ven afectados por la resistencia a los antimicrobianos y, a diferencia de muchos de estos compuestos, pueden atacar a las bacterias que se encuentran formando parte de las biopelículas. Los fagos pueden coexistir con su hospedador insertándose en el genoma bacteriano (bacteriófagos lisogénicos) o destruirlos (bacteriófagos líticos, siendo éstos el tipo más adecuado para el uso terapéutico). Los bacteriófagos se replican dentro de sus hospedadores y, posteriormente, liberan gran cantidad de bacteriófagos nuevos con capacidad para infectar más bacterias (Harper *et al.*, 2014).

Los bacteriófagos actúan de forma diferente sobre las bacterias que forman parte de las biopelículas con respecto a los antibióticos o biocidas. De hecho, algunos autores señalan que los fagos han evolucionado conjuntamente con las biopelículas bacterianas y, por tanto, se esperaría la infección de poblaciones bacterianas adherentes. Existen, al menos, cuatro mecanismos subyacentes (Harper *et al.*, 2014):

- Los bacteriófagos se replican dentro de las células hospedadoras, lo que resulta en aumentos localizados en el número de bacteriófagos (amplificación). Esto libera un número creciente de bacteriófagos de progenie infecciosos en la biopelícula. Al propagarse a través del biofilm, eliminando las bacterias que producen el material EPS (exopolisacárido), los bacteriófagos pueden eliminar progresivamente el biofilm y reducir el potencial de regeneración.
- Los bacteriófagos pueden transportar o expresar enzimas despolimerizantes que degradan el EPS.
- Los bacteriófagos pueden inducir enzimas despolimerizantes que degradan el EPS desde el interior del genoma del hospedador.
- Las células persistentes pueden infectarse por bacteriófagos; aunque los bacteriófagos no pueden replicarse y destruir células inactivas, pueden permanecer dentro de estas bacterias hasta que se reactivan para posteriormente producir una infección productiva, que posteriormente destruye las células.

Para diseñar tratamientos basados en fagos y minimizar la probabilidad de aparición de resistencias es imprescindible comprender los mecanismos subyacentes implicados en la resistencia a los fagos y las interacciones co-evolutivas entre los fagos y las biopelículas. Los tratamientos basados en fagos para eliminación de biopelículas se muestran en la Figura 22.

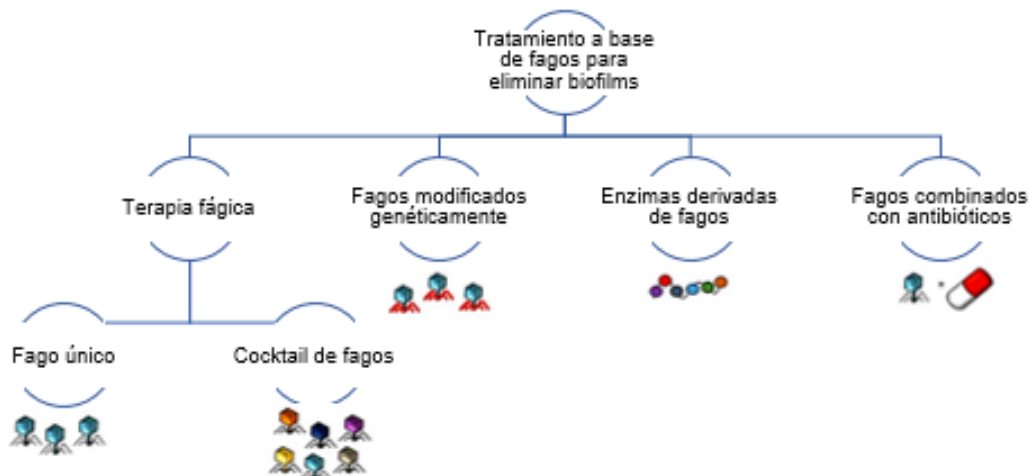


Figura 22. Principales tratamientos basados en fagos para la eliminación de biopelículas (Fuente: adaptada de Ferriol-González y Domingo-Calap, 2020).

4.4.2. Materiales y recubrimientos

La presencia de microorganismos sésiles en superficies abióticas puede causar serios problemas que se traducen en elevados costes y efectos negativos en diversas áreas, como unidades de atención médica, sistemas de transporte de agua, barcos e industria marina, intercambiadores de calor, sistemas de refrigeración o superficies de contacto con alimentos, entre otros. El uso de diferentes materiales de superficie con propiedades antimicrobianas y antiadhesivas es una estrategia muy importante que ha sido ampliamente estudiada como medida preventiva, siendo una alternativa a los protocolos de desinfección convencionales o a las terapias antibióticas.

Las superficies antimicrobianas pueden clasificarse como superficies de revestimiento pasivo, utilizadas para prevenir la adhesión, que no afectan la actividad microbiana, pero son responsables de la inhibición de la adhesión microbiana. Estas superficies evitan la adhesión bacteriana ya que la hidrofobicidad del material, la nanotopografía, la rugosidad y la carga eléctrica superficial se controlan cuidadosamente para lograr este objetivo. Además de eso, se definen otras modificaciones en las superficies que están asociadas con la actividad antimicrobiana, como recubrimientos antimicrobianos activos sin liberación (es decir, sistemas de liberación de plata, antibióticos/antisépticos y/o óxido nítrico) o como superficies que destruyen por contacto (es decir, recubrimientos a base de polimerización, superficies funcionalizadas con péptidos antimicrobianos, metales nanométricos y óxidos metálicos, recubrimientos a base de sílice, recubrimientos a base de enzimas y recubrimientos antimicrobianos fotoactivados) (Balaure y Grumezescu, 2020).

Se han utilizado varias superficies con diferentes propiedades fisicoquímicas para cultivar biopelículas como silicona, arcilla, metal, hidroxiapatita, vidrio, poliestireno y policarbonato. El vidrio borosilicato ha sido validado por el Comité de Pruebas y Materiales de la Sociedad Americana de Ensayos y Materiales (ASTM) (Método de Superficie E2871-12) para estudiar la eficacia de los desinfectantes en biopelículas (Crouzet *et al.*, 2014). Zobell (1943) ya observó que materiales como el vidrio, plásticos, porcelana, arena, tierra de diatomeas y otros (formados por partículas inertes) son superficies activas. Las partículas que presentan un tamaño mayor o similar a las bacterias son superficies beneficiosas para su supervivencia, sin embargo, partículas de tamaños inferiores a las bacterias podrían ser dañinas.

Tabla 5. Variables que influyen en la fijación celular y la formación de biopelículas (Fuente: adaptada de Donlan, 2002).

Propiedades del sustrato	Propiedades del fluido extracelular	Propiedades de la célula
Textura o rugosidad	Velocidad de flujo	Hidrofobicidad de superficie celular
Hidrofobicidad	pH	Fimbrias
Carga superficial	Temperatura	Flagelos
	Cationes	Sustancias poliméricas extracelulares
	Presencia de agentes antimicrobianos	

Las primeras interacciones entre bacterias y superficies son cruciales para la formación de biopelículas y, dependiendo de la naturaleza de la superficie, pueden ser impulsadas por diferentes mecanismos. La adhesión a superficies abióticas, por ejemplo, a menudo está mediada por eventos inespecíficos que dependen principalmente de la carga de la superficie celular y la hidrofobicidad, la presencia de polímeros extracelulares y la película acondicionadora orgánica (Dunne, 2002). Por otro lado, la unión a superficies bióticas como los tejidos óseos y las células epiteliales de la mucosa puede ser mediada por receptores específicos e influenciada por las respuestas del hospedador a la colonización bacteriana. Mientras que los factores ambientales influyen en los pasos iniciales de adhesión, también se

ha demostrado que la actividad bacteriana *per se* altera el resultado de las interacciones superficiales a través de la producción de moléculas antiadhesión que modifican las propiedades fisicoquímicas de la superficie, o la composición de una barrera bacteriana física previniendo el contacto superficial con otras bacterias competidoras (Rendueles y Ghio, 2012).

También es un hecho conocido que la adhesión bacteriana está influenciada por las propiedades del microorganismo y la superficie del sustrato (Teughels *et al.*, 2006). Algunas de las características que pueden influir en la adherencia de los microorganismos son la hidrofobicidad (Bos *et al.*, 1999), la motilidad (Martínez-Granero *et al.*, 2014) y la liberación de sustancias extracelulares, como polisacáridos, proteínas (González-Machado *et al.*, 2018) y/o biosurfactantes (Hoogmoed *et al.*, 2000). Las propiedades relevantes de la superficie del sustrato (Figura 23) son la hidrofobicidad, la carga eléctrica superficial y la nanotopografía superficial (Gomes *et al.*, 2020). El diseño de nuevas superficies es una estrategia emergente para prevenir la formación de biopelículas en muchas industrias, que requieren de técnicas innovadoras a través de nuevos diseños materiales, modificaciones superficiales, nuevos revestimientos y pinturas. Se han desarrollado nuevos enfoques para prevenir el desarrollo de biopelículas, modificando las propiedades de la superficie del biomaterial, como la química y topografía de la misma.

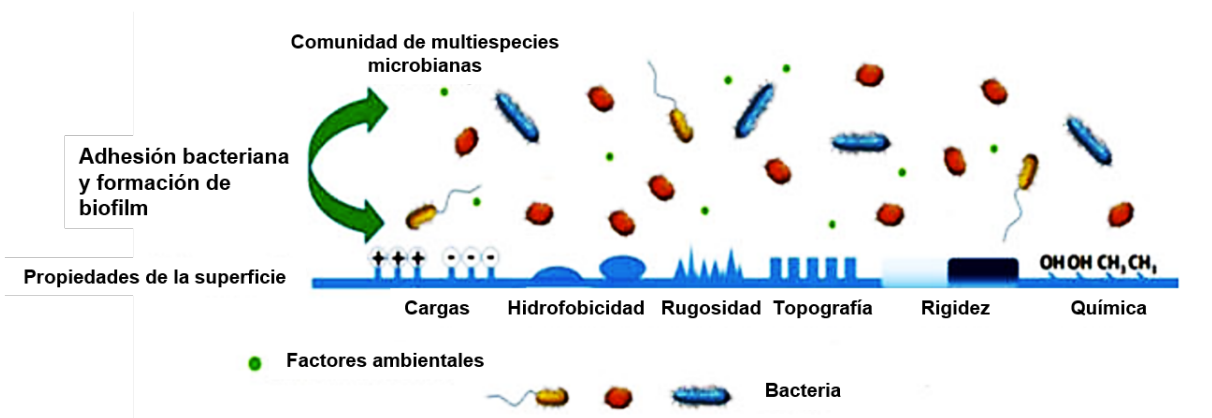


Figura 23. Esquema de la adhesión bacteriana y las propiedades del material de contacto (Fuente: adaptada de Song *et al.*, 2015).

5. EL ENFOQUE UNA SALUD (ONE HEALTH)

El concepto de “Una salud” (“One Health”, en inglés) se introdujo en la década de 1990 para poner nombre a una noción conocida desde hace más de un siglo: la **salud humana** y la **sanidad animal** son interdependientes y están vinculadas a la salud de los **ecosistemas** en los cuales coexisten (Figura 24). Se trata, por lo tanto, de un enfoque multidisciplinar que implica esfuerzos de colaboración de múltiples disciplinas en los ámbitos local, nacional y mundial, para lograr una salud óptima de las personas, de los animales y del medioambiente. Las áreas de trabajo en las que el enfoque Una Salud es particularmente relevante incluyen la Seguridad Alimentaria, el control de las zoonosis y la lucha contra la resistencia a los antibióticos (WHO, 2017).

El enfoque “One Health” se emplea en el escenario de **lucha contra las zoonosis**, enfermedades infecciosas de los animales que pueden ser naturalmente transmitidas a los seres humanos, y que representan 60% de las enfermedades infecciosas humanas y aproximadamente el 75% de las enfermedades infecciosas emergentes (Karesh *et al.*, 2012; Mwangi *et al.*, 2016). Hay que señalar que los microorganismos zoonóticos (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* o *Salmonella enterica*) se transmiten frecuentemente por el consumo de alimentos contaminados, de forma importante en el caso de los alimentos de origen animal.

El enfoque “Una Salud” también ha sido usado para el **control de la resistencia a los antibióticos**. El uso masivo de estos compuestos (tanto en medicina humana como en veterinaria) y el aumento concomitante de la resistencia a los mismos, es reconocido como un problema global emergente de primera magnitud e importancia creciente, que afecta la salud humana y animal y supone importantes costes sociales, económicos y perjuicios ambientales, estos últimos aún no totalmente cuantificados (Nguyen-Viet *et al.*, 2017). Así, se estima que, a partir de 2050, cada año fallecerán en el mundo 10 millones de personas debido a infecciones no tratables asociadas a agentes infecciosos con resistencias múltiples (O’Neill, 2016). En este contexto, debe considerarse la rápida interacción genética entre la microbiota de diferentes hábitats (animales, seres humanos, entornos de procesado de alimentos). Puesto que los genes de resistencia son móviles y pueden circular con facilidad en todos esos compartimentos, existe un alto riesgo de transmisión de estos elementos, o de las bacterias que los portan, desde los animales hasta el hombre **a través de la cadena de producción de alimentos** o por otras vías de contacto (heces, contacto directo, etc.). En este sentido, señalar también que tanto los alimentos como los residuos o subproductos de las industrias alimentarias (por ejemplo, los subproductos de origen animal no destinados a consumo humano, SANDACH), pueden ser un vehículo de microorganismos resistentes, de genes de

resistencia o de antibióticos, con el consiguiente riesgo de emergencia y diseminación de resistencias al hombre o al medioambiente.

La inmensa mayoría de las bacterias de interés en la Industria Alimentaria (tanto agentes zoonóticos como alterantes) tienen la capacidad de formar **biopelículas o biofilms**, lo que incrementa mucho su resistencia a los agentes de limpieza y desinfección y favorece su persistencia en los entornos de procesamiento de alimentos. Estas estructuras son un foco importante de contaminación de los alimentos, lo cual tiene importantes connotaciones negativas tanto en el ámbito de la Salud Pública y la Seguridad Alimentaria como en relación con las pérdidas económicas ocasionadas por el deterioro de los productos (Capita *et al.*, 2014; Piercey *et al.*, 2016).

Para el control de los microorganismos indeseables y la eliminación de los biofilms presentes en las superficies y equipos de las industrias alimentarias se emplean diferentes compuestos **biocidas**. En los últimos años se ha sugerido que el empleo prolongado de estos compuestos a dosis subletales podría contribuir a la reducción de la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos (biocidas y antibióticos) mediante diferentes mecanismos (resistencia cruzada, co-resistencia, selección de variantes clonales, respuesta SOS) (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

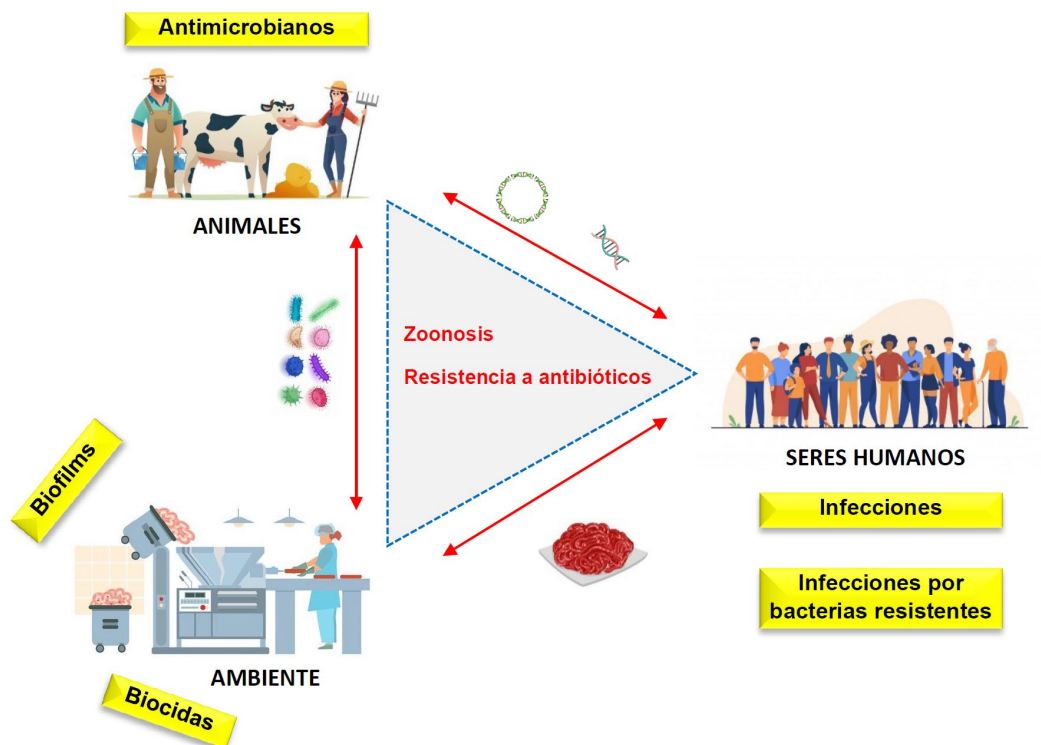


Figura 24. Algunos aspectos del enfoque Una Salud, en relación con las zoonosis y la resistencia a los antibióticos.

OBJETIVOS

El **OBJETIVO GENERAL** de esta Tesis Doctoral es, dentro del enfoque “Una Salud”, contribuir a la caracterización y el control de la resistencia a los compuestos antimicrobianos y de los biofilms de bacterias zoonóticas transmitidas por alimentos. Para la consecución de este objetivo, se han planteado los siguientes objetivos principales y secundarios:

OBJETIVOS PRINCIPALES:

- 1) Ampliar el conocimiento sobre la susceptibilidad de *Listeria monocytogenes* a diferentes biocidas y antibióticos mediante el estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias y de las concentraciones mínimas bactericidas. Objetivo desarrollado en los Capítulos I y XI.
- 2) Determinar si la exposición a dosis bajas de biocidas puede modificar la susceptibilidad a los antibióticos o a otros biocidas en cepas de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (VRE). Objetivo desarrollado en los Capítulos II, III y IV.
- 3) Determinar, por citometría de flujo, si la adaptación previa a determinados biocidas modifica el porcentaje de células de *Listeria monocytogenes* supervivientes a diferentes tratamientos con tetraciclina. Objetivo desarrollado en el Capítulo V.
- 4) Conocer la prevalencia, los niveles y los patrones de resistencia a antibióticos de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo en el noroeste de la Península Ibérica. Objetivo desarrollado en el Capítulo VI.
- 5) Determinar el efecto de diferentes aditivos sobre la prevalencia y los patrones de resistencia a antibióticos de *Listeria monocytogenes* en carne de pollo. Objetivo desarrollado en el Capítulo VII.
- 6) Determinar, mediante microscopía láser confocal de barrido (CLSM), la arquitectura y la viabilidad de las biopelículas formadas por diferentes especies bacterianas sobre distintas superficies de contacto a diferentes tiempos de incubación y varias temperaturas. Objetivo desarrollado en los Capítulos VIII y IX.

- 7) Conocer la distribución espacial y el biovolumen de las bacterias en biofilms monoespecie y mixtos (formados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas), a lo largo de 10 días de incubación a 10 °C. Objetivo desarrollado en el Capítulo X.
- 8) Evaluar, mediante microscopía láser confocal de barrido, el efecto de concentraciones bajas de hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio sobre la capacidad de *L. monocytogenes* para formar biofilm. Objetivo desarrollado en el Capítulo XI.
- 9) Evaluar, mediante microscopía láser confocal de barrido, el efecto de varias concentraciones de hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio sobre los biofilms formados por *L. monocytogenes*. Objetivo desarrollado en el Capítulo XII.
- 10) Conocer el efecto de diferentes concentraciones del bacteriófago P100 sobre las biopelículas de *L. monocytogenes*. Objetivo desarrollado en el Capítulo XIII.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- 1) Determinar la relación entre la hidrofobicidad superficial de las células bacterianas y su susceptibilidad a antimicrobianos (biocidas y antibióticos). Objetivo desarrollado en el Capítulo I.
- 2) Poner a punto la técnica de citometría de flujo para determinar los porcentajes de células bacterianas supervivientes tras la aplicación de antimicrobianos en diferentes condiciones. Objetivo desarrollado en el Capítulo V.
- 3) Conocer las diferencias entre la prevalencia, los niveles y los patrones de resistencia a antibióticos de *Listeria monocytogenes* en España y Portugal. Objetivo desarrollado en el Capítulo VI.
- 4) Poner a punto una metodología para cuantificar por separado los niveles de células totales y de células viables de *Listeria monocytogenes* en carne de ave. Objetivo desarrollado en el Capítulo VI.
- 5) Conocer los niveles de los principales grupos de microorganismos indicadores de calidad higiénica en carne de ave. Objetivo desarrollado en el Capítulo VI.

- 6) Determinar la relación entre la hidrofobicidad superficial de las células bacterianas y su capacidad para formar biopelículas en las diversas superficies. Objetivo desarrollado en el Capítulo IX.
- 7) Poner a punto la técnica de microscopía láser confocal de barrido para el estudio de los biofilms en diferentes condiciones. Objetivo desarrollado en los Capítulos VIII, IX, X, XI, XII y XIII.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2010). Aditivos. Disponible en: <https://www.aesan.gob.es/SIAC-WEB/pregunta.do;jsessionid=hNcPWRmby1R1cgqw7xpTqhJTsZcqNsQ4hKznnQTT518ktZpJyhxS!2003377714?reqCode=retrieve&bean.id=161> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2021a). Vigilancia de Zoonosis y Agentes Zoonóticos. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subseccion/vigilancia_zoonosis.htm (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2021b). Informe de análisis de datos de zoonosis 2019. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/control_oficial/2019_Informe_AESAN_Analisis_Datos_Zoonosis.pdf (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- Ahmed, M. A. E.-G.E.-S., Zhong, L.-L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., Tian, G.-B. (2020). Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerging Microbes and Infections* **9**:1, 868-885. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>
- Akhmaltdinova, L., Lavrinenko, A., Belyayev, I. (2017). Flow cytometry in detecting resistant *E. coli* strains. *Open access Macedonian Journal of Medical Sciences* **5**(5): 592–594. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.104>
- Alonso-Calleja, C., Guerrero-Ramos, E., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2015). Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control* **56**: 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.012>
- Alonso-Hernando, A., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2010). Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Food Microbiology* **137**(2-1): 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.022>
- Andersen, E. V. M. (2016). Bacterial resistance to biocides. *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry* (Second Edition), pp. 603-616. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00039-X>

- Aumeran, C., Balestrino, D., Forestier, C. (2020). Bacterial biofilms and health. Encyclopedia of the Environmental. Disponible en: <https://www.encycopedie-environnement.org/en/health/bacterial-biofilms/> (Fecha de último acceso: 18 de abril de 2021).
- Austin, J. W. (2014). Microbiological Safety of meat | *Clostridium botulinum* and Botulism. *Encyclopedia of Meat Sciences* (Second Edition), pp. 330-334. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00036-2>
- Balaure, P. C., Grumezescu, A. M. (2020). Recent advances in surface nanoengineering for biofilm prevention and control. Part ii: active, combined active and passive, and smart bacteria-responsive antibiofilm nanocoatings. *Nanomaterials* **10**(8): 1527. <https://doi.org/10.3390/nano10081527>
- Barocci, S., Calza, L., Blasi, G., Briscolini, S., de Curtis, B. P., Cucco, L., Postachini, M., Graziosi, T., Nardi, S., Pezzotti, G. (2008). Evaluation of a rapid molecular method for detection of *Listeria monocytogenes* directly from enrichment broth media. *Food Control* **19**(8): 750-756. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.013>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* **13**: 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- BOE (2002). Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. Ministerio de Sanidad y Consumo [BOE núm. 44, de 20 de febrero de 2002, BOE-A-2002-3366]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2002/BOE-A-2002-3366-consolidado.pdf> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- Boerema, J. A., Broda, D. M. (2004). Microbiological Safety of meat | *Clostridium botulinum*. *Encyclopedia of Meat Sciences*, pp. 786-793. <https://doi.org/10.1016/B0-12-464970-X/00053-2>
- Bos, R., Van der Mei, H. C., Busscher, H. J. (2006). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews* **23**(2): 179-230. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x>
- Brown, M. R. W., Gilbert, P. (1993). Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Applied Bacteriology* **74**(S22): 87S-97S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb04345.x>

- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**: 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.003>
- Camargo, A. C., Woodwar, J. J., Call, D. R., Nero, L. A. (2017). *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario. *Foodborne Pathogens and Disease* **14**(11): 623-636. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2274>
- Capita González, C. (2009). El problema de *Listeria* en la industria cárnica: *Listeria monocytogenes* y listeriosis. *Revista de la Asociación de Científicos y Tecnólogos de Alimentos de Castilla y León (ACTA CL)* **37**: 4-15.
- Capita González, R. (2013). *Papel de la industria alimentaria en el control de la resistencia bacteriana a los antibióticos*. Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León, León. Disponible en: <http://academiacienciasveterinariascyl.com/publicaciones/discursos%20ingreso/Rosa%20Capita%20Academico%20Correspondiente.pdf> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**(1): 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Rodríguez-Melcón, C., Panera-Martínez, S. (2021). La resistencia a los antibióticos también es un problema alimentario. *The Conversation*. Disponible en: <https://theconversation.com/la-resistencia-a-los-antibioticos-tambien-es-un-problema-alimentario-157943> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- Capita, R., Castaño-Arriba, A., Rodríguez Melcón, C., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C. (2020). Diversity, antibiotic resistance, and biofilm-forming ability of enterobacteria isolated from red meat and poultry preparations. *Microorganisms* **8**(8): 1226. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081226>
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(4): 1268-1280. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>
- Capita, R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Alonso-Calleja, C. (2019). Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance

- and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports* **9**: 15905. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51907-1>
- Cardoso Pereira, P. M., Reis Baltazar Vicente, A. F. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science* **93**(3): 586-592. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>
- CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades) (2020). *Salmonella* y los alimentos. Disponible en: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/salmonella-and-food-sp.html> (Fecha de último acceso: 19 de abril de 2021).
- Chauret, C. P. (2014). Sanitization. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition), pp. 360-364. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00407-9>
- Cheng, C., Li, H., Wang, J., Wang, H., Yang, X. (2020). A review of measurement methods for peracetic acid (PAA). *Frontiers of Environmental Science and Engineering* **14**(87): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11783-020-1266-5>
- Crouzet, M., Le Senechal, C., Brözel, V. S., Costaglioli, P., Barthe, C., Bonneu, M., Garbay, B., Vilain, S. (2014). Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. *BMC Microbiology* **14**: 253. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0253-z>
- Cunningham, A. B., Lennox, J. E., Ross, R. J. (2008). Chapter 1. Introduction to biofilms. Section 4. What are key characteristics of biofilms? Disponible en: <https://www.cs.montana.edu/webworks/projects/biofilmbook/contents/chapters/chapter001/section004/blue/page001.html> (Fecha de último acceso: 9 de enero de 2022).
- Del Río, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2007). Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology* **115**(3): 268-280. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.048>
- Deng, Z., Luo, X. M., Liu, J., Wang, H. (2020). Quorum sensing, biofilm, and intestinal mucosal barrier: involvement the role of probiotic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **10**: 538077. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.538077>
- Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology* **31**(2): 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.012>
- Donland, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* **8**(9): 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>

- DOUE (2008). Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios. [DOUE n°. 32008R1333 del 16 de diciembre de 2008 (18 págs.) DOUE-L-354-16]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:02008R1333-20200702&rid=1> (Fecha de último acceso: 14 de diciembre de 2021).
- DOUE (2013a). Reglamento de ejecución (UE) n° 797/2013 de la Comisión de 21 de agosto de 2013 relativo a la autorización de un preparado de *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 como aditivo en la alimentación de terneros de cría y engorde y de lechones destetados (titular de la autorización: Chr. Hansen A/S) y por el que se deroga el Reglamento (CE) n° 1333/2004. [DOUE n° L 224/6, del 21 de agosto de 2013 (3 págs.) DOUE-L-2013-224/6]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0797&from=EN> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- DOUE (2013b). Reglamento (UE) n° 101/2013 de la Comisión, de 4 de febrero de 2013, relativo a la utilización de ácido láctico para reducir la contaminación de superficie de las canales de bovinos. [DOUE-L-2013-34/1]. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX:32013R0101> (Fecha de último acceso: 14 de diciembre de 2021).
- Dynes, J. J., Lawrence, J. R., Kober, D. R., Swerhone, G. D. W., Leppard, G. G., Hitchcock, A. (2009). Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Canadian Journal of Microbiology* **55**(2): 163 – 178. <https://doi.org/10.1139/W08-109>
- ECHA (European Chemicals Agency) (2019a). Sodium Hypochlorite. Disponible en: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.028.790> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- ECHA (European Chemicals Agency) (2019b). Quaternary ammonium compounds, benzyl-C12-18-alkyldimethyl, chlorides. Disponible en: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.063.544> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- ECHA (European Chemicals Agency) (2019c). Peracetic acid. Disponible en: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.001.079> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- EFSA y ECDC (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* **17**(12): e05926. Disponible en:

- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2019.5926> (Fecha de último acceso: 06 de febrero de 2021).
- EFSA y ECDC (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* **19**(12): 6971. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2008). Technical guidance - Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA Journal* **6**(7): 732. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.732>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2011). Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. *EFSA Journal* **9**(7): 2317. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2317>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2017). Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. *EFSA Journal* **15**(12): 5063. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5063>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2018). Evaluation of the safety and efficacy of the organic acids lactic and acetic acids to reduce microbiological surface contamination on pork carcasses and pork cuts. *EFSA Journal* **16**(12): e05482. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5482>
- Elias, S., Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews* **36**(5): 990-1004. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x>
- European Commission (2021). Food Safety. Additives. What are food additives?. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/safety/food-improvement-agents/additives_en (Fecha de último acceso: 01 de septiembre de 2021).
- Ezzati, M., Lopez, A. D., Rodgers, A., Hoom, S. V., Murray, C., The Comparative Risk Assessment Collaborating Group (2002). Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *The Lancet* **360**(9343): 1347-1360. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11403-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11403-6)
- Fagerlund, A., Langsrud, S., Møretrø, T. (2021). Microbial diversity and ecology of biofilms in food industry environments associated with *Listeria monocytogenes* persistence. *Current Opinion in Food Science* **37**: 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.015>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (2020a). Producción y productos avícolas. Disponible en: <http://www.fao.org/poultry-production-products/production/es/> (Fecha de último acceso: 30 de agosto de 2021).

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (2020b). Perspectivas Alimentarias. Resúmenes de Mercado. Disponible en: <http://www.fao.org/3/cb0606es/cb0606es.pdf> (Fecha de último acceso: 30 de agosto de 2021).
- FAOSTAT (2020). Consumo carne de pollo. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL> (Fecha de último acceso: 15 de abril de 2021).
- Ferriol-González, C., Domingo-Calap, P. (2020). Phages for biofilm removal. *Antibiotics (Basel)* **9**(5): 268. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050268>
- Fessia, A., Dieser, S. A. (2018). *Streptococcus uberis: Identificación molecular y producción in vitro de biofilm*. Editorial Académica Española. ISBN: 978-620-2-11092-1. https://www.researchgate.net/publication/323756274_Streptococcus_uberis_Identificacion_molecular_y_produccion_in_vitro_de_biofilm#fullTextFileContent
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* **14**: 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Frazier, W. C., Westhoff, D. C. (1993). *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia S. A. Zaragoza (España).
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in Microbiology* **9**: 898. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Kačániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., Simões, M. (2015). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* **6**: 841. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>
- Gomes, I. B., Simões, M., Simões, L. C. (2020). Copper surfaces in biofilm control. *Nanomaterials* **10**(12): 2491. <https://doi.org/10.3390/nano10122491>
- González-Machado, C., Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2018). Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella* Agona biofilms at different stages of development. *PLoS ONE* **13**(7): e0200011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200011>
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M.-F., Bielecka, M. K., Scotti, M., Disson, O. Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O.,

- Lecuit, M. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases* **16**(1): 136-138. <https://doi.org/10.3201/eid1601.091155>
- Harper, D. R., Parracho, H. M. R. T., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S., Morales, S. (2014). Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics (Basel)* **3**(3): 270–284. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030270>
- Harris, L. J., Griffiths, M. W. (1992). The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction (PCR). *Food Research International* **25**(6): 457-469. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(92\)90171-Z](https://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90171-Z)
- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, Angulo, F. J., Devleeschauwer, B. (2015). World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Medicine* **12**(12): e1001923. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>
- Henry Perry, M. D. (2018). Is blepharitis the progenitor of OSD? *Ophthalmology Management* **22**: 87-94. Disponible en: <https://www.ophtalmologymanagement.com/issues/2018/october-2018/is-blepharitis-the-progenitor-of-osd> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- Herrera, M. L., Vargas, A., Campos, M. (1998). Aislamientos de *Enterococcus* spp., resistentes a la vancomicina, en muestras de heces de niños costarricenses. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños* **33**(1-2): 29-39. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461998000100004
- Heukelekian, H., Heller, A. (1940). Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *Journal of Bacteriology* **40**(4): 547-558. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374658/?page=2>
- Heydorn, A., Ersbøll, B. K., Hentzer, M., Parsek, M. R., Givskov, M., Molin, S. (2000). Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology* **146**(10): 2409–2415. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2409>
- Hoffmann, S., Devleeschauwer, B., Aspinall, W., Cooke, R., Corrigan, T., Havelaar, A., Angulo, F., Gibb, H., Kirk, M., Lake, R., Speybroeck, N., Torgerson, P., Hald, T. (2017). Attribution of global foodborne disease to specific foods: Findings from a World Health Organization structured expert elicitation. *PLoS ONE* **12**(9): e0183641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183641>

- Hoogmoed, C. G., van Der Kuijl-Booij, M., Van der Mei, H. C., Busscher, H. J. (2000). Inhibition of *Streptococcus mutans* NS adhesion to glass with and without a salivary conditioning film by biosurfactant-releasing *Streptococcus mitis* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(2): 659-663. <https://doi.org/10.1128/aem.66.2.659-663.2000>
- Hutchings, M., Truman, A., Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology* **51**:72-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- IFT (Institute of Food Technologists) (2006). Antimicrobial resistance: Implications for the Food System. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **5**(3): 71-137. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00004.x>
- INE (Instituto Nacional de Estadística) (2020a). Consumo medio de carne de ave por persona y año. Instituto Nacional de Estadística (España). Disponible en: <https://www.ine.es/consul/serie.do?d=true&s=EPF391286&c=2&nult=15> (Fecha de último acceso: 01 de septiembre de 2021).
- INE (Instituto Nacional de Estadística) (2020b). Consumo humano de carne per cápita, por tipo de carnes, anual. Instituto Nacional de Estadística (Portugal). Disponible en: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&contecto=pi&indOcorrCod=0000211&selTab=tab0 (Fecha de último acceso: 01 de septiembre de 2021).
- INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo) (2012). *Staphylococcus aureus*. Disponible en: <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Staphylococcus+aureus.pdf/0f7074f1-f1d4-441e-b808-edd4523c9fae> (Fecha de último acceso: 19 de abril de 2021).
- Jahid, I. K., Ha, S.-D. (2014). The paradox of mixed - species biofilms in the context of Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**(5): 990-1011. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12087>
- Jarzembowski, T., Józwiak, A., Wiśniewska, K., Witkowski, J. (2010). Flow cytometry approach study of *Enterococcus faecalis* vancomycin resistance by detection of Vancomycin@FL binding to the bacterial cells. *Current Microbiology* **61**: 407-410. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9628-z>
- Kafil, H. S., Asgharzadeh, M. (2014). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from education hospital of Iran. *Maedica (Bucur)* **9**(4): 323-327. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4316874/>
- Kang, M., Xie, Y., He, C., Chen, Z. X., Guo, L., Yang, Q., Liu, J. Y., Du, Y., Ou, Q. S., Wang, L. L. (2014). Molecular characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from

- a tertiary care hospital in Chengdu, China: molecular characteristics of VRE in China. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **33**(6): 933-939. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2029-z>
- Karesh, W. B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J. O., Lubroth, J., Dixon, M. A., Bennett, M., Aldrich, S., Harrington, T., Formenty, P., Loh, E. H., Machalaba, C. C., Thomas, M. J., Heymann, D. L. (2021). Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet* **380**(9857): 1936-1945. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)
- Katz, L., Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **43**(2-3): 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* **8**(6): 257–260. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02355-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02355-9)
- Kralik, P., Ricchi, M. (2017). A basic guide to Real Time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers Microbiology* **8**: 108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Lasa, I., Pozo, J. L., Penades, J. R., Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* **28**(2): 163-175. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1137-66272005000300002 (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- Levin, R. E (2012). PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *International Journal of Food Microbiology* **156**(1): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.001>
- Lin, J., Nishino, K., Roberts, M. C., Tolmasky, M., Aminov, R. I., Zhang, L. (2015). Mechanisms of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology* **6**: 34. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00034>
- Liu, B., Zhou, X., Zhang, L., Liu, W., Dan, X., Shi, C., Shi, X. (2012). Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis. *Food Control* **27**(1): 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.062>
- Lv, X., Gu, X., Wang, L., He, X., He, C., Zhang, J., Zhao, L. (2021). Rapid and absolute quantification of VBNC *Cronobacter sakazakii* by PMAxx combined with single intact cell droplet digital PCR in infant foods. *LWT* **145**: 111388. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111388>

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*, 12ª edición. Pearson Educación, Madrid (España).
- Maillard, J. -Y. (2002). Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology* **92**(s1): 16s-27s. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x>
- MAPA (2020a). Indicadores Económicos del sector avícola de carne 2020. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicossectoravicoladecarne2020_parapublicar_tcm30-419674.pdf (Fecha de último acceso: 15 de abril de 2021).
- MAPA (2020b). Sector avícola de carne de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/avicola-de-carne/> (Fecha de último acceso: 02 de septiembre de 2021).
- MAPA (2021). *Salmonella*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/salmonella/salmonella_general.aspx (Fecha de último acceso: 19 de abril de 2021).
- Martínez-Granero, F., Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M, De Heredia, E. G., Baena, I., Martín-Martín, I., Rivilla, R., Martín, M. (2014). Identification of flgZ as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas*. *PLoS ONE* **9**: e87608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087608>
- Matsuoka, H., Nakano, K., Takatani, N., Yoshida, T., Igimi, S., Saito, M. (2014). Flow cytometric method for in situ preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony-forming potentiality. *Journal of AOAC International* **97**(2): 479–483. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-302>
- McDonnell, G., Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 147-179. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>
- Melissa, B. M., Bonnie, L. B. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**: 165-199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Moreno García, B. (2006). *Higiene e inspección de carnes Vol I*. Ediciones Díaz de Santos, Madrid (España).

- Mwandi, W., Figueiredo, P. de, Criscitiello, M. F. (2016). One Health: addressing global challenges at the nexus of human, animal, and environmental health. *PLoS Pathogens* **12**(9): e1005731. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005731>
- Nair, D. V. T., Venkitanarayanan, K., Johny, A. K. (2018). Antibiotic-Resistant *Salmonella* in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. *Foods* **7**(10): 167. <https://doi.org/10.3390/foods7100167>
- Nguyen-Viet, H., Chotinun, S., Schelling, E., Widyastuti, W., Khong, N. V., Kakkar, M., Beeche, A., Jing, F., Khamlome, B., Tum, S., Adisasmito, W. (2017). Reduction of antimicrobial use and resistance needs sectoral-collaborations with a One Health approach: perspectives from Asia. *International Journal of Public Health* **62**(Suppl. 1): 3-5. <https://doi.org/10.1007/s00038-016-0933-6>
- Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., Carrique-Mas, J. J. (2017). Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: A review. *Frontiers in Veterinary Science* **4**: 126. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>
- Nivens, D. E., Palmer Jr., R. J., White, D. C. (1995). Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: A review of analytical techniques. *Journal of Industrial Microbiology* **15**: 263–276. <https://doi.org/10.1007/BF01569979>
- Novo, D. J., Perlmutter, N. G., Hunt, R. H., Shapiro, H. M. (2000). Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrobial Agents and Chemoteraphy* **44**(4): 827-834. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.4.827-834.2000>
- O'Toole, G. A., Gibbs, K. A., Hager, P. W., Phibbs Jr, P. V., Kolter, R. (2000). The Global Carbon Metabolism Regulator Crc Is a Component of a Signal Transduction Pathway Required for Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **182**(2): 425-431. <https://doi.org/10.1128/JB.182.2.425-431.2000>
- OMS (2020). Inocuidad de los alimentos. Organización Mundial de la Salud, Ginebra (Suiza). Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- O'Neill, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance*. HM Government, UK. Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021).

- Ortega Morente, E., Fernández-Fuentes, M. A., Grande Burgos, M. J., Abriouel, H., Pulido, R. P., Gálvez, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **162**(1-1): 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028>
- Pardo Hernández, D. (2014). *Susceptibilidad bacteriana frente a cuatro soluciones germicidas*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Tolima, Colombia. Disponible en: <http://45.71.7.21/bitstream/001/1199/1/RIUT-HAA-spa-2014-%20Susceptibilidad%20Bacteriana%20Frente%20A%20Cuatro%20Soluciones%20Germicidas.pdf> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- Piercey, M. J., Hingston, P. A., Hansen, L. T. (2016). Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15 °C. *International Journal of Food Microbiology* **223**: 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.009>
- Prescott, J. F. (2014). The resistance *tsunami*, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology. *Veterinary Microbiology* **171**(3-4): 273-278. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.035>
- Quereda, J. J., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Gómez-Martín, A., García-Muñoz, A., Thouvenot, P., Tessaud-Rita, N., Bracq-Dieye, H., Lecuit, M. (2020). *Listeria valentina* sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70**(11): 5868-5879. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004494>
- Raymond, Y., Champagne, C. P. (2014). The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. *Food Microbiology* **46**: 176-183. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.002>
- Reichhardt, C., Parsek, M. R. (2019). Confocal Laser Scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Frontiers in Microbiology* **10**: 677. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00677>
- Rendueles, O., Ghigo, J.-M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews* **36**(5): 972-989. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x>
- Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., Hernández, M. (2013). Real-time PCR in Food Science: PCR Diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology* **15**: 39-44. Disponible en:

- <https://www.caister.com/cimb/v/v15/39.pdf> (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021).
- Rutherford, S. T., Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**(11): a012427. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>
- Ryser, E. T. y Marth, E. H. (eds.). (2007). *Listeria, listeriosis and food safety*, 3º ed. CRC Press, Boca Raton (FL, USA).
- Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S.-H., Kim, Y.-R., Kim, H.-Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control* **32**(2): 659-664. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.048>
- Saludes, M., Troncoso, M., Figueroa, G. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in Chilean food matrices. *Food Control* **50**: 331-335. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.008>
- Sánchez Hernández, F. J. (2016). *Listeria monocytogenes*: un reto para la Seguridad Alimentaria. *FarmaJournal* **1**(2): 157-161. <https://revistas.usal.es/index.php/2445-1355/article/view/13224/15662>
- Sánchez Martín, M. A., Salgado Calvo, M.-T., San Miguel A., Pachón Julián, J., Rodríguez Barbero, E., Pastor Martín, R., Cabrero Lobato, P. (2019). Nisina (E 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos. *Gaceta Médica de Bilbao: Revista Oficial de la Academia de Ciencias Médicas de Bilbao* **116**(4): 166-173. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7183118#:~:text=La%20nisina%20es%20una%20sustancia,de%20alimentos%20como%20sustancia%20conservadora> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews* **28**(5): 519–542. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
- SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) (2001). Resistencia a la vancomicina en el género *Enterococcus*. Servicio de Microbiología. C.S.U. de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat (Barcelona). Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/envancor.pdf> (Fecha de último acceso: 19 de abril de 2021).

- SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) (2008). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Procedimientos en Microbiología Clínica. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf> (Fecha de último acceso: 28 de septiembre de 2021).
- Sekyere, J. O., Govinden, U., Essack, S. Y. (2015). Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **119**(5): 1219-1233. <https://doi.org/10.1111/jam.12918>
- Selvan, P., Narendra Babu, R., Sureshkumar, S., Venkataramanujam, V. (2007). Microbial quality of retail meat products available in Chennai city. *American Journal of Food Technology* **2**: 55-59. <https://doi.org/10.3923/ajft.2007.55.59>
- Shahidi, F., Samaranyaka, A. G. P., Pegg, R. B. (2014). Curing. Brine Curing of Meat. *Encyclopedia of Meat Sciences* (Second Edition), pp. 416-424. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00112-4>
- Song, F., Koo, H., Ren, D. (2015). Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. *Journal of Dental Research* **94**(8): 1027-1034. <https://doi.org/10.1177/0022034515587690>
- Stapleton, P. D., Taylor, P. W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science Progress* **85**(1): 57-72. <https://doi.org/10.3184/003685002783238870>
- Stewart, P. S., Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 199-210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., Haq, M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology* **9**:2066. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research* **17**(2): 68-81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>
- Weaver, J. L. (1998). Estimation of cell viability by Flow Cytometry. In: Jaroszeski, M. J., Heller, R. (eds.), *Flow Cytometry Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 91. Humana Press, Totowa, NJ (USA). <https://doi.org/10.1385/0-89603-354-6:77>

- Whiteley, M., Diggle, S. P., Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* **551**(7680): 313–320. <https://doi.org/10.1038/nature24624>
- WHO (2017). One Health. World Health Organization (Geneva, Switzerland). <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/one-health> (Fecha de último acceso: 7 de enero de 2022).
- WHO (2019). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization (Geneva, Switzerland). Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf;jsessionid=E9FBD8C54CF1D3ECADED84BAA9B4C0DB?sequence=1 (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- WHO (2021). Estimating the burden of foodborne diseases. World Health Organization (Geneva, Switzerland). Disponible en: <https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases> (Fecha de último acceso: 20 de abril de 2021).
- Wright, G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology* **8**: 123. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>
- Xu, H.-S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., Collwel, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology* **8**: 313–323. <https://doi.org/10.1007/BF02010671>
- Zhu, Z., Shan, L., Li, X., Hu, F., Yuan, Y., Zhong, D., Zhang, J. (2020). Effects of interspecific interactions on biofilm formation potential and chlorine resistance: Evaluation of dual-species biofilm observed in drinking water distribution systems. *Journal of Water Process Engineering* **38**: 101564. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101564>
- Zobell, C. E. (1943). The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology* **46**(1): 39-56. <https://doi.org/10.1128/jb.46.1.39-56.1943>

CAPÍTULOS

CAPÍTULO I

Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de 12 antimicrobianos (biocidas y antibióticos) en 8 cepas de *Listeria monocytogenes*

PUBLICACIÓN

Cristina Rodríguez-Melcón, Carlos Alonso-Calleja, Camino García-Fernández, Javier Carballo, Rosa Capita (2022). Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for twelve antimicrobials (biocides and antibiotics) in eight strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology* **11**(1), 46.
<https://doi.org/10.3390/biology11010046>

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las bacterias del género *Listeria* son bacilos cortos, Gram positivos, no productoras de esporas y con capacidad de crecimiento en un amplio rango de temperaturas (0,5 °C a 45 °C), valores de pH (4,7 a 9,2) y presiones osmóticas. Estas características, junto con el hecho de que son anaerobios facultativos, permiten a estos microorganismos sobrevivir en condiciones ambientales adversas (Skowron *et al.*, 2018).

Hasta ahora se han identificado un total de 26 especies dentro del género *Listeria* (Tabla I.1). De todas estas especies, la más destacada es *Listeria monocytogenes*, causante de la mayoría de los casos de listeriosis, ya sea en humanos o en animales. *Listeria ivanovii* también provoca a veces listeriosis, y se han descrito algunos casos esporádicos en los que la listeriosis fue causada por *Listeria seeligeri* (Wagner y McLauchin, 2008).

La listeriosis es una zoonosis de origen alimentario que afecta con mayor frecuencia y gravedad a los grupos de riesgo, conocidos colectivamente como YOPIs (*Young, Old, Pregnant, and Immunocompromised*; niños, ancianos, mujeres embarazadas, inmunodeprimidos). La listeriosis invasiva es una infección asociada a una alta tasa de ingresos hospitalarios y es la enfermedad transmitida por alimentos con mayor tasa de letalidad (EFSA y ECDC, 2021). Además, esta infección puede dar lugar a importantes lesiones y secuelas, como meningitis, encefalitis, septicemia, endocarditis y abortos (Sourav *et al.*, 2020). Por estas razones, *L. monocytogenes* representa un riesgo importante para la Industria Alimentaria, y en particular para los productores de alimentos listos para el consumo (*ready to eat*; RTE) (Rugna *et al.*, 2021). Por ello, se aplican varias medidas para reducir la prevalencia y/o los niveles de este microorganismo en los alimentos listos para el consumo (FDA, 2017; Kraśniewska *et al.*, 2020).

Entre los desinfectantes más utilizados en los entornos de procesado de alimentos se encuentran el hipoclorito de sodio (HS), el cloruro de benzalconio (CB) y el ácido peracético (AP). Los desinfectantes a base de cloro, como el HS, son compuestos oxidantes de bajo coste que muestran una potente actividad bactericida de amplio espectro (Waghmare y Annapure, 2015). Por su parte, los compuestos derivados del amonio cuaternario, como el CB, son tensioactivos catiónicos que actúan destruyendo la bicapa lipídica de la membrana y tienen un efecto antimicrobiano frente a varios tipos de microorganismos (Henriques y Fraqueza, 2017). La actividad antimicrobiana del AP también se basa en la oxidación de los componentes celulares (Finnegan *et al.*, 2010). Tanto el HS como el AP están aprobados para diversos usos en el Espacio Económico Europeo (EEE) y en Suiza, incluyendo la desinfección de áreas de alimentos y piensos (productos tipo 4). Esto está sujeto a las especificaciones y

condiciones de uso establecidas por el Reglamento de Ejecución (UE) N° 2017/1273 de la Comisión en el caso de HS, y el Reglamento de Ejecución (UE) N° 2016/672 de la Comisión para AP. En la actualidad, se está revisando en el EEE y en Suiza el uso de CB en diferentes tipos de productos biocidas, incluidos los desinfectantes para zonas donde se procesan alimentos y piensos (Capita *et al.*, 2019a).

Tabla I.1. Especies del género *Listeria* (Fuente: adaptado de Nwaiwu, 2020).

Especie	Año de descripción	Referencia
<i>Listeria monocytogenes</i>	1940	Pirie (1940)
<i>Listeria innocua</i>	1983	Seeliger (1981)
<i>Listeria seeligeri</i>	1983	Rocourt y Grimont (1983)
<i>Listeria welshimeri</i>	1983	Rocourt y Grimont (1983)
<i>Listeria ivanovii</i>	1984	Seeliger <i>et al.</i> (1984)
<i>Listeria grayi</i>	1992	Rocourt <i>et al.</i> (1992)
<i>Listeria marthii</i>	2010	Graves <i>et al.</i> (2010)
<i>Listeria rocourtiae</i>	2010	Leclerc <i>et al.</i> (2010)
<i>Listeria fleischmannii</i>	2013	Bertsch <i>et al.</i> (2013)
<i>Listeria weihenstephanensis</i>	2013	Lang Halter <i>et al.</i> (2013)
<i>Listeria aquatica</i>	2014	Den Bakker <i>et al.</i> (2014)
<i>Listeria cornellensis</i>	2014	Den Bakker <i>et al.</i> (2014)
<i>Listeria floridensis</i>	2014	Den Bakker <i>et al.</i> (2014)
<i>Listeria grandensis</i>	2014	Den Bakker <i>et al.</i> (2014)
<i>Listeria riparia</i>	2014	Den Bakker <i>et al.</i> (2014)
<i>Listeria booriae</i>	2015	Weller <i>et al.</i> (2015)
<i>Listeria newyorkensis</i>	2015	Weller <i>et al.</i> (2015)
<i>Listeria goaensis</i>	2018	Doijad <i>et al.</i> (2018)
<i>Listeria costaricensis</i>	2018	Núñez-Montero <i>et al.</i> (2018)
<i>Listeria thailandensis</i>	2019	Leclercq <i>et al.</i> (2019)
<i>Listeria valentina</i>	2020	Quereda <i>et al.</i> (2020)
<i>Listeria cossartiae</i>	2021	Carlin <i>et al.</i> (2021)
<i>Listeria farberii</i>	2021	Carlin <i>et al.</i> (2021)
<i>Listeria immobilis</i>	2021	Carlin <i>et al.</i> (2021)
<i>Listeria portnoyi</i>	2021	Carlin <i>et al.</i> (2021)
<i>Listeria rustica</i>	2021	Carlin <i>et al.</i> (2021)

Para que los desinfectantes sean eficaces, deben utilizarse en dosis adecuadas. El empleo de concentraciones inferiores a las letales no sólo es ineficaz, sino que incluso puede ser contraproducente, ya que las dosis bajas de biocidas están relacionadas con un aumento de la tolerancia a estas sustancias y la resistencia a los antibióticos, además de una mayor capacidad bacteriana para formar biofilms (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2014,

2019a; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019a, b). Por esta razón, el conocimiento de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) de los desinfectantes es crucial.

Debido a la gravedad de la infección, generalmente se requiere un tratamiento con antibióticos para las personas que padecen listeriosis invasiva. El incremento de la resistencia a los antibióticos en las últimas décadas se ha convertido en una fuente de preocupación en todo el mundo. Aunque se están diseñando diversas estrategias para prevenir y controlar este problema, las resistencias bacterianas son cada vez más frecuentes, tanto en las cepas de origen clínico como en las que se encuentran en el medio ambiente o en los alimentos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

En el contexto planteado se ha realizado la presente investigación, cuyos objetivos han sido: 1) determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) y las concentraciones bactericidas mínimas (MBC) de nueve antibióticos de interés clínico y de tres biocidas utilizados en plantas de procesado de alimentos, frente a ocho cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes a diferentes serotipos; 2) establecer la relación entre los valores de MIC y MBC de los biocidas y los antibióticos; y 3) conocer la influencia de la hidrofobicidad de la superficie celular en la susceptibilidad a los antimicrobianos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizaron 8 cepas de *L. monocytogenes*: ATCC -American Type Culture Collection- 19111 (serotipo 1/2a), ATCC 19112 (serotipo 1/2c), ATCC 19114 (serotipo 4a), ATCC 19117 (serotipo 4d), ATCC 13932 (serotipo 4b), CECT -Colección Española de Cultivos Tipo- 936 (serotipo 1/2b), CECT 937 (serotipo 3b) y CECT 938 (serotipo 3c). Los cultivos bacterianos se mantuvieron almacenados a una temperatura de -50 °C en caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) con un 20% (vol/vol) de glicerol. Antes de cada experimento, se transfirieron alícuotas (aproximadamente 20 µl del cultivo congelado) a tubos con 5 ml de TSB (Oxoid), que se incubaron durante la noche a 37 °C. Posteriormente, los cultivos se sembraron en placas con agar triptona de soja (TSA, Oxoid) y se almacenaron a 4 ± 1 °C para su posterior uso.

2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Se determinó la MIC de los antimicrobianos por el método de microdilución en caldo de acuerdo con el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, EE.UU. (CLSI, 2019). Para ello, se utilizaron diferentes concentraciones de 12 antimicrobianos (3 biocidas y 9 antibióticos). Los biocidas probados fueron hipoclorito de sodio (HS), cloruro de benzalconio (CB) y ácido peracético (AP). Los tres se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, Missouri, EE.UU.). Para la preparación de las correspondientes soluciones se partió de compuestos con un 10% de pureza (expresado como porcentaje de cloro libre) en el caso del hipoclorito sódico, un 95% (asumiendo que el producto es puro) en el caso del cloruro de benzalconio, y un 39% de ácido acético en el caso de AP. Los antibióticos deshidratados (Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.) fueron ampicilina (AMP), cefalotina (KF), cefoxitina (FOX), eritromicina (E), cloranfenicol (C), gentamicina (CN), tetraciclina (TE), vancomicina (VA) y fosfomicina (FOS). Antes de comenzar cada experimento, se prepararon soluciones de cada uno de estos compuestos en condiciones asépticas en agua destilada estéril (FOX, CN, TE, VA, FOS), en etanol al 95% (E, C), en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 8,0 (AMP) o en PBS a pH 6,0 (KF). Se realizaron tres repeticiones para cada cepa y compuesto antimicrobiano.

Se tomaron, a partir de placas de TSA (Oxoid), 5 colonias de cada cepa, que se inocularon en 9 ml de TSB (Oxoid) y se incubaron a 37 °C durante 18 a 24 horas. Para el experimento se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth

Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Los pocillos se llenaron con un volumen total de 200 μl , constituidos por 20 μl de la solución de antimicrobiano (se usó un rango de concentraciones) y 180 μl de la tercera dilución del inóculo, con el fin de obtener una concentración final en el pocillo de 10^5 ufc/ml. La concentración del inóculo se confirmó por siembra en placa. Se utilizaron controles negativos con 200 μl de TSB, controles negativos con 200 μl de las soluciones de antimicrobianos y controles positivos con 200 μl del inóculo bacteriano. El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica de cada muestra en un rango de 480 a 520 nm ($\text{DO}_{480-520}$) en un Bioscreen C MRB (Oy Growth Curves Ab). La MIC se estableció como la concentración mínima de antimicrobiano necesaria para impedir el crecimiento bacteriano después de 48 horas de incubación a 37 °C. Se consideró como límite de crecimiento una $\text{DO}_{480-520}$ de 0,200. Las cepas se clasificaron como resistentes, con susceptibilidad reducida (intermedia) o susceptibles en base a los siguientes criterios: criterios establecidos para *L. monocytogenes* en el caso de AMP y E (EUCAST, 2019), criterios establecidos para *Staphylococcus* spp. en el caso de C, TE, y FOS (EUCAST, 2019), *Staphylococcus aureus* para CN y VA (EUCAST, 2019), y criterios establecidos para *S. aureus* en el caso de KF y FOX (CLSI, 2017). En algunos casos se emplearon los criterios establecidos para otra bacteria Gram-positiva (*Staphylococcus* spp. o *S. aureus*) ante la inexistencia de criterios para *L. monocytogenes*.

2.3. Determinación de la concentración mínima bactericida (MBC)

Para el cálculo de las MBCs de los antimicrobianos se empleó el método de dilución en caldo (CLSI, 2019). A partir de los pocillos de las placas de microtítulo (Oy Growth Curves Ab Ltd.) en los que no se observó crecimiento tras 48 h de incubación a 37 °C, se sembraron 0,1 ml en la superficie de placas de TSA (Oxoid). Dichas placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C, considerándose MBC como la menor concentración de compuesto con la que no se formaron colonias en estas condiciones. Teniendo en cuenta que el límite de detección de la técnica es de 10 ufc/ml, la ausencia de crecimiento en las placas de TSA indica que la concentración es inferior a este valor y, por lo tanto, que la concentración inicial (10^5 ufc/ml) se ha reducido hasta menos de 10 ufc/ml. Por ello, se considera MBC como la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de destruir más del 99,99% de las bacterias presentes.

2.4. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular (CHS)

La hidrofobicidad de la superficie de las células microbianas se determinó mediante la prueba de adhesión microbiana a solventes (*microbial adhesion to solvents*, MATS) basado en la afinidad a los solventes no polares (To *et al.*, 2002). Se utilizó hexadecano como fase

hidrocarbonada. La CHS de las cepas se determinó mediante la prueba de adhesión microbiana a los disolventes (MATS) basada en la afinidad a los disolventes no polares (To *et al.*, 2002). Se utilizó hexadecano como fase hidrocarbonada. Las células de *L. monocytogenes* se cultivaron en TSB durante 24 h a 37 °C. Las células se recogieron por centrifugación (4.000 rpm, 10 min, 4 °C), se lavaron dos veces con PBS estéril (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se volvieron a suspender en TSB a una concentración inicial de 10⁵ ufc/ml. Tras 24 horas a 37 °C, las células bacterianas se centrifugaron, se lavaron dos veces con PBS y se volvieron a suspender en 150 mM de NaCl a una concentración de aproximadamente 10⁸ ufc/ml. Se obtuvo una muestra en fase acuosa (0,4 ml) y se determinó la absorbancia a 405 nm (DO₄₀₅; Bioscreen C MBR, Oy Growth Curves Ab). La suspensión celular (2,0 ml) se agitó en vórtex con 0,33 ml de hexadecano (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 60 s y luego se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente, lo que produjo la separación completa de las dos fases. El porcentaje de células presentes en el disolvente se calculó mediante la siguiente ecuación: % de afinidad = 100 × [1 - (A/A₀)], donde A₀ es la absorbancia de la suspensión original a 405 nm antes de la mezcla, y A es la absorbancia de la fase acuosa. La hidrofobicidad de la superficie celular se clasificó como afinidad débil (< 21%), moderada (21% a 50%) o fuerte (> 50%) (To *et al.*, 2002). Todas las determinaciones se llevaron a cabo ocho veces en cuatro días distintos (se realizaron dos réplicas en el mismo día).

2.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de correlación para determinar la relación entre la MIC y la MBC de los biocidas y antibióticos y los porcentajes de afinidad por el hexadecano (hidrofobicidad). Los valores de hidrofobicidad se compararon para determinar la significación estadística mediante un análisis de técnicas de varianza. Las separaciones de medias se obtuvieron mediante la prueba de rango múltiple de Duncan. Se establecieron diferencias significativas para un nivel de probabilidad del 5% ($P < 0,05$). Todo el procesado de datos de este estudio se realizó con el paquete de software Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de biocidas

Los valores de MIC y MBC de los tres biocidas ensayados para las 8 cepas de *L. monocytogenes* se muestran en la Tabla I.2 y se representan gráficamente en la Figura I.1. El HS fue el compuesto que requirió mayores concentraciones para inhibir el crecimiento de las cepas tras 48 horas de incubación, observándose MICs de entre 1.750 ppm (175 ppm de cloro libre) y 4.500 ppm (450 ppm de cloro libre). Los valores obtenidos para la MBC fueron iguales o superiores a los de la MIC, con un rango de 2.250 ppm a 4.500 ppm.

Tabla I.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) y concentración mínima bactericida (MBC, ppm) de tres biocidas en ocho cepas de *Listeria monocytogenes*.

CEPA	BIOCIDA		
	HS	CB	AP
LM ATCC 19111	1.750 (2.250)	0,25 (1,50)	1.650 (1.800)
LM ATCC 19112	2.250 (2.250)	0,50 (0,50)	1.500 (1.550)
LM ATCC 19114	3.500 (3.900)	2,00 (4,00)	1.050 (1.150)
LM ATCC 19117	3.500 (3.500)	0,75 (3,00)	1.700 (1.750)
LM ATCC 13932	3.500 (3.700)	4,00 (5,00)	1.100 (1.250)
LM CECT 936	3.500 (3.900)	3,00 (5,00)	1.050 (1.150)
LM CECT 937	4.000 (4.500)	20,00 (20,00)	1.600 (1.650)
LM CECT 938	4.500 (4.500)	19,00 (19,00)	1.400 (1.600)

HS, hipoclorito sódico; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético. LM, *Listeria monocytogenes*. ATCC, *American Type Culture Collection*; CECT, *Colección Española de Cultivos Tipo*. Los valores sin paréntesis corresponden a la concentración mínima inhibitoria (MIC); los valores con paréntesis corresponden a la concentración mínima bactericida (MBC).

La MIC del CB fue la más baja de entre los tres compuestos ensayados, oscilando entre 0,25 ppm y 20 ppm. Al igual que en el caso del HS, las MBCs de este compuesto fueron

similares o ligeramente superiores a las MICs, con un rango de entre 0,5 ppm y 20 ppm. Por lo que respecta al AP, los valores obtenidos para la MICs fueron ligeramente inferiores a los del HS, encontrándose en el rango de 1.050 ppm a 1.700 ppm. Las MBCs de AP fueron superiores en todos los casos a las MICs de este compuesto, con valores de entre 1.150 ppm y 1.800 ppm.

3.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de antibióticos

Los valores de las MICs y MBCs de nueve antibióticos de interés clínico estudiados con respecto a las ocho cepas de *L. monocytogenes* se muestran en la Tabla I.3. Las MICs variaron notablemente en función de la combinación de antibiótico y cepa considerada. Los valores (ppm) de las MICs oscilaron entre 1 y 15 para la ampicilina, entre 8 y 150 para la cefalotina, entre 20 y 170 para la ceftioxitina, entre 0,05 y 0,20 para la eritromicina, entre 4 y 50 para el cloranfenicol, entre 3 y 100 para la gentamicina, entre 2 y 15 para la tetraciclina, entre 2 y 80 para la vancomicina y entre 160 y 430 para la fosfomicina.

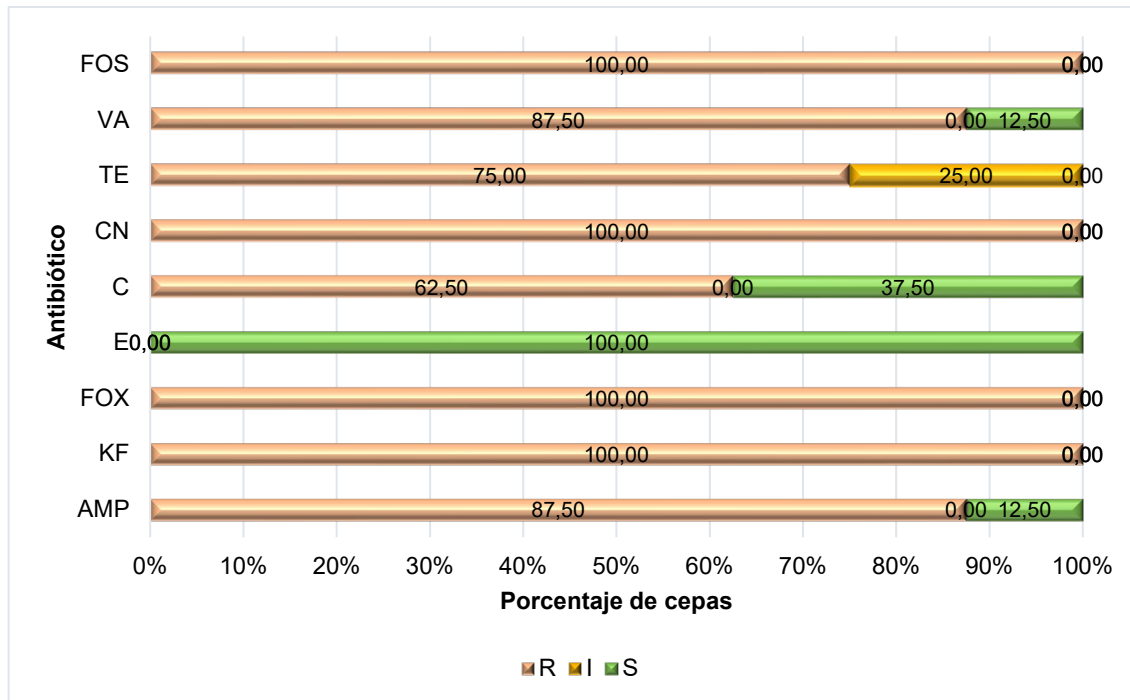
Los valores de MBCs fueron superiores o iguales a los de MICs con respecto a todas las cepas ensayadas. Además, se observaron diferencias considerables entre las cepas. Los valores registrados de MBC (ppm) oscilaron entre 5 y 20 para ampicilina, 9 y 160 para cefalotina, 70 y 200 para ceftioxitina, 4 y 5 para eritromicina, 9 y 70 para cloranfenicol, 5 y 100 para gentamicina, 3 y 30 para tetraciclina, 3 y 90 para vancomicina y 160 y 450 para fosfomicina. En particular, la eritromicina demostró una eficacia destacable, como muestran los bajos valores de MIC y MBC.

En la Figura I.1 se muestran los porcentajes de cepas resistentes, intermedias o susceptibles a cada uno de los antibióticos probados. Como puede observarse, todas las cepas presentaron resistencia a cefalotina, ceftioxitina, gentamicina y fosfomicina. La prevalencia de la resistencia también fue elevada en el caso de ampicilina y vancomicina (87,50%), tetraciclina (75,00%) y cloranfenicol (62,50%). En cambio, todas las cepas fueron sensibles a eritromicina.

Tabla I.3. Concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) y concentración mínima bactericida (MBC, ppm) para nueve antibióticos de interés clínico en ocho cepas de *Listeria monocytogenes*.

CEPA	ANTIBIÓTICO								
	AMP	KF	FOX	E	C	CN	TE	VA	FOS
LM ATCC 19111	7	150	170	0,05	20	45	15	80	350
	(10)	(150)	(180)	(4)	(70)	(50)	(30)	(90)	(350)
LM ATCC 19112	11	140	160	0,1	4	45	14	45	160
	(11)	(140)	(170)	(5)	(10)	(45)	(18)	(50)	(160)
LM ATCC 19114	9	80	140	0,05	20	20	8	20	230
	(9)	(90)	(180)	(5)	(70)	(20)	(11)	(20)	(290)
LM ATCC 19117	1	8	150	0,2	20	4	2	2	430
	(5)	(20)	(200)	(5)	(55)	(15)	(10)	(3)	(450)
LM ATCC 13932	9	70	160	0,2	35	20	11	20	250
	(9)	(70)	(160)	(5)	(60)	(20)	(11)	(20)	(260)
LM CECT 936	5	8	20	0,2	5	3	2	20	170
	(6)	(9)	(70)	(5)	(30)	(5)	(3)	(20)	(180)
LM CECT 937	15	150	170	0,2	50	50	15	35	240
	(15)	(150)	(200)	(5)	(70)	(50)	(30)	(40)	(280)
LM CECT 938	13	150	150	0,2	5	100	15	50	220
	(20)	(160)	(150)	(5)	(9)	(100)	(30)	(60)	(230)
PUNTOS DE CORTE									
S≤ - R>	1-1	0,12-0,5*	4-8	1-1	8-8	1-1	1-2	2-2	32-32

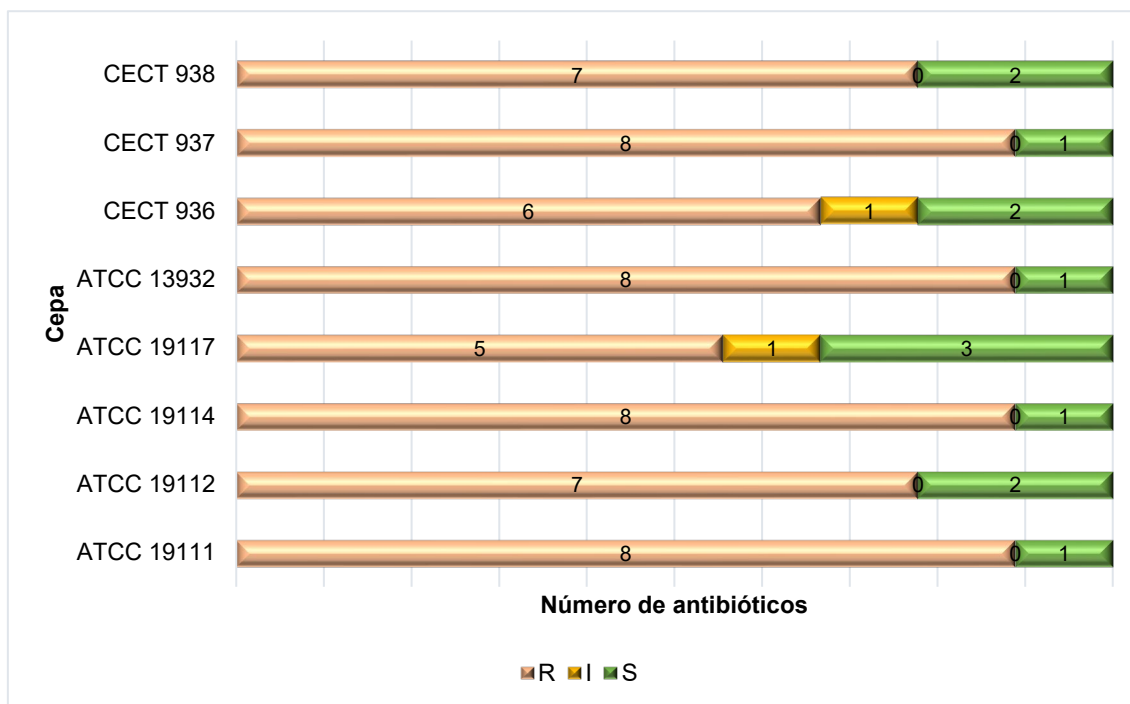
AMP (ampicilina), KF (cefalotina), FOX (cefoxitina), E (eritromicina), C (cloranfenicol), CN (gentamicina), TE (tetraciclina), VA (vancomicina), FOS (fosfomicina). HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético, FTS, fosfato trisódico. LM, *Listeria monocytogenes*. Puntos de corte usados para clasificar las cepas como susceptibles (MIC ≤ punto de corte inferior), de susceptibilidad reducida (MIC > punto de corte inferior ≤ punto de corte superior), o resistentes (MIC > punto de corte superior). Los criterios para AMP y E son específicos de *L. monocytogenes* (EUCAST, 2019). Los de C, TE, FOS corresponden a *Staphylococcus* spp. y CN, VA para *Staphylococcus aureus* (EUCAST, 2019), los de KF y FOX son también de *S. aureus* (CLSI, 2017). *- Rango del Control de Calidad. Las celdas sombreadas en verde muestran las cepas susceptibles, las sombreadas en amarillo las cepas con susceptibilidad reducida, y las sombreadas en rojo las cepas resistentes, según los criterios aplicados. Los valores sin paréntesis corresponden a la concentración mínima inhibitoria (MIC); los valores con paréntesis corresponden a la concentración mínima bactericida (MBC).



AMP (ampicilina), KF (cefalotina), FOX (cefoxitina), E (eritromicina), C (cloranfenicol), CN (gentamicina), TE (tetraciclina), VA (vancomicina) y FOS (fosfomicina). LM -*Listeria monocytogenes*- ATCC -*American Type Culture Collection*- 19111 (serotipo 1/2a), ATCC 19112 (serotipo 1/2c), ATCC 19114 (serotipo 4a), ATCC 19117 (serotipo 4d), ATCC 13932 (serotipo 4b), CECT -Colección Española de Cultivos Tipo- 936 (serotipo 1/2b), CECT 937 (serotipo 3b) y CECT 938 (serotipo 3c).

Figura I.1. Porcentaje de cepas de *Listeria monocytogenes* resistentes (R), intermedias (I, con susceptibilidad reducida) o susceptibles (S) a cada uno de los nueve antibióticos estudiados.

Por último, en la Figura I.2 se muestra el número de antibióticos a los que cada una de las cepas era resistente. Cuatro cepas (ATCC 19111, ATCC 19114, ATCC 13932 y CECT 937) fueron resistentes a ocho antibióticos, dos cepas (ATCC 19112 y CECT 938) a siete, una cepa (CECT 936) a seis y una cepa (ATCC 19117) a cinco antibióticos diferentes.



ATCC, American Type Culture Collection; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo.

Figura I.2. Número de antibióticos a los que cada cepa de *L. monocytogenes* fue resistente, intermedia (con susceptibilidad reducida) o susceptible.

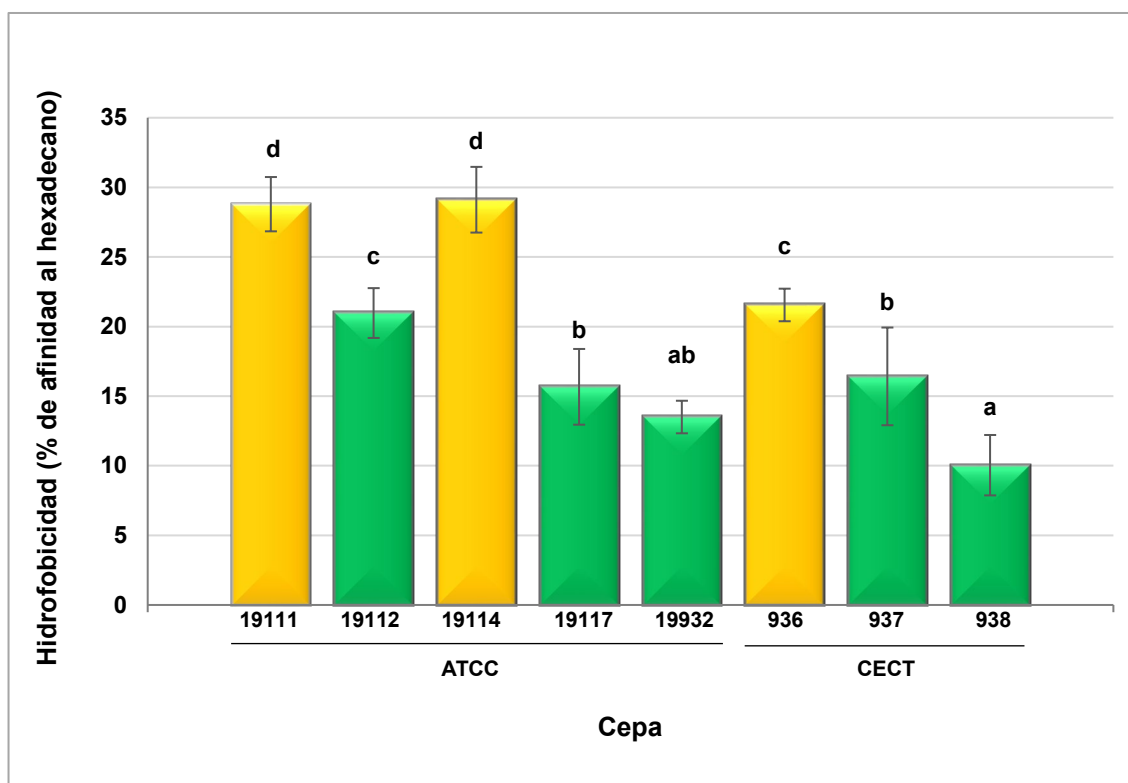
3.3. Relación entre las MICs y las MBCs de los biocidas y antibióticos

Entre las 66 correlaciones analizadas se encontraron 23 correlaciones positivas (34,8%; $P < 0,05$) y 3 negativas (4,5%; $P < 0,05$) (Tabla I.4). En el caso de los MBC (Tabla I.5), se encontraron 27 (40,9%) correlaciones positivas y cinco (7,6%) negativas. Se obtuvo una correlación positiva ($P < 0,001$) entre los valores de MIC y de MBC para cada antimicrobiano probado (Tabla I.6).

3.4. Hidrofobicidad de la superficie celular

Se observaron diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los valores de hidrofobicidad en las distintas cepas de *L. monocytogenes* ensayadas. El porcentaje de afinidad por el hexadecano osciló entre el $10,04 \pm 2,17\%$ en el caso de la cepa LM CECT 938 y el $29,11 \pm 2,36\%$ de LM ATCC 19114 (Figura I.3). Los valores más altos de hidrofobicidad de la superficie celular se reflejaron en un mayor porcentaje de células que pasaron a la fase hidrofóbica del ensayo de MATS.

Tres cepas (37,5% del total) presentaron una hidrofobicidad moderada de la superficie celular (entre 21% y 50% de afinidad por el hexadecano), mientras que cinco cepas (62,5%) mostraron reacciones débiles (< 21% de afinidad por el hexadecano). En particular, los valores de hidrofobicidad se correlacionaron negativamente con las MIC y MBC de los biocidas (significativamente para HS y CB) (Tabla I.7).



Los datos son medias \pm desviaciones estándar (DE) para ocho determinaciones. Los valores medios sin letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$). ATCC, *American Type Culture Collection*; CECT, *Colección Española de Cultivos Tipo*. Las columnas verdes representan CHS débiles; las columnas amarillas representan CHS moderadas.

Figura I.3. Valores de hidrofobicidad de la superficie celular (CHS) observados en cultivos de ocho cepas de *Listeria monocytogenes*.

Tabla I.4. Coeficientes de correlación entre los valores MIC (concentración mínima inhibitoria) de 12 biocidas y antibióticos en ocho cepas de *Listeria monocytogenes*.

	Biocidas (MIC)					Antibióticos (MIC)							
	HS	CB	AP	AMP	KF	FOX	E	C	CN	TE	VA	FOS	
HS	-												
CB	0,715 ***	-											
AP	-0,284	0,144	-										
AMP	0,273	0,734 ***	-0,016	-									
KF	-0,182	0,483 *	0,385	0,809 ***	-								
FOX	-0,169	0,185	0,568 **	0,387	0,640 ***	-							
E	0,706 ***	0,507 *	-0,018	0,000	-0,348	-0,265	-						
C	0,196	0,348	0,164	0,292	0,147	0,451 *	0,194	-					
CN	0,220	0,696 ***	0,297	0,732 ***	0,829 ***	0,438 *	0,006	-0,119	-				
TE	-0,166	0,471 *	0,319	0,818 ***	0,977 ***	0,678 ***	-0,268	0,229	0,801 ***	-			
VA	-0,513 *	0,135	0,367	0,412 *	0,808 ***	0,342	-0,492 *	0,141	0,646 ***	0,774 ***	-		
FOS	-0,155	-0,235	0,590 **	-0,576 **	-0,230	0,380	-0,011	0,271	-0,236	-0,231	-0,080	-	

HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético; AMP, ampicilina; KF, cefalotina; FOX, cefoxitina; E, eritromicina; C, cloranfenicol; CN, gentamicina; TE, tetraciclina; VA, vancomicina; FOS, fosfomicina. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Tabla I.5. Coeficientes de correlación entre los valores MBC (concentración mínima bactericida) de 12 biocidas y antibióticos en ocho cepas de *Listeria monocytogenes*.

	Biocidas (MBC)						Antibióticos (MBC)					
	HS	CB	AP	AMP	KF	FOX	E	C	CN	TE	VA	FOS
HS	-											
CB	0,785 ***	-										
AP	-0,312	0,171	-									
AMP	0,374	0,798 ***	0,289	-								
KF	-0,128	0,435*	0,471 *	0,821 ***	-							
FOX	0,144	0,079	0,598 **	0,162	0,430 *	-						
E	0,601 **	0,301	-0,475 *	0,052	-0,341	-0,157	-					
C	0,047	-0,094	0,027	-0,342	-0,104	0,479 *	-0,354	-				
CN	0,140	0,631 ***	0,506 *	0,937 ***	0,833 ***	0,209	-0,158	-0,414 *	-			
TE	-0,017	0,566 **	0,698 ***	0,799 ***	0,913 ***	0,473 *	-0,453 *	0,017	0,854 ***	-		
VA	-0,426 *	0,126	0,517 **	0,549 **	0,807 ***	0,108	-0,749 ***	-0,127	0,694 ***	0,805 ***	-	
FOS	-0,043	-0,132	0,510 *	-0,325	-0,210	0,618 **	-0,325	0,633 ***	-0,178	0,063	-0,156	-

HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético; AMP, ampicilina; KF, cefalotina; FOX, cefoxitina; E, eritromicina; C, cloranfenicol; CN, gentamicina; TE, tetraciclina; VA, vancomicina; FOS, fosfomicina. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Tabla I. 6. Coeficientes de correlación entre los valores de MIC (concentración mínima inhibitoria) y MBC (concentración mínima bactericida) de 12 antimicrobianos en ocho cepas de *Listeria monocytogenes*.

	Biocidas						Antibióticos					
	HS	CB	AP	AMP	KF	FOX	E	C	CN	TE	VA	FOS
	0,967 ***	0,995 ***	0,979 ***	0,850 ***	0,996 ***	0,905 ***	0,571 **	0,767 ***	0,993 ***	0,868 ***	0,997 ***	0,974 ***

Los valores representan el coeficiente de correlación entre la MIC y la MBC para cada antimicrobiano. HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético; AMP, ampicilina; KF, cefalotina; FOX, cefoxitina; E, eritromicina; C, cloranfenicol; CN, gentamicina; TE, tetraciclina; VA, vancomicina; FOS, fosfomicina. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$.

Tabla I.7. Coeficientes de correlación entre los valores de hidrofobicidad y MIC (concentración mínima inhibitoria) o MBC (concentración mínima bactericida) de 12 biocidas y antibióticos en ocho cepas de *Listeria monocytogenes*.

	Biocidas						Antibióticos						
	HS	CB	AP	CB	AP	HS	CB	CB	AP	HS	CB	AP	HS
	-0,504 *	-0,580 **	-0,389	0,017	0,116	0,103	-0,725 ***	-0,365	-0,198	0,117	0,140	-0,328	
HID	(-0,532 **)	(-0,616 **)	(-0,387)	(-0,186)	(0,113)	(0,006)	(-0,082)	(-0,097)	(-0,155)	(-0,237)	(0,099)	(-0,313)	

HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético; AMP, ampicilina; KF, cefalotina; FOX, cefoxitina; E, eritromicina; C, cloranfenicol; CN, gentamicina; TE, tetraciclina; VA, vancomicina; FOS, fosfomicina; HID, hidrofobicidad. *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$. Los valores sin paréntesis (primera fila) representan las correlaciones entre la hidrofobicidad y los valores MIC. Los valores entre paréntesis (segunda fila) representan las correlaciones entre la hidrofobicidad y los valores de MBC.

4. DISCUSIÓN

4.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de biocidas

En estudios previos se ha puesto de manifiesto que el contacto con dosis subinhibitorias de diferentes biocidas de uso habitual en la Industria Alimentaria puede provocar la adaptación de las bacterias a los compuestos, así como favorecer la emergencia de resistencia a antibióticos e incrementar la capacidad de diferentes grupos microbianos para formar biofilm (Buzón-Durán *et al.*, 2018; Capita *et al.*, 2014, 2017, 2019a; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019a, b), lo cual supone un desafío en el ámbito de la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública. Por ello, a la hora de establecer protocolos efectivos de desinfección, es necesario conocer las MICs y las MBCs de los desinfectantes para los diferentes microorganismos que pueden estar presentes en los entornos de procesado de alimentos. En el presente estudio se determinaron las MICs y las MBCs de tres biocidas de amplio uso en la Industria Alimentaria, hipoclorito sódico (HS), cloruro de benzalconio (CB) y ácido peracético (AP), en 8 cepas de *L. monocytogenes* de diferentes serotipos.

El desinfectante que requirió mayores MIC fue el HS, necesitando entre 1.750 y 4.500 ppm, lo que equivale a 175 a 450 ppm de cloro libre. Estos valores se encuentran dentro del rango observado por Lundén *et al.* (2003), que citaron un valor de 2.500 ppm, y por Rodríguez-Melcón *et al.* (2019b), que registraron el valor de 3.500 ppm, ambos relativos a cepas de *L. monocytogenes*. Buzón-Durán *et al.* (2017) también observaron una MIC similar (de 5.000 ppm) en cepas de otro microorganismo Gram-positivo, concretamente *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). Cabe señalar que la comparación de nuestros resultados con los de otros trabajos de investigación debe realizarse con precaución, ya que la composición del caldo de cultivo utilizado para la determinación de la MIC y la MBC (TSB en el presente estudio) podría influir en los resultados obtenidos (Dorey y Lees, 2017; Sawyer *et al.*, 1997).

El cloruro de benzalconio, un compuesto perteneciente al grupo de los derivados del amonio cuaternario, fue el desinfectante que produjo la inhibición a las concentraciones más bajas (entre 0,25 ppm y 20,00 ppm). Estos valores son similares a los señalados por otros autores para bacterias Gram-positivas, como los valores de 2 ppm registrados por Buzón-Durán *et al.* (2017) para MRSA y el rango de entre 3 y 13 ppm para diferentes cepas de *L. monocytogenes* por Rodríguez-Melcón *et al.* (2019b). En el caso de las bacterias Gram negativas, también se han registrado resultados en línea con los del presente trabajo de investigación, con valores de 8 ppm para *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (Buzón-

Durán *et al.*, 2018), 15 ppm para *Cronobacter sakazakii*, y 20 ppm para *Yersinia enterocolitica* (Capita *et al.*, 2019a).

Los valores de MIC para el AP observados en este estudio, que oscilan entre 1.050 ppm y 1.700 ppm de AP al 39%, lo que equivale aproximadamente a 410 ppm y 663 ppm del compuesto puro, fueron superiores a las MICs registradas para los peroxiácidos en investigaciones anteriores sobre *L. monocytogenes*, que se situaban en el rango de 100 a 110 ppm (Alonso-Hernando *et al.*, 2009). Las diferencias en los resultados de los distintos informes pueden deberse a que no todas las cepas presentan la misma susceptibilidad a los biocidas, como se ha demostrado anteriormente (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019b). Además, la composición variable de las mezclas de peroxiácidos también puede haber sido responsable de las marcadas diferencias en los resultados obtenidos por los distintos autores citados (EFSA, 2014). Hay que señalar que las MIC observadas en el presente trabajo están en consonancia con los valores registrados para el AP en trabajos anteriores sobre determinadas bacterias Gram negativas, en los que se observó un valor de 1.200 ppm, equivalente a 468 ppm de la sustancia pura como MIC para *Cronobacter sakazakii*, y un valor de 1.275 ppm, equivalente a 497,3 ppm del producto en estado puro como MIC para *Yersinia enterocolitica* (Capita *et al.*, 2019a).

A diferencia de los antibióticos, no se han definido concentraciones de desinfectantes que permitan clasificar las bacterias como resistentes, de susceptibilidad intermedia o susceptibles a los compuestos. Varios autores consideran que las bacterias son resistentes cuando sus valores de MIC son al menos entre dos y cuatro veces superiores a los encontrados en las cepas más susceptibles (Soumet *et al.*, 2005). De acuerdo con este criterio, el trabajo realizado por Rodríguez-Melcón *et al.* (2019b) estableció dos poblaciones de cepas de *L. monocytogenes* en cuanto a su susceptibilidad al CB. Se trataba de cepas susceptibles, con un valor medio de MIC de 3 ppm, y cepas resistentes, donde los valores de la MIC eran iguales o superiores a 9 ppm. En el presente trabajo, las cepas de *L. monocytogenes* pueden clasificarse en relación con el HS formando dos grupos, sensibles, con la MIC comprendida en el rango de 1.750 a 2.250 ppm, y resistentes, donde los valores correspondientes estaban entre 3.500 y 4.500 ppm. Esto podría aplicarse de forma similar a CB, con cepas sensibles cuyas MIC oscilan entre 0,25 y 4 ppm, y cepas resistentes que oscilan entre 19 y 20 ppm. En cuanto al AP, las diferencias entre las cepas fueron menos marcadas y no permitieron una clasificación de este tipo.

En relación con los MBC, los valores obtenidos para el HS, que oscilan entre 2.250 ppm y 4.500 ppm, coinciden con los hallazgos de investigaciones anteriores (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019b), donde los valores observados se situaban entre 3.500 ppm y 4.500 ppm. En este

sentido, también hay que tener en cuenta que los valores de MBC pueden variar en función del modo de crecimiento de la bacteria. Así, varios estudios, entre ellos el de Smith y Hunter (2008), han puesto de manifiesto que los MBC para microorganismos como MRSA o *Pseudomonas aeruginosa* son entre 10 y 1.000 veces mayores para las bacterias sésiles que forman parte de biofilms que para las bacterias planctónicas (de vida libre).

Cabe destacar que los desinfectantes ensayados se utilizan habitualmente en concentraciones muy superiores a sus MBC para conseguir una inactivación rápida y eficaz de los microorganismos, por lo que es muy improbable que las bacterias sobrevivan y desarrollen resistencias en condiciones normales (Chen *et al.*, 2021). Las concentraciones que se suelen emplear en el caso de sustancias que liberan cloro como el HS son del orden de 800 a 2.000 ppm de cloro libre (Henriques y Fraqueza, 2017; Norwood y Gilmour, 2000). En el caso de los compuestos de amonio cuaternario, como el cloruro de benzalconio, oscilan entre 1.000 y 5.000 ppm (Henriques y Fraqueza, 2017; Poimenidou *et al.*, 2015; Tamburro *et al.*, 2015). En el caso del AP, los valores son de 10.000 ppm a 150.000 ppm de la sustancia pura (Gawande *et al.*, 2013; Kitis, 2004). Sin embargo, es bien conocido que en determinadas circunstancias se produce una exposición subletal a los biocidas, como consecuencia, por ejemplo, de un cálculo incorrecto de las concentraciones, de un almacenamiento inadecuado de los desinfectantes, de la distribución heterogénea de los compuestos o de la presencia de cantidades excesivas de residuos de materia orgánica, capaces de inactivar diferentes sustancias biocidas, como el hipoclorito sódico (Capita *et al.*, 2014). Estas situaciones deben evitarse ya que, como se ha indicado con anterioridad, la exposición de las bacterias presentes en los equipos e instalaciones de las industrias alimentarias a dosis subletales de biocidas supone un desafío para la Seguridad Alimentaria, al favorecer la adaptación a los desinfectantes y aumentar el riesgo de emergencia de resistencia a los antibióticos y la capacidad para formar biofilm (Capita *et al.*, 2019a).

4.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de antibióticos

En las últimas décadas se ha producido un marcado incremento de la prevalencia de bacterias resistentes a los antibióticos, que se han convertido en una de las principales amenazas para la Salud Pública mundial (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Se estima que en el año 2050 las infecciones por bacterias resistentes serán la primera causa de muerte en el mundo, provocando unos 10 millones de fallecimientos anuales, cifra superior a la correspondiente a las enfermedades cardiovasculares y al cáncer. Este número de fallecimientos estimado para dentro de tres décadas contrasta con las 700.000 muertes

atribuibles a bacterias resistentes en 2014 (O'Neill, 2016). La resistencia a los antibióticos tiene, además, importantes repercusiones económicas, estimándose que las infecciones por estas bacterias suponen un coste a los sistemas de salud de la Unión Europea y el Espacio Económico Europeo (EEE) de aproximadamente 1,1 millones de euros cada año (OECD, 2019).

En el presente estudio, la prevalencia de resistencia fue dependiente del antibiótico considerado. Se obtuvieron elevados porcentajes de cepas resistentes (entre el 62,5% y el 100%) a todos los antibióticos ensayados, con la excepción de la eritromicina, compuesto al que todas las cepas fueron susceptibles. Es especialmente preocupante que se hayan observado altos niveles de resistencia a la ampicilina, el cloranfenicol, la gentamicina, la tetraciclina y la vancomicina, que son antibióticos utilizados para tratar la listeriosis invasiva. Los antibióticos de elección para estos tratamientos son los betalactámicos, principalmente la ampicilina, administrada sola o en combinación con la gentamicina. En caso de alergia a los betalactámicos, se suele administrar eritromicina, vancomicina, trimetoprim/sulfametoxazol o fluoroquinolonas. La vancomicina también se utiliza para tratar la listeriosis durante el embarazo (Charpentier y Courvalin, 1999). Otros antibióticos que a veces se utilizan para tratar esta infección son la rifampicina, la tetraciclina y el cloranfenicol (Charpentier y Courvalin, 1999). Hay que tener en cuenta que la resistencia a los antibióticos indicados se ha puesto de manifiesto anteriormente en cepas de *L. monocytogenes* de diferentes orígenes (Alonso-Hernando *et al.*, 2012; Álvarez-Fernández *et al.* 2012a; Aras y Ardic, 2015; Capita *et al.*, 2019b; Carvalho *et al.*, 2019).

Por otro lado, debe señalarse que los antibióticos indicados tienen una gran importancia tanto en medicina humana como en veterinaria. Así, los antibióticos ampicilina, cefalotina, cefoxitina, eritromicina, gentamicina, vancomicina y fosfomicina son considerados "de importancia crítica", y el cloranfenicol y la tetraciclina "de importancia elevada" en medicina humana, según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2019). La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2018) clasifica la ampicilina, la eritromicina, la gentamicina y la tetraciclina como "críticamente importantes", y la cefalotina y la fosfomicina como "altamente importantes" en términos de medicina veterinaria. Dada la importancia clínica de estos antibióticos, son preocupantes las elevadas prevalencias de resistencia encontradas, incluso en el caso de los antibióticos no empleados directamente para el tratamiento de la listeriosis, ante la posibilidad de transferencia horizontal de los genes de resistencia a diferentes géneros de bacterias patógenas (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Las cepas de *L. monocytogenes* han sido tradicionalmente susceptibles a la mayoría de los antibióticos efectivos frente a las bacterias Gram-positivas. Así, en un estudio realizado

hace más de 3 décadas por Wiggins *et al.* (1978), se puso de manifiesto que los valores de MIC de ampicilina, penicilina, eritromicina y tetraciclina para 175 cepas de *L. monocytogenes* se encontraban por debajo del punto de corte establecido por el CLSI. Sin embargo, en los últimos años se está observando un incremento considerable de la prevalencia de resistencia en bacterias de esta especie microbiana (Álvarez-Fernández *et al.*, 2012a; Fallah *et al.*, 2012).

La presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos, sobre todo cuando se emplean incorrectamente a dosis subinhibitorias, se ha identificado como la principal causa del marcado aumento en la prevalencia de resistencia que ha tenido lugar en las últimas décadas (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Cufaoglu *et al.*, 2021). Además, diversos trabajos realizados recientemente han puesto de manifiesto que los cambios en los perfiles de resistencia a antibióticos pueden deberse a la exposición de los microorganismos a concentraciones subinhibitorias de los biocidas o a otros factores de estrés subletal (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Capita *et al.*, 2014, 2019a, Molina-González *et al.*, 2014). Por otro lado, la posibilidad de transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (transposones o plásmidos) entre bacterias del mismo o de diferentes géneros permite la diseminación rápida de los genes de resistencia, hecho que se encuentra también entre las causas de este incremento de la prevalencia de resistencia a antibióticos observado en las últimas décadas (Olimat *et al.*, 2018).

4.3. Relación entre las MICs y las MBCs de los biocidas y antibióticos

Se observaron correlaciones positivas para las MICs y las MBCs entre las diferentes clases de antimicrobianos. Se utilizaron un total de siete grupos de antibióticos, entre ellos los betalactámicos (ampicilina, cefalotina y cefoxitina), los macrólidos (eritromicina), los fenicoles (cloranfenicol), los aminoglucósidos (gentamicina), las tetraciclinas (tetraciclina), los glucopéptidos (vancomicina) y la fosfomicina. El hecho de que estos compuestos tengan modos de acción y mecanismos de resistencia no relacionados entre sí (Kapoor *et al.*, 2017) sugiere que los diferentes genes implicados en la resistencia a los antibióticos se encuentran en los mismos elementos genéticos móviles, como se había señalado anteriormente (Álvarez-Fernández *et al.*, 2012b). Así, se ha demostrado que la co-selección y la co-transferencia son un fenómeno común en la aparición y propagación de la resistencia a los antibióticos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

4.4. Hidrofobicidad de la superficie celular

Los valores de hidrofobicidad obtenidos para las distintas cepas de *L. monocytogenes* ($10,04 \pm 2,17\%$ a $29,11 \pm 2,36\%$) se sitúan en el rango de estudios anteriores ($4,84 \pm 1,11\%$

a $31,82 \pm 5,98\%$) utilizando xileno como fase hidrocarbonada (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019c). Cabe destacar las correlaciones negativas encontradas entre la hidrofobicidad y las MICs o MBCs de los biocidas. Cuanto mayor es la hidrofobicidad, mayor es la susceptibilidad a los biocidas. Estos resultados vuelven a revelar que la superficie celular desempeña un papel importante en la tolerancia de *L. monocytogenes* a estos compuestos antimicrobianos, y especialmente al HS y al CB. Otros autores han observado la relación entre una alta hidrofobicidad y una alta susceptibilidad a los antimicrobianos hidrofóbicos (por ejemplo, el cloruro de benzalconio o la eritromicina) (Chiu *et al.*, 2017; Jones y Joshi, 2021). Por el contrario, estos resultados no coinciden con varios trabajos de investigación realizados con bacterias Gram negativas, en los que las células bacterianas con una alta hidrofobicidad de la superficie celular han mostrado una mayor tolerancia a los biocidas (Loughlin *et al.*, 2002), lo que es consecuencia del bajo número de sitios de unión cargados (hidrofílicos) para los biocidas (Braoudaki y Hilton, 2004; Capita *et al.*, 2014).

Conclusiones

Se ha comprobado que las MICs y las MBCs de los biocidas ensayados, hipoclorito de sodio, cloruro de benzalconio y ácido peracético, en relación con *L. monocytogenes*, eran muy inferiores a las concentraciones habituales de uso de estos desinfectantes. Para que estos compuestos sean completamente eficaces, deben superar los valores de MBCs en todas las áreas tratadas, controlándose aspectos como el cálculo correcto de las concentraciones a emplear, la distribución homogénea de las sustancias desinfectantes y la eliminación previa de cualquier residuo de materia orgánica, siendo esto último de especial importancia cuando se emplean compuestos clorados. Se encontró una relación positiva entre la hidrofobicidad de la superficie celular y la susceptibilidad a los biocidas, lo que indica que las características de la superficie celular desempeñan un papel importante en la tolerancia de *L. monocytogenes* a estos compuestos.

Se observó una elevada prevalencia de la resistencia a la mayoría de los antibióticos ensayados, lo que pone de manifiesto la necesidad de adoptar las medidas necesarias para controlar la resistencia de *L. monocytogenes*. De los nueve antibióticos incluidos en el estudio, la eritromicina fue el que presentó la mayor eficacia antimicrobiana, ya que tuvo los valores más bajos tanto para la MIC como para la MBC. Las correlaciones positivas observadas para las MICs y las MBCs entre los biocidas y los antibióticos con diferentes modos de acción sugieren que los genes de resistencia se encuentran en los mismos elementos genéticos móviles.

El conocimiento de las MICs y las MBCs de biocidas y antibióticos en *L. monocytogenes* puede facilitar la elección de los antimicrobianos más eficaces para el control de este microorganismo, tanto en la Industria Alimentaria como en el Sistema Sanitario. No obstante, las marcadas diferencias intraespecíficas observadas, ponen de manifiesto la importancia de incluir diferentes cepas en los estudios destinados a determinar la resistencia de *L. monocytogenes* a biocidas y antibióticos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. (2009). Adaptation and cross-adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants. *The Journal of Microbiology* **47**: 142–146. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0237-5>
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2012). Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* **23**(1): 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.006>
- Álvarez-Fernández, E., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Capita, R. (2012b). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology* **153**(1): 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.011>
- Álvarez-Fernández, E., Domínguez-Rodríguez, J., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012a). Influence of housing systems on microbial load and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from eggs produced for human consumption. *Journal of Food Protection* **75**(5): 847-853. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-182>
- Aras, K., Ardiç, M. (2015). Occurrence and antibiotic susceptibility of *Listeria* species in turkey meats. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **35**(5): 669–673. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.5.669>
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M. R., Haug, M. C., Lawson, P. A., Lacroix, C., Meile, L. (2013). *Listeria fleischmannii* sp. nov. isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**(Pt_2): 526–532. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.036947-0>
- Braoudaki, M., Hilton, A. C. (2004). Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(1): 73–78. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.73-78.2004>
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. (2017). Effect of subinhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**: 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.003>
- Buzón-Durán, L., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2018). Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant staphylococci (MRS) of food origin: A comparison of agar disc diffusion method and a commercially available miniaturized test. *Food Microbiology* **72**: 220-224. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.018>

- Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**(1): 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- Capita, R., Buzón-Durán, L., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2017). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* **14**(6): 350-356. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2241>
- Capita, R., Felices-Mercado, A., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. (2019b) Characterization of *Listeria monocytogenes* originating from the Spanish meat-processing chain. *Foods* **8**(11): 542. <https://doi.org/10.3390/foods8110542>
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(4): 1268-1280. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>
- Capita, R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Alonso-Calleja, C. (2019a). Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports* **9**: 15905. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51907-1>
- Carlin, C. R., Liao, J., Weller, D., Guo, X., Orsi, R., Wiedmann, M. (2021). *Listeria cossartiae* sp. nov., *Listeria immobilis* sp. nov., *Listeria portnoyi* sp. nov. and *Listeria rustica* sp. nov., isolated from agricultural water and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **71**(5): 004795. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004795>
- Carvalho, F. T., Vieira, B. S., Vallim, D. C., Carvalho, L. A., Carvalho, R. C. T., Pereira, R. C. L., Figueiredo, E. E. S. (2019). Genetic similarity, antibiotic resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat and chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. *LWT* **109**: 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.099>
- Charpentier, E., Courvalin, P. (1999). Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(9): 2103-2108 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89430/>

- Chen, B., Han, J., Dai, H., Jia, P. (2021). Biocide-tolerance and antibiotic-resistance in community environments and risk of direct transfers to humans: Unintended consequences of community-wide surface disinfecting during COVID-19? *Environmental Pollution* **283**: 117074. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117074>
- Chiu, J., Han, G., McCrystal, K., Zuo, M. (2017). Macrolide Structures Can Confer Differential Susceptibility in *Escherichia coli* K30 Deletions of Group 1 Capsule Assembly Genes. *The Journal of Experimental Microbiology and Immunology (UJEMI)* **3**: 50–56.
- CLSI (2019). M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA. **29**. Disponible en: https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf (Fecha de acceso: 27 de diciembre del 2021).
- CLSI (2017). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard-Third Edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA, USA. **28** (8): M31-A3. Disponible en: <https://www.dbt.univr.it/documenti/Occorrenzalns/matdid/matdid485539.pdf> (Fecha de acceso: 27 de diciembre del 2021).
- Cufaoglu, G., Ambarcioglu, P., Ayaz, N. D. (2021). Meta-analysis of the prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic resistant *L. monocytogenes* isolates from foods in Turkey. *LWT* **144**: 111210. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111210>
- Den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C. *et al.* (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**(Pt_6): 1882–1889. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.052720-0>
- Doijad, S. P., Poharkar, K. V., Kale, S. B., Kerkar, S., Kalorey, D. R., Kurkure, N.V., Rawool, D.B., Malik, S.V.S., Ahmad, R.F., Hudel, M., *et al.* (2018). *Listeria goensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**(10): 3285–3291. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002980>
- Dorey, L., Lees, P. (2017). Impact of growth matrix on pharmacodynamics of antimicrobial drugs for pig pneumonia pathogens. *BMC Veterinary Research* **13**(1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1086-4>

- EFSA (2014). Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of peroxyacetic acid solutions for reduction of pathogens on poultry carcasses and meat. *EFSA Journal* **12**(3): 3599. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3599>
- EFSA y ECDC (European Food Safety Authority y European Centre for Disease Prevention and Control). (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal* **19**(2): 6406. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
- EUCAST (2019). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing v.9. Disponible en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9_0_Breakpoint_Tables.pdf (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021).
- Fallah, A. A., Saei-Dehkordi, S. S., Rahnama, M., Tahmasby, H., Mahzounieh, M. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria* species isolated from poultry products marketed in Iran. *Food Control* **28**(2): 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.014>
- FDA (2017). Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods: Guidance for Industry. Draft Guidance. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Disponible en: <https://www.fda.gov/files/food/published/Draft-Guidance-for-Industry--Control-of-Listeria-monocytogenes-in-Ready-To-Eat-Foods-%28PDF%29.pdf> (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021).
- Finnegan, M., Linley, E., Denyer, S.P., McDonnell, G., Simons, C., Maillard, J.Y. (2010). Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: Differences between liquid and gas forms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**(10): 108–115. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq308>
- Gawande, H. M., Dhotre, A. V., Shendurse, A. M., Khodwe, N. M. (2013). Peroxyacetic acid: A potent food industry sanitizer. *Indian Food Industry Mag* **32**(3): 27-30.
- Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I. *et al.* (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(6): 1280–1288. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014118-0>
- Henriques, A. R., Fraqueza, M. J. (2017). Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the ready-to-eat meat-based food products

- food chain. *LWT - Food Science and Technology* **81**: 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.045>
- Jones, I. A., Joshi, L. T. (2021). Biocide use in the antimicrobial era: A review. *Molecules* **26**(8): 2276. <https://doi.org/10.3390/molecules26082276>
- Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* **33**(3): 300-305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- Kitis, M. (2004). Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International* **30**(1): 47-55. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00147-8)
- Kraśniewska, K., Kosakowska, O., Pobiega, K., Gniewosz, M. (2020). The influence of two-component mixtures from Spanish origanum oil with Spanish marjoram oil or coriander oil on antilisterial activity and sensory quality of a fresh cut vegetable mixture. *Foods* **9**(12): 1740. <https://doi.org/10.3390/foods9121740>
- Lang Halter, E., Neuhaus, K., Scherer, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**(Pt_2): 641–647. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.036830-0>
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S.M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., et al. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(9): 2210–2214. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.017376-0>
- Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C., Lecuit, M. (2019). *Listeria thailandensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **69**(1): 74–81. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003097>
- Loughlin, M. F., Jones, M. V., Lambert, P. A. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**(4): 631–639. <https://doi.org/10.1093/jac/49.4.631>
- Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology* **82**(3): 265–272. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00312-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00312-4)

- Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2014). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* **40**: 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.046>
- Norwood, D.E., Gilmour, A. (2000). The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology* **88**(3): 512-520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00990.x>
- Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerdá, J., Lecuit, J. (2018). *Listeria costaricensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **68**(3): 844–850. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002596>
- Nwaiwu, O. (2020). What are the recognized species of the genus *Listeria*? *Access Microbiology* **2**(9): e000153. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000153>
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021).
- OECD (2019). Antimicrobial Resistance. Tackling the Burden in the European Union. Disponible en: <https://www.oecd.org/health/health-systems/AMR-Tackling-the-Burden-in-the-EU-OECD-ECDC-Briefing-Note-2019.pdf> (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021)
- OIE (2018). OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance; World Organization for Animal Health. World Organisation for Animal Health, Paris (France). Disponible en: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/a-oie-list-antimicrobials-may2018.pdf> (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021).
- Olaimat, A. N., Al-Holy, M. A., Shahbaz, H. M., Al-Nabusli, A. A., Abu Goush, M. H., Osaili, T. M., Ayyash, M. M., Holley, R. A. (2018). Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **17**(5): 1277-1292. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12387>
- Pirie, J. H. (1940). The genus *Listerella* Pirie. *Science* **91**(2364): 383. <https://doi.org/10.1126/science.91.2364.383>
- Poimenidou, S. V., Chrysadaku, M., Tzakoniati, A., Bikouli, V. C., Nychas, G.-J., Skandamis, P. N. (2016). Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless

- steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology*. **237**: 164–171. [https://doi.org/ 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.029](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.029)
- Quereda, J. J., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Gómez-Martín, A., García-Muñoz, A., Thouvenot, P., Tessaud-Rita, N., Bracq-Dieye, H., Lecuit, M. (2020). *Listeria valentina* sp. nov., isolated from a water trough and the faeces of healthy sheep. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70**(11): 5868-5879. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004494>
- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C., Piffaretti, J. C. (1992). Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **42**(1): 171–174. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-171>
- Rocourt, J., Grimont, P.A.D. (1983). *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **33**(4): 866–869. [https://doi.org/ 10.1099/00207713-33-4-866](https://doi.org/10.1099/00207713-33-4-866)
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019c). Architecture and viability of the biofilms formed by nine *Listeria* strains on various hydrophobic and hydrophilic materials. *Applied Sciences* **9**(23): 5256 [https://doi.org/ 10.3390/app9235256](https://doi.org/10.3390/app9235256)
- Rodríguez-Melcón, C., Capita, R., Rodríguez-Jerez, J. J., Martínez-Suárez, J., Alonso-Calleja, C. (2019a). Effect of low doses of disinfectants on the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* **16**(4): 262–268. [https://doi.org/ 10.1089/fpd.2018.2472](https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2472)
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019b). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology* **82**: 533–540. [https://doi.org/ 10.1016/j.fm.2019.03.020](https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020)
- Rugna, G., Carra, E., Bergaminia, F., Franzinia, G., Faccini, S., Gattuso, A., Morgantia, M., Baldi, D., Naldia, S., Serraino, A., Piva, S., Merialdi, G., Giacomettic, F. (2021). Distribution, virulence, genotypic characteristics and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated over one-year monitoring from two pig slaughterhouses and processing plants and their fresh hams. *International Journal of Food Microbiology* **336**: 108912. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108912>

- Sawer, I. K., Berry, M. I., Ford, J. L. (1997). Effect of medium composition, agitation and the presence of EDTA on the antimicrobial activity of cryptolepine. *Letters in Applied Microbiology* **25**(3): 207–211. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00206.x>
- Seeliger, H. P. R. (1981). A pathogen listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977). *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie* **249**(4): 487–493. [https://doi.org/10.1016/S0174-3031\(81\)80108-4](https://doi.org/10.1016/S0174-3031(81)80108-4)
- Seeliger, H. P. R., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P. A. D., Jones, D. (1984). Notes: *Listeria ivanovii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **34**(3): 336–337. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-3-336>
- Shourav, H. A., Hasan, M., Ahmed, S. (2020). Antibiotic susceptibility pattern of *Listeria* spp. isolated from cattle farm environment in Bangladesh. *Journal of Agriculture and Food Research* **2**: 100082. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100082>
- Skowron, K., Kwiecińska-Piróga, J., Grudlewska, K., Świeca, A., Paluszak, Z., Bauza-Kaszewska, B., Walecka-Zacharska, E., Gospodarek-Komkowska, E. (2018). The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant. *International Journal of Food Microbiology* **282**: 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.011>
- Smith, K., Hunter, I. S. (2008). Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology* **57**(8): 966–973. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47668-0>
- Soumet, C., Ragimbeau, C., Maris, P. (2005). Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. *Letters in Applied Microbiology* **41**(3): 291–296. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01763.x>
- Tamburro, M., Ripabelli, G., Vitullo, M., Dallman, T. J., Pontello, M., Amar, C. F. L., Sammarco M. L. (2015). Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **40**: 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.03.004>
- To, M. S., Favrin, S., Romanova, N., Griffiths, M. W. (2002). Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(11): 5258–5264. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5258-5264.2002>

- Waghmare, R. B., Annapure, U. S. (2015). Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. *Food Packaging and Shelf Life* **3**: 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.11.001>
- Wagner, M., McLauchin, J. (2008). Biology. In: *Handbook of Listeria monocytogenes*, Liu, D. (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL (USA), pp. 3–25. <https://doi.org/10.1201/9781420051414.ch2>
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., Den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**(Pt_1): 286–292. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.070839-0>
- WHO (2019). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*, 6th rev. World Health Organization. Geneva, Switzerland. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf> (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021)
- Wiggins, G. L., Albritton, L. W., Feeley, J. C. (1978). Antibiotic susceptibility of clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **13**(5): 854-860. <https://doi.org/10.1128/aac.13.5.854>

CAPÍTULO II

Efecto de dosis bajas de biocidas sobre la susceptibilidad de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* a varios antibióticos de importancia clínica

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El aumento constante de la prevalencia de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos se ha convertido en una de las principales amenazas para la Salud Pública en todo el mundo. A pesar del esfuerzo y las medidas adoptadas hasta el momento, cada vez es mayor la frecuencia con que se aíslan cepas resistentes a antibióticos (AR) y resistentes a múltiples antibióticos (MAR). Esta tendencia también se ha observado en los últimos años en los aislamientos de *Listeria monocytogenes*, una especie que, aunque sigue siendo en gran medida sensible a los antimicrobianos clínicamente relevantes, presenta cada vez más frecuentemente resistencia a los antibióticos, particularmente por lo que se refiere a las cepas aisladas en la cadena alimentaria (Komora *et al.*, 2017).

L. monocytogenes es un agente zoonótico ubicuo transmitido por los alimentos que causa listeriosis, de forma más frecuente y grave en los grupos de riesgo, constituidos por niños, ancianos, mujeres embarazadas y personas inmunodeprimidas, denominados YOPIs (*young, old, pregnant women and immunocompromised individuals*). Aunque todavía es relativamente rara, la listeriosis humana en Europa es una de las enfermedades transmitidas por los alimentos de mayor gravedad, dadas las elevadas tasas de hospitalización y letalidad (EFSA y ECDC, 2021); el tratamiento con antibióticos suele ser necesario para el control de la infección invasiva causada por esta bacteria (Rugna *et al.*, 2021).

Por su parte, la salmonelosis es la zoonosis asociada con el mayor número de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en la Unión Europea (UE), ocupando el segundo puesto, después de la campilobacteriosis, en cuanto al número de casos de enfermedad humana. El número de casos confirmados de salmonelosis en 2020 ascendió a 52.702, lo que supone una tasa de notificación de 13,71 por cada 100.000 habitantes (EFSA y ECDC, 2021).

Desde hace varias décadas, la resistencia a los antibióticos se ha convertido en una preocupación mundial de primera magnitud. Por ello, se han puesto en práctica diferentes medidas para evitar la propagación de resistencias. A pesar de ello, lejos de resolverse, este problema es cada vez más acusado, observándose un aumento tanto en la prevalencia de cepas resistentes, como de resistencias múltiples (Capita y Alonso-Calleja, 2013). La dificultad de tratar las infecciones por bacterias resistentes implica costes adicionales sustanciales para los servicios de salud, además de tener un impacto importante en términos de morbilidad y mortalidad.

En los últimos años se ha sugerido que existe una relación directa entre la tolerancia a los biocidas y la resistencia a los antibióticos, ya que los mecanismos que contribuyen a ambas circunstancias son similares, por ejemplo, los cambios en la permeabilidad celular o la

síntesis de bombas de expulsión (Capita *et al.*, 2019). Específicamente para *L. monocytogenes*, conocida por tener, como se ha indicado con anterioridad, una baja frecuencia de genes de resistencia, también se ha observado esta tendencia (Alonso-Hernando *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2014; Komora *et al.*, 2017). Dado que las bacterias tienen la notable capacidad de desarrollar resistencia, podemos anticipar que incluso las especies bacterianas como *L. monocytogenes*, que todavía se consideran susceptibles a muchos antibióticos, evolucionarán hacia multirresistencia (Charpentier y Courvalin, 1999).

Como ha sido sugerido con anterioridad (Capita *et al.*, 2014), los desinfectantes se utilizan en ocasiones en la industria alimentaria a concentraciones bajas (sub-MICs) (por ejemplo, como consecuencia de un cálculo incorrecto de las concentraciones, por un almacenamiento inadecuado de los productos, que provoca su pérdida de efectividad, por la falta de una limpieza suficiente antes de llevar a cabo la desinfección o por una distribución heterogénea de los compuestos). Comprender la respuesta de los microorganismos a las condiciones que pueden ocurrir en los entornos de procesado de alimentos ayudaría en el desarrollo de estrategias de desinfección efectivas. Se ha demostrado que los cambios en la fluidez de la membrana pueden desempeñar un papel importante en la adaptación de *L. monocytogenes* y *S. enterica* a los descontaminantes de la carne de ave (Alonso-Hernando *et al.*, 2010, 2015). Tales cambios pueden causar alteraciones en las características de la superficie celular. Por lo tanto, es factible que los cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular sean, al menos parcialmente, responsables del aumento no específico de la tolerancia a los biocidas (Romanova *et al.*, 2006).

En el contexto planteado se ha desarrollado el presente estudio, cuyo objetivo ha sido determinar la influencia de la exposición a dosis bajas de diferentes biocidas sobre la susceptibilidad a los antibióticos y la hidrofobicidad de la superficie celular de cepas de *L. monocytogenes* y *S. enterica*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Se utilizaron 2 microorganismos: *Listeria monocytogenes* (LM; serotipo 1/2a) y *Salmonella enterica* Agona (SA), ambas de origen cárnico y previamente disponibles en nuestro laboratorio. Los cultivos bacterianos se mantuvieron almacenados a una temperatura de - 80 °C en caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) con un 20 % (vol/vol) de glicerol. Antes de cada experimento, las células se activaron mediante la transferencia de aproximadamente 20 µl del cultivo congelado a tubos con 5 ml de TSB (Oxoid) y posterior incubación del caldo durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente, los cultivos se cultivaron en placas con agar triptona de soja (TSA, Oxoid) para su almacenamiento a 4 ± 1 °C.

2.2. Desinfectantes

Se utilizaron cuatro compuestos: hipoclorito sódico (NaClO, HS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.), cloruro de benzalconio (CB, Sigma-Aldrich), ácido peracético (PA, Sigma-Aldrich) y fosfato trisódico (FTS, Merck, Darmstadt, Alemania). Para la preparación de las correspondientes soluciones de trabajo se partió de compuestos con un 10 % de pureza (expresado como porcentaje de cloro libre) en el caso del hipoclorito sódico, de un 95 % (asumiendo que el producto es puro) en el caso del cloruro de benzalconio, y de un 100 % de pureza para el resto de biocidas. Las soluciones de cada uno de los compuestos se prepararon en condiciones asépticas en agua destilada estéril antes del comienzo de cada experimento.

2.3. Cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias

Los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) se establecieron utilizando un método de microdilución en caldo de acuerdo con el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, EE.UU. (CLSI, 2018). Se tomaron, a partir de placas de TSA (Oxoid), 5 colonias de cada cepa, que se inocularon en 9 ml de caldo BBL™ Mueller Hinton II ajustado con cationes (MHB, Becton Dickinson and Company, Sparks, EE.UU.) con un 0,6 % de extracto de levadura (YE, Oxoid). Para la incubación y correspondientes diluciones de las cepas de *L. monocytogenes*, se añadió un 0,2% de sangre lacada de caballo (Thermo Scientific, Hampshire, Reino Unido). Todas las cepas se incubaron a 37 °C durante 18 - 24

horas. Para el experimento se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Los pocillos se rellenaron con 20 μ l de la solución desinfectante (se utilizó un rango de concentraciones) y 180 μ l de inóculo en las diluciones apropiadas (en MHB y con sangre para *L. monocytogenes*) con el fin de obtener una concentración final en el pocillo de aproximadamente 10^5 ufc/ml. Se utilizaron controles negativos con el medio de cultivo, controles negativos con las soluciones desinfectantes y controles positivos con el inóculo. La concentración del inóculo se confirmó por siembra en placa. El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica ($DO_{480-520}$) en un Bioscreen C MRB (Oy Growth Curves Ab). La MIC se estableció como la concentración de biocida mínima necesaria para prevenir el crecimiento bacteriano después de 48 horas de incubación. En base a ensayos previos, se consideró como límite de crecimiento una $DO_{480-520}$ de 0,200 para las cepas sin sangre (SA) y 0,600 para las cepas con sangre (LM).

2.4. Adaptación de las cepas a los biocidas utilizados

El experimento se llevó a cabo del mismo modo que las determinaciones de las MICs, con algunas modificaciones (Capita *et al.*, 2013). La concentración de partida del biocida en la placa de microtítulo fue MIC/2. Cuando se observaba crecimiento, se transfería, en condiciones asépticas, una alícuota de 20 μ l de la suspensión al siguiente pocillo, que contenía 160 μ l de TSB y 20 μ l de la solución desinfectante. Los cálculos se realizaron de forma que cada pocillo contenía una concentración de biocida 1,5 veces superior a la del pocillo anterior. El procedimiento continuó hasta comprobar la ausencia de crecimiento a las 72 horas de incubación a 37 °C. La suspensión del último pocillo en la que se observó crecimiento se sembró en placas de TSA con los biocidas correspondientes (se añadió al TSA la mitad de la máxima concentración de biocida que permite el crecimiento microbiano). Las células no expuestas crecieron en MHB + YE (añadiendo un 0,2 % de sangre en el caso de *L. monocytogenes*) y se trasladaron a placas de TSA sin biocidas. Después de la incubación a 37 °C durante 48 horas, las placas de agar se almacenaron a 4 °C \pm 1 °C durante una semana como máximo. Para experimentos posteriores, se añadieron biocidas (a la mitad de la máxima concentración que permitía el crecimiento) a tubos con 9 ml de MHB + YE (y 0,2 % de sangre en el caso de *L. monocytogenes*), para promover el crecimiento de las células bacterianas adaptadas, y el mismo caldo sin biocidas para las células bacterianas no expuestas previamente. Los tubos fueron inoculados a partir de las cepas conservadas en placas de TSA (células no adaptadas) o TSA con biocidas (células adaptadas a HS, CB, AP o FTS). Todos los cultivos se ensayaron simultáneamente.

2.5. Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las cepas de LM y SA adaptadas y no adaptadas a los diferentes desinfectantes utilizados, antes y después de la exposición a los productos químicos, por el método de microdilución en caldo, anteriormente descrito. Para ello, se utilizaron diferentes concentraciones de 10 antibióticos: ampicilina (AMP, 100 mg), cefalotina sodio (KF, 250 mg), ceftioxina (FOX, 100 mg), eritromicina (E, 1.000 mg), cloranfenicol (C, 1.000 mg), gentamicina (CN, 1.000 mg), tetraciclina clorhidrato (TE, 1.000 mg), vancomicina clorhidrato (VA, 250 mg), fosfomicina sodio (FOS, 100 mg) y enrofloxacin (ENR, 500 mg). Todos los antibióticos utilizados procedían de la firma Sigma-Aldrich.

Las cepas se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas. Para el experimento se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab). Los pocillos se llenaron con 20 µl de la solución de antibiótico (se utilizó un rango de concentraciones) y 180 µl de inóculo en las diluciones apropiadas (en MHB + YE, y con 0,2 % sangre en el caso de LM) con el fin de obtener una concentración final en el pocillo de aproximadamente 10⁵ ufc/ml. Se realizaron controles negativos con el medio de cultivo, controles negativos con las soluciones de antibióticos y controles positivos con el inóculo de cada cepa. La concentración del inóculo se confirmó por siembra en placa. El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica (DO₄₈₀₋₅₂₀) en un Bioscreen C MRB (Oy Growth Curves Ab). La MIC se estableció como la concentración de antibiótico mínima necesaria para impedir el crecimiento bacteriano después de 48 horas de incubación. Se consideró como límite de crecimiento una DO₄₈₀₋₅₂₀ de 0,200 para las cepas sin sangre y de 0,600 para las cepas con sangre.

2.6. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular (CHS)

La hidrofobicidad de la superficie de las células microbianas se determinó mediante la prueba de adhesión microbiana a solventes (*microbial adhesion to solvents*, MATS) basado en la afinidad a los solventes no polares (Capita *et al.*, 2014). Para llevar a cabo el experimento, se sembraron las cepas en tubos con 9 ml de caldo BBL™ Mueller Hinton II ajustado con cationes (MHB, Becton Dickinson and Company) con un 0,6 % de extracto de levadura (YE, Oxoid) y biocidas a concentraciones de MIC/2 (expuestas) o la mitad de la máxima concentración que permite el crecimiento (adaptadas). Los tubos utilizados para *L. monocytogenes* contenían un 0,2% de sangre lacada de caballo (Thermo Scientific, Hampshire, Reino Unido). Las cepas se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, se recogieron por centrifugación (4.000 rpm; 10 minutos, 4 °C) en tubos de plástico estériles,

las células de LM y SA adaptadas o expuestas a los diferentes biocidas, en fase exponencial de crecimiento. Las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino con un pH = 7,4 (PBS, Merck), se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron con el asa de siembra en tubos estériles con las mismas condiciones anteriormente descritas. Las cepas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, teniendo una concentración inicial en tubo de 10^5 ufc/ml, y una concentración final de aproximadamente 10^9 ufc/ml. Transcurrido este tiempo, se realizó una dilución de forma que se asegurase la presencia de 10^8 ufc/ml para ambos microorganismos, recogiendo por centrifugación (4.000 rpm; 10 minutos, 4 °C) en tubos de plástico estériles, células de LM y SA adaptadas o expuestas a los diferentes biocidas. Las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS, pH = 7,4), se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en 2,4 ml de una solución de cloruro sódico (NaCl) 150 mM a una concentración de aproximadamente 10^8 ufc/ml. Posteriormente y tras tomar dos muestras de la mezcla (0,4 ml en total, quedando 2 ml de cada muestra en el tubo), se añadieron 0,333 ml de xileno (C_8H_{10} , Merck) de acuerdo con la proporción: 2,4 ml de mezcla = 0,4 ml de xileno, agitándose la mezcla durante 60 segundos con un vórtex. Posteriormente los tubos se dejaron en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente, lo que permitió la separación completa entre las dos fases (acuosa y orgánica). Transcurrido este tiempo, se tomaron 0,4 ml de la fase acuosa y se determinó la densidad óptica a 405 nm (DO_{405} ; Bioscreen C MRB). El porcentaje de células presentes en el solvente se calculó utilizando la siguiente ecuación: **porcentaje de afinidad al xileno = $100 \times [1 - (A/A_0)]$** , donde A_0 es la absorbancia de la suspensión original en solución salina (antes del mezclado con el solvente) y A es la absorbancia de la fase acuosa tras el mezclado y reposo. Cada experimento se repitió tres veces con cultivos preparados de forma independiente en tres días diferentes. Se establecieron tres categorías de la hidrofobicidad de acuerdo con el siguiente esquema: débil (< 21 %), moderada (21 % - 50 %) y fuerte (> 50 %) (Alonso-Hernando, 2011; Capita *et al.*, 2014).

2.7. Análisis estadístico

Los porcentajes de afinidad al xileno se compararon utilizando técnicas de análisis de varianza (ANOVA), con separación de medias mediante la prueba de rango múltiple de Duncan. El procesado de los datos se realizó utilizando el paquete informático Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.). Se establecieron diferencias significativas para un nivel de probabilidad del 5% ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y adaptación

Las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de los microorganismos *L. monocytogenes* (LM) y *Salmonella enterica* serotipo Agona (SA) se muestran en la Tabla II.1. También se muestran concentraciones máximas de biocidas que permitieron el crecimiento microbiano después de realizar varios pases en medio de cultivo con concentraciones gradualmente crecientes de los compuestos (adaptación).

Tabla II.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración máxima de biocida que permite el crecimiento microbiano después de la adaptación de *L. monocytogenes* y *S. enterica*.

Microorganismo	Biocida	MIC (ppm) ^a	Adaptación (ppm) ^b
<i>L. monocytogenes</i>	HS ^c	3.500	3.150
	CB ^d	8	6,75
	AP ^e	1.750	1.687,50
	FTS ^f	20.000	56.953,10
<i>S. enterica</i>	HS	2.500	2.100
	CB	28	34,50
	AP	500	1.339,10
	FTS	20.000	16.875

^aConcentración mínima inhibitoria. ^bConcentración máxima de biocidas que permitió el crecimiento microbiano tras realizar pases sucesivos con concentraciones gradualmente crecientes de los compuestos. ^cHipoclorito de sodio; ^dCloruro de benzalconio; ^eÁcido peracético; ^fFosfato trisódico.

El FTS fue la sustancia antimicrobiana que requirió las concentraciones más altas para inhibir el crecimiento de ambas cepas después de 48 horas de incubación (20.000 ppm para ambos microorganismos), seguido del HS (3.500 ppm, equivalente a 350 ppm de cloro libre para LM, y 2.500 ppm, equivalente a 250 ppm de cloro libre para SA). Los valores de MIC encontrados para HS son similares a los observados en otros estudios para *L. monocytogenes* (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018, 2019a). Asimismo, se encuentran dentro del rango observado

en otras enterobacterias como *Yersinia enterocolitica* y *Cronobacter sakazakii* (Capita *et al.*, 2019). El CB fue el desinfectante que produjo la inhibición del crecimiento a concentraciones más bajas (8 ppm para *L. monocytogenes* y 28 ppm para *S. enterica*). Estos valores son similares a los observados anteriormente en otros estudios: 2 ppm para bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Buzón-Durán *et al.*, 2017), de 3 a 13 ppm para *L. monocytogenes* (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019b), 8 ppm para *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (Capita *et al.*, 2017), y 15 y 20 ppm para *Cronobacter sakazakii* y *Yersinia enterocolitica*, respectivamente (Capita *et al.*, 2019).

Los valores de MIC observados en el presente estudio para el AP (1.750 ppm para LM y 500 ppm para SA), fueron similares a los observados por Capita *et al.* (2019) para enterobacterias, pero difieren de otros estudios anteriores como el de Alonso-Hernando *et al.* (2009a), donde observaron una MIC de entre 70 y 80 ppm para *S. enterica* y de 100 a 110 ppm para *L. monocytogenes*. Estas diferencias pueden deberse al hecho de que no todos los microorganismos presentan la misma susceptibilidad a los diferentes biocidas, independientemente del serotipo o la especie bacteriana. Asimismo, pueden existir diferencias en la composición de los productos ensayados.

Después de realizar varios pases sucesivos aumentando 1,5 veces la concentración de compuesto a medida que se va observando el crecimiento bacteriano, la concentración máxima de HS que permitió el crecimiento de ambos microorganismos no superó la MIC (3.150 ppm para LM y 2.100 ppm para SA) por lo que se considera que estos microorganismos no han adquirido adaptación a este biocida. Algo similar ocurrió con *L. monocytogenes* para CB y AP (6,75 ppm y 1.687,50 ppm, respectivamente) y para SA con FTS (16.875 ppm, frente a 20.000 ppm de MIC).

Sin embargo, se observó una adaptación muy marcada para *L. monocytogenes* con FTS (una cifra 2,85 veces mayor a la MIC de la cepa no expuesta). *S. enterica* mostró adaptación a dos biocidas: CB, situación en la que toleró 1,23 veces más de biocida que en la cepa no expuesta (34,5 ppm frente a 28 ppm de la cepa no expuesta al compuesto), y AP, con una tolerancia 2,68 veces mayor (1.339,1 ppm frente a 500 ppm de la cepa no expuesta previamente al compuesto).

La reducción de la susceptibilidad a los biocidas después de la exposición repetida de las cepas a concentraciones subinhibitorias también se ha observado en estudios previos con *L. monocytogenes* (Alonso-Hernando *et al.*, 2009a) y enterobacterias como *E. coli* (Capita *et al.*, 2014) o *S. enterica* (Alonso-Hernando *et al.*, 2009a; Capita *et al.*, 2017; Molina-González *et al.*, 2014).

En ocasiones, los biocidas se utilizan a dosis subinhibitorias en los entornos de procesado de alimentos (Capita *et al.*, 2014; Virto *et al.*, 2005). La reducción de la susceptibilidad a los biocidas después de su aplicación a bajas concentraciones puede deberse a mutaciones cromosómicas, que desencadenan modificaciones en las células bacterianas, principalmente en la composición y estructura de la membrana externa, evitando la penetración de los agentes antimicrobianos. Esta resistencia también puede asociarse con modificaciones fenotípicas, como consecuencia de la regulación metabólica de las respuestas al estrés inducido por la presencia de biocidas (por ejemplo, la expresión de mecanismos de bombas de expulsión) (Capita *et al.*, 2013). Con el fin de evitar el aumento de la tolerancia a los biocidas, deben utilizarse concentraciones letales de estas sustancias, ya sea en los entornos clínicos o de procesado de alimentos (Capita *et al.*, 2019).

3.2. Susceptibilidad a antibióticos

Las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos son difíciles de tratar, ya que muchas sustancias empleadas habitualmente en la práctica clínica quedan invalidadas como opciones terapéuticas (Capita *et al.*, 2019). La resistencia a los antibióticos es un problema de dimensiones crecientes, actualmente considerado como uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta la Salud Pública en todo el mundo (Capita y Alonso-Calleja, 2013). En este estudio se determinó si la exposición de *L. monocytogenes* y *S. enterica* a bajas concentraciones de biocidas podría contribuir al aumento de la resistencia a antibióticos. Con este fin, se estudiaron las cepas para determinar la susceptibilidad a 10 antibióticos de importancia clínica antes y después de la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas estudiados. Los resultados de las MICs de antibióticos para LM y SA se muestran en las Tablas II.2 y II.3, respectivamente.

Tabla II.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) de 10 antibióticos en cepas de *Listeria monocytogenes* expuestas y no expuestas a dosis bajas de biocidas.

CEPAS	ANTIBIÓTICOS (ppm)									
	AMP	KF	FOX	E	C	CN	TE	VA	FOS	ENR
LM no expuesta	30	190	40	0,10	26	15	14	38	30	>2.300
LM expuesta a HS	6	550	440	0,05	8	6	60	130	180	>2.300
LM expuesta a CB	4	650	1000	4	8	60	2	40	240	>2.300
LM expuesta a AP	0,50	190	900	1	6	30	7	4	190	>2.300
LM expuesta a FTS	40	130	300	750	8	20	20	40	90	>2.300
Puntos de corte										
S ≤ - R >	1-1	0,12-0,5	4-8	1-1	8-8	1-1	1-2	2-2	32-32	0,5-4

AMP (ampicilina), KF (cefalotina), FOX (cefotaxima), E (eritromicina), C (cloranfenicol), CN (gentamicina), TE (tetraciclina), VA (vancomicina), FOS (fosfomicina), ENR (enrofloxacin). HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético, FTS, fosfato trisódico. LM, *Listeria monocytogenes*. Puntos de corte usados para clasificar las cepas como susceptibles (MIC ≤ punto de corte inferior), de susceptibilidad reducida (MIC > punto de corte inferior ≤ punto de corte superior), o resistentes (MIC > punto de corte superior). Los criterios para AMP y E son específicos de *L. monocytogenes* (EUCAST, 2021). Los de C, TE y FOS corresponden a *Staphylococcus* spp. y los de CN y VA a *Staphylococcus aureus* (EUCAST, 2021); los de KF y FOX son también de *S. aureus* (CLSI, 2020) y los de ENR de *Staphylococcus* spp. (CLSI, 2018). Las celdas sombreadas en verde muestran las cepas susceptibles, las sombreadas en amarillo las cepas con susceptibilidad reducida, y las sombreadas en rojo las cepas resistentes, según los criterios aplicados.

Antes de la exposición, *L. monocytogenes* mostró resistencia a todos los antibióticos estudiados, a excepción de eritromicina (E) y fosfomicina (FOS). En el estudio realizado por Alonso-Hernando *et al.* (2012), a diferencia de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, se observó que todos los aislamientos de *L. monocytogenes* del año 2006 eran susceptibles a cloranfenicol y tetraciclina. Estos autores indicaron que el patrón de resistencia a antibióticos estaba cambiando a lo largo del tiempo, siendo cada vez más frecuentes las cepas con resistencia. Dicha modificación en los patrones de susceptibilidad a antibióticos parece haberse desarrollado por el uso generalizado de estos compuestos en producción animal, ya que el uso excesivo o inadecuado de los antibióticos, tanto en animales como en seres humanos, puede considerarse como el primer factor de riesgo en la aparición de resistencias bacterianas a estos antimicrobianos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Hay que señalar que, afortunadamente, la eritromicina continúa mostrando una fuerte actividad frente a *L. monocytogenes*. Sin embargo, es preocupante la resistencia encontrada para la ampicilina. En otros estudios se ha observado que el 20,9% (Jamali *et al.*, 2015) y el

67,6% (Carvalho *et al.*, 2019) de cepas de *L. monocytogenes* muestran resistencia a este antibiótico. La AMP, suministrada sola o en combinación con gentamicina, es el tratamiento de elección para la listeriosis humana (Alonso-Hernando *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2019).

Después de la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas, se observó un aumento de la resistencia de *L. monocytogenes* a la eritromicina, con respecto a la cepa no expuesta (Tabla II.2), de acuerdo con las directrices establecidas por EUCAST (2021). El CB y el AP provocaron un incremento de la tolerancia de la cepa hasta valores 10 y 40 veces superiores, con 1 ppm y 4 ppm, respectivamente. La cifra más sorprendente se obtuvo con la exposición de la cepa al FTS, que la permitió resistir concentraciones de eritromicina de 750 ppm. Estudios realizados por Capita *et al.* (2001), demuestran que la exposición de las cepas de *L. monocytogenes* a concentraciones subinhibitorias de FTS favorecen el crecimiento de esta bacteria, hecho que sugiere la necesidad de una mayor dosis del antibiótico para inhibir al microorganismo. Para la fosfomicina, se obtuvo una MIC de 30 ppm en la cepa no expuesta a los biocidas. Sin embargo, los valores de MIC tras la exposición a los compuestos ascendieron de forma notable, siendo de 180 ppm, 240 ppm, 190 ppm y 90 ppm para HS, CB, AP y FTS, respectivamente.

Por otro lado, se puso de manifiesto un aumento de la susceptibilidad a los antibióticos tras la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas, como es el caso de cloranfenicol, presentando una MIC de 26 ppm en la cepa no expuesta a biocidas, lo que la clasifica como resistente, pero unos valores de entre 6 y 8 ppm para la cepa expuesta a los biocidas estudiados. En el caso de la ampicilina, la vancomicina y la tetraciclina, los valores de MIC en las cepas no expuestas fueron de 30 ppm, 38 ppm y 14 ppm, respectivamente. Estas cifras disminuyeron a 6 ppm en la cepa expuesta a CB o 4 ppm en la cepa expuesta a AP para el primer antibiótico, 4 ppm para la cepa expuesta a AP en el caso de la vancomicina y 7 ppm para la exposición al mismo biocida en el caso de la tetraciclina. Algo similar observaron Alonso-Hernando *et al.* (2009b) para cepas de *L. monocytogenes* y *S. enterica*. Estos autores comprobaron que la susceptibilidad a los antibióticos disminuyó en las células expuestas con respecto a las no expuestas, si bien las cifras se mantuvieron muy por encima de los límites de resistencia establecidos, y continuaron clasificándose como susceptibles.

Tabla II.3. Concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) de 10 antibióticos en cepas de *Salmonella enterica* serotipo Agona expuestas y no expuestas a dosis bajas de biocidas.

CEPAS	ANTIBIÓTICOS (ppm)									
	AMP	KF	FOX	E	C	CN	TE	VA	FOS	ENR
SA no expuesta	700	50	4	142	376	3	7	700	38	0,06
SA expuesta a HS	800	110	30	90	410	10	10	940	90	0,10
SA expuesta a CB	800	50	20	150	390	10	5	820	90	0,75
SA expuesta a AP	540	70	40	110	370	34	7	692	60	6
SA expuesta a FTS	710	120	25	90	400	14	70	1000	100	1,50
Puntos de corte	8-32	16-32	8-32	1-2	8-32	4-16	4-16	2-2	64-256	0,5-4
S ≤ - R ≥										

AMP (ampicilina), KF (cefalotina), FOX (cefoxitina), E (eritromicina), C (cloranfenicol), CN (gentamicina), TE (tetraciclina), VA (vancomicina), FOS (fosfomicina), ENR (enrofloxacin). HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético, FTS, fosfato trisódico. Sa, *Salmonella enterica* serotipo Agona. Puntos de corte usados para clasificar las cepas como susceptibles (MIC ≤ punto de corte inferior), de susceptibilidad reducida (MIC ≥ punto de corte inferior ≤ punto de corte superior), o resistentes (MIC > punto de corte superior). Las celdas sombreadas en verde muestran las cepas susceptibles, las sombreadas en amarillo las cepas con susceptibilidad reducida, y las sombreadas en rojo las cepas resistentes, según los criterios aplicados. Se han usado los criterios establecidos para las enterobacterias (CLSI, 2020). Los criterios para E y VA son específicos de *Staphylococcus* spp. y *S. aureus*, respectivamente (EUCAST, 2021) y los de ENR de *Staphylococcus* spp. (CLSI, 2018).

Antes de la exposición, *S. enterica* mostró resistencia AMP, KF, E, C, VA y FOS. Algunos estudios demuestran que las enterobacterias producen α y β lactamasas que confieren resistencia a antibióticos como AMP (Bonardi *et al.*, 2013; Bronke *et al.*, 2011; Fàbrega *et al.*, 2012); la presencia de bombas de expulsión en bacterias Gram-negativas también podría estar relacionada con la resistencia a este antibiótico (Nikaido, 1996). La resistencia frente a betalactámicos es un motivo de gran preocupación, ya que las cefalosporinas (p. ej., cefalotina), son utilizadas con frecuencia para el tratamiento de la salmonelosis en pacientes jóvenes (Alonso-Hernando *et al.*, 2009a).

Después de la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas, *S. enterica* mostró resistencia a varios antibióticos a los que era sensible antes de la exposición. Esto sucedió con cefoxitina (FOX, cepa expuesta a todos los biocidas), gentamicina (CN, cepa expuesta a todos los biocidas), tetraciclina (TE, cepa expuesta a FTS) y enrofloxacin (ENR, cepa expuesta a todos los biocidas). Para enrofloxacin se obtuvo una MIC de 0,06 ppm, clasificándose como susceptible de acuerdo con las directrices establecidas por el CLSI (2018). Tras la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas, se obtuvieron MICs de 0,10 ppm, 0,75 ppm y 1,5 ppm para HS, CB y FTS, respectivamente

(Tabla II.3). Sin embargo, el resultado más sorprendente se observó para la exposición de *S. enterica* a AP, donde se encontró un aumento de la resistencia 100 veces mayor que el valor de partida, alcanzándose una cifra de 6 ppm. Algo similar fue observado para cefoxitina, presentando una MIC en la cepa no expuesta de 4 ppm clasificándose como susceptible de acuerdo con las directrices establecidas por CLSI. Sin embargo y tras la exposición de *S. enterica* a los biocidas estudiados, se obtuvieron valores de MIC de entre 5 y 7,5 veces superiores a la MIC de la cepa no expuesta a biocidas, siendo de 30 ppm, 20 ppm, 40 ppm y 25 ppm para HS, CB, AP y FTS, respectivamente. Por último y para tetraciclina, se obtuvo una MIC de 7 ppm de la cepa sin exposición a biocidas, clasificándose como susceptibilidad reducida. Solamente se observó un aumento de la resistencia a este antibiótico para la cepa de *S. enterica* expuesta a FTS, obteniendo una MIC 10 veces mayor que en la cepa no expuesta, con 70 ppm.

Se han observado, para diversas clases de antibióticos, cambios en los patrones de susceptibilidad a estos compuestos tras la exposición a biocidas, hecho que sugiere que la adaptación a los biocidas puede estar asociada a mecanismos de amplio espectro, como son bombas de expulsión o alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares (Capita *et al.*, 2019). En este sentido, autores como Randall *et al.* (2007) y Condell *et al.* (2012) observaron una reducción en la susceptibilidad a antibióticos, como cefoxitina (FOX), después de la exposición a dosis subinhibitorias de biocidas, hecho que relacionaron con la presencia de bombas de expulsión.

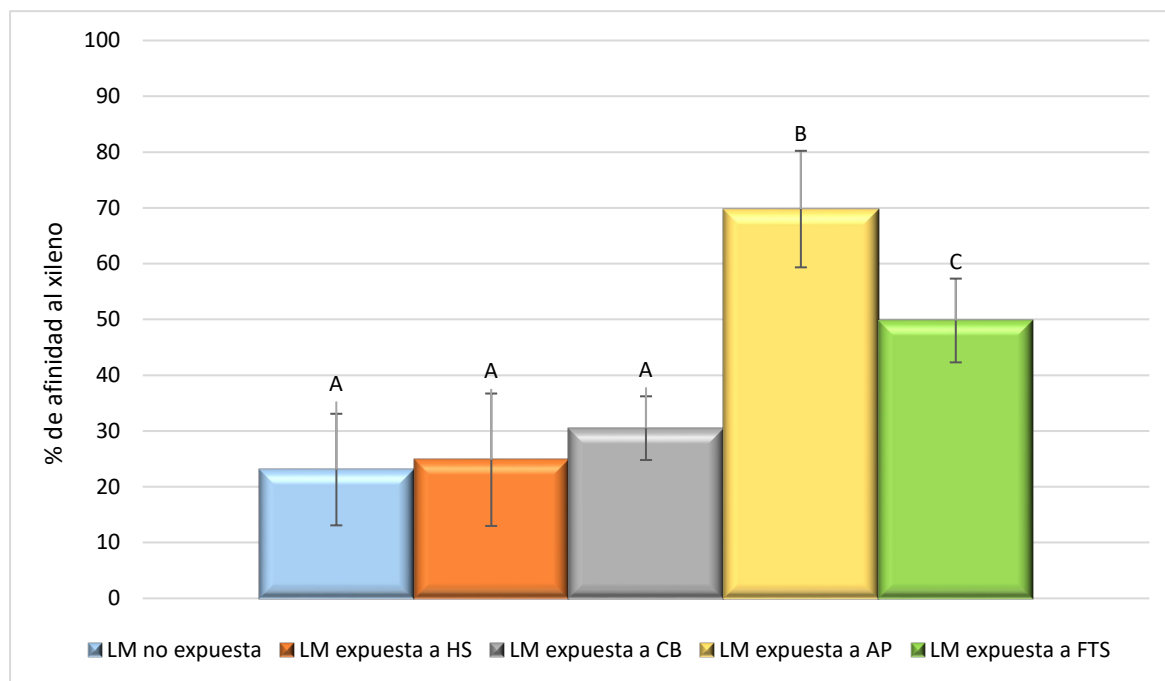
3.3. Hidrofobicidad de la superficie celular

Algunos investigadores han demostrado que la hidrofobicidad de la superficie celular microbiana desempeña un papel crítico en la adherencia de las bacterias a superficies hidrofóbicas, como el poliestireno, para la posterior formación de biopelículas (Gallardo-Moreno *et al.*, 2002a, b). Dado que la adhesión bacteriana a la superficie es el primer paso en la formación de biopelículas, cabe esperar que un aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular vaya acompañado de una mayor capacidad bacteriana para formar biopelículas en superficies abióticas de naturaleza hidrofóbica (Norouzi *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los valores de hidrofobicidad obtenidos para las cepas de *L. monocytogenes* y *S. enterica*. El porcentaje de afinidad al xileno osciló entre el $23,0890 \pm 6,0675\%$ para la cepa de LM no expuesta a los biocidas y de $44,5254 \pm 5,5705\%$ para la cepa de *S. enterica* antes de la exposición a concentraciones subinhibitorias de biocidas (Figuras II.1 y II.2).

Con respecto a los resultados obtenidos en las cepas de LM expuestas a biocidas, no se encontraron diferencias ($P > 0,05$) entre el porcentaje de afinidad al xileno de LM expuesta a HS, expuesta a CB y control. Todas ellas presentaron una reacción moderada (entre 21% y 50% de afinidad al xileno). Sin embargo, el porcentaje de afinidad al xileno de LM expuesta a AP ($69,7804 \pm 10,4434$; reacción fuerte) y a FTS ($49,8098 \pm 7,5064$; reacción moderada) fue mayor ($P < 0,05$) que los valores obtenidos para LM expuesta al resto de biocidas o no expuesta.

Es bien conocido que *L. monocytogenes* es capaz de adaptarse a los ambientes hostiles empleados en las instalaciones de procesado de alimentos, como los agentes antibacterianos. Además, se ha demostrado que exponer las bacterias a concentraciones subletales de estos compuestos conduce a la adaptación cruzada a diversos factores de estrés subletal (Alonso-Hernando *et al.*, 2009b). Algunos estudios han demostrado que *L. monocytogenes* es un potente donador de electrones, lo que le hace ganar afinidad por disolventes que captan electrones, como es el cloroformo (Lee *et al.*, 2017). Sin embargo, nuestro estudio revela que la exposición a concentraciones subinhibitorias de AP aumenta la afinidad por los solventes no polares, como es el xileno. Esto podría deberse al mecanismo de acción del AP sobre los microorganismos, ya que este compuesto posee la capacidad de oxidar la membrana externa, provocando de este modo su inactivación. Este hecho es preocupante, teniendo en cuenta, por un lado, que los materiales hidrofóbicos son empleados habitualmente en los entornos de procesado de alimentos (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019c) y, por otro, la relación entre aumento de hidrofobicidad e incremento de la capacidad de las cepas de *L. monocytogenes* para formar biofilms en este tipo de superficies.



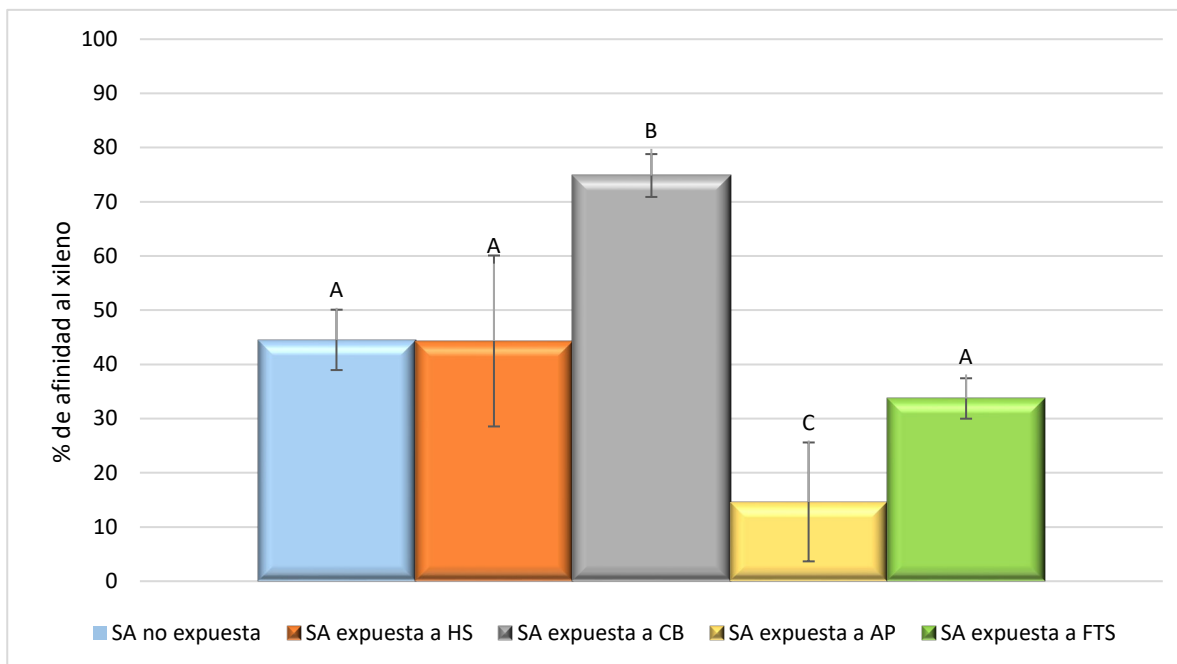
LM, *Listeria monocytogenes*; HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético; FTS, fosfato trisódico. Las columnas que no comparten ninguna letra presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Figura II.1. Valores de hidrofobicidad de la superficie celular en células de *L. monocytogenes* (LM6) control o previamente adaptadas a diferentes compuestos químicos.

En cuanto a los resultados obtenidos de las cepas de SA expuestas a biocidas, no existen diferencias ($P > 0,05$) entre el porcentaje de afinidad de SA expuesta a HS, a FTS y no expuesta (control). En todos los casos se observaron reacciones moderadas de afinidad al xileno (entre 21% y 50%). En estudios previos (Alonso-Hernando *et al.*, 2015) se indica que el contacto (adaptación o exposición) con algunos biocidas podría modificar la hidrofobicidad de la superficie celular en microorganismos Gram-negativos, como *Escherichia coli*, aumentándola.

La cepa de SA expuesta a AP presentó el valor más bajo de afinidad al xileno ($14,63 \pm 3,95$), y la expuesta al CB el más alto ($74,85 \pm 7,51$). En trabajos anteriores, autores como Jones *et al.* (1989) y Loughlin *et al.* (2002) han señalado que las células de bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* adaptadas a los compuestos de amonio cuaternario (QACs), como es el cloruro de benzalconio, presentaban aumentos en la hidrofobicidad de la superficie celular cuando fueron examinadas por el ensayo MATS. Una explicación podría estar relacionada con el aumento de la hidrofobicidad resultante de una reducción de los sitios de unión (hidrófilos) cargados negativamente para el grupo principal positivo del desinfectante. A medida que las células bacterianas se adaptan más a CB, tienden

a perder o enmascaran sus sitios de unión para el desinfectante. Estos sitios de unión están cargados negativamente y por lo tanto restan hidrofobicidad de la célula, por lo que a medida



que se pierden o enmascaran, la célula aumenta su hidrofobicidad (Loughlin *et al.*, 2002).

SE, *Salmonella enterica*; HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético; FTS, fosfato trisódico. Las columnas que no comparten ninguna letra presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Figura II.2. Valores de hidrofobicidad de la superficie celular en células de *S. enterica* serotipo Agona (SA) control o previamente adaptadas a diferentes compuestos químicos.

Conclusiones

L. monocytogenes y *S. enterica* plantean un importante desafío de Seguridad Alimentaria en los entornos de procesamiento de alimentos. Los efectos de las diferentes concentraciones y tipos de desinfectantes utilizados para la limpieza y desinfección de las industrias alimentarias deben estudiarse en profundidad con el fin de lograr la optimización de las estrategias de higienización. En el presente estudio se han calculado las concentraciones mínimas inhibitorias de *L. monocytogenes* y *S. enterica* antes y después de la exposición de los microorganismos a concentraciones crecientes subinhibitorias de varios biocidas de uso común en la Industria Alimentaria, para comprobar su nivel de adaptación a los compuestos estudiados, así como la influencia del contacto con los biocidas en la disminución de la susceptibilidad a los antibióticos y en la hidrofobicidad de la superficie celular. Los resultados obtenidos pueden contribuir a una mejor comprensión del comportamiento y los mecanismos de supervivencia de *L. monocytogenes* y *S. enterica* en presencia de concentraciones

subinhibitorias de biocidas. Puesto que el contacto con dosis bajas de estos desinfectantes incrementa la resistencia de las cepas a algunos antibióticos de importancia clínica, a la vez que modifica la hidrofobicidad de la superficie celular (aspecto relacionado con la capacidad para formar biofilm) es necesario enfatizar la importancia de una adecuada aplicación de los compuestos desinfectantes en las plantas de procesado de alimentos. Se requieren estudios adicionales para determinar las variaciones fenotípicas y genotípicas de estos microorganismos patógenos ante la exposición a concentraciones subletales de biocidas.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2010). Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Food Microbiology* **137**: 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.022>
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. (2009a). Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* **20**(12): 1108–1111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.011>
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. (2009b). Adaptation and cross-adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants. *The Journal of Microbiology* **47**: 142-146. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0237-5>
- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2015). Effect of various decontamination treatments against Gram-positive bacteria on chicken stored under differing conditions of temperature abuse. *Food Control* **47**: 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.032>
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2012). Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* **23**(1): 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.006>
- Bonardi, S., Bassi, L., Brindani, F., D’Incau, M., Barco, L., Carra, E., Pongolini, S. (2013). Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. *International Journal of Food Microbiology* **163**(2–3): 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.012>
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**: 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.003>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**(1): 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, M. C., Moreno, B. (2001). Influence of strain and trisodium phosphate concentration on growth parameters of *Listeria monocytogenes*

- in vitro. *Letters in Applied Microbiology* **32**(6). <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00936.x>
- Capita, R., Buzón-Durán, L., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2017). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* **14**(6): 350–356 <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2241>
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(4): 1268-1280. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>
- Capita, R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Alonso-Calleja, C. (2019). Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports* **9**: 15905. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51907-1>
- Carvalho, F. T., Vieira, B. S., Vallim, D. C., Carvalho, L. A., Carvalho, R. C. T., Pereira, R. C. L., Figueiredo, E. E. S. (2019). Genetic similarity, antibiotic resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat and chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. *LWT* **109**: 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.099>
- Charpentier, E., Courvalin, P. (1999). Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(9): 2103-2108. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89430/>
- CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. CLSI VET08-ED4:2018. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania (USA). Disponible en: <http://clsivet.org/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20VET08%20ED4:2018&xormat=SPDF&src=BB> (Fecha de último acceso: 15 de diciembre de 2021).
- CLSI (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania (USA). Disponible en: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf> (Fecha de último acceso: 15 de diciembre de 2021).

- Condell, O., Iversen, C., Cooney, D., Power, K. A., Walsh, C., Burgess, C., Fanning, S. (2012). Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied Environmental Microbiology* **78**(9): 3087-3097. <https://doi.org/10.1128/AEM.07534-11>
- EFSA y ECDC (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* **19**(12): 6971. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- EUCAST (2021). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. V. 11.0. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (Fecha de último acceso: 03 de septiembre de 2021).
- Fàbrega, A., Vila, J. (2012). *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **30**(1): 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.07.017>
- Gallardo-Moreno, A. M., González-Martín, M. L., Pérez-Giraldo, C., Bruque, J. M., Gómez-García, A. C. (2002a). Serum as a factor influencing adhesion of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(11): 5784–5787. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5784-5787.2002>
- Gallardo-Moreno, A. M., González-Martín, M. L., Pérez-Giraldo, C., Garduno, E., Bruque, J. M., Gómez-García, A. C. (2002b). Thermodynamic analysis of growth temperature dependence in the adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(5): 2610-2613. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2610-2613.2002>
- Gómez, D., Azón, E., Marco, N., Carramiñana, J. J., Rosa, C., Ariño, A., Yangüela, J. (2014). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiology* **42**: 61 - 65. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.017>
- Jamali, H., Paydar, M., Ismail, S., Yeng Looi, C., Fen Wong, W., Radmehr, B., Abedini, A. (2015). Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets. *BMC Microbiology* **15**: 144. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0476-7>
- Komora, N., Bruschi, C., Magalhães, R., Ferreira, V., Teixeira, P. (2017). Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses.

- International Journal of Food Microbiology* **245**: 79-87.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.013>
- Lee, B. H., Hébraud, M., Bernardi, T. (2017). Increased adhesion of *Listeria monocytogenes* strains to abiotic surfaces under cold stress. *Frontiers in Microbiology* **8**: 2221.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02221>
- Loughlin, M. F., Jones, M. V., Lambert, P. A. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**(4): 631-639.
<https://doi.org/10.1093/jac/49.4.631>
- Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2014). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* **40**: 329–334.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.046>
- Norouzi, F., Mansouri, S., Moradi, M., Razavi, M. (2010). Comparison of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among ESBL-and non ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *African Journal of Microbiology Research* **4**(11): 1143–1147. <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000189>
- Patel, J., Sharma, M., Ravishakar, S. (2011). Effect of curli expression and hydrophobicity of *Escherichia coli* O157:H7 on attachment to fresh produce surfaces. *Journal of Applied Microbiology* **110**: 737–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04933.x>
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Coldham, N. G., Penuela, E. G., Mott, A. C., Woodward, M. J., Piddock, L. J. V., Webber, M., A. (2007). Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60**(6): 1273-1280. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm359>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., Carballo, J., García-Fernández, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2018). Structure and viability of 24- and 72-h old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology*. **76**: 513–517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019c). Architecture and viability of the biofilms formed by nine *Listeria* strains on various hydrophobic and hydrophilic materials. *Applied Sciences* **9**(23): 5256. <https://doi.org/10.3390/app9235256>

- Rodríguez-Melcón, C., Capita, R. Rodríguez-Jerez, J. J., Martínez-Suárez, J. V., Alonso-Calleja, C. (2019b). Effect of low doses of disinfectants on the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* **16**(4): 262-268. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2472>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, A., Capita, R. (2019a). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology* **82**: 533-540. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020>
- Romanova, N. A., Wolfs, P. F. G., Brovko, L. Y., Griffiths, M. W. (2006). Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(5): 3498-3503. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3498-3503.2006>
- Rugna, G., Carra, E., Bergamini, F., Franzini, G., Faccini, S., Gattuso, A., Morganti, M., Baldi, D., Naldi, S., Serraino, A., Piva, S., Merialdi, G., Giacometti, F. (2021). Distribution, virulence, genotypic characteristics and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated over one-year monitoring from two pig slaughterhouses and processing plants and their fresh hams. *International Journal of Food Microbiology* **336**: 108912. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108912>
- Takahashi, H., Suda, T., Tanaka, Y., Kimura, B. (2010). Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology* **50**: 618-625. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02842.x>
- Virto, R., Mañas, P., Álvarez, I., Condón, S., Raso, J. (2005). Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(9): 5022-5028. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5022-5028.2005>

CAPÍTULO III

Susceptibilidad a biocidas de uso alimentario en bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas. Efecto de dosis subinhibitorias de los biocidas sobre la resistencia a antibióticos

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los alimentos son un artículo de primera necesidad para los seres humanos, ya que aportan la energía y los nutrientes necesarios para la vida. Sin embargo, determinados tipos de microorganismos indeseables pueden contaminar los productos alimenticios, así como los equipos e instalaciones de los entornos de procesamiento de los mismos, lo que se asocia con un riesgo de generación de enfermedades transmitidas por alimentos. Los patógenos de transmisión alimentaria son aquellos microorganismos que causan enfermedades humanas (en ocasiones incluso a bajas dosis infectivas) al ingerir alimentos contaminados (Yousef y Abdelhamid, 2019).

Las enfermedades transmitidas por alimentos presentan un importante problema de Salud Pública en el ámbito mundial, siendo *Salmonella* una de las principales causas de enfermedades transmitidas por los alimentos. Entre las enfermedades gastrointestinales, es la tercera causa principal de mortalidad en humanos, con aproximadamente 155.000 fallecimientos asociados cada año (Mechesso *et al.*, 2020). Los serotipos de *Salmonella* no tifoideos se encuentran entre las principales causas de diarrea bacteriana en individuos inmunodeprimidos. Los productos alimenticios de origen animal son las principales, aunque no exclusivas, fuentes de infecciones humanas por este microorganismo (Feasey *et al.*, 2012).

Listeria monocytogenes es un bacilo Gram-positivo, anaerobio facultativo no formador de esporas (AECOSAN, 2019). Este patógeno transmitido por alimentos resiste a una amplia gama de condiciones de estrés (Bucur *et al.*, 2018); su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 °C y 37 °C, pero también puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración, incluso próximas a 0 °C. Además, se multiplica en un amplio rango de pH (4,4 - 9,4) (AECOSAN, 2019) y tiene capacidad de desarrollarse a elevadas concentraciones de sal (10 - 14 %) (Rivera, 2016). La listeriosis es responsable de 23.000 infecciones invasivas cada año en todo el mundo, y conlleva una tasa de letalidad que puede alcanzar el 30% (Rodríguez-Campos *et al.*, 2019).

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena responsable de infecciones nosocomiales o comunitarias (Lowy, 1998). En los Estados Unidos se notificaron 119.000 infecciones y casi 20.000 muertes asociadas en 2017 (CDC, 2019; Chung *et al.*, 2021; Kavanagh, 2019). Dentro de la especie *S. aureus*, se encuentran las cepas resistentes a la meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; MRSA), descritas por primera vez en 1961. Desde entonces, se han convertido en una de las principales causas de infecciones hospitalarias en seres humanos, con tasas de mortalidad elevadas, provocando principalmente infecciones cutáneas, pulmonares y septicemias (Buzón-Durán *et al.*, 2017).

Dentro del género *Enterococcus* destacan las cepas resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*, VRE), que pueden transmitirse al hombre por ingestión o manipulación de los alimentos contaminados. Las cepas de VRE suponen un desafío en la práctica clínica, ya que la vancomicina se emplea habitualmente como última opción en el tratamiento de infecciones provocadas por cepas de enterococos con resistencias múltiples (Guerrero-Ramos, 2016). Entre los años 1990 y 1997, la prevalencia de resistencia a este compuesto antimicrobiano en cepas aisladas de infecciones hospitalarias oscilaba entre el 1% y el 15%, pero desde el año 2000 hasta la actualidad se ha observado un incremento de la resistencia a este glucopéptido, afectando actualmente a más del 25% de los aislamientos de enterococos de origen clínico (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Guerrero-Ramos, 2016).

El control de los microorganismos para permitir extender la vida útil de los alimentos y lograr que sean inocuos para el consumidor, ha evolucionado a lo largo de la historia de la humanidad. Los métodos de control microbiano apuntan, principalmente, a inhibir el crecimiento de los microorganismos indeseables mediante la aplicación de estrategias basadas en el empleo de compuestos antimicrobianos (Abdelhamid y El-DougDoug, 2020).

Los biocidas se utilizan ampliamente en la industria alimentaria como aditivos alimentarios, descontaminantes o desinfectantes ambientales para controlar microorganismos nocivos (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Los desinfectantes a base de cloro, como el hipoclorito de sodio, son compuestos oxidantes muy utilizados en las industrias alimentarias debido a sus actividades bactericidas de amplio espectro, alta eficacia y bajo coste (Waghmare y Annapure, 2015). Los compuestos de amonio cuaternario (QAC), como el cloruro de benzalconio, son tensioactivos catiónicos que actúan mediante la disrupción de las bicapas de las membranas lipídicas, siendo efectivos frente a diferentes grupos microbianos, especialmente bacterias Gram-positivas (Ortiz *et al.*, 2014).

La industria avícola ha reclamado alternativas al uso de los compuestos clorados para la limpieza y desinfección. Algunos estudios (Viola *et al.*, 2018) han demostrado que a mayor potencial redox, mayor poder bactericida. El ácido peracético (AP) tiene un potencial redox de 1,385 V, siendo más elevado que el del cloro (1,361 V), el del dióxido de cloro (1,174 V) y, a diferencia de otros desinfectantes, no forma subproductos químicos nocivos, ya que el AP normalmente se descompone en oxígeno y agua (Zhang *et al.*, 2018).

El tratamiento con ácido láctico (AL) se ha autorizado recientemente como descontaminante superficial de la carne, de acuerdo con la normativa de la Unión Europea (UE), Reglamento 101/2013 de la Comisión, de 4 de febrero de 2013, relativo al uso de ácido láctico para reducir la contaminación microbiológica de la superficie de las canales bovinas (DOUE, 2013). Se ha sugerido que las reducciones en la carga microbiana después del

tratamiento con AL son el resultado de la descontaminación inmediata de las superficies a través de los efectos inhibidores residuales, que inicialmente pueden ser bactericidas debido al pH más bajo en la superficie de la carne durante un breve período de tiempo después de un tratamiento con ácido (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2017). También se ha observado una protección residual frente al crecimiento posterior de las bacterias (Carpenter *et al.*, 2011).

Los antibióticos se han utilizado ampliamente como agentes metafilácticos, profilácticos y terapéuticos en las explotaciones ganaderas. El uso generalizado de estos compuestos en animales destinados a la producción de alimentos provoca la aparición de cepas resistentes (Buzón-Durán *et al.*, 2018; Mechesso *et al.*, 2020). Además, la evidencia científica sugiere que la presión selectiva ejercida por el uso de biocidas, incluidos los compuestos ampliamente utilizados en las instalaciones de producción de alimentos, podría contribuir al incremento de la resistencia a los antibióticos, por ejemplo, mediante fenómenos de resistencia cruzada, co-resistencia, selección de variantes clonales resistentes a biocidas y antibióticos, o activación de la respuesta SOS (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Randall *et al.*, 2007).

En ocasiones, los microorganismos pueden contactar con concentraciones sub-inhedoras de biocidas como consecuencia de un cálculo incorrecto de las mismas, de una distribución heterogénea de los compuestos, del almacenamiento inadecuado de las formulaciones, de la presencia de cantidades excesivas de materia orgánica (capaz de inactivar diferentes compuestos biocidas) o del uso de compuestos a concentraciones subletales, lo que se conoce como "efecto barrera" o "efecto obstáculo" (Alonso-Hernando *et al.*; 2009, Molina-González *et al.*, 2014).

En el contexto planteado se ha realizado este trabajo, cuyo objetivo ha sido determinar el efecto de la exposición a concentraciones subinhibitorias de cuatro antimicrobianos comúnmente utilizados en la industria alimentaria (hipoclorito sódico, ácido peracético, cloruro de benzalconio y ácido láctico) sobre la susceptibilidad a antibióticos de importancia clínica de cuatro especies de microorganismos patógenos aislados de alimentos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Se utilizaron cuatro cepas de bacterias aisladas de alimentos y disponibles en nuestro laboratorio: *L. monocytogenes* (LM) serotipo 1/2a, *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (MRSA 48a), *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (VRE 61s) y *Salmonella enterica* serotipo Hadar (SH). Los cultivos bacterianos se mantuvieron almacenados a una temperatura de -80 °C en caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) con un 20% (vol/vol) de glicerol. Antes de cada experimento, las células se activaron mediante la transferencia de aproximadamente 20 µl del cultivo congelado a tubos con 5 ml de TSB (Oxoid) y posterior incubación del caldo durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente, los cultivos se cultivaron en placas con agar triptona de soja (TSA, Oxoid) para su mantenimiento a 4 ± 1 °C durante la realización del experimento.

2.2. Desinfectantes

Se utilizaron cuatro compuestos: hipoclorito sódico (NaClO, HS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.), cloruro de benzalconio (CB, Sigma-Aldrich), ácido peracético (AP, Sigma-Aldrich) y ácido láctico (C₃H₆O₃, AL, Sigma-Aldrich). Para la preparación de las correspondientes soluciones se partió de compuestos con un 10% de pureza (expresado como porcentaje de cloro libre) en el caso del hipoclorito sódico, un 95% (asumiendo que el producto es puro) en el caso del cloruro de benzalconio, un 39% para el ácido peracético y un 85% para el ácido láctico con un pKa de 3,50. Las soluciones de cada uno de los compuestos se prepararon en condiciones asépticas en agua destilada estéril antes del comienzo de cada experimento.

2.3. Cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs)

Los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) se establecieron utilizando un método de microdilución en caldo de acuerdo con el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, EE.UU. (CLSI, 2019). Se tomaron, a partir de placas de TSA (Oxoid) 5 colonias de cada cepa, que se inocularon en 9 ml de TSB (Oxoid) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Para el experimento se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Los pocillos se llenaron con 20 µl de la solución desinfectante (se utilizaron en un rango de concentraciones) y 180 µl de

inóculo en las diluciones apropiadas con el fin de obtener una concentración final en el pocillo de 5×10^5 ufc/ml. La concentración del inóculo se confirmó por siembra en placa. El crecimiento se determinó midiendo la $DO_{420-580}$ en un Bioscreen C MRB (Oy Growth Curves Ab). La MIC se estableció como la concentración de biocida mínima necesaria para evitar el crecimiento bacteriano después de 48 horas de incubación.

2.4. Cálculo de las concentraciones mínimas bactericidas (MBCs)

Para el cálculo de las MBCs de los antimicrobianos se empleó el método de dilución en caldo (CLSI, 2019). A partir de los pocillos de las placas de microtítulo (Oy Growth Curves Ab Ltd.) en los que no se observó crecimiento tras 48 h de incubación a 37 °C, se sembraron 0,1 ml en la superficie de placas de TSA (Oxoid). Dichas placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C, considerándose MBC como la menor concentración de compuesto con la que no se formaron colonias en estas condiciones. Teniendo en cuenta que el límite de detección de la técnica es de 10 ufc/ml, la ausencia de crecimiento en las placas de TSA indica que la concentración es inferior a este valor y, por lo tanto, que la concentración inicial (10^5 ufc/ml) se ha reducido hasta menos de 10 ufc/ml. Por ello, se considera MBC como la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de destruir más del 99,99% de las bacterias presentes.

2.5. Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Se determinó la susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *L. monocytogenes* antes y después de la exposición a los desinfectantes. Para ello, se utilizaron 30 antibióticos, que fueron ensayados por el método de difusión en disco en MHA (Oxoid) descrito por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2019).

Inicialmente, se sembraron las cepas en tubos con 9 ml de TSB (Oxoid) con y sin biocidas a concentraciones de MIC/2 (según se tratase de cepas expuestas o control) y se incubaron durante 6 horas a 37 °C. Posteriormente, se sembraron las placas en césped con ayuda de un bastoncillo estéril. A continuación, se depositaron los discos de antibióticos (4-5 discos/placa), utilizando para ello una pinza estéril. Se utilizaron los siguientes discos (Oxoid): estreptomina (S, 10 µg), gentamicina (CN, 10 µg), amikacina (AK, 30 µg), kanamicina (K, 30 µg), vancomicina (VA, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), penicilina (P, 10 unidades), oxacilina (OX, 1 µg), amoxicilina (AML, 10 µg), ampicilina/sulbactam (SAM, 20 µg), enrofloxacina (ENR, 5 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), moxifloxacina (MXF, 5 µg), ácido nalidíxico (NA, 30 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), clindamicina (DA, 2 µg), eritromicina (E, 15 µg), claritromicina (CLR, 15 µg), imepenem (IMP, 10 µg) meropenem (MEM, 10 µg), ceftriaxona (CAZ, 30 µg), cefoxitina

(FOX, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), ceftriaxona (CRO, 30 µg), cefepima (FEP, 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT, 25 µg), cloranfenicol (C, 30 µg), rifampicina (RD, 5 µg), nitrofurantoína (F, 300 µg) y aztreonam (ATM, 30 µg). Posteriormente, las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en posición invertida. Las zonas de inhibición se midieron y las cepas se clasificaron como sensibles, con sensibilidad intermedia o resistentes de acuerdo con las directrices CLSI (2017) y EUCAST (2019). Se realizaron un total de 580 pruebas, teniendo en cuenta todas las combinaciones de cepas (4), biocidas (4 + control) y antibióticos (29).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y concentraciones mínimas bactericidas (MBCs) de los biocidas

Los desinfectantes son agentes químicos que se utilizan para reducir los niveles y/o la prevalencia de los microorganismos en diversos entornos, como los clínicos o alimentarios. Sin embargo, su uso inadecuado puede disminuir la eficacia bactericida de los desinfectantes, especialmente en entornos agrícolas y de producción de alimentos, donde los desechos orgánicos que quedan después de una limpieza insuficiente comprometen la eficacia de los biocidas (Maertens *et al.*, 2019).

Los valores de las MICs para *L. monocytogenes*, MRSA, VRE y *S. Hadar* de HS, AP, CB y AL se muestran en la Tabla III.1. A su vez, se muestran las concentraciones de biocidas que eliminaron el 99,99% de las bacterias tras 48 h de incubación (MBC).

Tabla III.1. Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) y concentración mínima bactericida (MBC, ppm) de cuatro biocidas en las diferentes cepas de microorganismos patógenos estudiados.

	LM ^a		MRSA ^b		VRE ^c		SH ^d	
	MIC ^e (ppm)	MBC ^f (ppm)	MIC (ppm)	MBC (ppm)	MIC (ppm)	MBC (ppm)	MIC (ppm)	MBC (ppm)
HS^g	3.500	3.500	3.750	3.750	4.750	5.250	3.200	4.000
AP^h	2.000	2.500	3.250	4.750	3.500	5.000	1.500	1.800
CBⁱ	13	14	8	14	8	12	22	26
AL^j	2.250	2.750	3.000	5.000	3.000	5.000	3.500	4.000

^a*Listeria monocytogenes*; ^b*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina; ^c*Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina; ^d*Salmonella enterica* serotipo Hadar. ^eConcentración mínima inhibitoria; ^fConcentración mínima bactericida. ^gHipoclorito de sodio; ^hÁcido peracético; ⁱCloruro de benzalconio; ^jÁcido láctico.

El hipoclorito de sodio fue la sustancia que requirió una concentración más elevada de compuesto para inhibir el crecimiento de los microorganismos patógenos estudiados tras 48 h de incubación (3.500 ppm para LM, equivalentes a 350 ppm de cloro libre; 3.750 ppm para MRSA, equivalentes a 375 ppm de cloro libre; 4.750 ppm para VRE, equivalente a 475 ppm

de cloro libre y 3.200 ppm para SH, equivalente a 320 ppm de cloro libre). Las MICs observadas para las bacterias Gram-positivas se encuentran dentro del rango establecido previamente en otros estudios, oscilando entre 3.000 ppm y 5.000 ppm (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018) y para Gram-negativas, entre 250 y 380 ppm de cloro libre (Capita *et al.*, 2019a). Los valores MIC de peroxiácidos encontrados en trabajos anteriores para otros microorganismos como *S. enterica*, oscilan entre 70 ppm y 80 ppm, y para *L. monocytogenes*, entre 100 ppm y 110 ppm (Alonso-Hernando *et al.*, 2009). Sin embargo, nuestros resultados se sitúan entre 1.500 ppm y 3.500 ppm. Estas disparidades ya fueron observadas en el estudio llevado a cabo por Capita *et al.* (2019a), quienes señalaron que las diferencias en los resultados que surgen de varios trabajos de investigación pueden deberse a que no todos los microorganismos presentan la misma susceptibilidad a diferentes biocidas, o bien a las diferencias en la composición de los peroxiácidos.

El cloruro de benzalconio fue el desinfectante que produjo inhibición a concentraciones más bajas en todos los casos (13 ppm y 8 ppm para las Gram-positivas y 22 ppm para *S. Hadar*). Estas cifras son similares a las observadas en otros estudios: entre 3 ppm y 13 ppm para *L. monocytogenes* (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019a), 2 ppm para MRSA (Buzón-Durán *et al.*, 2017) y de 8 ppm a 20 ppm para otras enterobacterias (Capita *et al.*, 2017, 2019a).

Los valores obtenidos para las MBCs en las cepas estudiadas no coinciden con los de las concentraciones mínimas inhibitorias, a excepción de los valores obtenidos para *L. monocytogenes*. Estos resultados son congruentes con lo indicado por Rodríguez-Melcón *et al.* (2019b), donde se observó la coincidencia de la MIC con la MBC en cepas de *L. monocytogenes* tratadas con HS. Yang *et al.* (2018) compararon la susceptibilidad a desinfectantes en aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de equipos destinados a la elaboración de productos cárnicos y observaron valores de MIC con rangos de entre 38 y 125 ppm de cloro libre para HS y entre 2,7 y 9,4 ppm para CB; sin embargo, los valores de la MBC para ambos biocidas se vieron incrementados, especialmente para CB, siendo de entre 4,7 ppm y 39,6 ppm, lo que coincide con nuestro estudio.

3.2. Susceptibilidad a antibióticos

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud mundial debido al fracaso en el tratamiento en enfermedades infecciosas humanas y animales. En una revisión sobre la resistencia a los antimicrobianos (AMR), O'Neill (2016) estimó que para el año 2050 la resistencia a los antibióticos podría ocasionar en torno a 10 millones de muertes anuales. Las bacterias pueden adquirir resistencia a través de mutaciones genéticas o mediante la transferencia horizontal de genes, por lo que los genes de resistencia a los antibióticos que

aparecen en elementos genéticos móviles pueden propagarse horizontalmente a otras bacterias (Maertens *et al.*, 2019), siendo especialmente importante la transferencia mediante mecanismos de conjugación (EFSA y ECDC, 2018a).

En el presente estudio se determinó si la exposición de los microorganismos patógenos estudiados a dosis subinhibitorias de algunos biocidas ampliamente empleados en la Industria Alimentaria (HS, CB, AP y AL) podría contribuir al aumento de la resistencia a antibióticos. Se ensayó, antes y después de la exposición a concentraciones subinhibitorias de los biocidas, la susceptibilidad de las cepas frente a 30 antibióticos de importancia en el ámbito de la medicina humana y veterinaria. Los patrones de resistencia a antibióticos de las cepas analizadas se muestran en la Tabla III.2.

Antes de la exposición, las cepas mostraban resistencia a 14 (SH), 17 (VRE), 19 (LM) y 24 (MRSA) antibióticos diferentes, destacando OX, ENR, NA, CLR, CTX y ATM, compuestos para los que no se observó susceptibilidad en ninguna de las cepas ensayadas.

Estudios anteriores (Alonso-Hernando *et al.*, 2009; Capita *et al.*, 2019b) mostraron que determinados antibióticos no son efectivos frente a *L. monocytogenes* (OX, NA, CTX) o *S. enterica* (NA). Coincidiendo con nuestro estudio, otros trabajos (Buzón-Durán *et al.*, 2017) han puesto de manifiesto que MRSA es resistente a eritromicina (76,67%) y ciprofloxacina (56,67%). Autores como Cordero *et al.* (2019) ya observaron el preocupante aumento de la prevalencia de resistencias a antibióticos en cepas de *Enterococcus*, destacando la resistencia a CN, K, VA, CIP y E, hallazgos que coinciden con los resultados del presente trabajo.

Tabla III.2. Patrones de resistencia a antibióticos en diferentes cepas control o previamente expuestas a dosis bajas de biocidas

Cepas	Antibióticos																															
	S	CN	AK	K	VA	AMP	P	OX	AML	SAM	ENR	CIP	MXF	NA	TE	DA	E	CLR	IMP	MEM	CAZ	FOX	CTX	CRO	FEP	SXT	C	RD	F	ATM		
LM no expuesta	I	S	CN	AK	K	VA	AMP	P	OX	AML	SAM	ENR	CIP	MXF	NA	TE	DA	E	CLR	IMP	MEM	CAZ	FOX	CTX	CRO	FEP	SXT	C	RD	F	ATM	
LM expuesta a HS	I	S	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LM expuesta a CB	I	S	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LM expuesta a AP	I	S	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
LM expuesta a AL	I	S	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MRSA no expuesta	R	R	R	R	I	S	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MRSA expuesta a HS	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MRSA expuesta a CB	R	R	R	R	I	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MRSA expuesta a AP	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MRSA expuesta a AL	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Para interpretación, ver página siguiente.

Tabla III.2. Patrones de resistencia a antibióticos en diferentes cepas control o previamente expuestas a dosis bajas de biocidas (continuación).

Cepas	Antibióticos																															
	S	CN	AK	K	VA	AMP	P	OX	AML	SAM	ENR	CIP	MXF	NA	TE	DA	E	CLR	IMP	MEM	CAZ	FOX	CTX	CRO	FEP	SXT	C	RD	F	ATM		
VRE no expuesta	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	I	S	R	S	S	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	
VRE expuesta a HS	R	R	R	R	S	S	R	S	I	R	R	R	R	R	S	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
VRE expuesta a CB	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
VRE expuesta a AP	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	I	S	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
VRE expuesta a AL	R	R	I	R	S	S	S	R	S	R	I	R	R	R	S	S	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	
SH no expuesta	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	I	S	R	I	S	S	S	S	I	S	R	
SH expuesta a HS	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	
SH expuesta a CB	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	I	I	S	I	I	S	S	S	S	I	S	I	
SH expuesta a AP	I	S	S	S	I	S	R	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	R	S	S	S	S	I	S	I	
SH expuesta a AL	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	I	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	I

S, estreptomicina (10 µg); CN, gentamicina (10 µg); AK, amikacina (30 µg); K, kanamicina (30 µg); VA, vancomicina (30 µg); AMP, ampicilina (10 µg); P, penicilina G (10 unidades); OX, oxacilina (1 µg); AML, amoxicilina (10 µg); SAM, ampicilina/sulbactam (20 µg); ENR, enrofloxacin (5 µg); CIP, ciprofloxacina (5 µg); MXF, moxifloxacina (5 µg); NA, ácido nalidixico (30 µg); TE, tetraciclina (30 µg); DA, clindamicina (2 µg); E, eritromicina (15 µg); CLR, claritromicina (15 µg); IMP, imipenem (10 µg); MEM, meropenem (10 µg); KF, cefalotina (30 µg); FOX, cefoxitina (30 µg); CTX, cefotaxima (30 µg); CRO, ceftriaxona (30 µg); FEP, cefepima (30 µg); SXT, sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg); C, cloranfenicol (30 µg); R, rifampicina (5 µg); F, nitrofurantoina (300 µg); ATM, aztreonam (30 µg).

R, cepa resistente; I, cepa de susceptibilidad reducida (intermedia); S, cepa susceptible. Las cepas que, tras la exposición, vieron incrementada su resistencia, en relación con las cepas control (no expuestas) se muestran sombreadas en gris. El aumento de la resistencia se define como un cambio de S (antes de la exposición) a R (después de la exposición), de acuerdo con las directrices presentadas por EUCAST (2019) CLSI (2017) para bacterias Gram-positivas, predominando los límites para *Staphylococcus aureus* y Gram-negativas, predominando los límites para enterobacterias.

Después de la exposición a concentraciones subinhibitorias de biocidas, las cepas estudiadas pasaron de la categoría susceptible o con susceptibilidad reducida a resistentes en el caso de varios antibióticos, especialmente en los microorganismos expuestos a concentraciones subinhibitorias de HS (LM expuesta a HS y CB, MRSA expuesta a HS, CB y AL, y VRE expuesta a HS, CB y AP).

Se han detectado cambios en los patrones de susceptibilidad a varias clases de antibióticos, que presentan diferentes mecanismos de acción, lo que sugiere que la tolerancia a los biocidas está asociada con mecanismos de amplio espectro (como bombas de expulsión o alteraciones de la permeabilidad celular). Por ejemplo, la ciprofloxacina, compuesto para el que se observó una reducción en la susceptibilidad después de la exposición a dosis subinhibitorias de biocidas, es un conocido sustrato de bombas de expulsión (Capita *et al.*, 2019a; Condell *et al.*, 2012; Randall *et al.*, 2007). Hay que señalar que en la lista de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE, 2018), la CIP se clasifica como un antimicrobiano de importancia crítica en medicina veterinaria.

Por otro lado, después de la exposición a AL, las cepas adquirieron resistencia a VA (LM y MRSA), SAM (MRSA), MXF (VRE), IMP (SH y MRSA) y F (VRE). De acuerdo con la FAO-OMS (2016), los tratamientos con ácidos orgánicos, como los lavados con ácido láctico y acético, pueden reducir significativamente la prevalencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* spp. no tifoidea en carne de vacuno y cerdo. A su vez, en un informe de la EFSA (2018b) se indica que el empleo durante años de los ácidos orgánicos para la conservación de alimentos implica que las posibles resistencias a antibióticos ya se habrían producido. Sin embargo, muchos estudios revelan que la exposición de los microorganismos a dosis subinhibitorias de estos compuestos antimicrobianos puede promover cambios en la susceptibilidad a antibióticos, circunstancia que coincide con nuestros resultados (Alonso-Hernando *et al.*, 2009; Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2013, 2019; Molina-González *et al.*, 2014; Randall *et al.*, 2007).

Se han observado algunos cambios en la susceptibilidad de SAM (*L. monocytogenes* y MRSA), F (MRSA y VRE), P y MXF (VRE) tras la exposición de los microorganismos a concentraciones subinhibitorias de CB. Algunos estudios han mostrado su preocupación en relación especialmente con los compuestos de amonio cuaternario (QAC) por su posible contribución a la aparición de bacterias resistentes a los antimicrobianos (Maertens *et al.*, 2018). Específicamente, el cloruro de benzalconio (CB), que es una mezcla de cloruros de alquilbencil dimetil amonio con varias cadenas de alquilo lineales pares y una cabeza de nitrógeno cuaternario cargada positivamente (Gilbert y Moore, 2005), es el QAC más común (Maertens *et al.*, 2019).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos asociadas con bacterias resistentes a los antibióticos han aumentado de forma preocupante en el ámbito mundial, particularmente a través del consumo de alimentos de origen animal (Zhang y Wang, 2018). Como se ha puesto de manifiesto en este estudio, las concentraciones subletales de biocidas podrían proporcionar una presión selectiva causante de la selección y proliferación de cepas resistentes a estos compuestos, y generar una resistencia cruzada a los antibióticos (Capita *et al.*, 2013). Estudios de laboratorio realizados con anterioridad también han demostrado que el uso de diferentes descontaminantes puede provocar la emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos, particularmente cuando la exposición a concentraciones por debajo de las óptimas es prolongada o repetida (SCENIHR, 2009).

Conclusiones

Nuestros resultados sugieren que el uso de biocidas a dosis bajas puede tener un efecto sustancial sobre la resistencia a los antibióticos de microorganismos patógenos aislados de alimentos. Hay que señalar, no obstante, que los resultados de este estudio derivan de experimentos de laboratorio y se necesitan investigaciones adicionales para verificar estos hallazgos. Con el fin de prevenir o minimizar la selección de bacterias resistentes es necesario realizar más estudios para identificar los mecanismos que provocan este aumento de la resistencia y para determinar la contribución de los diferentes tipos de biocidas y condiciones de tratamiento a la aparición de resistencia a los antibióticos en diversas poblaciones microbianas. Además, debe determinarse si los aumentos de resistencia observados son de importancia clínica.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelhamid, A. G., El-Dougdoug, N. K. (2020). Controlling foodborne pathogens with natural antimicrobials by biological control and antivirulence strategies. *Heliyon* **6**(9): e05020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05020>
- AECOSAN (2019). Seguridad alimentaria: Listeriosis. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/listeria.htm (Fecha de último acceso: 03 de marzo de 2021).
- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2013). Growth kinetic parameters of Gram-positive and Gram-negative bacteria on poultry treated with various chemical decontaminants. *Food Control* **33**(2): 429–432. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.009>
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. (2009). Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* **20**(12): 1108-1111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.011>
- Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U., Nicolau, A. I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Frontiers in Microbiology* **9**(11): 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02700>
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**: 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.003>
- Buzón-Durán, L., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2018). Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant staphylococci (MRS) of food origin: A comparison of agar disc diffusion method and a commercially available miniaturized test. *Food Microbiology* **72**: 220-224. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.018>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**(1): 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- Capita, R., Álvarez-Fernández, E., Fernández-Buelta, E., Manteca, J., Alonso-Calleja, C. (2013). Decontamination treatments can increase the prevalence of resistance to

- antibiotics of *Escherichia coli* naturally present on poultry. *Food Microbiology* **34**(1): 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.011>
- Capita, R., Buzón-Durán, L., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2017). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* **14**(6): 350-356. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2241>
- Capita, R., Felices-Mercado, A., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. (2019b). Characterization of *Listeria monocytogenes* originating from the Spanish meat-processing chain. *Foods* **8**(11): 542. <https://doi.org/10.3390/foods8110542>
- Capita, R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Alonso-Calleja, C. (2019a). Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports* **9**: 15905. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51907-1>
- Carpenter, C. E., Smith, J. V., Broadbent, J. R. (2011). Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. *Meat Science* **88**(2): 256-260. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.032>
- CDC (2019). Centers for Disease Control and Prevention. Vital signs: epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections - United States. *Weekly* **68**(9): 214-219.
- Chung, H. Y., Kim, Y.-T., Kwon, J.-G., Im, H. H., Ko, D., Lee, J.-H., Choi, S. H. (2021). Molecular interaction between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and chicken breast reveals enhancement of pathogenesis and toxicity for food-borne outbreak. *Food Microbiology* **93**: 103602. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103602>
- CLSI (2017). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard M31-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Pennsylvania (USA).
- Condell, O., Iversen, C., Cooney, S., Power, P., Walsh, C., Burgess, C., Fanning, S. (2012). Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(9): 3087–3097. <https://aem.asm.org/content/78/9/3087>
- Cordero, J., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Capita, R. (2019). Microbial load and antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* isolates from

- the meat of wild and domestic pigeons. *Foods* **8**(11): 536. <https://doi.org/10.3390/foods8110536>
- DOUE (2013). Reglamento (UE) nº 101/2013 de la Comisión, de 4 de febrero de 2013, relativo al uso de ácido láctico para reducir la contaminación microbiológica de la superficie de las canales bovinas. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L34, pp. 1 – 3. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32013R0101> (Fecha de último acceso: 05 de marzo de 2021).
- EFSA y ECDC (2018a). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal* **16**(2): 5182. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182>
- EFSA (2018b). Evaluation of the safety and efficacy of the organic acids lactic and acetic acids to reduce microbiological surface contamination on pork carcasses and pork cuts. *EFSA Journal* **16**(12): e05482. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5482>
- EUCAST (2019). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. V. 9.0. Available online: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf (Fecha del último acceso: 14 de julio de 2021).
- FAO – OMS (2016). Anteproyecto de directrices para el control de *Salmonella* spp. no tifoidea en la carne de bovino y cerdo. *Codex Alimentarius*. Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B87-2016%252FCXG_087s.pdf (Fecha de último acceso: 08 de marzo de 2021).
- Feasey, N. A., Dougan, G., Kingsley, R. A., Heyderman, R. S., Gordon, M. A. (2012). Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *The Lancet* **379**(9835): 2489-2499. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61752-2)
- Gilbert, P., Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology* **99**(4): 703-715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>
- Guerrero-Ramos, E. (2015). *Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antimicrobianos en cepas de Escherichia coli y Enterococcus spp. de origen alimentario*. Tesis Doctoral, Universidad de León. Disponible en:

- <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/5468/Tesis%20Emilia%20Guerrero.PDF?sequence=1&isAllowed=y> (Fecha de último acceso: 03 de marzo de 2021).
- Kavanagh, K. T. (2019). Control of MSSA and MRSA in the United States: Protocols, policies, risk adjustment and excuses. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* **8**(1): 103. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0550-2>
- Lowy, F. D. M. D. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine* **339**: 520-532. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>
- Maertens, H., De Reu, K., Meyer, E., Weyenberg, S. V., Dewulf, J., Coillie, V. E. (2019). Exposure of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* broiler isolates to subinhibitory concentrations of a quaternary ammonium compound does not increase antibiotic resistance gene transfer. *Poultry Science* **98**(7): 2972-2976. <https://doi.org/10.3382/ps/pez185>
- Maertens, H., De Reu, K., Weyenberg, S. V., Coillie, E. V., Meyer, E., Meirhaeghe, H. V., Immerseel, V. F., Vandenbroucke, V., Vanrobbaeys, M., Dewulf, J. (2018). Evaluation of the hygienogram scores and related data obtained after cleaning and disinfection of poultry houses in Flanders during the period 2007 to 2014. *Poultry Science* **97**(2): 620-627. <https://doi.org/10.3382/ps/pex327>
- Mechesso, A. F., Moon, D. C., Kim, S.-J., Kang, H. Y., Na, S. H., Choi, J.-H., Kim, H.-Y., Yoon, S.-S., Lim, S.-K. (2020). Nationwide surveillance on serotype distribution and antimicrobial resistance profiles of non-typhoidal *Salmonella* serovars isolated from food-producing animals in South Korea. *International Journal of Food Microbiology* **335**: 108893. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108893>
- Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2014). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* **40**: 329-334. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.046>
- OIE (2018). OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_May2018.pdf (Fecha de último acceso: 08 de marzo de 2021).
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf (Fecha de último acceso: 05 de marzo de 2021).

- Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J. V. (2014). The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **189**: 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.007>
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Coldham, N. G., Penuela, E. G., Mott, A. C., Woodward, M. J., Piddock, L. J. V., Webber, M. A. (2007). Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60**(6): 1273–1280. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm359>
- Rodríguez-Campos, D., Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019). Persistent *Listeria monocytogenes* isolates from a poultry-processing facility form more biofilm but do not have a greater resistance to disinfectants than sporadic strains. *Pathogens* **8**(4): 250. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040250>
- Rodríguez-Melcón, C., Capita, R., Rodríguez-Jerez, J. J., Martínez-Suárez, J. V., Alonso-Calleja, C. (2019a). Effect of low doses of disinfectants on the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* **16**(4): 262-268. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2472>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019b). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology* **82**: 533-540. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020>
- SCENIHR (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (European Commission, Health & Consumer Protection DG). Disponible en: https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf (Fecha de último acceso: 08 de marzo de 2021).
- Viola, K. S., Rodrigues, E. M., Tanoma-Filho, M., Carlos, I. Z., Guerreiro-Tanomaru, M. J., Faria, G. (2017). Cytotoxicity of peracetic acid: evaluation of effects on metabolism, structure and cell death. *International Endodontic Journal* **51**(54): e264-e277. <https://doi.org/10.1111/iej.12750>
- Waghmare, R. B., Annapure, U. S. (2015). Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. *Food Packaging and Shelf Life* **3**: 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.11.001>

- Yang, X., Wang, H., He, A., Tran, F, (2018). Biofilm formation and susceptibility to biocides of recurring and transient *Escherichia coli* isolated from meat fabrication equipment. *Food Control* **90**: 205-211. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.050>
- Zhang, C., Brown, P. J. B., Hu, Z. (2018). Thermodynamic properties of an emerging chemical disinfectant, peracetic acid. *Science of The Total Environment* **162**: 948-959. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.195>
- Zhang, Y., Wang. B. (2018). Comparison of the efficacy of commercial antimicrobial interventions for reducing antibiotic resistant and susceptible beef-associated *Salmonella* and *Escherichia coli* strains. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* **13**: 3-23. <https://doi.org/10.1007/s00003-017-1141-x>

CAPÍTULO IV

Efecto de la exposición a dosis bajas de biocidas sobre la adaptación cruzada a otros biocidas y la resistencia a antibióticos en cepas de *Listeria monocytogenes*

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, no formadora de esporas y responsable de la listeriosis, una zoonosis cuya principal ruta de transmisión es a través del consumo de alimentos contaminados (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019a, b). Se han descrito un total de 13 serotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7), si bien tres de ellos (1/2a, 1/2b y 4b) son responsables de la gran mayoría de los casos de infección humana (Jamshidi y Zeinali, 2019; Rodríguez-Campos *et al.*, 2019). Las cepas de serotipo 4b son el agente etiológico de la mayoría de los casos y brotes de listeriosis, mientras que la mayoría de las cepas aisladas de alimentos e industrias alimentarias pertenecen al serotipo 1/2a (Mazaheri *et al.*, 2020).

En 2020 se notificaron 1.876 casos confirmados de listeriosis humana invasiva en la Unión Europea (0,42 casos por cada 100.000 personas). La tasa de mortalidad fue del 13,0%, con 167 muertes registradas, el valor más alto del conjunto de enfermedades transmitidas por los alimentos. El número de personas hospitalizadas fue de 780 y supuso una tasa de hospitalización del 97,1%, siendo la más alta de las zoonosis alimentarias (EFSA y ECDC, 2021). Los ancianos, las mujeres embarazadas, los neonatos y los adultos inmunodeprimidos son los más afectados por esta enfermedad, tanto en frecuencia como en gravedad, aunque las personas sin estos factores de riesgo también pueden infectarse. Las presentaciones clínicas más comunes de la listeriosis invasiva son septicemia, meningitis, encefalitis, aborto espontáneo y muerte fetal (Capita *et al.*, 2001).

L. monocytogenes es una bacteria ubicua que puede crecer en diferentes condiciones ambientales adversas, incluyendo bajas temperaturas (algunas cepas se multiplican a temperaturas próximas a 0 °C), un amplio rango de valores de pH (4,0 - 9,6), un alto contenido de sal (10% - 20%) y bajos niveles de oxígeno, constituyendo así una preocupación importante para las industrias alimentarias (Sadekuzzaman *et al.*, 2017). La contaminación de los productos alimenticios por este patógeno puede darse con frecuencia durante el procesado de los alimentos, generalmente a través de eventos de contaminación cruzada con superficies de contacto contaminadas (Ripolles-Avila *et al.*, 2019). Un motivo adicional de preocupación lo constituye el hecho de que este microorganismo puede persistir durante años en los equipos e instalaciones de las industrias alimentarias, debiéndose este hecho, principalmente, a su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en condiciones que son estresantes para otras bacterias, así como a su capacidad para formar biopelículas o biofilms (Rodríguez-López *et al.*, 2018; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019a).

Las biopelículas son comunidades heterogéneas de células microbianas embebidas en una matriz polimérica extracelular autoproducida que puede presentar estructuras tridimensionales complejas y adherirse a superficies inertes o vivas (González-Rivas *et al.*, 2018; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018b). La formación de biopelículas por bacterias patógenas es una preocupación para la Industria Alimentaria y los entornos clínicos, ya que estas estructuras representan una fuente importante de contaminación. Además, las biopelículas bacterianas son más resistentes a los desafíos ambientales, incluidos los desinfectantes y los agentes antibacterianos, que las células planctónicas o de vida libre, hecho que incrementa la supervivencia de las bacterias sésiles (Capita *et al.*, 2014; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018a).

Entre los biocidas más utilizados para la limpieza y desinfección de las industrias alimentarias se encuentran el hipoclorito de sodio (HS), el cloruro de benzalconio (CB) y el ácido peracético (AP). El HS es un desinfectante a base de cloro que actúa como un compuesto oxidante, interactuando con las membranas celulares o penetrando directamente en la célula formando grupos N-cloro que reaccionan con el metabolismo celular. Se trata de un compuesto ampliamente utilizado gracias a su actividad bactericida de amplio espectro, potente capacidad antimicrobiana y bajo coste (Rodríguez-López *et al.*, 2018; Waghmare y Annapure, 2015). Los compuestos de amonio cuaternario (QAC) son, sin duda, uno de los grupos de desinfectantes más utilizados en la Industria Alimentaria, siendo eficaces frente a diferentes grupos microbianos, incluso a bajas concentraciones (Rodríguez-López *et al.*, 2018). Algunos compuestos derivados del amonio cuaternario, como el CB, son tensioactivos catiónicos utilizados principalmente en formulaciones desinfectantes y antisépticas empleadas en instalaciones sanitarias, agricultura e industria (Gadea *et al.*, 2017). El AP, uno de los compuestos antimicrobianos más utilizados en las industrias lácteas (Lee *et al.*, 2015), presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana y se encuentra activo a temperaturas de entre 0 °C y 25 °C. El HS y el AP están aprobados para su uso tanto en el Espacio Económico Europeo (EEE) como en Suiza para diversos usos, incluyendo la desinfección de industrias alimentarias (Capita *et al.*, 2019b).

Un aumento en la tolerancia a los biocidas es un problema importante de Salud Pública, ya que se podría esperar que contribuya a una mayor persistencia de bacterias patógenas y alterantes en la cadena alimentaria (Capita *et al.*, 2014). Un uso inapropiado de estos compuestos (por ejemplo, uso incorrecto, almacenamiento inadecuado o presencia de residuos excesivos de materia orgánica, que disminuye la efectividad de algunos desinfectantes, como los compuestos clorados) puede implicar la exposición de las bacterias a dosis subletales de los biocidas, lo que representa un riesgo de adaptación de los microorganismos a los compuestos (Buzón-Durán *et al.*, 2017). Además, estudios recientes han demostrado que la exposición a concentraciones subletales de biocidas incrementa la

producción de biopelículas por *L. monocytogenes* (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018b) y otros microorganismos patógenos (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2014, 2019b).

Un fenómeno adicional observado en los últimos años es la creciente resistencia a los antibióticos, una amenaza global para la Salud Pública que involucra tanto a los principales microorganismos patógenos como a los diferentes compuestos antimicrobianos (Capita y Alonso-Calleja, 2013). La resistencia a los antibióticos se adquiere como consecuencia de mutaciones esporádicas o por la transferencia horizontal de genes de resistencia, alguno de los cuales puede proceder de microorganismos comensales que se encuentran en los alimentos (Skowron *et al.*, 2019). La asociación entre el contacto con biocidas y la aparición de resistencia a los antibióticos ha sido previamente demostrada. Se ha planteado la hipótesis de que algunos biocidas y antibióticos pueden compartir los lugares diana o *target* y, por lo tanto, los mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias (Alonso-Hernando *et al.*, 2009). Así, la evidencia científica reciente sugiere que la presión selectiva ejercida por el uso de biocidas en concentraciones subletales podría contribuir a la expresión y diseminación de mecanismos de resistencia a los antibióticos (Capita *et al.*, 2014).

El objetivo de este estudio ha sido determinar si la exposición de *L. monocytogenes* a dosis subletales de tres desinfectantes de uso común en las industrias alimentarias (HS, CB y AP) provoca la adaptación y la adaptación cruzada a los biocidas e influye en la susceptibilidad de las cepas a los antibióticos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Se utilizaron 5 cepas de *L. monocytogenes* (ATCC -*American Type Culture Collection*- 19114, ATCC 13932, CECT -*Colección Española de Cultivos Tipo*- 936, ATCC 15313 y NCTC -*National Collection of Type Cultures*- 11994) previamente disponibles en nuestro laboratorio. Las cepas pertenecían a los serotipos 4a, 4b, 1/2b, 1/2a y 4b, respectivamente. Los cultivos bacterianos se mantuvieron almacenados a una temperatura de - 80 °C en caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) con un 20% (vol/vol) de glicerol. Antes de cada experimento, las células se activaron mediante la transferencia de aproximadamente 20 µl del cultivo congelado a tubos con 5 ml de TSB (Oxoid), y posterior incubación del caldo durante toda la noche a 37 °C. Los cultivos se cultivaron en placas con agar triptona de soja (TSA, Oxoid) y se mantuvieron a 4 ± 1 °C para su posterior uso.

2.2. Desinfectantes

Se utilizaron tres compuestos: hipoclorito sódico (NaClO, HS, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.), cloruro de benzalconio (CB, Sigma-Aldrich) y ácido peracético (AP, Sigma-Aldrich). Para la preparación de las correspondientes soluciones se partió de compuestos con un 10% de pureza (expresado como porcentaje de cloro libre) en el caso del hipoclorito sódico, un 95% (asumiendo que el producto es puro) en el caso del cloruro de benzalconio y ácido peracético (con un 39% de pureza). Las soluciones de cada uno de los compuestos se prepararon en condiciones asépticas en agua destilada estéril antes del comienzo de cada experimento.

2.3. Cálculo de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) se establecieron utilizando el método de microdilución en caldo de acuerdo con el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, EE.UU. (CLSI, 2019). Se tomaron, a partir de las placas de TSA (Oxoid), 5 colonias de cada cepa, que se inocularon en tubos con 9 ml de TSB (Oxoid) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas, para obtener una concentración final en tubo de aproximadamente 5×10^8 ufc/ml. Para el experimento se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Los pocillos se llenaron con 20 µl de la solución desinfectante (HS, CB o AP, utilizados en un rango de concentraciones) y 180 µl de inóculo en las diluciones apropiadas con el fin de obtener una concentración final en el

pocillo de 5×10^5 ufc/ml. La concentración del inóculo se confirmó por siembra en placa. También se realizaron controles positivos y negativos. El crecimiento se determinó midiendo la $DO_{420-580}$ en un Bioscreen C MRB (Oy Growth Curves Ab). La MIC se estableció como la concentración de biocida mínima necesaria para impedir el crecimiento bacteriano tras 48 horas de incubación.

2.4. Cálculo de la concentración mínima bactericida (MBC)

Los valores de las concentraciones mínimas bactericidas (MBCs) se establecieron utilizando el método de microdilución en caldo de acuerdo con el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, EE.UU. (CLSI, 2019), con algunas modificaciones. A partir de las placas de microtítulo (Oy Growth Curves Ab Ltd.) en las que se determinaron las MICs correspondientes transcurridas 48 horas de incubación a 37 °C, se sembraron en la superficie de placas de TSA (Oxoid) 100 μ l de los pocillos de cada cepa en los que no se había detectado crecimiento del microorganismo. Dichas placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C, considerándose MBC como la menor concentración de antibiótico con la que no se formaron colonias en estas condiciones. Teniendo en cuenta que el límite de detección de la técnica de siembra en superficie es de 10 ufc/ml, la ausencia de crecimiento en las placas de TSA indica que la concentración es inferior a este valor y, por lo tanto, que la concentración inicial (10^5 ufc/ml) se ha reducido hasta menos de 10 ufc/ml. Por ello, se considera MBC como la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir más del 99,99% de las bacterias presentes.

2.5. Adaptación de las cepas de *L. monocytogenes* a los biocidas

El experimento se llevó a cabo de la misma forma que se describió para las determinaciones de las MICs (Capita *et al.*, 2014). Se tomaron, a partir de placas de TSA (Oxoid), 5 colonias de cada cepa, que se inocularon en tubos con 9 ml de TSB (Oxoid) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas con el fin de obtener una concentración final de aproximadamente 5×10^8 ufc/ml. Se depositaron 200 μ l de una mezcla de inóculo en las diluciones apropiadas (180 μ l) y biocida (20 μ l), de forma que la concentración de biocida de partida era MIC/2, y la concentración bacteriana de 5×10^5 ufc/ml. Cuando se observaba crecimiento, se transferían 20 μ l de la suspensión al siguiente pocillo en condiciones asépticas, este segundo pocillo contenía 160 μ l de TSB y 20 μ l de la solución desinfectante en niveles tales que la concentración final en el pocillo era 1,5 veces la del pocillo anterior. El procedimiento continuó hasta que dejó de observarse crecimiento a las 72 horas de incubación a 37 °C. La suspensión del último pocillo con crecimiento se sembró en placas de

TSA con los biocidas correspondientes (se añadió al TSA la mitad de la máxima concentración de biocida que permitió el crecimiento microbiano). Después de la incubación a 37 °C durante 48 horas, las placas de agar se almacenaron a 4 ± 1 °C durante un tiempo máximo de una semana.

Para la realización de experimentos posteriores, se añadieron, a tubos con 9 ml de TSB, los biocidas a concentraciones de MIC/2, para promover así el crecimiento de las células bacterianas adaptadas, usándose TSB sin biocidas para las células bacterianas no adaptadas previamente. El caldo fue inoculado a partir de las cepas conservadas en placas de TSA (Oxoid) con biocidas (células adaptadas a HS, CB o AP) o TSA (Oxoid, células no adaptadas).

2.6. Cálculo de las MIC de las cepas adaptadas a biocidas

Al igual que para las cepas no adaptadas, los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) se establecieron utilizando un método de microdilución en caldo de acuerdo con el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, EE.UU. (CLSI, 2019). Se tomaron, a partir de placas de TSA (Oxoid), 5 colonias de cada cepa, que se inocularon en tubos con 9 ml de TSB (Oxoid) que contenían una concentración de biocida de MIC/2, y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Para el experimento se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Los pocillos se rellenaron con un total de 200 μ l, que incluían 20 μ l de la cada una de las soluciones desinfectantes (se utilizó un rango de concentraciones) y 180 μ l de inóculo en las diluciones apropiadas con el fin de obtener una concentración final en el pocillo de aproximadamente 5×10^5 ufc/ml. A su vez, se realizaron controles positivos y negativos, depositando 200 μ l de la última dilución de la cepa y 200 μ l de TSB estéril, respectivamente. La concentración del inóculo se confirmó por siembra en placa. El crecimiento se determinó midiendo la DO_{580} en un Bioscreen C MRB (Oy Growth Curves Ab). La MIC se estableció como la concentración de biocida mínima necesaria para impedir el crecimiento bacteriano después de 48 horas de incubación.

2.7. Cálculo de las MBC de las cepas adaptadas a biocidas

Los valores de las concentraciones mínimas bactericidas (MBCs) se establecieron utilizando un método de microdilución en caldo de acuerdo con el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, EE.UU. (CLSI, 2019), con algunas modificaciones. A partir de las placas de microtítulo (Oy Growth Curves Ab Ltd.) en las que se determinaron las MICs correspondientes trascurridas 48 horas de incubación a 37 °C, se tomaron 100 μ l de los pocillos de cada cepa adaptada en los que no se había detectado crecimiento alguno del microorganismo, y se

sembraron en la superficie de placas de TSA (Oxoid). Dichas placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C. La MBC se estableció como la mínima cantidad de biocida empleada capaz de destruir más del 99,99% de las bacterias presentes.

2.8. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Se determinó, antes y después de la exposición a los desinfectantes, la susceptibilidad de las cepas de *L. monocytogenes* a 30 antibióticos de interés clínico, utilizando el método de dilución por disco (CLSI, 2019). Inicialmente, se sembraron las cepas en tubos con 9 ml de TSB (Oxoid) con biocida (MIC/2) en el caso de las cepas adaptadas, o en tubos con 9 ml de TSB sin biocidas, en el caso de las cepas no adaptadas, y se incubaron durante 6 horas a 37 °C. Posteriormente, se sembraron en césped placas de TSA, tomando el caldo de cultivo con el extremo de un bastoncillo estéril. A continuación, se depositaron los discos de antibióticos (5 discos/placa), utilizando para ello una pinza estéril. Se utilizaron los siguientes discos (Oxoid): estreptomina (S, 10 µg), gentamicina (CN, 10 µg), amikacina (AK, 30 µg), kanamicina (K, 30 µg), vancomicina (VA, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), penicilina G (P, 10 unidades), oxacilina (OX, 1 µg), amoxicilina (AML, 10 µg), ampicilina/sulbactam (SAM, 20 µg), enrofloxacin (ENR, 5 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), moxifloxacin (MXF, 5 µg), ácido nalidíxico (NA, 30 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), clindamicina (DA, 2 µg), eritromicina (E, 15 µg), claritromicina (CLR, 15 µg), imipenem (IMP, 10 µg), meropenem (MEM, 10 µg), cefalotina (KF, 30 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), ceftriaxona (CRO, 30 µg), cefepima (FEP, 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT, 25 µg), cloranfenicol (C, 30 µg), rifampicina (RD, 5 µg), nitrofurantoína (F, 300 µg) y aztreonam (ATM, 30 µg). Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C en posición invertida y, posteriormente, se midieron los halos de inhibición y las cepas se clasificaron como sensibles, de sensibilidad reducida (intermedias) o resistentes de acuerdo con las directrices de CLSI (2017) y EUCAST (2019). Se realizaron un total de 600 pruebas, teniendo en cuenta todas las combinaciones de las cepas, biocidas y antibióticos.

3. RESULTADOS

3.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de las cepas de *L. monocytogenes*

Las MICs y las MBCs de las cepas de *L. monocytogenes* se presentan en la Tabla IV.1. A su vez, se muestran las concentraciones máximas de biocidas que permitieron el crecimiento microbiano tras la realización de varios pases sucesivos en medio de cultivo con concentraciones gradualmente crecientes de los compuestos (adaptación).

Tabla IV.1. Valores de MIC (concentración mínima inhibitoria, ppm), de MBC (concentración mínima bactericida, ppm) y de concentración máxima que permitió el crecimiento microbiano tras la adaptación de las cepas de *L. monocytogenes*.

		ATCC 19114	ATCC 13932	CECT 936	ATCC 15313	NCTC 11994
HS	MIC	3.500	3.500	3.750	3.500	3.500
	MBC	3.900	3.700	3.900	3.700	4.000
	ADAPTACIÓN	5.906,3	2.625	3.935,5	3.935,5	3.935,5
AP	MIC	1.000	1.000	1.000	1.000	1.050
	MBC	1.050	1.150	1.100	1.250	1.050
	ADAPTACIÓN	1.125	1.125	1.125	750	1.125
CB	MIC	2	4	2	1	2
	MBC	2	4	4	5	3
	ADAPTACIÓN	1,7	8,5	3,4	5,7	8,5

HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético; *L. monocytogenes* ATCC -American Type Culture Collection- 19114 serotipo 4a; *L. monocytogenes* ATCC 13932 serotipo 4b; *L. monocytogenes* CECT -Colección Española de Cultivos Tipo- 936 serotipo 1/2b; *L. monocytogenes* ATCC 15313 serotipo 1/2a; *L. monocytogenes* NCTC -National Collection of Type Cultures- 11994 serotipo 4b.

El hipoclorito de sodio (HS) fue la sustancia antimicrobiana que requirió las concentraciones más altas para inhibir el crecimiento de las cepas de *L. monocytogenes* tras 48 horas de exposición, oscilando los valores de MIC entre 3.500 ppm y 3.750 ppm (valores equivalentes a 350 ppm y 375 ppm de cloro libre, respectivamente), seguido del ácido peracético, con una MIC de entre 1.000 ppm y 1.050 ppm. Los valores de MIC más bajos se obtuvieron para el cloruro de benzalconio, con cifras de entre 1 y 4 ppm. En cuanto a los valores de MBC, se encontraron valores iguales o superiores a la MIC en todos los casos, oscilando entre 3.700 ppm y 4.000 ppm para el HS, entre 1.050 ppm y 1.250 ppm para el AP

y entre 2 ppm y 5 ppm para el CB. Al igual que para las MIC, el HS fue la sustancia antimicrobiana que requirió concentraciones más altas para inactivar los microorganismos.

Tras la realización de sucesivos pases en medio de cultivo con concentraciones crecientes de los biocidas, la concentración máxima de HS que permitió el crecimiento osciló entre 2.625 ppm y 5.906,3 ppm, dependiendo de la cepa. Para el ácido peracético, se obtuvieron unos valores de adaptación de entre 750 ppm y 1.125 ppm. En el caso del cloruro de benzalconio se observaron grandes diferencias en los valores de adaptación de las distintas cepas (Tabla IV.1).

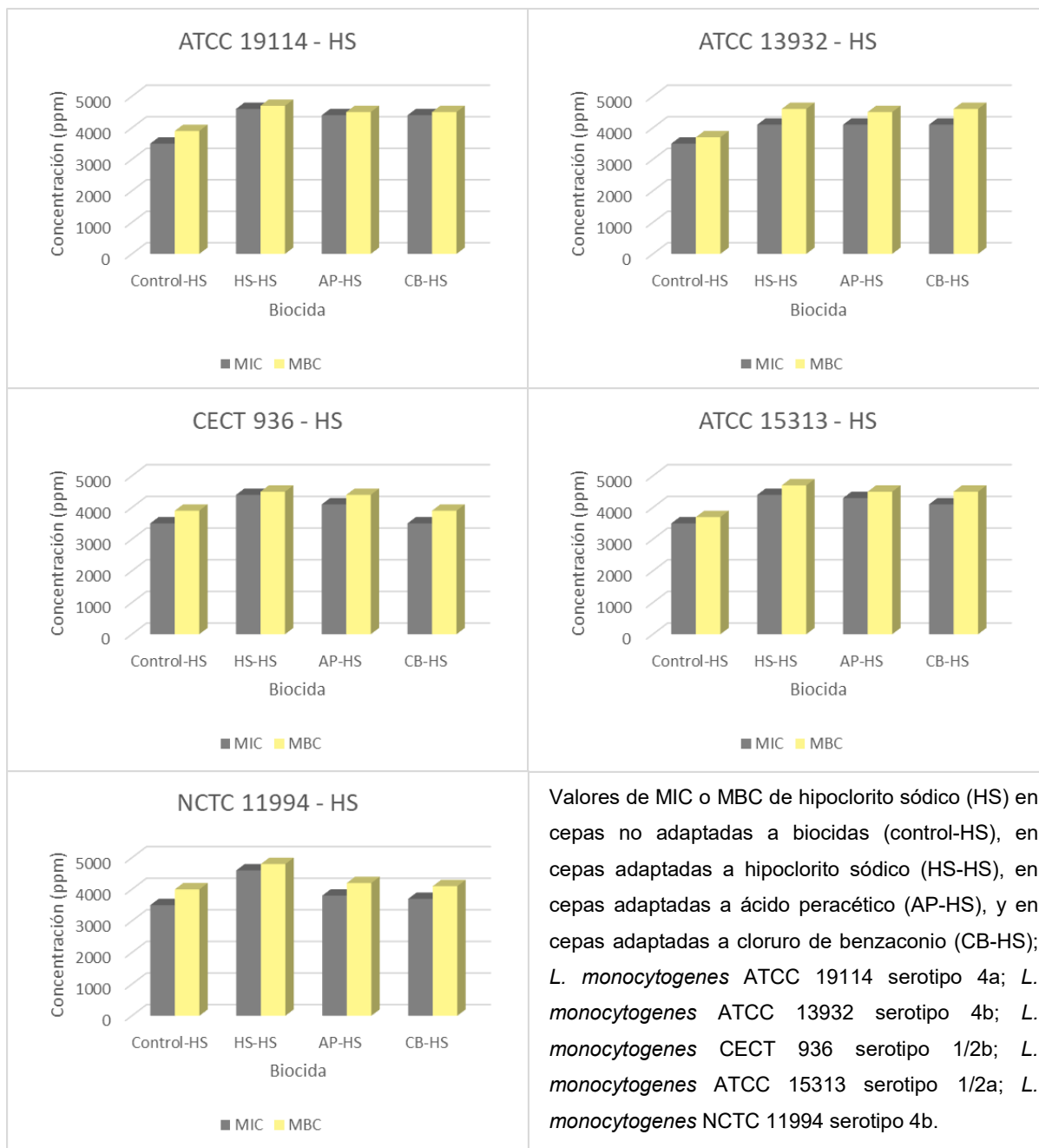
Una vez realizada la adaptación de las cepas a los biocidas, se calcularon de nuevo las MICs y las MBCs de los 3 biocidas estudiados. En la Tabla IV.2 se muestran los resultados de las MICs y las MBCs de HS en las cepas adaptadas a los biocidas. En la mayor parte de las ocasiones las cepas adaptadas mostraron un incremento, respecto a las cepas control, de la MIC de HS (Figura IV.1). Así, los valores oscilaron entre 3.700 y 4.600 ppm, a excepción de *L. monocytogenes* CECT 936 adaptada a CB, en que se observó una disminución en el valor de la MIC (de 3.750 a 3.500 ppm) (Tabla IV.2).

Al igual que para las MICs, las cepas adaptadas presentaron, en la mayor parte de los casos (adaptadas a HS, AP o CB) valores más altos de MBC en comparación con las cepas control (oscilando los valores entre 4.500 ppm y 4.800 ppm para el HS, entre 4.200 ppm y 4.500 ppm para el AP y de entre 3.900 y 4.600 ppm, para el CB); una excepción la constituye la cepa CECT 936, que mantuvo el valor de MBC (3.900 ppm).

Tabla IV.2. Valores de MIC (concentración mínima inhibitoria, ppm) y MBC (concentración mínima bactericida, ppm) de hipoclorito sódico (HS) en cepas de *L. monocytogenes* previamente adaptadas a diferentes biocidas.

	ATCC 19114		ATCC 13932		CECT 936		ATCC 15313		NCTC 11994	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
HS-HS (ppm)	4.600	4.700	4.100	4.600	4.400	4.500	4.400	4.700	4.600	4.800
AP-HS (ppm)	4.400	4.500	4.100	4.500	4.100	4.400	4.300	4.500	3.800	4.200
CB-HS (ppm)	4.400	4.500	4.100	4.600	3.500	3.900	4.100	4.500	3.700	4.100

Valores de MIC o MBC de HS en la cepa adaptada a HS (HS-HS); valores de MIC o MBC de AP en la cepa adaptada a HS (AP-HS); valores de MIC o MBC de HS en la cepa adaptada a CB (CB-HS); *L. monocytogenes* ATCC -American Type Culture Collection- 19114 serotipo 4a; *L. monocytogenes* ATCC 13932 serotipo 4b; *L. monocytogenes* CECT -Colección Española de Cultivos Tipo- 936 serotipo 1/2b; *L. monocytogenes* ATCC 15313 serotipo 1/2a; *L. monocytogenes* NCTC -National Collection of Type Cultures- 11994 serotipo 4b.



Valores de MIC o MBC de hipoclorito sódico (HS) en cepas no adaptadas a biocidas (control-HS), en cepas adaptadas a hipoclorito sódico (HS-HS), en cepas adaptadas a ácido peracético (AP-HS), y en cepas adaptadas a cloruro de benzaconio (CB-HS); *L. monocytogenes* ATCC 19114 serotipo 4a; *L. monocytogenes* ATCC 13932 serotipo 4b; *L. monocytogenes* CECT 936 serotipo 1/2b; *L. monocytogenes* ATCC 15313 serotipo 1/2a; *L. monocytogenes* NCTC 11994 serotipo 4b.

Figura IV.1. MICs (concentraciones mínimas inhibitorias) y MBCs (concentraciones mínimas bactericidas) de hipoclorito sódico (HS) en cepas patrón de *L. monocytogenes* no adaptadas (control) o adaptadas a hipoclorito sódico (HS), ácido peracético (AP) o cloruro de benzalconio (CB).

En la Tabla IV.3 se muestran los resultados de las MIC y MBC de AP en las cepas adaptadas a los biocidas. Las cepas adaptadas presentaron unos valores ligeramente superiores de MIC y MBC de AP que las cepas control. Los valores de MIC de AP en las cepas

de *L. monocytogenes* adaptadas a HS, AP y CB se encuentran en el rango entre 1.050 ppm y 1.150 ppm al igual que para las cepas control o no adaptadas a AP (Figura IV.2).

Los valores presentados de MBC para las cepas adaptadas a los diferentes biocidas y expuestas a AP (tras dicha adaptación) son dispares, observándose un aumento de los mismos para los casos de las cepas de *L. monocytogenes* ATCC 19114 (situándose entre 1.150 y 1.250 ppm), ATCC 13932 (entre 1.200 y 1.350 ppm), CECT 936 (aumentado para los casos de HS-AP y AP-AP, obteniendo valores de 1.250 y 1.200 ppm), ATCC 15313 (aumentado sólo para el caso de HS-AP, situándose en 1.300 ppm) y NCTC 11994 (situándose entre 1.100 y 1.200 ppm). Por el contrario, los valores de MBC disminuyeron (respecto de las cepas control) para la exposición a AP de la cepa ATCC 15313 adaptada a AP y CB, obteniendo valores de 1.200 y 1.150 ppm, respectivamente. Únicamente la cepa CECT 936 adaptada a CB mantuvo el valor de MBC (1.100 ppm) respecto del obtenido para la cepa control.

Tabla IV.3. Valores de MIC (concentración mínima inhibitoria, ppm) y MBC (concentración mínima bactericida, ppm) de ácido peracético (AP) en cepas de *L. monocytogenes* previamente adaptadas a diferentes biocidas.

	ATCC 19114		ATCC 13932		CECT 936		ATCC 15313		NCTC 11994	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
HS-AP (ppm)	1.150	1.250	1.150	1.350	1.100	1.250	1.150	1.300	1.050	1.200
AP-AP (ppm)	1.100	1.150	1.150	1.200	1.100	1.200	1.050	1.200	1.100	1.150
CB-AP (ppm)	1.100	1.150	1.100	1.200	1.000	1.100	1.050	1.150	1.050	1.100

Valores de MIC o MBC de AP en la cepa adaptada a HS (HS-AP); valores de MIC o MBC de AP en la cepa adaptada a AP (AP-AP); valores de MIC o MBC de HS en la cepa adaptada a CB (CB-AP); *L. monocytogenes* ATCC -American Type Culture Collection- 19114 serotipo 4a; *L. monocytogenes* ATCC 13932 serotipo 4b; *L. monocytogenes* CECT -Colección Española de Cultivos Tipo- 936 serotipo 1/2b; *L. monocytogenes* ATCC 15313 serotipo 1/2a; *L. monocytogenes* NCTC -National Collection of Type Cultures- 11994 serotipo 4b.



Figura IV.2. MICs (concentraciones mínimas inhibitorias) y MBCs (concentraciones mínimas bactericidas) de ácido peracético (AP) en cepas patrón de *L. monocytogenes* no adaptadas (control) o adaptadas a hipoclorito sódico (HS), ácido peracético (AP) o cloruro de benzalconio (CB).

En la Tabla IV.4 se muestran los resultados de las MIC y MBC de CB en las cepas adaptadas a los biocidas. La mayor parte de las cepas expuestas a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas aumentaron ligeramente su MIC de CB. Los valores de MIC de HS-CB y AP-CB se encuentran en el rango entre 2 ppm y 4 ppm, a excepción de

la cepa *L. monocytogenes* NCTC 11994 adaptada a AP, que presentó un valor de 7 ppm. Sin embargo, y a diferencia del resto de exposiciones, las cepas adaptadas y expuestas a CB aumentaron su MIC en todos los casos, oscilando entre 3 ppm y 8 ppm (Figura IV.3).

En cuanto a los valores de MBC (para todas las cepas analizadas y en todos los casos), éstos aumentaron respecto de los obtenidos para las cepas control, situándose entre 4 ppm y 10 ppm, duplicándose en algunos casos (como en la cepa ATCC 19114 sometida al ensayo denominado como HS-CB) y siendo más del doble del valor de la cepa control en otros (como en el caso de la cepa ATCC 13932, CB-CB) por lo que puede decirse, de manera general, que el tratamiento aplicado (en este caso) al conjunto de cepas, ha aumentado considerablemente el valor de MBC de biocidas para las mismas.

Tabla IV.4. Valores de Valores de MIC (concentración mínima inhibitoria, ppm) y MBC (concentración mínima bactericida, ppm) de cloruro de benzalconio (CB) en cepas de *L. monocytogenes* previamente adaptadas a diferentes biocidas.

	ATCC 19114		ATCC 13932		CECT 936		ATCC 15313		NCTC 11994	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
HS-CB (ppm)	2	4	3	5	2	6	3	7	4	5
AP-CB (ppm)	2	5	4	7	2	6	2	6	7	8
CB-CB (ppm)	7	9	6	10	3	7	7	9	8	10

Valores de MIC o MBC de CB en la cepa adaptada a HS (HS-CB); valores de MIC o MBC de CB en la cepa adaptada a AP (AP-CB); valores de MIC o MBC de HS en la cepa adaptada a CB (CB-CB); *L. monocytogenes* ATCC 19114 serotipo 4a; *L. monocytogenes* ATCC 13932 serotipo 4b; *L. monocytogenes* CECT 936 serotipo 1/2b; *L. monocytogenes* ATCC 15313 serotipo 1/2a; *L. monocytogenes* NCTC 11994 serotipo 4b.

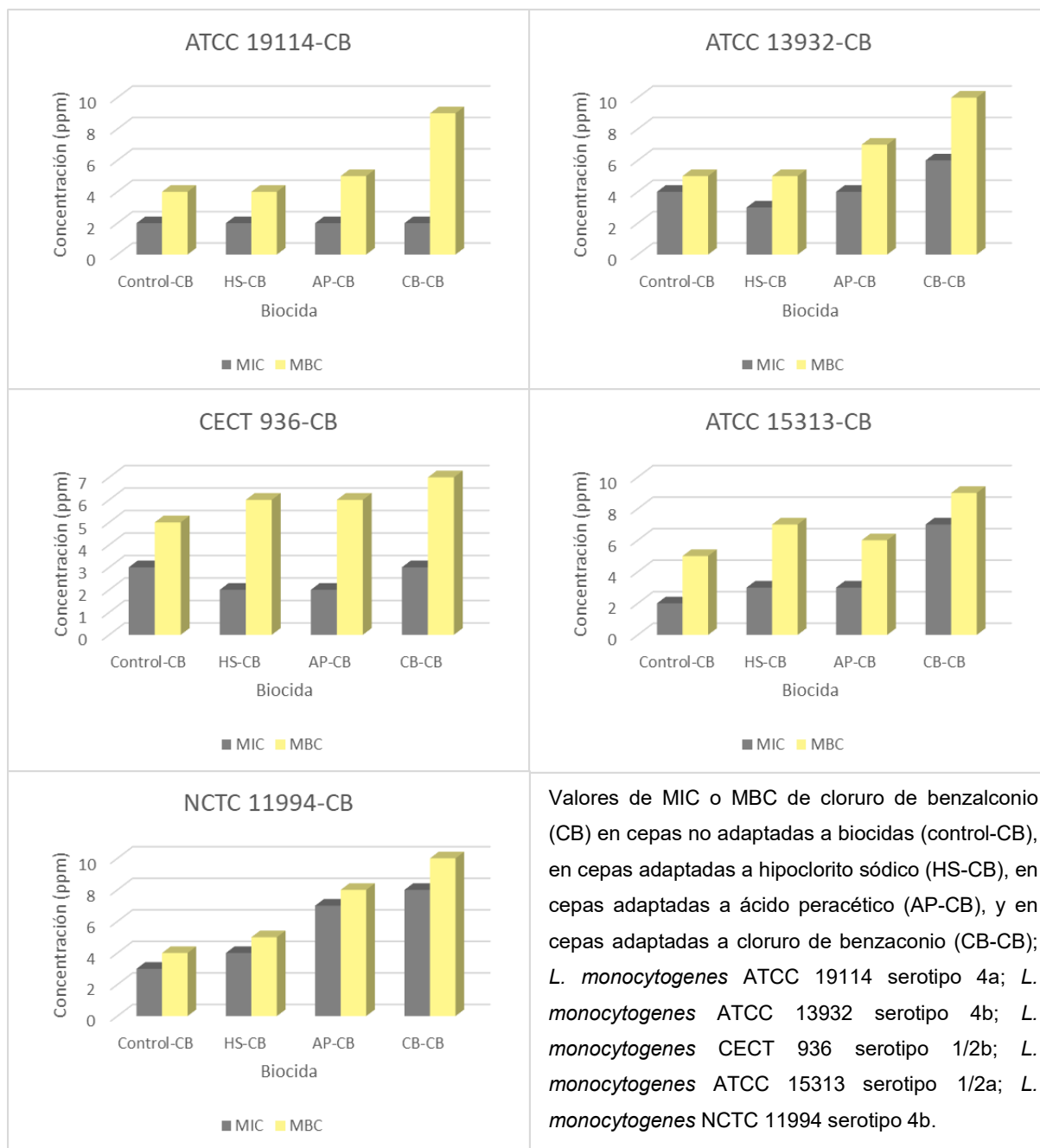


Figura IV. 3. MICs (concentraciones mínimas inhibitorias) y MBCs (concentraciones mínimas bactericidas) de cloruro de benzalconio (CB) en cepas patrón de *L. monocytogenes* no adaptadas (control) o adaptadas a hipoclorito sódico (HS), ácido peracético (AP) o cloruro de benzalconio (CB).

3.2. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Antes y después de la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas, se examinaron las cepas para detectar la susceptibilidad a 30 antibióticos. Los patrones de resistencia a los antibióticos de las cepas analizadas se muestran en la Tabla

IV.5. Antes de la exposición, las cepas mostraron resistencia a 14 (ATCC 19114, serotipo 4a), 15 (ATCC 13932, serotipo 4b), 13 (CECT 936, serotipo 1/2b), 15 (ATCC 15313, serotipo 1/2a) o 17 (NCTC 11994, serotipo 4b) antibióticos. La exposición de cepas a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas se asoció con reducciones de la susceptibilidad a varios antibióticos, pasando de la categoría de "susceptible" (lo que implica que las infecciones debidas a estas bacterias probablemente responderán a ese antibiótico) a la de "resistente" (lo que implica que las infecciones debidas a estas bacterias probablemente no responderán a ese antibiótico), de acuerdo con las directrices utilizadas. En varios casos, el aumento de la resistencia fue ligero, y las cepas pasaron de "susceptibles" a "intermedias", o de "intermedias" a "resistentes" (Tabla IV.5). Para varios cultivos y antibióticos adicionales, el diámetro de las zonas de inhibición en las células expuestas disminuyó con respecto a los cultivos no expuestos, pero no superó el límite de resistencia de acuerdo con las directrices de CLSI (2017) y EUCAST (2019).

HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; AP, ácido peracético; ¹ *L. monocytogenes* ATCC 19114 serotipo 4a; ² *L. monocytogenes* ATCC 13932 serotipo 4b1; ³ *L. monocytogenes* CECT 936 serotipo 1/2b; ⁴ *L. monocytogenes* ATCC 15313 serotipo 1/2a; ⁵ *L. monocytogenes* NCTC 11994 serotipo 4b2.

S, estreptomina (10 µg), CN, gentamicina (10 µg), AK, amikacina (30 µg), K, kanamicina (30 µg), VA, vancomicina (30 µg), AMP, ampicilina (10 µg), P, penicilina G (10 unidades), OX, oxacilina (1 µg), AML, amoxicilina (10 µg), SAM, ampicilina/sulbactam (20 µg), ENR, enrofloxacina (5 µg), CIP, ciprofloxacina (5 µg), MXF, moxifloxacina (5 µg), NA, ácido nalidixico (30 µg), TE, tetraciclina (30 µg), DA, clindamicina (2 µg), E, eritromicina (15 µg), CLR, claritromicina (15 µg), IMP, imipenem (10 µg), MEM, meropenem (10 µg), KF, cefalotina (30 µg), FOX, cefoxitina (30 µg), C-TX, cefotaxima (30 µg), CRO, ceftriaxona (30 µg), FEP, cefepima (30 µg), SXT, sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg), C, cloranfenicol (30 µg), R, rifampicina (5 µg), F, nitrofurantoina (300 µg), ATM, aztreonam (30 µg).

R, cepa resistente, I, cepa de susceptibilidad reducida, S, cepa susceptible. Las cepas que vieron incrementada su resistencia, en relación con las cepas no expuestas, tras la exposición a los biocidas, se presentan sombreadas. El aumento de la resistencia se define como un cambio de S o I (antes de la exposición) a R (después de la exposición), de acuerdo con los criterios de EUCAST (2019) y CLSI (2017).

4. DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la MIC y MBC antes y después de la adaptación de *L. monocytogenes*

Los valores de MIC obtenidos para los biocidas ensayados se encuentran dentro del rango de valores observados por otros autores al analizar bacterias Gram-positivas (Buzón-Durán *et al.*, 2017) y Gram-negativas (Capita *et al.*, 2014, 2019b; Molina-González *et al.*, 2014), lo que confirma que se trata de agentes antibacterianos eficaces.

Las cepas de *L. monocytogenes* mostraron, en rasgos generales, tolerancia adquirida a los biocidas (especialmente a CB), tras la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de dichos compuestos. Estudios realizados recientemente con bacterias Gram-positivas (Buzón-Durán *et al.*, 2017) indican que la tolerancia aumentada y estable observada para algunos biocidas como HS como consecuencia de una exposición subletal de los microorganismos podría representar un riesgo de desarrollo de la adaptación a los compuestos antibacterianos. Un uso inadecuado de los biocidas (por ejemplo, almacenamiento inapropiado o la presencia de cantidades excesivas de materia orgánica, que se sabe que inactivan determinados biocidas, como los compuestos clorados) podría representar un riesgo real para el desarrollo de una susceptibilidad reducida a estos compuestos (Capita *et al.*, 2014).

Éste parece ser el primer estudio en el que se expusieron cepas de *L. monocytogenes* a diferentes biocidas tras la adaptación, de forma que se pudo comprobar la adaptación cruzada a los compuestos, observándose el aumento de la MIC en la mayor parte de los casos con respecto a las cepas no adaptadas. Se encontraron valores de 4.600 ppm para la cepa ATCC 19114 adaptada a HS y expuesta posteriormente a HS (HS-HS) y 4.400 ppm para CB-HS y AP-HS, frente a 3.500 ppm de MIC en la cepa control o no adaptada a HS. Por ello, nuestros resultados sugieren que la tolerancia a algunos biocidas podría repercutir en el uso posterior de otros compuestos químicos diferentes de limpieza y desinfección, disminuyendo notablemente su eficacia.

4.2. Resistencia a antibióticos

Las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos suelen ser difíciles de tratar, ya que muchas de las sustancias habitualmente empleadas en la práctica clínica se descartan como opciones terapéuticas (Capita *et al.*, 2019b). En este estudio se determinó si la adaptación de 5 cepas de *L. monocytogenes* a tres desinfectantes de uso común influye en el incremento de las resistencias a antibióticos con respecto a las cepas no adaptadas a los

biocidas. Las cepas de *L. monocytogenes* se ensayaron frente a un panel de 30 antibióticos de importancia clínica, tanto en medicina humana como veterinaria, antes y después de la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas. Los patrones de resistencia a los antibióticos de las cepas analizadas se muestran en la Tabla IV.5.

Todas las cepas fueron susceptibles a CN, P, TE y KF antes y después de la exposición a concentraciones subinhibitorias de biocidas. Estos resultados coinciden con lo expuesto por Granier *et al.* (2011), quienes señalan que la mayor parte de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos entre los años 1996 y 2006 fueron completamente susceptibles a las penicilinas y gentamicinas, y naturalmente resistentes a las cefalosporinas, coincidiendo con nuestros datos, a excepción de cefalotina (KF) compuesto al que las cepas mostraron susceptibilidad.

El paso de algunas de las cepas estudiadas desde la categoría de susceptible o de susceptibilidad reducida a resistente, observado en el caso de cloranfenicol o estreptomina, respectivamente, después de la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de HS o CB, coincide con los hallazgos de Alonso-Hernando *et al.* (2012), quienes observaron un incremento en las resistencias de *L. monocytogenes* a estreptomina, cefalotina y cloranfenicol tras la exposición a diferentes compuestos descontaminantes. Los resultados obtenidos por otros autores como Capita *et al.* (2019a) también coinciden con lo expuesto, señalando la elevada prevalencia de resistencias en el caso de cefoxitina, cefotaxima, cefepima, ácido nalidíxico y oxacilina, observándose en nuestro estudio que las cepas eran resistentes a los antibióticos citados casi en su totalidad (Tabla IV.5), tanto antes como después de la exposición a concentraciones subinhibitorias de los biocidas. Estos resultados son motivo de gran preocupación, ya que algunos antibióticos de la familia de los aminoglucósidos (como es la estreptomina), combinados con penicilina, son los fármacos de elección para el tratamiento de la listeriosis humana (Drevets y Bronze, 2008).

En muchos estudios se han encontrado mecanismos similares en la resistencia a biocidas y antibióticos, tales como cambios en las cubiertas celulares (reducción de porinas y modificaciones en los lipopolisacáridos y otros lípidos), bombas de expulsión inespecíficas (capaces de expulsar una amplia gama de compuestos), sobreexpresión de algunos genes o alteración del lugar diana o *target* (SCENIHR, 2008).

Algunos autores, como Lavilla Lerma *et al.* (2014), observaron la existencia de susceptibilidad reducida a antibióticos en cepas de bacterias Gram-positivas (dos especies de *Enterococcus* spp.), indicando que podía deberse a mecanismos de resistencia inespecíficos como son las bombas de expulsión. En *L. monocytogenes*, se ha descrito que dos bombas de expulsión MFS (*Major Facilitator Superfamily*), MdrL y Lde, contribuyen a la resistencia a los

antibióticos. Lde puede conferir resistencia a las fluoroquinolonas hidrofílicas. Además, dentro de *L. monocytogenes*, MdrL se ha descrito como responsable de la resistencia al cloruro de benzalconio cuando se sobreexpresa (Romanova *et al.*, 2006).

Conclusiones

Este estudio viene a confirmar que la exposición a concentraciones subletales de algunos biocidas comúnmente utilizados para la limpieza y desinfección de las superficies y los equipos de las industrias alimentarias, como HS, CB o AP, puede conferir adaptación y adaptación cruzada a otros biocidas en cepas de *L. monocytogenes*. Se sugiere que la adaptación de esta bacteria a los biocidas podría ser causada, al menos parcialmente, por bombas de expulsión y cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular. Sin embargo, se necesitan investigaciones adicionales para confirmar estos hallazgos. Los mecanismos de adaptación a los biocidas deben investigarse con el fin de desarrollar estrategias encaminadas a prevenir o reducir este fenómeno, que puede dar como resultado un aumento de la resistencia a ciertos antibióticos, hecho preocupante en el contexto de Salud Pública. Los peligros derivados de la exposición a concentraciones subinhibitorias de biocidas deben ser tenidos en cuenta cuando se realizan las operaciones de limpieza y desinfección en los entornos de procesamiento de alimentos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. (2009). Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* **20**(12): 1108-1111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.011>
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2012). Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* **23**(1): 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.006>
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**: 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.003>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**(1): 11-48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, M. C. (2001). Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology* **65**: 75–82. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00497-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00497-9)
- Capita, R., Felices-Mercado, A., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. (2019a). Characterization of *Listeria monocytogenes* originating from the Spanish meat-processing chain. *Foods* **8**(11): 542. <https://doi.org/10.3390/foods8110542>
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(4): 1268-1280. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>
- Capita, R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Alonso-Calleja, C. (2019b). Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports* **9**: 15905. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51907-1>
- Charpentier, E., Courvalin, P. (1999). Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(9): 2103-2108. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.9.2103>

- CLSI (2017). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard-Third Edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA, USA. **28**(8): M31-A3. Disponible en: <https://www.dbt.univr.it/documenti/OccorrenzaInS/matdid/matdid485539.pdf> (Fecha de acceso: 27 de diciembre de 2021).
- CLSI (2019). M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA. **29**. Disponible en: https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf (Fecha de acceso: 27 de diciembre de 2021).
- Drevets, D. A., Bronze, M. S. (2008). *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **53**(2): 151–165. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00404.x>
- EFSA y ECDC (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* **17**(12): 5926. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- EFSA y ECDC (2021). The European Union One Health 2020 zoonoses Report. *EFSA Journal*, **19**(2): 6406. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2021.6971> (Fecha de último acceso: 06 de febrero de 2021).
- EUCAST (2019). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* v.9. Disponible en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9_0_Breakpoint_Tables.pdf (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021)
- Gadea, R., Fernández Fuentes, M. A., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., Ortega, E. (2017). Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiology* **63**: 58-71. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.037>
- González-Rivas, F., Ripolles-Avila, C., Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A. G., Rodríguez-Jerez, J. J. (2018). Biofilms in the spotlight: Detection, quantification, and removal methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **17**: 1261-1276. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12378>
- Granier, S. A., Moubareck, C., Colaneri, C., Lemire, A., Roussel, S., Dao, T.-T., Courvalin, P., Brisabois, A. (2011). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Applied and Environmental Microbiology* **77**(8): 2788–2790. <https://doi.org/10.1128/AEM.01381-10>

- Jamshidi, A., Zeinali, T. (2019). Significance and characteristics of *Listeria monocytogenes* in poultry products. *International Journal of Food Science* **2019**: 7835253. <https://doi.org/10.1155/2019/7835253>
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Sánchez Valenzuela, A., Casado Muñoz, M. C., Gálvez, A., Abriouel, H. (2014). Role of EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. *Food Microbiology* **44**: 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.009>
- Lee, S. H. I., Cappato, L. P., Corassin, C. H., Cruz, A. G., Oliveira, C. A. F. (2015). Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. *Journal of Dairy Science* **99**(3): 2384-2390. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10007>
- Mazaheri, T., Ripolles-Avila, C., Hascoët, A. S., Rodríguez-Jerez, J. J. (2020). Effect of an enzymatic treatment on the removal of mature *Listeria monocytogenes* biofilms: A quantitative and qualitative study. *Food Control* **114**: 107266. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107266>
- Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2014). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* **40**: 329-334. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.046>
- Ripolles-Avila, C., García-Hernández, N., Cervantes-Huaman, B. H., Mazaheri, T., Rodríguez-Jerez, J. J. (2019). Quantitative and compositional study of monospecies biofilms of spoilage microorganisms in the meat industry and their interaction in the development of multispecies biofilms. *Microorganisms* **7**(12): 655. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120655>
- Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J. J., Vázquez-Sánchez, D., López-Cabo, M. (2018). Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in food-related environments: incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. *Foods* **7**(6): 85. <https://doi.org/10.3390/foods7060085>
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019a). Architecture and viability of the biofilms formed by nine *Listeria* strains on various hydrophobic and hydrophilic materials. *Applied Sciences* **9**(23): 5256. <https://doi.org/10.3390/app9235256>

- Rodríguez-Melcón, C., Capita, R., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. (2018a). Effects of bacteriophage P100 at different concentrations on the structural parameters of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Food Protection* **81**(12): 2040-2044. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-177>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., Carballo, J., García-Fernández, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2018b). Structure and viability of 24- and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology* **76**: 513-517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019b). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology* **82**: 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020>
- Romanova, N. A., Wolfs, P. F. G., Brovko, L. Y., Griffiths, M. W. (2006). Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3498-3503. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3498-3503.2006>
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, Md. F. R., Kim, H.-S., Ha, S.-D. (2017). Effectiveness of a phage cocktail as a biocontrol agent against *L. monocytogenes* biofilms. *Food Control* **78**: 256-263. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.056>
- SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) (2008). Opinion on the effects of the active substances in biocidal products on antibiotic resistance. Version of 4 November 2008 for public consultation. <https://www.semanticscholar.org/paper/Scientific-Committee-on-Emerging-and-Newly-Health-4-Auvinen-Bridges/f8468661d550a59e9f8572ae597f3c44dbf10026>
- Skowron, K., Wiktorczyk, N., Grudlewska, K., Kwiecińska-Piróg, J., Walecka-Zacharska, E., Paluszak, Z., Gospodarek-Komkowska, E. (2019). Drug-susceptibility, biofilm-forming ability and biofilm survival on stainless steel of *Listeria* spp. strains isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology* **296**: 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.021>
- Waghmare, R. B., Annapure, U. S. (2015). Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. *Food Packaging and Shelf Life* **3**: 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.11.001>

CAPÍTULO V

Estimación por citometría de flujo de los porcentajes de supervivencia de *Listeria monocytogenes* tras el tratamiento con tetraciclina en células previamente expuestas o no expuestas a diferentes biocidas

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Listeria monocytogenes es el agente etiológico de la listeriosis humana, una infección cuya incidencia mundial oscila anualmente entre 0,1 y 11,3 casos por millón de habitantes (Lomonaco *et al.*, 2015). Se trata de la enfermedad transmitida por alimentos con mayor tasa de letalidad, pudiendo superar el 30% (Ariza-Miguel *et al.*, 2015). Las personas pertenecientes a los denominados grupos de riesgo (niños, ancianos, mujeres embarazadas y personas inmunodeprimidas) sufren la infección con más frecuencia y de forma más severa (Rodríguez-Campos *et al.*, 2019).

En los Estados Unidos se producen cada año aproximadamente 1.600 casos de listeriosis invasiva (la tasa de incidencia es de 0,26 casos por 100.000 habitantes), y en torno a 260 de ellos fallecen (CDC, 2020). En la Unión Europea se confirmaron en 2020 un total de 1.876 casos de listeriosis invasiva (0,42 casos por 100.000 habitantes), que se asociaron a una tasa de letalidad del 13,0% (EFSA y ECDC, 2021).

L. monocytogenes presenta una elevada resistencia a diferentes factores ambientales adversos, como altas concentraciones de sal (es capaz de crecer en presencia de un 10% de NaCl) y fuerte acidez (puede soportar un rango de pH de 4,1 a 9,6) (Jamshidi *et al.*, 2019; Ortiz *et al.*, 2016). Además, esta bacteria puede crecer en un amplio rango de temperaturas (desde 1 °C hasta 45 °C) y es anaerobia facultativa (Jamshide *et al.*, 2019). Estas características favorecen la persistencia de *L. monocytogenes* en los ambientes de procesado de alimentos, donde la bacteria puede permanecer durante largos periodos de tiempo (Ortiz *et al.*, 2016).

Para desinfectar las superficies de las industrias alimentarias se utilizan habitualmente diferentes compuestos, entre los que se encuentran el hipoclorito sódico (HS), el ácido peracético (AP) y el cloruro de benzalconio (CB). Los desinfectantes a base de cloro, como el HS, son compuestos oxidantes de bajo precio, que muestran una potente actividad bactericida de amplio espectro (Waghmare *et al.*, 2015). La actividad antimicrobiana del AP se basa también en la oxidación de componentes celulares (Finnegan *et al.*, 2010). Por su parte, los compuestos derivados del amonio cuaternario, como el CB, son surfactantes catiónicos que actúan destruyendo las bicapas de la membrana lipídica, ejerciendo su efecto antimicrobiano frente a diferentes microorganismos patógenos (Henriques y Fraqueza, 2017). El HS y el AP están aprobados en el Espacio Económico Europeo (EEE) y Suiza para varios usos, incluyendo la desinfección de áreas de alimentos y piensos (productos tipo 4), sujetos a las especificaciones y condiciones de uso establecidas en el Reglamento de Ejecución (UE) 2017/1273 de la Comisión (para el HS) y en el Reglamento de Ejecución (UE) 2016/672 de la Comisión (para el AP). El CB está siendo revisado para su empleo en diferentes tipos de

productos biocidas, incluidos los desinfectantes para áreas de alimentos y piensos, en el EEE y Suiza (Capita *et al.*, 2019a).

Para que los desinfectantes sean efectivos, deben ser usados en concentraciones adecuadas. Sin embargo, en ocasiones los biocidas se aplican a dosis subinhibitorias, como consecuencia, por ejemplo, del cálculo incorrecto de las concentraciones, del almacenamiento inadecuado de los compuestos (que provoca su pérdida de efectividad), de la presencia de cantidades excesivas de materia orgánica (que reduce el efecto de diferentes compuestos, como el HS), de la distribución inadecuada de los biocidas o de la dificultad para lograr que los compuestos alcancen determinadas áreas (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2014, 2017; Molina-González *et al.*, 2014).

La resistencia a los antibióticos es un problema prioritario de Salud Pública, y su importancia está en aumento. Las infecciones provocadas por bacterias resistentes son muy difíciles de tratar, al estar invalidados, como opción terapéutica, muchos de los antibióticos de empleo habitual. Ello supone un incremento de los costes de tratamiento para los sistemas sanitarios, además de tener un impacto importante en términos de morbilidad y mortalidad (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Se ha sugerido que hay una relación directa entre tolerancia a biocidas y resistencia a antibióticos, puesto que los mecanismos que contribuyen a ambas circunstancias son similares, por ejemplo, cambios en la permeabilidad celular o síntesis de bombas de expulsión (Alonso-Calleja *et al.*, 2015; Capita *et al.*, 2014). Así, en investigaciones previas realizadas con enterobacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Cronobacter sakazakii* y *Yersinia enterocolitica*) se ha observado que la exposición a dosis subinhibitorias de desinfectantes provoca la adaptación de las poblaciones bacterianas a los biocidas, a la vez que modifica el patrón de resistencia a antibióticos de las cepas (Capita *et al.*, 2013, 2014, 2019; Molina-González *et al.*, 2014).

La determinación del grado de susceptibilidad a un antibiótico mediante métodos dependientes de cultivo son lentos, lo que puede conducir a la prescripción de un antibiótico inapropiado en un entorno clínico debido a la urgencia en el tratamiento (WHO, 2014). Algunas alternativas a la detección de la susceptibilidad a los antibióticos consisten en la evaluación de otros indicadores de viabilidad celular (por ejemplo, integridad de las cubiertas celulares) utilizando colorantes fluorescentes. Para diferenciar entre células vivas e inactivadas se pueden emplear dos colorantes fluorescentes, el SYTO9 y el yoduro de propidio (YP). El colorante rojo (YP) penetra únicamente en las células con las membranas dañadas, y generalmente no penetra en las células viables. Por el contrario, el colorante verde SYTO9 es capaz de penetrar tanto en las células vivas como en las inactivadas. La señal fluorescente del SYTO9 y del YP se ve fuertemente potenciada cuando los compuestos se unen a los ácidos nucleicos. El YP exhibe una mayor afinidad por los ácidos nucleicos que el SYTO9 y, por lo tanto, cuando ambos colorantes están presentes, el YP desplaza al SYTO9. Por ello,

las células viables emiten fluorescencia verde, mientras que las inactivadas emiten fluorescencia roja (Buzón-Durán *et al.*, 2017). La determinación de la fluorescencia puede realizarse por citometría de flujo, técnica que permite diferenciar y cuantificar, de forma rápida, las células de una población en base a su viabilidad celular (Jarzembowski *et al.*, 2008; Robertson *et al.*, 2019).

Los objetivos de este trabajo han sido: 1) determinar los porcentajes de células de *L. monocytogenes* que sobreviven a diferentes tratamientos (concentraciones y tiempos de exposición) con tetraciclina, antibiótico usado para el tratamiento de la listeriosis humana (Capita *et al.*, 2019b), 2) comparar los porcentajes de supervivencia de células control (no expuestas a biocidas) y células previamente adaptadas a tres biocidas (HS, AP, CB) y 3) determinar la utilidad de la citometría de flujo con el kit de viabilidad celular LIVE/DEAD BacLight™, para esta finalidad.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepa y desinfectantes

Se utilizó la cepa de *L. monocytogenes* NCTC – *National Collection of Type Cultures*-11994 (serotipo 4b). El cultivo bacteriano se mantuvo almacenado a - 50 °C en caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) con un 20% (vol/vol) de glicerol. Antes de cada experimento, las células se inocularon en TSB (Oxoid) y, tras incubación a 37 °C durante toda la noche, los cultivos se sembraron en placas con agar triptona de soja (TSA, Oxoid) para su mantenimiento a 4 ± 1 °C durante el tiempo de realización del experimento.

Para el ensayo se emplearon tres desinfectantes: cloruro de benzalconio (CB, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.), hipoclorito sódico (NaClO, HS, Sigma-Aldrich) y ácido peracético (AP, Sigma-Aldrich). El hipoclorito sódico contenía un 10% de cloro libre. Las soluciones de cada uno de los compuestos se prepararon en condiciones asépticas en agua destilada estéril antes del comienzo de cada experimento.

2.2. Cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs)

Se calcularon las MICs de *L. monocytogenes* siguiendo el protocolo descrito previamente por Capita *et al.* (2014), con mínimas modificaciones. Se tomaron, a partir de placas de TSA (Oxoid), 5 colonias, que se inocularon en 9 ml de TSB (Oxoid) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas para obtener una concentración final en tubo de aproximadamente 5×10^8 ufc/ml (la concentración se confirmó por siembra en placa). A partir de este inóculo se realizaron tres diluciones decimales en caldo TSB. Para el experimento se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Los pocillos se llenaron con 20 μ l de la solución desinfectante (HS, CB o AP a diferentes concentraciones) y 180 μ l de la tercera dilución de la cepa, con el fin de obtener una concentración final en el pocillo de aproximadamente 5×10^5 ufc/ml. También se utilizaron controles positivos (200 μ l de la tercera dilución de la cepa) y negativos (200 μ l de caldo de cultivo estéril). El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la $DO_{420-580}$ en un Bioscreen C MRB (Oy Growth Curves Ab). La MIC se estableció como la concentración de biocida mínima necesaria para impedir el crecimiento bacteriano ($DO_{420-580} \leq 0,200$) tras 48 horas de incubación a 37 °C.

2.3. Exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas

El procedimiento fue similar al desarrollado para el cálculo de las MICs. En los pocillos de una placa de microtítulo (Oy Growth Curves Ab) se depositaron 180 μ l de la tercera dilución

del caldo de cultivo con la cepa (aproximadamente 5×10^5 ufc/ml) y 20 μ l del biocida, para lograr en el pocillo una concentración MIC/2. Cuando se observó crecimiento (midiendo la $DO_{420-580}$ en un Bioscreen C MRB) tras 48 horas de incubación a 37 °C, se transfirió una alícuota de 20 μ l de la suspensión al siguiente pocillo, que contenía 160 μ l de TSB (Oxoid) y 20 μ l de la solución desinfectante. La concentración de biocida en el pocillo era 1,5 veces la del pocillo anterior. Este procedimiento se repitió hasta que dejó de observarse crecimiento al cabo de 72 horas de incubación a 37 °C. La suspensión del último pocillo en el que se observó crecimiento se sembró en placas de TSA (Oxoid) con los biocidas correspondientes (se añadió al TSA la mitad de la máxima concentración de biocida que permitió el crecimiento microbiano). En el caso de las cepas no expuestas a los desinfectantes se empleó TSA sin biocidas. Después de la incubación a 37 °C durante 48 horas, las placas se almacenaron a 4 ± 1 °C durante un tiempo máximo de una semana. Para experimentos posteriores, las cepas se sembraron en TSB con MIC/2 de los biocidas en el caso de las cepas adaptadas y TSB sin biocidas en las cepas no expuestas previamente a los desinfectantes.

2.4. Exposición a la tetraciclina

Inicialmente, se inocularon 5 colonias de cada una de las placas de TSA (control, CB, HS y AP) en 10 ml de TSB o de TSB con la cantidad correspondiente de biocida (la mitad de la máxima concentración de biocida que permitió el crecimiento microbiano en cada caso). Posteriormente, las cepas se incubaron durante 18 - 24 h a 37 °C para conseguir una concentración final en tubo de aproximadamente 5×10^8 ufc/ml. Una vez transcurrido este tiempo, se depositó el contenido de los tubos de vidrio en tubos de plástico estériles y se centrifugó (durante 20 minutos a $3.200 \times g$ y 4 °C). Tras ello, se procedió a retirar el sobrenadante y se añadieron a los tubos 10 ml de cloruro sódico al 0,85% (NaCl, Sigma-Aldrich). Se depositaron, en tubos Falcon estériles, 900 μ l de cepa (suspensión en cloruro sódico) y 100 μ l de una solución acuosa de tetraciclina (TE, Sigma-Aldrich). Se estudiaron las concentraciones de 0 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, 1.000 ppm y 1.250 ppm de tetraciclina. Los tiempos de exposición al antibiótico fueron 24, 48 y 72 horas, y la temperatura de incubación, de 30 °C.

2.5. Tinción de las muestras

Inicialmente se depositaron 987 μ l de NaCl al 0,85% en tubos de plástico estériles. Posteriormente se añadieron 1,5 μ l de cada uno de los colorantes fluorescentes marcadores de ácidos nucleicos, SYTO9 (solución 3,34 mM en DMSO) y yoduro de propidio (YP, solución 20 mM en DMSO) del producto BacLight Viability Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Una

vez hecho esto, se depositaron 10 μ l de la cepa sometida a los distintos tratamientos con TE (de forma que se consiguió una concentración final en los tubos -incuyendo células viables e inactivadas- de aproximadamente 10^6 ufc/ml). Para verificar las mediciones, se realizaron, a su vez, controles positivos y negativos de las muestras con porcentajes bacterianos conocidos en fase exponencial de crecimiento (18 - 24 h de incubación). El control positivo estaba constituido por células vivas sin tratar, y el control negativo por células muertas (tras ser tratadas a 90 °C durante 20 minutos). Ambos controles se tiñeron con los dos colorantes señalados. A su vez, se realizó un control de células vivas sin colorantes, que sirvió para calibrar y determinar la autofluorescencia bacteriana. Una vez añadidos los colorantes, todos los tubos se incubaron a 30 °C durante 20 minutos en la oscuridad para favorecer la penetración de los colorantes en las células bacterianas.

2.6. Visualización y cuantificación por citometría de flujo

El análisis de las muestras se llevó a cabo utilizando el citómetro de flujo CyAn ADP (Beckman Coulter, California, E.E.U.U.) con el software Summit V4.4.00. Se utilizó una fuente de excitación de 488 nm procedente de un láser de argón, empleado para dos detectores: FL1 (530/40, 545 DLP) como detector para la fluorescencia verde, y FL3 (613/20, 640 DLP) como detector para la fluorescencia roja. El voltaje de los parámetros de adquisición fue, para los fluorocromos, FL1 (correspondiente a SYTO9) de 560 v, FL3 (correspondiente a YP) de 597 v, y para el detector "Side Scatter" (SSC, complejidad relativa interna o granularidad) de 752 v. Se estableció, para todos los valores, una ganancia de 1,0 (predeterminada). El "Side Scatter" (SSC) se define como la luz dispersada a un ángulo de 90° de la luz incidente del láser. Se asocia, a su vez, con la rugosidad de la superficie de elementos en el interior celular; a mayor cantidad, mayor será la complejidad registrada en el detector SSC. A su vez, se estableció un valor de "threshold" (o punto de corte, porcentaje de umbral en el que un evento será detectado por el citómetro) de 0,01% y el parámetro de dispersión frontal de la luz, "Forward Scatter" (FSC, tamaño relativo de las células). Se trata de la luz que la célula bacteriana no deja transmitir de forma frontal y se encuentra relacionado con la superficie o el tamaño de la misma. Se estableció una ganancia de FSC de 50,0%.

Se estableció, posteriormente, una región o ventana ("gate"), para discriminar el ruido de fondo de la zona de interés donde se localiza la población celular, basándose en la complejidad celular (SSC, eje de ordenadas) frente al tamaño de las mismas (FSC, eje de abscisas) y la emisión de fluorescencia. Todos los análisis se realizaron a baja velocidad y se empleó como condición de parada 10.000 eventos (o células) en la región seleccionada, con

100.000 eventos como máximo. Los parámetros se expresaron en escala logarítmica en forma de citograma (“dot plot”).

2.7. Análisis estadístico

Los parámetros cuantitativos bacterianos se compararon mediante el uso de técnicas de análisis de varianza (ANOVA). La separación de medias se realizó con la prueba de rango múltiple de Duncan. Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de probabilidad del 95% ($P < 0,05$). El procesado de los datos se llevó a cabo con el programa informático Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y adaptación a concentraciones crecientes de los biocidas

Los valores de las MICs de CB, HS y AP para la cepa de *L. monocytogenes* ensayada se presentan en la Tabla V.1. A su vez, se muestran también los valores de las concentraciones máximas de biocidas que permitieron el crecimiento microbiano después de realizar pases sucesivos con concentraciones crecientes de los compuestos químicos.

Tabla V.1. Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y concentraciones máximas de biocidas que permitieron el crecimiento microbiano tras la adaptación para *L. monocytogenes* NCTC 11994.

Biocida	MIC (ppm) ^a	Adaptación (ppm) ^b
CB ^c	2,0	8,5
HS ^d	3.500,0	3.935,5
AP ^e	1.050,0	1.125,0

^a concentración mínima inhibitoria; ^b concentración máxima de biocidas que permitió el crecimiento microbiano tras realizar varios pases con concentraciones gradualmente crecientes de los compuestos; ^c cloruro de benzalconio; ^d hipoclorito sódico; ^e ácido peracético.

El HS fue el biocida que requirió las concentraciones más altas para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* tras 48 h de incubación a 37 °C (3.500 ppm, lo que equivale a 350 ppm de cloro libre). Los valores MIC para el ácido peracético (AP), se sitúan en 1.050 ppm, llegando a una concentración final de crecimiento de 1.125 ppm en la cepa adaptada. El CB, sustancia perteneciente a la familia de los compuestos de amonio cuaternario (QAC), produjo la inhibición del crecimiento bacteriano a la concentración más baja, siendo ésta de 2 ppm. Sin embargo, también fue el biocida al que más se adaptó la cepa, llegando a crecer en presencia de 8,5 ppm del compuesto (4,25 veces más que la MIC).

3.2. Porcentajes de supervivencia a la tetraciclina de las células previamente expuestas y no expuestas a los biocidas

Previamente al análisis de las muestras, se establecieron una serie de controles que permitieron optimizar los protocolos de adquisición de los resultados. En esta fase previa se usaron controles positivos y controles negativos. Se utilizaron como controles positivos cultivos de *L. monocytogenes* de 24 h de incubación a 37 °C, y como controles negativos, los

cultivos anteriores expuestos a 90 °C durante 20 minutos, de forma que se obtenían porcentajes de células muertas $\geq 95\%$ (Figura V.1). Ambos cultivos se tiñeron con los dos colorantes utilizados, SYTO9 y YP, de forma que se verificaba el contenido celular de cada muestra, así como su porcentaje de viabilidad.

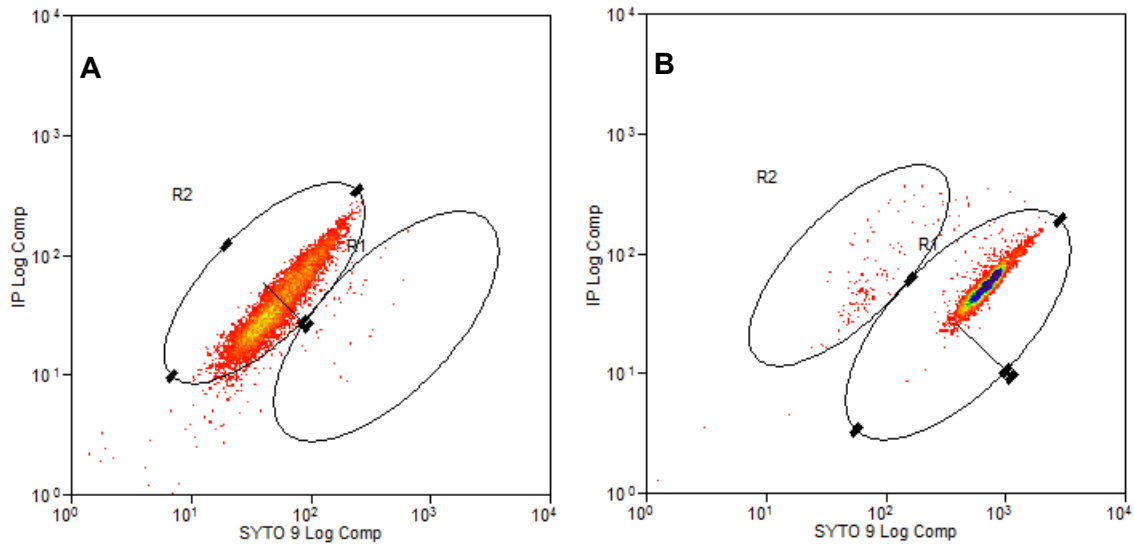


Figura V.1. Citogramas de los controles de *L. monocytogenes*: A, control de células muertas, con un 98,15% de inactivación en la región 2 (R2); B, control de células vivas, con un 98,7% de viabilidad en la región 1 (R1).

Los datos de citometría de flujo permitieron estimar el impacto de la tetraciclina (TE) en la viabilidad microbiana y el daño celular. En las Figuras V.2-V.7 se muestran los citogramas de los distintos grupos de células tras la exposición a 0 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, 1.000 ppm y 1.250 ppm de TE. En términos generales, después del doble marcaje celular con los colorantes de viabilidad SYTO9 y YP, se pudieron identificar dos subpoblaciones claras; en la región 1 (R1) se sitúan las células vivas o marcadas con SYTO9, de acuerdo con lo establecido por los ensayos realizados con los controles de viabilidad, y en la región 2 (R2) se sitúan las células muertas o no viables, teñidas con YP. A medida que aumenta el tiempo de exposición a TE, la densidad de la población detectada en R1 va disminuyendo y pasando progresivamente a R2, debido a una disminución de la fluorescencia del SYTO9 y a un desplazamiento de este colorante por el YP.

Cabe destacar la subpoblación que se encuentra fuera de ambas regiones en algunos citogramas. Esta subpoblación puede corresponderse con células doblemente teñidas, viables pero lesionadas o dañadas, donde el YP no ha conseguido desplazar del todo al colorante SYTO9 por no tener una membrana suficientemente dañada para que todo el colorante acceda al ADN celular. Estas subpoblaciones no se tuvieron en cuenta a la hora de realizar el análisis estadístico de los datos.

En la Tabla V.2 se muestra el porcentaje de células vivas tras la exposición a diferentes concentraciones de tetraciclina (0 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, 1.000 ppm y 1.250 ppm) durante cada uno de los tiempos de incubación del experimento (24, 48 y 72 h), tanto en las células no expuestas (control) como en las previamente expuestas a concentraciones subinhibitorias de biocidas. El porcentaje de células supervivientes osciló entre $0,93 \pm 0,67\%$ (cultivos previamente expuestos a HS y tratados con 1.250 ppm de TE durante 72 h) y $95,54 \pm 3,37\%$ (cultivos previamente expuestos a CB e incubados durante 24 h en ausencia de TE).

En ausencia de TE, se observaron mayores ($P < 0,05$) porcentajes de viabilidad celular a las 48 y 72 horas de incubación en los cultivos previamente expuestos a CB (entre $71,64 \pm 16,59\%$ y $85,85 \pm 9,54\%$ de células vivas) y AP (entre $89,10 \pm 9,64$ y $93,42 \pm 2,70\%$) que en los cultivos no expuestos (control; entre $51,15 \pm 15,67\%$ y $71,65 \pm 10,83\%$) o expuestos a HS (entre $52,53 \pm 8,18\%$ y $70,27 \pm 10,68\%$). Cuando las células se trataron con tetraciclina, la exposición previa a AP mejoró el porcentaje de supervivencia bacteriana, respecto a los cultivos control o tratados con HS, tras la exposición a tetraciclina durante 72 horas (250 ppm TE), 48 y 72 horas (500 ppm TE), 24, 48 y 72 horas (750 ppm y 1.000 ppm de TE) o 24 y 72 horas (1.250 ppm de TE) (Figura V.2). El porcentaje de supervivencia obtenido en los cultivos previamente expuestos a CB se situó en una posición intermedia, entre los cultivos control o expuestos a HS y los cultivos expuestos a AP.

Tanto en el caso de las células control como en las previamente expuestas a los biocidas, la concentración de TE influyó en el porcentaje de células supervivientes, observándose, como era esperable, los menores valores a las concentraciones más altas ensayadas (Tabla V.2). De igual manera, a mayores tiempos de tratamiento con TE se obtuvieron, para la mayoría de condiciones ensayadas, menores concentraciones de células supervivientes.

Cepa

LM-control LM-CB LM-HS LM-AP

24 h

LM-control LM-CB LM-HS LM-AP

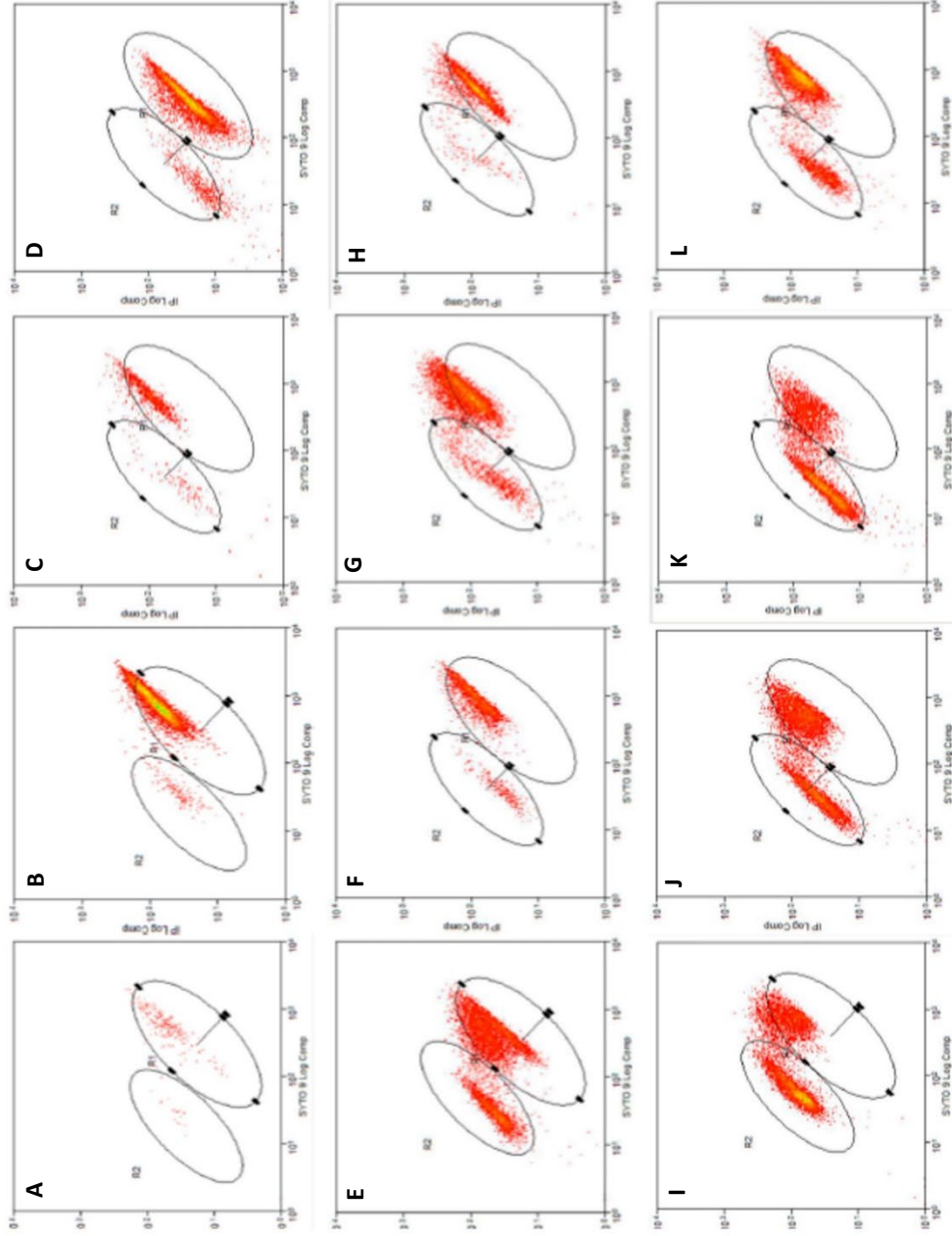
48 h

LM-control LM-CB LM-HS LM-AP

72 h

LM-Control (sin adaptación previa a biocidas), LM-CB (*L. monocytogenes* adaptada a cloruro de benzalconio), LM-HS (*L. monocytogenes* adaptada a hipoclorito sódico), LM-AP (*L. monocytogenes* adaptada a ácido peracético).

Figura V.2. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 0 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.



Cepa

Tiempo de
exposición a TE

24 h

48 h

72 h

LM-Control (sin adaptación
previa a biocidas), LM-CB (*L.
monocytogenes* adaptada a
cloruro de benzalconio), LM-
HS (*L. monocytogenes*
adaptada a hipoclorito sódico),
LM-AP (*L. monocytogenes*
adaptada a ácido peracético).

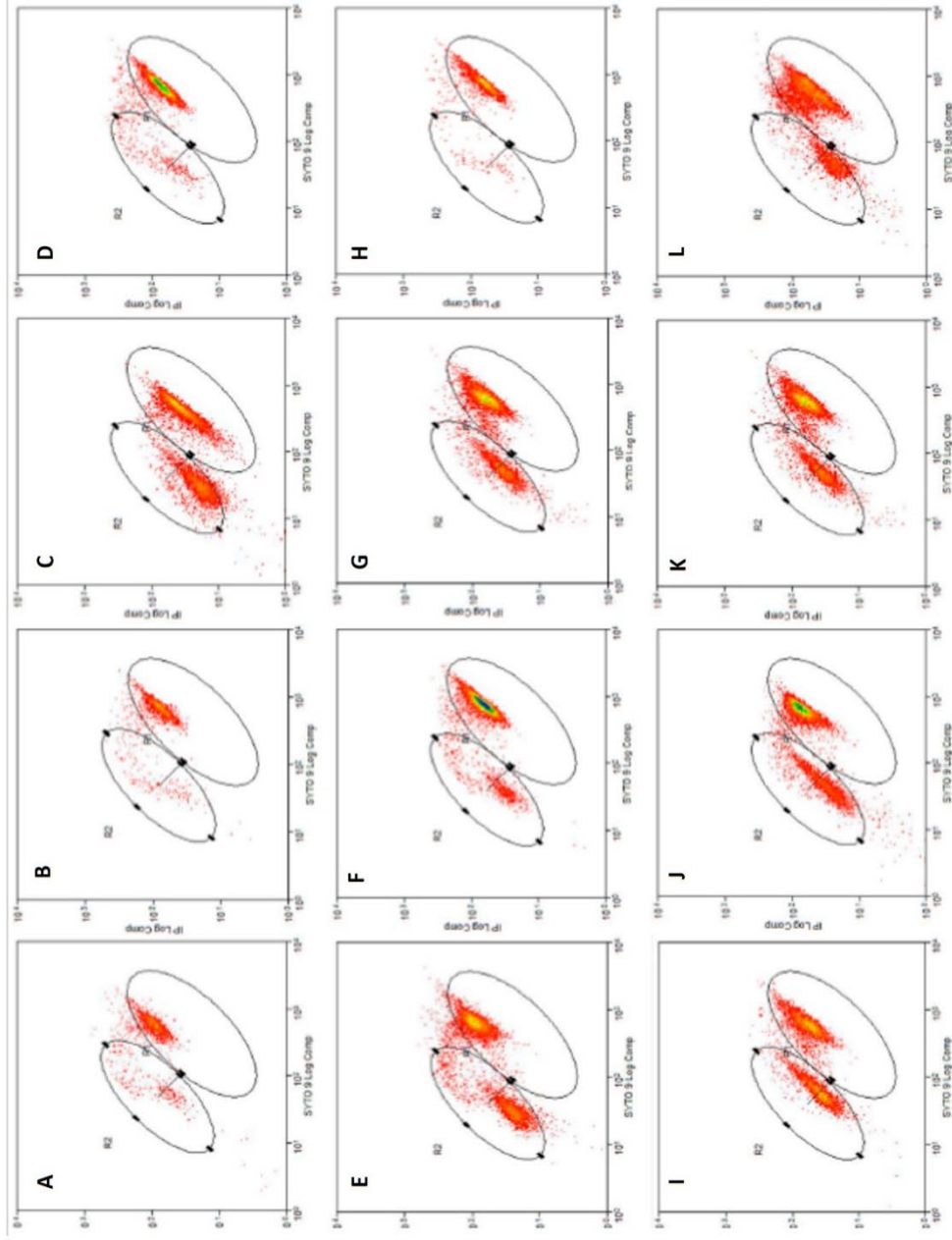


Figura V.3. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 250 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.

Cepa

Tiempo de
exposición a TE

LM-Control (sin adaptación previa a biocidas), LM-CB (*L. monocytogenes* adaptada a cloruro de benzalconio), LM-HS (*L. monocytogenes* adaptada a hipoclorito sódico), LM-AP (*L. monocytogenes* adaptada a ácido peracético).

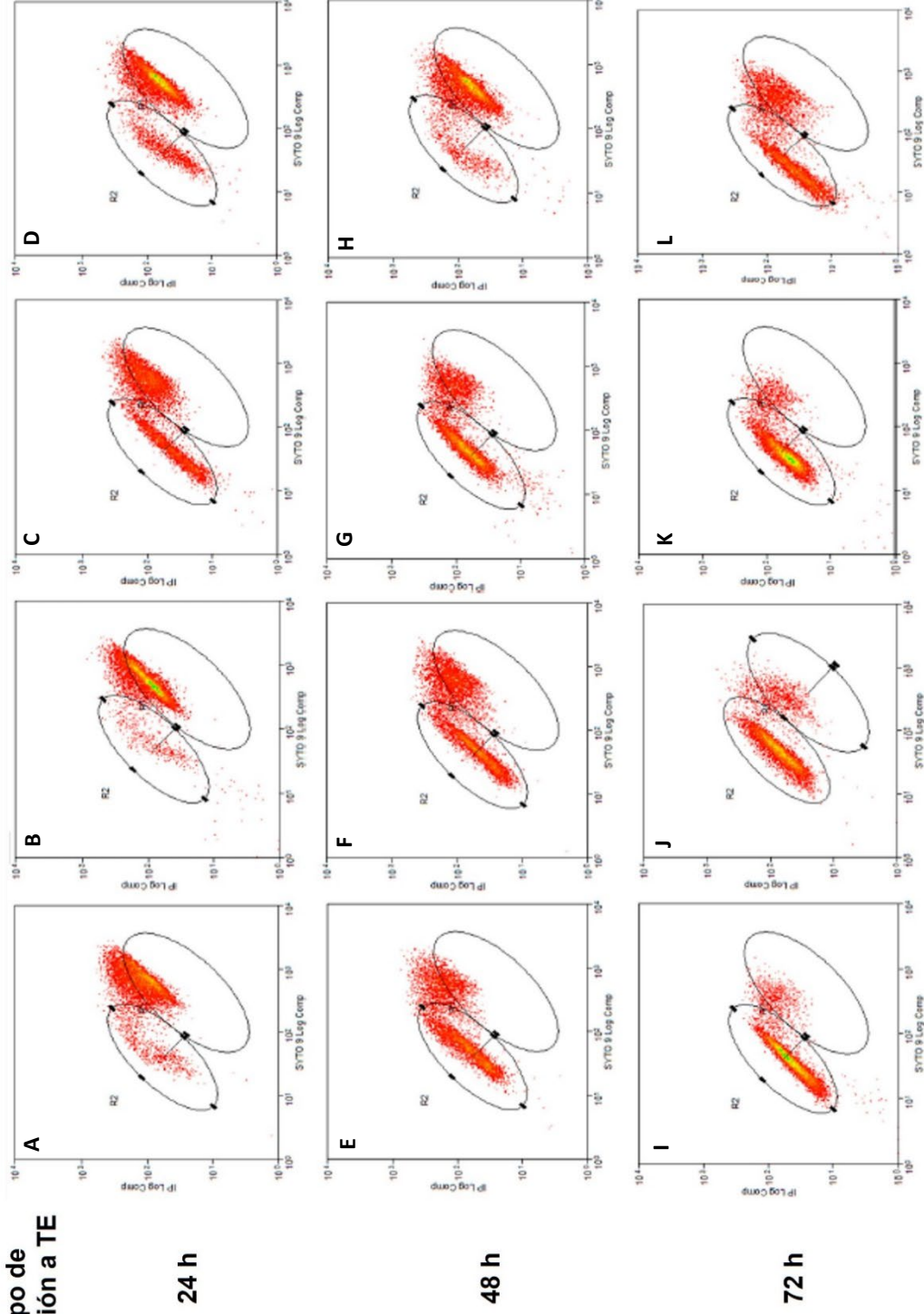


Figura V.4. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 500 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.

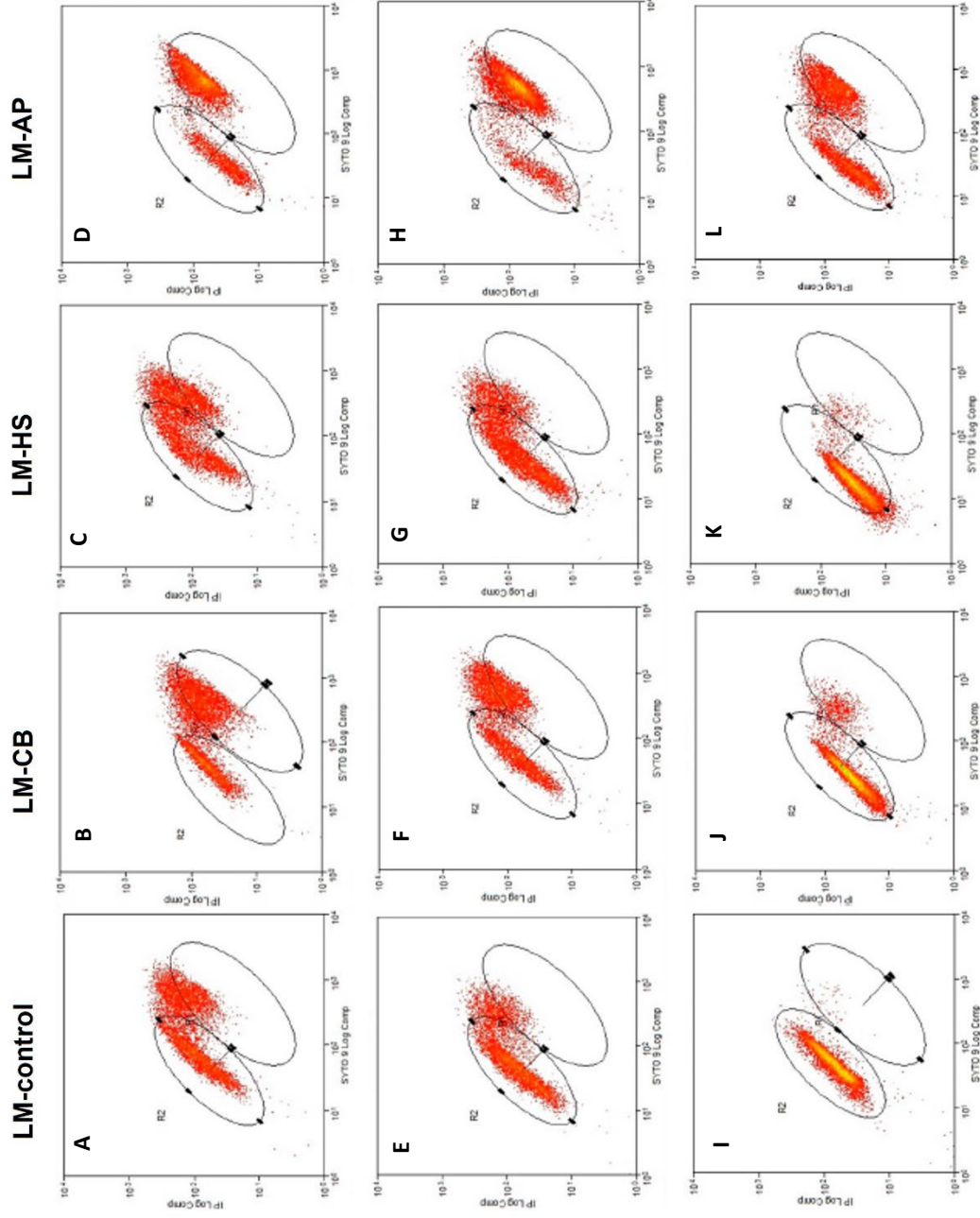
Cepa

Tiempo de
exposición a TE

24 h

48 h

72 h



LM-Control (sin adaptación previa a biocidas), LM-CB (*L. monocytogenes* adaptada a cloruro de benzalconio), LM-HS (*L. monocytogenes* adaptada a hipoclorito sódico), LM-AP (*L. monocytogenes* adaptada a ácido peracético).

Figura V.5. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 750 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.

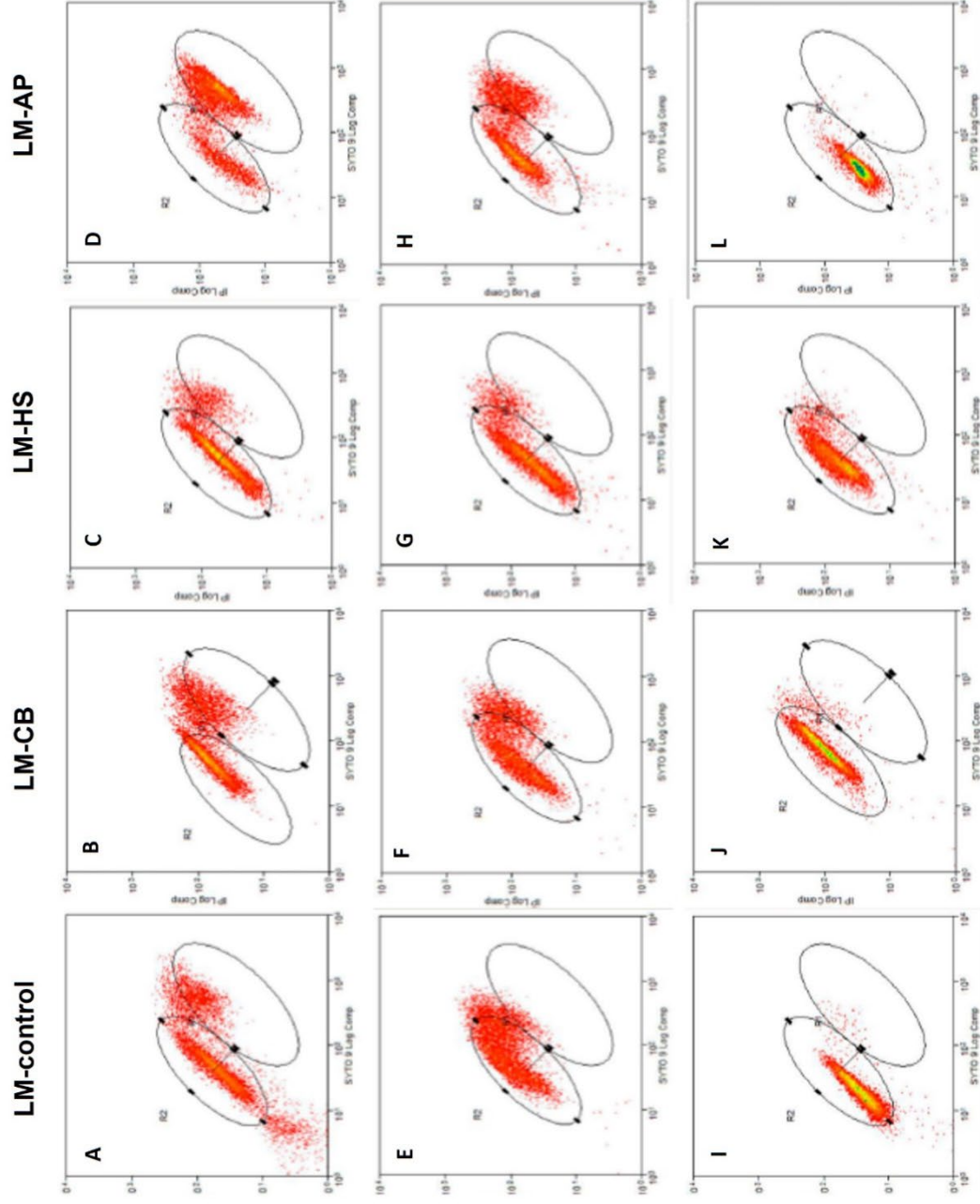
Cepa

Tiempo de
exposición a TE

24 h

48 h

72 h



LM-Control (sin adaptación previa a biocidas), LM-CB (*L. monocytogenes* adaptada a cloruro de benzalconio), LM-HS (*L. monocytogenes* adaptada a hipoclorito sódico), LM-AP (*L. monocytogenes* adaptada a ácido peracético).

Figura V.6. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 1.000 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.

Cepa

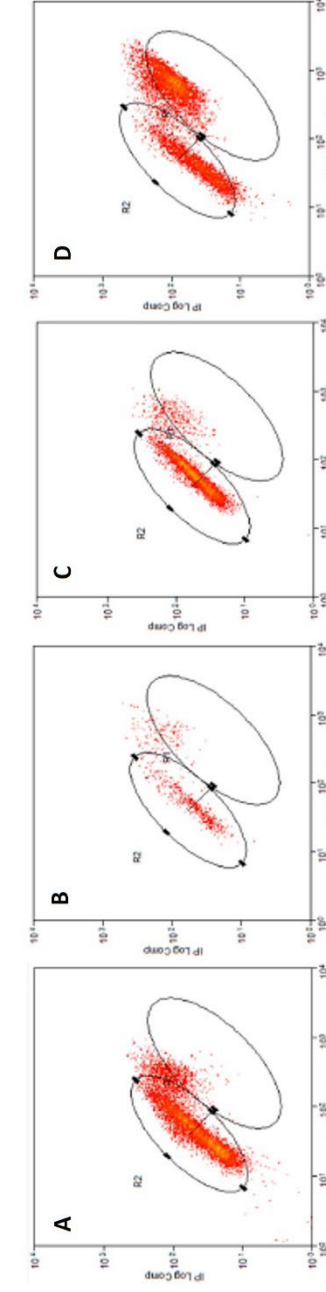
Tiempo de
exposición a TE

LM-control

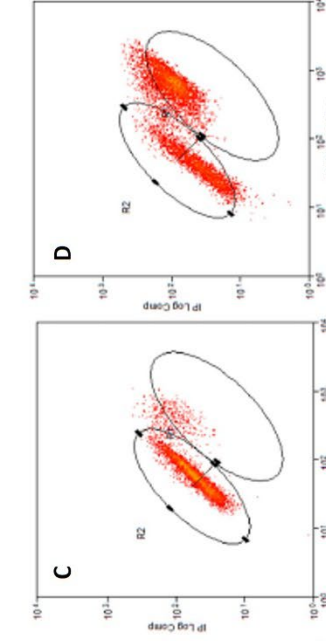
LM-CB

LM-HS

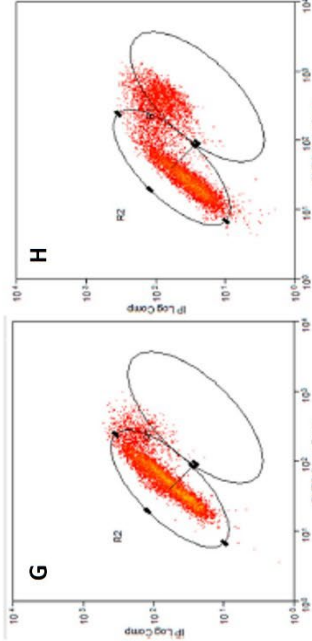
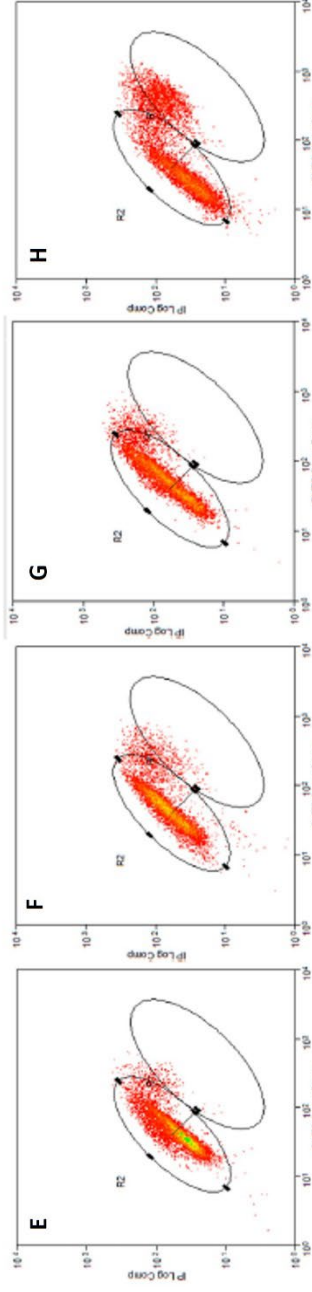
LM-AP



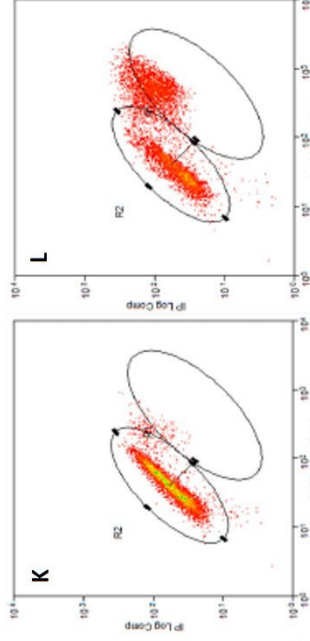
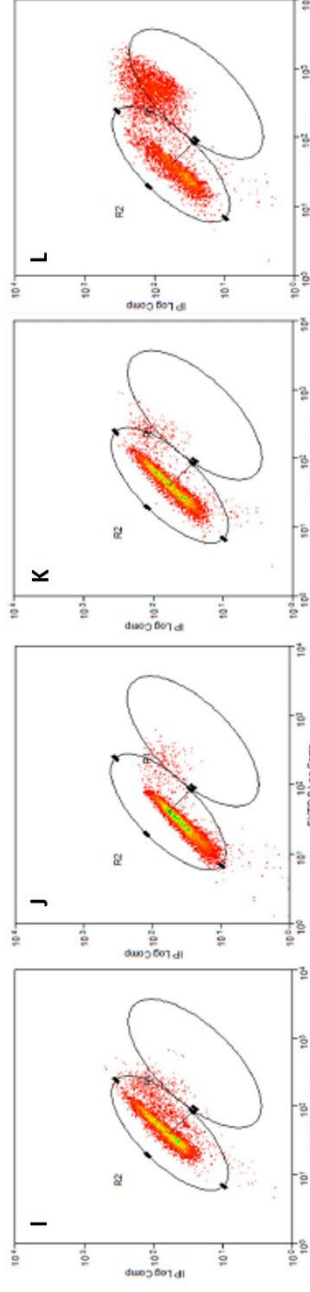
24 h



48 h

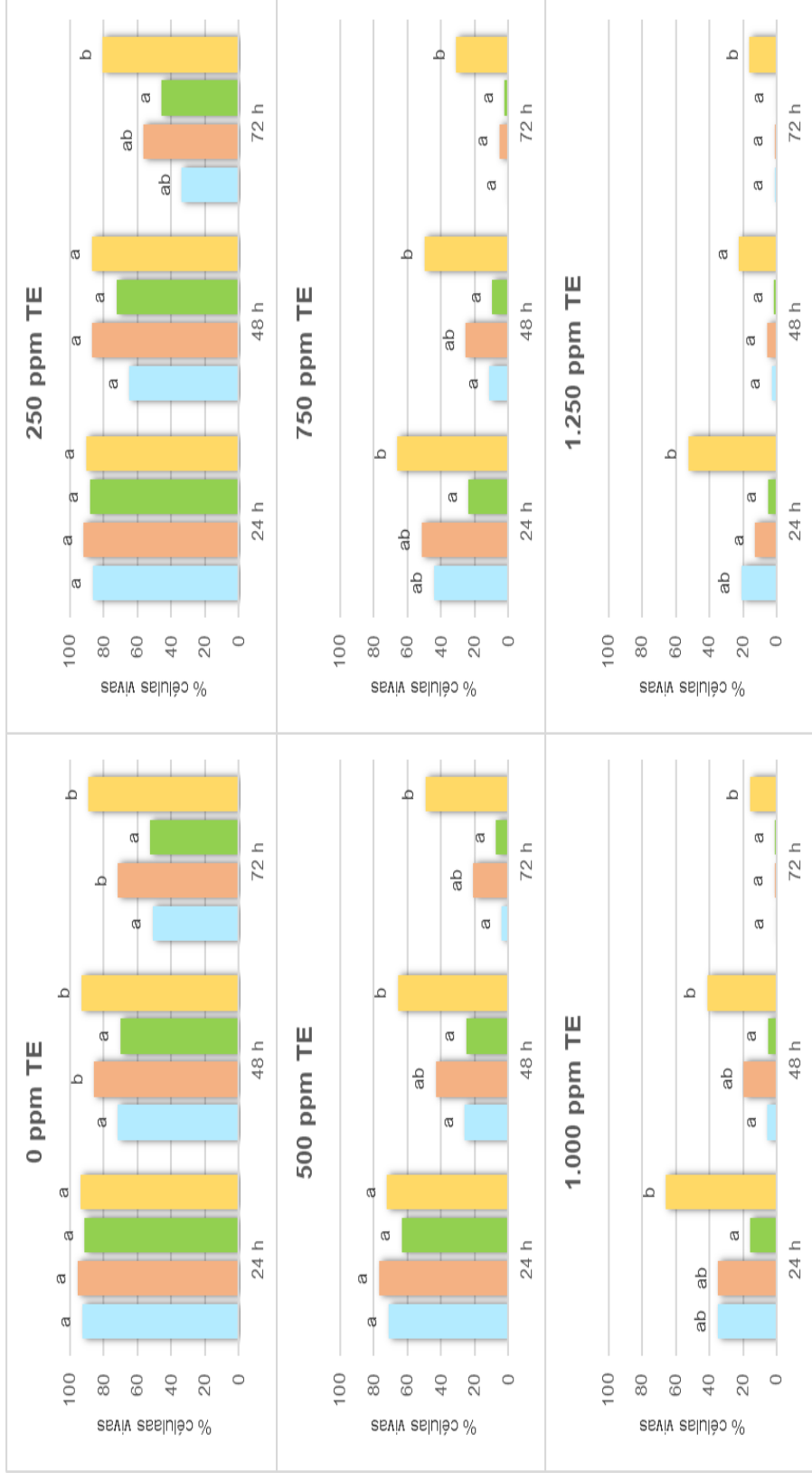


72 h



LM-Control (sin adaptación previa a biocidas), LM-CB (*L. monocytogenes* adaptada a cloruro de benzalconio), LM-HS (*L. monocytogenes* adaptada a hipoclorito sódico), LM-AP (*L. monocytogenes* adaptada a ácido peracético).

Figura V.7. Citogramas de células vivas (región 1, R1) y muertas (región 2, R2) de LM36 NCTC 11994 previamente adaptada a cloruro de benzalconio (CB: B, F, J), hipoclorito de sodio (HS: C, G, K) o ácido peracético (AP: D, H, L) o no adaptada (control: A, E, I) y expuesta a 1.250 ppm de tetraciclina durante 24 h (A, B, C, D), 48 h (E, F, G, H) o 72 h (I, J, K, L) a 30 °C.



Las columnas que, para una misma concentración de tetraciclina y tiempo de tratamiento comparten alguna letra no muestran diferencias significativas entre sí ($P > 0,05$).

Figura V.8. Porcentaje de supervivencia de *L. monocytogenes* (LM) adaptada a cloruro de benzalconio (CB), hipoclorito sódico (HS), ácido peracético (AP), o no adaptada (control) tras la exposición a diferentes concentraciones de tetraciclina (TE, ppm) durante 24 h, 48 h o 72 h a 30 °C.

Tabla V.2. Porcentaje (%) de células supervivientes tras el tratamiento con tetraciclina (se ensayaron diferentes concentraciones y tiempos de exposición) en cepas de *L. monocytogenes* previamente expuestas y no expuestas (control) a concentraciones subinhibitorias de biocidas.

Células previamente expuestas a ¹	Tiempo de exposición a tetraciclina (horas)	Concentración de tetraciclina (ppm)					
		0	250	500	750	1.000	1.250
Control (no expuestas)	24	92,79 ± 5,57 ^c	86,74 ± 19,87 ^b	71,16 ± 21,78 ^{b,c}	44,32 ± 31,13 ^{ab}	35,31 ± 32,96 ^{ab}	21,04 ± 34,23 ^a
	48	71,65 ± 10,83 ^b	64,79 ± 29,91 ^{b,ab}	25,87 ± 25,11 ^a	11,19 ± 14,72 ^a	5,55 ± 4,67 ^a	3,01 ± 2,96 ^a
	72	51,15 ± 15,67 ^c	34,04 ± 22,41 ^b	3,83 ± 3,95 ^a	0,58 ± 0,43 ^a	0,82 ± 0,48 ^a	1,34 ± 1,17 ^a
CB ²	24	95,54 ± 3,37 ^b	91,92 ± 7,09 ^b	77,00 ± 15,74 ^b	51,59 ± 17,84 ^b	35,01 ± 21,28 ^b	12,87 ± 9,62 ^b
	48	85,85 ± 9,54 ^{ab}	87,01 ± 6,04 ^b	43,21 ± 29,63 ^a	25,29 ± 20,09 ^{ab}	19,72 ± 18,81 ^{ab}	5,81 ± 7,26 ^{ab}
	72	71,64 ± 16,59 ^b	56,54 ± 32,73 ^b	20,85 ± 23,18 ^a	5,30 ± 5,04 ^a	1,44 ± 0,55 ^a	1,33 ± 1,09 ^a
HS ³	24	91,30 ± 6,16 ^c	88,22 ± 9,68 ^b	63,30 ± 27,02 ^b	23,73 ± 18,93 ^b	15,85 ± 14,62 ^{a,b}	5,30 ± 2,07 ^b
	48	70,27 ± 10,68 ^b	72,47 ± 13,44 ^b	25,03 ± 17,12 ^a	9,51 ± 10,89 ^{ab}	5,37 ± 4,72 ^{ab}	1,78 ± 0,86 ^a
	72	52,53 ± 8,18 ^b	45,83 ± 27,07 ^b	7,45 ± 3,92 ^a	2,30 ± 1,32 ^a	1,15 ± 0,43 ^a	0,93 ± 0,67 ^a
AP ⁴	24	93,83 ± 6,79 ^b	90,59 ± 6,42 ^b	72,05 ± 27,72 ^{ab}	66,07 ± 31,01 ^{ab}	65,78 ± 29,80 ^{ab}	52,65 ± 34,65 ^a
	48	93,42 ± 2,70 ^c	87,26 ± 4,20 ^c	65,69 ± 26,84 ^{b,c}	49,80 ± 30,54 ^{ab}	41,49 ± 28,42 ^{ab}	22,61 ± 28,75 ^a
	72	89,10 ± 9,64 ^c	80,68 ± 17,40 ^c	49,21 ± 37,09 ^b	31,04 ± 20,88 ^{ab}	16,08 ± 18,89 ^a	16,31 ± 19,08 ^a

¹, los cultivos se expusieron a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas hasta que dejó de observarse crecimiento; ², cloruro de benzalconio; ³, hipoclorito sódico; ⁴, ácido peracético; los valores (n = 5) que en la misma fila comparten alguna letra (superíndice) no muestran diferencias significativas entre sí; los valores que en la misma columna (se compararon diferentes tiempos para un mismo grupo de células) comparten alguna letra (subíndice) no muestran diferencias significativas entre sí.

4. DISCUSIÓN

4.1. Adaptación de *L. monocytogenes* a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas

En estudios previos se ha indicado que el empleo de concentraciones subinhibitorias de biocidas (como las que se han ensayado en el presente trabajo) es relativamente frecuente en los entornos de procesado de alimentos, bien como consecuencia de un cálculo incorrecto de las concentraciones, de una distribución irregular de los compuestos, o por la presencia de cantidades excesivas de materia orgánica, que inactiva algunos compuestos biocidas (por ejemplo, los compuestos clorados), entre otras causas (Alonso-Hernando *et al.*, 2009, 2011; Capita *et al.*, 2014).

El CB produjo la inhibición de crecimiento de *L. monocytogenes* a 2 ppm, la concentración más baja del conjunto de biocidas utilizados. En trabajos previos realizados con *L. monocytogenes* (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019) se han obtenido MICs de 3 ppm y 14 ppm, similares a los del presente estudio. Igualmente, el CB ha demostrado ser un biocida muy eficaz frente a otros microorganismos, en los que se han obtenido MICs de 2 ppm (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, MRSA; Buzón-Durán *et al.*, 2017), 8 ppm (*Salmonella enterica* serotipo Typhimurium; Capita *et al.*, 2017) o entre 15 y 20 ppm (*Cronobacter sakazakii* y *Yersinia enterocolitica*; Capita *et al.*, 2019a).

La MIC de HS observada en el presente estudio se situó también dentro del rango de valores previamente observado para cepas de otras bacterias Gram-positivas. Así, Buzón-Durán *et al.* (2017) y Rodríguez-Melcón *et al.* (2018a), determinaron que la MICs para cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y para *L. monocytogenes* del serotipo 1/2a, eran de 5.000 ppm (500 ppm de cloro libre) y 3.000 ppm (300 ppm de cloro libre), respectivamente. En el caso del AP, los valores de MIC observados por Capita *et al.* (2019a), fueron de entre 1.200 ppm y 1.275 ppm para cepas de bacterias Gram-negativas, concretamente de *Cronobacter sakazakii* y de *Yersinia enterocolitica*, respectivamente, valores que coinciden con los hallazgos de nuestro estudio. Sin embargo, otros autores (Alonso-Hernando *et al.*, 2011) obtuvieron valores de MIC de entre 100 y 110 ppm para *L. monocytogenes* utilizando peroxiácidos. Las diferencias en estos resultados pueden deberse a que no todos los microorganismos presentan la misma susceptibilidad a diferentes biocidas. Además, existen algunas diferencias en la composición de los biocidas, ya que algunos están formados por varios compuestos (Capita *et al.*, 2019b).

Tras haber realizado varios pases en medio de cultivo con concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas, la concentración máxima de HS que permitió el crecimiento bacteriano (3.935,5 ppm) fue superior a la MIC. Estos resultados coinciden con lo observado por Capita *et al.* (2019a), quienes pusieron de manifiesto que *Y. enterocolitica* se adaptó al

HS en presencia de dosis bajas del biocida; concretamente, tras ser expuesta a concentraciones crecientes subinhibitorias de HS, la cepa fue capaz de crecer en presencia de una concentración del compuesto 2,53 veces mayor que la MIC. Sin embargo, y para AP, los citados autores observaron una adaptación muy escasa, resultados que coinciden con los del presente estudio.

Algunos investigadores, como Sidhu *et al.* (2004), han observado que las bacterias ácido-lácticas previamente tolerantes al CB se adaptaban más fácilmente y a concentraciones superiores a dicho desinfectante que las bacterias sensibles al mismo. En el presente estudio con CB obtuvimos una adaptación 4,25 veces superior a la MIC, y superior al resto de biocidas estudiados. Los resultados del estudio realizado por Capita *et al.* (2019a) corroboran nuestros hallazgos, ya que en cepas de *C. sakazakii* observaron una adaptación de 3,8 veces la MIC. La reducción de la susceptibilidad a los biocidas después de la exposición repetida de las cepas a concentraciones subinhibitorias también se ha observado en estudios previos con enterobacterias como *E. coli* (Capita *et al.*, 2015) o *S. enterica* (Alonso-Hernando *et al.*, 2009; Capita *et al.*, 2017; Molina-González *et al.*, 2014).

4.2. Porcentajes de supervivencia a la tetraciclina de las células previamente expuestas y no expuestas a los biocidas

La citometría de flujo es una técnica basada en la formación de un flujo de partículas (generalmente células) ordenadas de forma lineal y con un caudal de entre 500 y 4.000 partículas/segundo. Gracias a este alineamiento, la técnica permite medir simultáneamente múltiples características de una sola célula, de tal forma que es posible caracterizar, separar y cuantificar las diferentes subpoblaciones celulares que se engloban en un conjunto. Además, utilizando diferentes fluorocromos, se pueden estudiar diversos parámetros bacterianos (potencial de membrana, tamaño celular, actividad enzimática, integridad de la membrana celular y concentración microbiana) que pueden aportar información sobre la sensibilidad a los antibióticos de los microorganismos y de cada una de sus células individuales (Jarzembowski *et al.*, 2008; March-Roselló, 2017).

Hasta donde llega nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero en determinar, mediante citometría de flujo, el efecto de la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de 3 biocidas comúnmente utilizados en las industrias alimentarias (CB, HS, AP) sobre la susceptibilidad de *L. monocytogenes* a antibióticos, en este caso tetraciclina. Nuestros resultados mostraron que la citometría de flujo puede ser una técnica muy útil para la evaluación de los efectos de la tetraciclina sobre células de *L. monocytogenes* sometidas a diferentes condiciones. Así, mediante la tinción con SYTO9 y YP, se pudieron diferenciar claramente las células viables con membranas intactas y las células inactivadas.

La utilidad del kit BacLight para evaluar la viabilidad bacteriana ha sido muy estudiada (Capita *et al.*, 2019b; Robertson *et al.*, 2019; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018b, 2019). Se han utilizado una variedad de concentraciones de colorantes, tiempos de incubación de los fluorocromos, cepas bacterianas, medios de cultivo y tinciones, así como longitudes de onda de excitación y emisión, habiéndose obtenido, en general, una buena distinción entre células vivas y muertas. Algunos estudios indican que el kit BacLight para la detección de la viabilidad celular de *L. monocytogenes* por citometría de flujo proporciona tinciones rápidas y reproducibles, con alta intensidad de fluorescencia y sensibilidad, a la par que una buena correlación de los resultados con el número de unidades formadoras de colonias (Jacobsen *et al.*, 1997).

Como se ha mencionado con anterioridad, el SYTO9 es un colorante que confiere a los ácidos nucleicos bacterianos una fluorescencia verde (510 - 540 nm) y puede penetrar en células bacterianas tanto intactas como dañadas. Después de la incubación con SYTO9, prácticamente todas las bacterias emiten fluorescencia verde tras la excitación con luz azul, lo que permite el recuento de células totales. En contraste, el YP no puede penetrar en bacterias con las membranas intactas. Por ello, la emisión de fluorescencia roja (620-650 nm) solo está asociada a bacterias permeabilizadas (Freire *et al.*, 2014). Cuando ambos colorantes están presentes en la misma célula, la emisión de SYTO9 disminuye debido al desplazamiento de un colorante por el otro, dada la mayor afinidad del YP por los ácidos nucleicos.

En nuestro estudio, pudimos observar una clara separación de dos subpoblaciones concretas utilizando los colorantes SYTO9 y YP conjuntamente en ambas muestras (Figura V.1), de modo que se establecieron, a partir de los controles realizados, las regiones delimitantes de dichas subpoblaciones presentes en las muestras tratadas con TE. La señal de fluorescencia para ambos colorantes fue adecuada, ya que se mostraron porcentajes superiores al 98% para ambas subpoblaciones (Figura V.1), de forma que se aseguró que el SYTO9 solamente iba a presentar intensidad elevada en R1, y el YP en R2. En las Figuras V.3-V.7, se muestra una clara disminución de la fluorescencia del SYTO9 en las células control expuestas a tetraciclina (gráficas A, E, I), ya que apenas hubo detección de fluorescencia en la R1. Algunos autores, como Stiefel *et al.* (2015) corroboran nuestros resultados, ya que demostraron que el desplazamiento de SYTO9 por YP es efectivo, tal y como se esperaba, ya que observaron una señal 9 veces más débil de SYTO9 en las células muertas de *S. aureus* que en las vivas.

En el presente estudio se ha podido observar con precisión el efecto de la tetraciclina en la viabilidad de *L. monocytogenes* adaptada o no a biocidas (Figuras V.2-V.7). Otros autores (Freire *et al.*, 2014) han demostrado también la utilidad de la citometría de flujo para estudiar la permeabilidad bacteriana inducida por antibióticos. Novo *et al.* (2000), utilizando técnicas de citometría de flujo, demostraron que concentraciones de tetraciclina de 4 µg/ml

permeabilizaban la membrana del 50% de las células bacterianas de *S. aureus* y *Micrococcus luteus* teñidas con TO-PRO-3 (fluorescencia roja, muertas) y DiOC₂ (fluorescencia verde, vivas) tras 4 h de exposición al fármaco. Estos resultados no coinciden con nuestro estudio, ya que se necesitaron concentraciones más elevadas de TE y tiempos más prolongados para eliminar el 50% de la población bacteriana de *L. monocytogenes*. De acuerdo con lo expuesto en las Figuras V.3-V.7, se necesitaron concentraciones de 500 ppm de TE durante 24 h para alcanzar una viabilidad celular del 55,23%. Todo ello puede explicarse por la variabilidad microbiana y, aunque la tetraciclina actúa principalmente en la síntesis de proteínas, este fármaco también es capaz de actuar perturbando la membrana celular a concentraciones superiores a las MIC (Novo *et al.*, 2000).

Por su parte, Jarzembowski *et al.* (2008) señalaron que la citometría de flujo puede usarse como un ensayo rápido y sencillo para la detección de resistencia a antibióticos como la penicilina, pero no está claro si puede servir para distinguir entre mecanismos de resistencia a dicho fármaco. Algunos autores como Wilson *et al.* (2018) han indicado que la resistencia a la tetraciclina en cepas de *L. monocytogenes* se ha relacionado con elementos genéticos móviles que incluyen los genes de resistencia a la tetraciclina *tetA*, *tetK* y *tetL*, que codifican la síntesis de proteínas de la bomba de expulsión de protones, así como *tetM* y *tetS*, enfocados a la síntesis de proteínas de protección ribosómica.

De acuerdo con lo indicado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020), se puede considerar que *L. monocytogenes* es susceptible a TE en una dosis igual o inferior a 4 mg/l, de acuerdo con los datos establecidos para *Staphylococcus* spp. En el presente estudio se ha observado que una sola dosis de 750 ppm de tetraciclina durante 72 h de exposición (0,584% de células vivas, Figura V.4) puede ser efectiva para el tratamiento de la listeriosis, presentando una concentración microbiana de partida de aproximadamente 10⁸ ufc/ml; estos resultados sugieren que la cepa ensayada para el estudio presenta un elevado grado de resistencia al antibiótico. En el mismo sentido, Obaidat *et al.* (2015) señalaron la existencia de una alta frecuencia (concretamente el 90,5%) de cepas de *L. monocytogenes* (aisladas de peces de 3 países diferentes) resistentes a la tetraciclina. Por el contrario, otros investigadores (Wilson *et al.*, 2018) no encontraron ninguna cepa resistente a TE entre las 100 cepas aisladas de *L. monocytogenes* procedentes de diversos productos alimenticios.

Los resultados mostrados en las Figuras V.2-V.8 y en la Tabla V.2 ponen de manifiesto claros cambios en la resistencia de la cepa a la tetraciclina tras la exposición a dosis subinhibitorias de los biocidas. En la concentración más alta estudiada (1.250 ppm), se observó un porcentaje de células vivas no adaptadas a biocidas de un 21,04% a las 24 horas de exposición a TE, mientras que las adaptadas a AP presentan porcentajes de supervivencia del 52,65%. Las células adaptadas a HS, por el contrario, presentaron resultados similares a las células expuestas a CB, con un 5,30% y 12,87%, respectivamente, de viabilidad tras 24

horas de exposición a 1.250 ppm de TE. De acuerdo con lo estudiado por Bansal *et al.* (2018), la exposición a concentraciones subletales de HS provoca un estrés oxidativo relacionado con cambios en la ultraestructura celular, como el grosor de la pared celular, la forma de la membrana o modificaciones citoplasmáticas, en cepas de *L. monocytogenes* y, por consiguiente, un incremento de su vulnerabilidad al antibiótico.

Algunos estudios previamente publicados en los que se han ensayado diferentes desinfectantes y cepas bacterianas, proporcionaron diversas perspectivas en relación con la aparición de resistencias debido al uso de biocidas. Así, Molina-González *et al.* (2014) y Randall *et al.* (2007) observaron que el uso de ciertos tipos de biocidas puede incrementar la resistencia de *Salmonella enterica* a diversos desinfectantes y antibióticos. Otros autores, como Potenski *et al.* (2003), han señalado que la exposición de bacterias Gram-negativas a concentraciones subletales de aditivos, como el ácido acético, incrementaban la resistencia a múltiples antibióticos, entre ellos la tetraciclina. Por su parte, Romanova *et al.* (2006), estudiaron el comportamiento de cepas de *L. monocytogenes* naturalmente sensibles a CB. Después de la adaptación de las mismas a CB, comprobaron que estas cepas presentaban adaptación cruzada a otros compuestos de amonio cuaternario con un modo de acción similar, y a ciertos antibióticos, como gentamicina y kanamicina, pudiendo deberse todo ello a fenómenos de resistencia cruzada entre antibióticos y desinfectantes. Esto respalda la opinión de Levy (2002), quien indica que la adaptación cruzada puede estar relacionada con la expresión de bombas de expulsión inespecíficas.

Sin embargo, existen escasos estudios que relacionen la adaptación cruzada a AP y la disminución de la sensibilidad a antibióticos en cepas de bacterias Gram-positivas (Kampf, 2019). Por ello, los resultados obtenidos en el presente estudio ofrecen datos nuevos sobre el incremento de la resistencia de *L. monocytogenes* a la TE tras la adaptación a dosis crecientes subinhibitorias de AP (Figura V.8).

Se ha observado un marcado aumento del porcentaje de células inactivadas de LM a las 72 horas de exposición al antibiótico, especialmente en el caso de las células control (no adaptadas a biocidas) y en las expuestas a HS. Es de destacar la elevada resistencia a la TE mostrada por las células previamente expuestas a AP, hecho que sugiere la importancia de emplear este desinfectante a las concentraciones adecuadas.

Como se ha indicado con anterioridad, en algunos casos se observaron en los citogramas representaciones fuera de las regiones seleccionadas a partir de la Figura V.1. En este sentido, algunos autores (Paparella *et al.*, 2008) han observado en sus investigaciones que, con el uso de aceites esenciales, se observaban 3 subpoblaciones diferentes: células viables, células muertas y células lesionadas, aumentando esta última población conforme se aumentaba la concentración de los compuestos. Estos resultados coinciden parcialmente con los hallazgos de nuestro estudio, ya que a medida que se aumenta el tiempo de exposición a TE, va

disminuyendo el porcentaje de representaciones situadas fuera de las regiones R1 y R2 (véase Figuras V.2 a V.7) y van sumándose a la región R2 (muertas).

En el caso de las células adaptadas a AP, no se consiguió una mortalidad cercana al 100% a ninguno de los tiempos de exposición estudiados, ni a las concentraciones de TE más elevadas ensayadas (1.250 ppm). Estos resultados son preocupantes, ya que la tetraciclina se emplea con frecuencia para el tratamiento de la listeriosis en pacientes con alergia a los betalactámicos (Olaimat *et al.*, 2018; Wilson *et al.*, 2018).

Conclusiones

La exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de HS y CB provocó la adaptación de la cepa LM NCTC 11994 (serotipo 4b) a los biocidas, especialmente al segundo, aumentando en más de 4 veces la concentración de compuesto que fue capaz de resistir tras la adaptación. Además, el contacto con dosis bajas de CB y, especialmente, de AP, incrementó la resistencia de las células bacterianas a la tetraciclina, lo que supone un hallazgo preocupante, ya que se trata de un antibiótico comúnmente utilizado para el tratamiento de la listeriosis como alternativa a los betalactámicos.

Los resultados obtenidos sugieren la utilidad de la técnica de citometría de flujo para estudiar la resistencia a los antibióticos de células de *L. monocytogenes* sometidas a diferentes condiciones, destacándose su rapidez y simplicidad. No obstante, se precisan estudios adicionales, utilizando más cepas de *L. monocytogenes* y antimicrobianos, para obtener resultados concluyentes en relación con el uso de concentraciones subinhibitorias de biocidas y el posible desarrollo de resistencia a antibióticos, así como para validar la técnica de citometría de flujo con esta finalidad. Además, se debería determinar si los aumentos en la resistencia observados *in vitro* son de importancia clínica.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. (2011). Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* **20**(12): 1108-1111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.011>
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. (2009). Adaptation and cross-adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants. *Journal of Microbiology* **47**(2): 142–146. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0237-5>
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2012). Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* **23**(2): 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.006>
- Ariza-Miguel, J., Fernández-Natal, M. I., Soriano, F., Hernández, M., Stessl, B., Rodríguez-Lázaro, D. (2015). Molecular epidemiology of invasive listeriosis due to *Listeria monocytogenes* in a Spanish hospital over a nine-year study period, 2006-2014. *BioMed Research International* **2015**: 191409. <https://doi.org/10.1155/2015/191409>
- Bansal, M., Nannapaneni, R., Sharma, C. S., Kiess, A. (2018). *Listeria monocytogenes* response to sublethal chlorine induced oxidative stress on homologous and heterologous stress adaptation. *Frontiers in Microbiology* **9**: 2050. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02050>
- Buzón-Durán L., Alonso-Calleja C., Riesco-Peláez F., Capita R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**: 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.003>
- Capita R., Buzón-Durán L., Riesco-Peláez F., Alonso-Calleja C. (2017). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* **14**(6): 350-356. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2241>
- Capita R., Fernández-Pérez, S., Buzón-Durán L., Alonso-Calleja C. (2019b). Effect of sodium hypochlorite and benzalkonium chloride on the structural parameters of the biofilms formed by ten *Salmonella enterica* serotypes. *Pathogens* **8**(3): 154. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030154>
- Capita R., Riesco-Peláez F., Alonso-Hernando A., Alonso-Calleja C. (2014). Exposure of

- Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(4): 1268-80. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>
- Capita R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Alonso-Calleja C. (2019a). Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports* **9**: 15905. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51907-1>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, C. (2001). Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology* **65**(1-2): 75-82. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00497-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00497-9)
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**(1): 11-48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- CLSI (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania (USA). Disponible en: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf> (Fecha de último acceso: 15 de diciembre de 2021).
- EFSA y ECDC (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* **19**(12): 6971. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- Freire, J. M., Gaspar, D., García de la Torre, B., Veiga, A. S., Andreu, D., Castanho, M. A. R. B. (2015). Monitoring antibacterial permeabilization in real time using time-resolved flow cytometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* **1848**(2): 554-560. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.11.001>
- Henriques, A. R., Fraqueza, M. J. (2017). Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from ready-to-eat meat-based food products food chain. *LWT - Food Science and Technology* **81**: 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.045>
- Jacobsen, C. N., Rasmussen, J., Jakobsen, M. (1997). Viability staining and flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods* **28**(1): 35-43. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(96\)00960-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(96)00960-8)
- Jamshidi, A., Zeinali, T. (2019). Significance and characteristics of *Listeria monocytogenes* in poultry products. *International Journal of Food Science* **2019**: 7835253, 1–7.

<https://doi.org/10.1155/2019/7835253>

Jarzembowski, T., Wiśniewska, K., Józwik, A., Bryl, E., Witkowski, J. (2008). Flow cytometry as a rapid test for detection of penicillin resistance directly in bacterial cells in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology* **57**: 167–169.

<https://doi.org/10.1007/s00284-008-9179-8>

Kampf, G. (2019). Antibiotic resistance can be enhanced in Gram-positive species by some biocidal agents used for disinfection. *Antibiotics* **8**(1): 13.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics8010013>

Levy, S. B. (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance.

Journal of Applied Microbiology **92**(1): 65S - 71S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.4.x>

Lomonaco, S., Nucera, D., Filipello, V. (2015). The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution* **35**:

172-183. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.008>

March-Roselló, G. A. (2017). Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (EIMC) **35**(3): 182-188.

<https://doi.org/10.1016/j.eimce.2017.02.007>

Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2014). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* **40**: 329–334.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.046>

Novo, D. J., Perlmutter, N. G., Hunt, R. H., Shapiro, H. M. (2000). Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability,

and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**(4): 827-834. [https://doi.org/10.1128/aac.44.4.827-](https://doi.org/10.1128/aac.44.4.827-834.2000)

[834.2000](https://doi.org/10.1128/aac.44.4.827-834.2000)

Obaidat, M. M., Bani Salman, A. E., Lafi, S. Q., Al-Abboodi, A. R. (2015). Characterization of *Listeria monocytogenes* from three countries and antibiotic resistance differences among

countries and *Listeria monocytogenes* serogroups. *Letters in Applied Microbiology* **60**(6):

609-614. <https://doi.org/10.1111/lam.12420>

Olaimat, A. N., Al-Holy, M. A., Shahbaz Al-Nabusi, A. A., Abu Ghoush, M. H., Osaili, T. M., Ayyash, M. M., Holley, R. A. (2018). Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from food products: a comprehensive review. *Comprehensive*

Comprehensive Reviews in Food Safety and Food Quality **17**: 1-12.

Reviews in Food Science and Food Safety **17**(5): 1277 - 1292.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12387>

Ortiz, S., López-Alonso, V., Rodríguez, P., Martínez-Suárez, J. V. (2016). The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: evidence from comparative genome analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **82**: 308–317.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02824-15>

Paparella, A., Taccogna, L., Aguzzi, I., Chaves-López, C., Serio, A., Marsilio, F., Suzzi, G. (2008). Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **19**(12): 1174 - 1182.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.01.002>

Potenski, C. J., Gandhi, M., Matthews, K. R. (2003). Exposure of *Salmonella* Enteritidis to chlorine or food preservatives increases susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters* **220**(2): 181 - 186. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00099-5)

Randall, L. P., Cooles, S. W., Coldham, N. G., Penuela, E. G., Mott, A. C., Woodward, M. J., Piddock, L. J. V., Webber, M. A. (2007). Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60**(6): 1273–1280, <https://doi.org/10.1093/jac/dkm359>

Robertson, J., McGoverin, C., Vanholsbeeck, F., Swift, D. (2019). Optimisation of the protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit for rapid determination of bacterial load. *Frontiers in Microbiology* **10**: 801. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00801>

Rodríguez-Melcón, C., Capita, R., Rodríguez-Jerez, J., Martínez-Suárez, J., Alonso-Calleja, C. (2018a). Effect of low doses of disinfectants on the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* **16**(4): 262 - 268
<https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2472>

Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., Carballo, J., García-Fernández, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2018b). Structure and viability of 24- and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology* **76**: 513 - 517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>

Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology* **82**: 533-540.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020>

- Romanova, N. A., Wolffs, P. F. G., Brovko, Y. L., Griffiths, M. W. (2006). Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(5): 3498 - 3503. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3498-3503.2006>
- Sidhu, S. M., Langsrudy, S., Langsrud, S., Holck, A. (2004). Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from the food industry. *Microbial Drug Resistance* **7**(1): 73 – 83. <https://doi.org/10.1089/107662901750152846>
- Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., Ren, Q. (2015). Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology* **15**: 36. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>
- Waghmare, R. B., Annapure, U. S. (2015). Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. *Food Packaging and Shelf Life* **3**: 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.11.001>
- WHO: World Health Organization (2014). Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. 256 pp. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=5554873D47E5994E9756DA03188041BD?sequence=1 (Fecha de último acceso: 14 de marzo de 2021).
- Wilson, A., Gray, J., Chandry, P. S., Fox, E. M. (2018). Phenotypic and genotypic analysis of antimicrobial resistance among *Listeria monocytogenes* isolated from Australian food production chains. *Genes (Basel)* **9**(2): 80. <https://doi.org/10.3390/genes9020080>

CAPÍTULO VI

**Cuantificación de células totales y viables y
determinación de patrones de resistencia a antibióticos
de *Listeria monocytogenes* en carne de ave**

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La producción de carne de ave es una de las más extendidas en todo el mundo, siendo el pollo la especie de cría más común (Nhung *et al.*, 2017), con más de 114 millones de toneladas producidas en el año 2018 (FAOSTAT, 2020). En 2017, la carne de ave representó aproximadamente el 37% de la producción mundial de carne, siendo Estados Unidos el mayor productor (con un 18% de la producción total de carne de ave) seguido de China y Brasil (FAO, 2020). La Unión Europea ocupa el cuarto lugar, representando el 12,4% del total de carne de ave producida (MAPA, 2020).

En 2017, el consumo mundial per cápita de carne de ave se situó en 15,2 kilogramos, sólo superado por la carne de cerdo (15,7 kg) (FAOSTAT, 2020). El elevado consumo de dicho tipo de carne (ave), puede atribuirse a su variedad, versatilidad y bajo contenido en grasa. Además, es un alimento económico, fácil de cocinar, ofrece cualidades sensoriales agradables y es aceptable para casi todas las culturas y religiones (Cardoso Pereira y Baltazar Vicente, 2013).

Una cierta proporción de dicho alimento se consume en forma de preparaciones cárnicas. El Reglamento (CE) Nº 853/2004 define las preparaciones cárnicas (por ejemplo, carne picada), como carne fresca, incluida la carne que ha sido reducida a fragmentos, a la que se le han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que ha sufrido procesos insuficientes para modificar la estructura interna de la fibra muscular de la carne, y así eliminar las características de la carne fresca (Capita *et al.*, 2020). Los preparados cárnicos son adecuados para una amplia variedad de técnicas de cocinado, satisfaciendo así las demandas de los consumidores, que prefieren los productos listos para consumir ya que el ahorro de tiempo en la preparación de alimentos se ha convertido en una prioridad para la mayoría de las familias (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Selvan *et al.*, 2007).

El alto consumo de carne de ave justifica el interés por que los productos comercializados sean seguros y presenten una composición, sabor, color y apariencia adecuados. Los productos excesivamente contaminados con microorganismos son indeseables tanto desde el punto de vista económico como desde la perspectiva de la Salud Pública (Del Río *et al.*, 2007).

El músculo de un animal sano es esencialmente estéril, pero incluso en condiciones de estricta higiene puede contaminarse con bacterias patógenas o alterantes durante el proceso de faenado (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2017). Hay una serie de grupos microbianos, como la microbiota aerobia viable, los microorganismos psicrotrofos y las enterobacterias, cuyo recuento en carne permite evaluar su seguridad microbiológica, las condiciones higiénicas

durante el procesado, el grado de alteración de los productos y la vida útil de los mismos (Álvarez-Astorga *et al.*, 2002; Del Río *et al.*, 2007).

La contaminación de la carne de ave por microorganismos patógenos, como *Listeria monocytogenes*, es una preocupación de magnitud mundial (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018). *Listeria monocytogenes* es una bacteria Gram-positiva con forma de bacilo, anaerobia facultativa, psicotrofa y no formadora de esporas. Este microorganismo es responsable de la listeriosis, una infección cuya principal vía de transmisión al ser humano es a través de la ingesta de alimentos contaminados (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019). Anualmente se producen en el mundo en torno a 23.000 casos de listeriosis invasiva (Rodríguez-Campos *et al.*, 2019). Por lo que respecta a la Unión Europea, en 2020 se registraron 1.876 casos de listeriosis invasiva, lo que supone una tasa de notificación de 0,42 casos por cada 100.000 habitantes. El grupo de edad más afectado por esta enfermedad fue el de los mayores de 64 años, particularmente el grupo con más de 84 años, con una tasa de letalidad del 13,0 %, siendo la más alta entre todas las enfermedades de transmisión alimentaria (EFSA y ECDC, 2021). Estos hechos convierten a la listeriosis en una de las enfermedades más graves transmitidas por los alimentos.

Los métodos estándar oficiales para detectar microorganismos patógenos, como *L. monocytogenes*, se basan en el enriquecimiento y cultivo en un medio selectivo. Tienen algunos inconvenientes, como el largo tiempo de análisis o problemas asociados a la presencia de células bacterianas que son viables, pero no cultivables, ya que estas no se detectarían con tales métodos (Barretta *et al.*, 2019). Varias técnicas más rápidas, como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), son alternativas efectivas para la detección y cuantificación de microorganismos patógenos en los alimentos. Además, si se utilizan junto con un marcador de viabilidad, es posible cuantificar exclusivamente las células viables, no solo las totales.

En los últimos años se ha observado un incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos, problema que afecta no sólo a los principales microorganismos patógenos, sino también a una amplia gama de sustancias antimicrobianas. La presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en los alimentos es preocupante, en vista de la posibilidad de que se produzca una infección, bien como consecuencia de la manipulación de alimentos contaminados o por su consumo (cuando se producen eventos de insuficiente cocinado o de contaminación cruzada). Además, las bacterias resistentes a los antimicrobianos pueden constituir un reservorio de genes de resistencia transferibles a otras bacterias en la cadena alimentaria (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Se estima que dentro de tres décadas las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos se convertirán en la principal causa de mortalidad, provocando aproximadamente diez millones de fallecimientos anuales en todo el mundo (Capita *et al.*, 2019). Para comprender la magnitud de este problema, dichas cifras deben compararse con las 700.000 muertes atribuibles a la resistencia a los antibióticos en 2014 (O'Neill, 2016). Las consecuencias económicas asociadas a la resistencia a los antibióticos son considerables, habiéndose estimado que las infecciones asociadas a dicha resistencia implican un coste para los sistemas sanitarios de la UE y del EEU de 1,1 mil millones de euros anuales (OECD, 2019).

En este contexto se ha planteado el presente trabajo de investigación, cuyo objetivo ha sido conocer la prevalencia, los niveles y los patrones de resistencia a antibióticos de *Listeria monocytogenes* en muestras de carne picada de pollo en el noroeste de la península ibérica. También se determinaron los niveles de diferentes grupos microbianos indicadores de calidad higiénica. Con el fin de poner de manifiesto las diferencias entre países, las muestras fueron obtenidas en España y Portugal.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Se analizaron veinte muestras de carne picada de pollo, cada una con un peso aproximado de 400 gramos, adquiridas en diferentes puntos de venta en las ciudades de León (España; diez muestras) y Vila Real (Portugal; diez muestras). Todas las muestras fueron trasladadas en envoltorios individuales a los respectivos laboratorios de cada localización geográfica, donde se procesaron de inmediato tras su llegada.

2.2. Recuentos microbianos indicadores de calidad higiénica

Se depositaron 25 gramos de muestra, junto con 225 ml de agua de peptona al 0,1%, en bolsas estériles con filtro. La homogeneización se realizó durante 120 segundos en un homogeneizador de paletas (Stomacker, IUL Instruments, Barcelona, España). A partir de los homogeneizados se realizaron diluciones decimales utilizando el mismo diluyente y posteriormente se llevaron a cabo las siembras, por duplicado. En la Tabla VI.1 se muestran los medios de cultivo, las condiciones de incubación y las referencias usadas para cada uno de los grupos microbianos estudiados. Todos los medios de cultivo utilizados en esta investigación eran de la firma Oxoid Ltd. (Hampshire, Reino Unido).

Tabla VI.1. Medios de cultivo, condiciones de incubación y referencias para cada grupo microbiano estudiado.

Grupo microbiano	Medios de cultivo	Incubación		Referencia
		Hora	Temperatura (°C)	
Microbiota aerobia viable (MAV)	PCA ¹	3 días	30 °C	Jay (2002)
Microorganismos psicrotrofos	PCA ¹	10 días	7 °C	Cousin <i>et al.</i> (2001)
Enterobacterias	VRBGA ^{2,3}	24 horas	37 °C	Baird <i>et al.</i> (1987)

¹, agar para recuento en placa, técnica de siembra en superficie (0,1ml); ², agar cristal violeta, rojo neutro, sales biliares, glucosa, ³ técnica de siembra en profundidad (1 ml) con adición de sobrecapa. Las siembras se realizaron por duplicado.

2.3. Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*

Para la detección de *L. monocytogenes* se usó el método UNE-EN ISO 11290-1. Las muestras (25 g) se introdujeron en bolsas estériles con filtro y se homogenizaron (Stomacher, IUL) en 225 ml de caldo Half Fraser durante 120 segundos. Al cabo de 24 horas de incubación a 30 °C, se pasaron alícuotas de 100 µl a tubos con 10 ml de caldo Fraser, que se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se sembraron por estría placas de medio cromogénico OCLA. Tras incubación durante 48 horas a 37 °C de dichas placas, se tomaron, a partir de cada muestra, 5 colonias azul-verdosas con halo (presuntas cepas de *L. monocytogenes*), para su posterior identificación. Las cepas se conservaron a - 50 °C en caldo triptona de soja (TSB) con 20% de glicerol (Panreac AppliChem, Darmstadt, Alemania).

La identificación de las cepas aisladas se realizó empleando el método molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando cebadores y condiciones específicas para la detección del gen *Imo1030* (Tabla VI.2). Para el diseño de los primers se usó el Software Primer-Blast (Ye *et al.*, 2012).

Tabla VI.2. Genes y cebadores utilizados para la identificación por PCR de los aislamientos de *Listeria monocytogenes*.

Gen	Primer	Secuencia (5' → 3')	T ^a de anillamiento (°C) (tamaño de la banda, pb)	Referencia
<i>Imo1030</i>	Lmo1030-F	GCTTGATTCACTTGGATTTGTCTGG	62 (509)	Ryu <i>et al.</i> , 2013
	Lmo1030-R	ACCATCCGCATATCTCAGCCAACT		

El ADN de las cepas se extrajo a partir de un medio de cultivo TSB incubado entre 18 y 24 horas a 37 °C, realizando dos centrifugaciones (13.000 rpm, 60 segundos) y su posterior exposición, en baño de agua, a 100 °C durante 30 minutos. La pureza y concentración del ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro Nano-Drop One (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE.UU.) fijando una longitud de onda de 260 nm. Se consideró adecuada una concentración de entre 80 ng/µl y 180 ng/µl.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 µl, utilizando 5 µl de ADN, 0,5 µM de cada cebador (Isogen Life Sciences, Barcelona, España), una mezcla 0,2 mM de desoxinucleósidos trifosfato (dNTP's) (EURx, Gdansk, Polonia), tampón de reacción a concentración 1× (EUR_x), MgCl₂ a concentración 3 mM (EUR_x), 1,25 U de ADN Taq

polimerasa (Bioron, GbmH, Ludwingshafen, Alemania) y agua destilada estéril (hasta completar un volumen final de 25 μ l).

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador Bio-Rad (Hercules, Contra Costa, California, EE.UU.) programado de la siguiente manera: un ciclo de desnaturalización inicial (a 95 °C durante 5 minutos), 35 ciclos de amplificación (95 °C durante 30 segundos de desnaturalización, 60 °C durante 30 segundos de alineamiento y una extensión a 72 °C durante 45 segundos), y, por último, una elongación final (a 72 °C durante 5 minutos). Los productos de la amplificación se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Bioron, GbmH, Ludwingshafen, Alemania) al 1% (peso/volumen) en tampón 1 \times Tris-acetato-EDTA teñidos con SimplySafe (EUR_x) diluido en proporción 1:10.000. Se utilizó un tampón de carga (glicerol, Panreac AppliChem, Darmstadt, Alemania) y colorante azul de bromofenol (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España). Para la visualización de las bandas de electroforesis se empleó un transiluminador UV (Gel Doc Sistem EZ, Bio-Rad). Se estimó el tamaño de cada producto de PCR utilizando marcadores de peso molecular estándar (escalera de ADN de 10 kb; Bioron). En todos los ensayos de PCR se incluyeron controles negativos (agua MilliQ) y positivos (*L. monocytogenes* ATCC 13932).

2.4. Detección y cuantificación de *L. monocytogenes* por q-PCR

Para la detección y cuantificación de *Listeria monocytogenes* en carne picada de pollo por q-PCR, se tomó una alícuota de 750 μ l del contenido de las bolsas de homogeneizado con agua de peptona al 0,1% (Oxoid), depositándose en un tubo de fondo redondo Falcon™ de 5 ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), que posteriormente se agitó con ayuda de un agitador orbital. Tras dicha agitación, se eliminó una cantidad de 750 μ l del contenido del tubo. La extracción de ADN se realizó con ayuda del kit PrepSEQ™ Rapid Spin Sample Preparation Extra Clean (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) con proteinasa K. Para la amplificación mediante q-PCR, se depositaron 30 μ l de las extracciones de ADN en cada uno de los pocillos del kit de detección de *Listeria monocytogenes* MicroSEQ™ (ThermoFisher Scientific). Tanto la extracción de ADN como la amplificación se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tras todo ello, se transfirió una cantidad de 800 μ l del tubo Falcon™ (Thermo Fisher Scientific) a un tubo Eppendorf estéril. A continuación, se añadió un volumen de 1 μ l del marcador de viabilidad PMAxx (Biotium, Fremont, California, EE.UU.), lo que supuso una concentración final de colorante de 25 μ M, agitándose esta mezcla con la pipeta. Las muestras con PMAxx se incubaron a 42 °C durante 30 minutos en la oscuridad, rotándose varias veces (manualmente) para favorecer la unión del colorante al ADN de las células dañadas. Las

muestras teñidas se expusieron a una fuente de luz halógena durante 15 minutos a una distancia de aproximadamente 20 centímetros, colocándose sobre un bloque de hielo cubierto de papel de aluminio para mejorar la reflexión de la luz. Posteriormente, se tomaron 750 μl del contenido del tubo Eppendorf y se procedió a la extracción del ADN mediante un kit de preparación de muestras PrepSEQ™ Rapid Spin con proteinasa K (Thermo Fisher Scientific). Para su amplificación mediante q-PCR, se pusieron 30 μl de los extractos de ADN en cada uno de los pocillos de un kit de detección MicroSEQ™ *L. monocytogenes* (Thermo Fisher Scientific). Tanto la extracción como la amplificación del ADN se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las muestras se colocaron en el termociclador StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos), fijando un umbral de fluorescencia en 0,3. Para transformar los ciclos de amplificación en cantidades de ADN, se utilizó una recta patrón ($y = -3,0525x + 23,206$; $R^2 = 0,966$), elaborada a partir de muestras con cantidades conocidas de ADN de *L. monocytogenes*, como se muestra en la Figura VI.1. Para extrapolar la cantidad de ADN en términos de concentraciones bacterianas (\log_{10} ufc /g de muestra) se tuvo en cuenta el tamaño del genoma de *L. monocytogenes*, considerándose que 1 ng de ADN equivale aproximadamente a 340.000 ufc (Glaser *et al.*, 2001). Los cálculos se realizaron sobre la base de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de } L. monocytogenes \left(\log_{10} \frac{\text{ufc}}{\text{g}} \right) = \log_{10} \left(\frac{10^{\frac{Ct-23,206}{-3,0525}} \times 340.000 \times 10^5}{750} \right) \text{ ufc/g}$$

Para elaborar esta ecuación, se tuvieron en cuenta varios elementos: 1) el volumen total de la bolsa de homogeneización (250 ml, es decir, 250.000 μl), 2) la dilución decimal realizada para producir el homogeneizado (25 g de muestra en 225 ml de diluyente), 3) el hecho de que el tubo de reacción reciba una décima parte de la cantidad total de ADN extraído (30 μl de 300 μl) y 4) que el ADN se haya extraído únicamente de 750 μl .

Para comparar los datos de detección de *L. monocytogenes* obtenidos con el método clásico (OCLA-PCR) y mediante q-PCR, se calculó la sensibilidad, especificidad, eficacia y valores predictivos del segundo método. Dado que se desconocía el grado de contaminación de las muestras, el método de cálculo asumía que la técnica convencional OCLA-PCR proporciona los resultados correctos, considerándose por ello como método de referencia. Adicionalmente, los dos métodos se compararon calculando el coeficiente *kappa*, o de concordancia (Capita *et al.*, 2001). Las definiciones y la forma de calcular estos parámetros se muestran en la Figura VI.2.

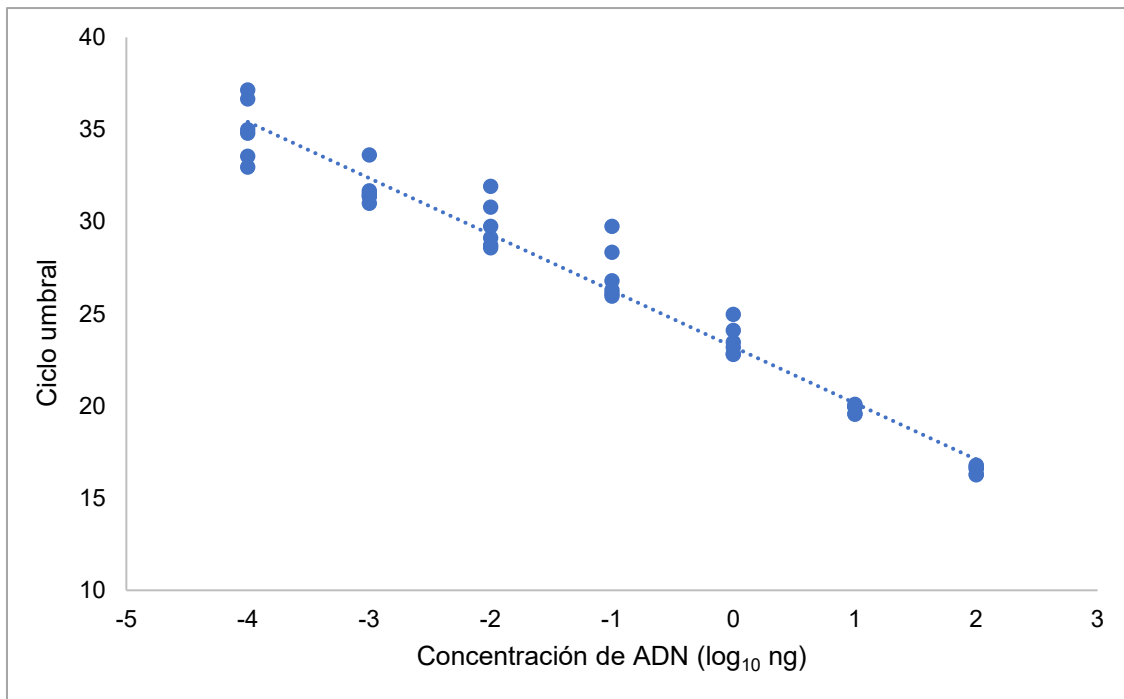


Figura VI.1. Recta patrón, realizada con concentraciones conocidas de ADN de *Listeria monocytogenes* (abscisas) y número de ciclos (q-PCR) correspondiente a cada una de esas concentraciones (ordenadas).

		OCLA-PCR ¹	
		+	-
q-PCR ²	+	a	b
	-	c	d

a = verdadero positivo, muestras con *L. monocytogenes* detectada con ambos métodos (convencional y q-PCR)

b = falso positivo, muestras con *L. monocytogenes* detectada por q-PCR pero no con el convencional

c = falso negativo, muestras con *L. monocytogenes* detectada con el método convencional pero no por q-PCR

d = verdadero negativo, muestras con *L. monocytogenes* no detectada con ninguno de los dos métodos

Sensibilidad (capacidad para detectar muestras con células viables cultivables de *L. monocytogenes*) = $a/(a+c)$

Especificidad (capacidad para detectar muestras sin células viables cultivables de *L. monocytogenes*) = $d/(b+d)$

Eficiencia (probabilidad de que el resultado sea correcto) = $(a+d)/n$; $n=a+b+c+d$

Valor predictivo:

de una prueba positiva (probabilidad de que un resultado positivo sea correcto) = $a/(a+b)$

de una prueba negativa (probabilidad de que un resultado negativo sea correcto) = $d/(c+d)$

Coeficiente *kappa* = $(\text{eficiencia} - X)/(1-X)$

$$X = [((a+b)/n) ((a+c)/n) + ((c+d)/n) ((b+d)/n)]$$

¹, OCLA-PCR, aislamiento por el método especificado por la norma UNE-EN ISO 11290-1 (en medio selectivo OCLA) con identificación de cepas presuntivas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); ², detección por PCR cuantitativa.

Figura VI.2. Definición y cálculo de la sensibilidad, especificidad, eficiencia, valor predictivo y coeficiente *kappa* de la q-PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada de pollo.

2.5. Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Se determinó la susceptibilidad de 70 cepas de *L. monocytogenes* (cinco colonias aisladas del medio OCLA para cada muestra positiva) a un panel de 15 antibióticos. Se empleó el método de difusión por disco descrito por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, EE.UU. (CLSI, 2018). Inicialmente, las cepas se cultivaron en tubos que contenían 9 ml de

caldo Mueller Hinton (MHB), tomándose 20 µl con un asa de inoculación de cada uno de los cultivos mantenidos en congelación. Estos tubos se incubaron durante 11 horas a 37 °C y, a partir de ellos, se sembraron placas de Petri de agar Mueller Hinton (MHA) mediante la técnica de cultivo de siembra en césped, con ayuda de un hisopo estéril. A continuación, se colocaron los discos de antibióticos (5 discos/placa), con pinzas estériles. Se utilizaron los siguientes discos de antibióticos (Oxoid): ampicilina (AMP, 10 µg), oxacilina (OX, 1 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), cefepima (FEP, 30 µg), gentamicina (CN, 10 µg), eritromicina (E, 15 µg), vancomicina (VA, 30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 25 µg), rifampicina (RD, 5 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), cloranfenicol (C, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), enrofloxacina (ENR, 5 µg) y nitrofurantoína (F, 300 µg).

Las placas (una vez colocados los discos) se incubaron durante 24 horas a 37 °C en posición invertida. Se midieron las zonas o halos de inhibición generados y las cepas se clasificaron como sensibles, de sensibilidad reducida o resistentes, en función del tamaño del halo de inhibición, de acuerdo con los criterios de EUCAST (2021) en el caso de CN, E, SXT, RD, TE, C y CIP, y de CLSI (2020) con respecto a AMP, FOX, OX, CTX, FEP, VA, ENR y F.

2.6. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico, los recuentos microbianos se transformaron en unidades logarítmicas (\log_{10} ufc/g) y se compararon mediante técnicas de análisis de varianza (ANOVA), realizándose la separación de las medias con la prueba de rango múltiple de Duncan. Las prevalencias de *L. monocytogenes* y de resistencia a los antibióticos en las muestras de los dos países se compararon mediante la prueba exacta de Fisher. Para comparar el número de resistencias por cepa de los distintos grupos de muestras se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U. Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de probabilidad del 95% ($P < 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del programa informático Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Niveles de microorganismos indicadores de calidad higiénica

Los niveles medios (\log_{10} ufc/g) encontrados fueron de $7,53 \pm 1,02$ (para la microbiota aerobia viable, MAV), $7,13 \pm 1,07$ (para los microorganismos psicrotrofos) y $4,23 \pm 0,88$ (para las enterobacterias) (Tabla VI.3). No se observaron diferencias ($P > 0,05$) entre países con respecto a la MAV (encontrándose $7,81 \pm 0,85 \log_{10}$ ufc/g en España y $7,29 \pm 1,12 \log_{10}$ ufc/g en Portugal) y enterobacterias (siendo la cifra española de $4,55 \pm 0,96 \log_{10}$ ufc/g y la portuguesa de $4,02 \pm 0,78 \log_{10}$ ufc/g). No obstante, las muestras adquiridas en Portugal presentaban niveles más bajos ($P < 0,05$) de microorganismos psicrotrofos ($6,64 \pm 1,10 \log_{10}$ ufc/g) que las procedentes de España ($7,56 \pm 0,86 \log_{10}$ ufc/g).

Los recuentos de microbiota aerobia viable fueron similares ($P > 0,05$) a los de los microorganismos psicrotrofos, tanto en las muestras de cada país, como por lo que respecta al conjunto de muestras estudiadas. Los niveles de enterobacterias fueron inferiores ($P < 0,05$) a los de los demás grupos de microorganismos en todos los casos.

Los microorganismos psicrotrofos supusieron, respecto a la microbiota aerobia viable, un 56,23% en el caso de las muestras adquiridas en España, un 14,13% en las adquiridas en Portugal, y un 39,81% considerando el conjunto de muestras analizadas.

Tabla VI.3. Recuentos microbianos (\log_{10} ufc/g) obtenidos en muestras de carne picada de pollo procedentes de España y de Portugal.

Grupo microbiano	Origen de las muestras de carne de pollo picada		
	España	Portugal	Todas las muestras
	(n = 10)	(n = 10)	(n = 20)
Microbiota aerobia viable	$7,81 \pm 0,85^a$	$7,29 \pm 1,12^{a_a}$	$7,53 \pm 1,02_a$
Microorganismos psicrotrofos	$7,56 \pm 0,86^a$	$6,64 \pm 1,10^{b_a}$	$7,13 \pm 1,07_a$
Enterobacterias	$4,55 \pm 0,96^{a_b}$	$4,02 \pm 0,78^{a_b}$	$4,23 \pm 0,88_b$

Los valores (media \pm DE) que en la misma fila comparten alguna letra (superíndice) no muestran diferencias significativas entre sí ($P > 0,05$). Los valores que en la misma columna comparten alguna letra (subíndice) no muestran diferencias significativas entre sí ($P > 0,05$).

3.2. Prevalencia y niveles de *L. monocytogenes*

Se aislaron colonias con una morfología típica de *L. monocytogenes* (de color azul verdoso con un halo en medio OCLA) a partir de 14 muestras (9 de España y 5 de Portugal). Todas las colonias aisladas (un total de 70, cinco de cada muestra positiva) fueron identificadas como *L. monocytogenes* mediante PCR. Por lo tanto, la prevalencia de células viables para el cultivo de *L. monocytogenes* fue del 70% (90% en las muestras adquiridas en España y del 50% en las de Portugal; $P = 0,051$).

Las 20 muestras de *L. monocytogenes* se examinaron mediante q-PCR. En cada ciclo de amplificación de la q-PCR se duplica la cantidad de ADN de la muestra. Cuanto más ADN bacteriano exista en cada muestra, menos ciclos de amplificación serán necesarios para detectarlo. Se considera una muestra positiva cuando se supera la fluorescencia del valor umbral (0,3); en este momento, el equipo nos da un valor de Ct (ciclo en el que se supera el umbral) (Figura VI.3).

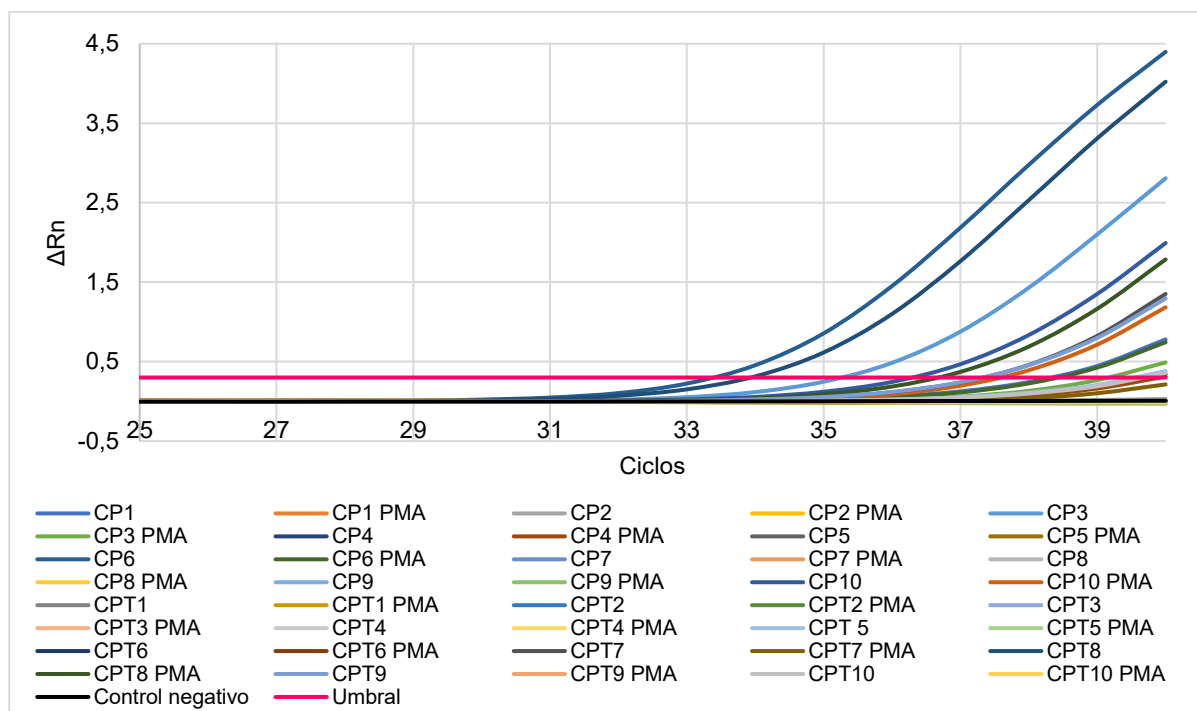


Figura VI.3. Gráfica de amplificación de muestras de *L. monocytogenes* por q-PCR. Se incluyen las 20 muestras de carne picada de pollo, un control negativo y el valor de fluorescencia umbral.

Siete muestras (cuatro de España y tres de Portugal) arrojaron resultados positivos tanto con la OCLA-PCR como con la q-PCR, tres muestras (de Portugal) dieron lugar a resultados negativos tanto con la OCLA-PCR como con la q-PCR, siete muestras (cinco de España y dos de Portugal) mostraron resultados positivos con OCLA-PCR pero negativos con q-PCR y tres muestras (una de España y dos de Portugal) presentaron resultados negativos con OCLA-PCR pero positivos con q-PCR. La Tabla VI.4 muestra los resultados obtenidos de la amplificación en la qPCR en términos de Ct, ng de ADN en el tubo de reacción y \log_{10} ufc/g en la muestra, registrando la totalidad de las células, así como las células viables. Los niveles de contaminación por *L. monocytogenes* oscilaron entre $< 2,15 \log_{10}$ ufc/g (límite de detección) y $4,32 \log_{10}$ ufc/g. En el caso de las células viables, las concentraciones variaron entre $< 2,15 \log_{10}$ ufc/g y $3,25 \log_{10}$ ufc/g. El porcentaje de células viables de *L. monocytogenes* con respecto al total osciló entre el 9,25% y el 88,48%.

Ambos métodos (OCLA-PCR y q-PCR) se compararon por lo que respecta a su capacidad para detectar células viables cultivables de *L. monocytogenes*. El método convencional (OCLA-PCR) se consideró método de referencia. La técnica q-PCR presentó unos valores de sensibilidad (capacidad de detectar muestras positivas), especificidad (capacidad de detectar muestras negativas) y eficacia (la probabilidad de que los resultados sean correctos) del 50,00%. El valor predictivo para una prueba positiva y para una negativa fueron del 70,00% y 30,00%, respectivamente. Finalmente, se obtuvo una concordancia (coeficiente *kappa*) de 0,00.

Tabla VI.4. Resultados transformados de la cuantificación de *L. monocytogenes* en muestras de carne picada de pollo por q-PCR.

MUESTRA	RESULTADOS CON q-PCR								RESULTADOS CON OCLA-PCR
	CÉLULAS TOTALES				CÉLULAS VIVAS				
	Ct	ADN (ng) en el tubo de reacción	Log ₁₀ ufc/g en la muestra	Ct PMA	ADN (ng) en el tubo de reacción	Log ₁₀ ufc/g en la muestra	% del total de células		
ESPAÑA	CP1	38,280	0,000012	2,72	40,00	0,000003	2,15	34,90	+
	CP2	> 40	< 0,000003	< 2,15	> 40	< 0,000003	< 2,15	-	+
	CP3	35,260	0,000112	3,71	39,15	0,000006	2,43	9,25	+
	CP4	39,720	0,000004	2,25	39,92	0,000003	2,18	88,48	-
	CP5	> 40	< 0,000003	< 2,15	> 40	< 0,000003	< 2,15	-	+
	CP6	33,400	0,000458	4,32	38,37	0,000011	2,69	4,78	+
	CP7	> 40	< 0,000003	< 2,15	> 40	< 0,000003	< 2,15	-	+
	CP8	> 40	< 0,000003	< 2,15	> 40	< 0,000003	< 2,15	-	+
	CP9	> 40	< 0,000003	< 2,15	> 40	< 0,000003	< 2,15	-	+
	CP10	36,29	0,000052	3,37	37,59	0,000019	2,94	45,13	+
PORTUGAL	CPT1	> 40	< 0,000003	< 2,15	> 40	< 0,000003	< 2,15	-	-
	CPT2	> 40	< 0,000003	< 2,15	> 40	< 0,000003	< 2,15	-	+
	CPT3	> 40	< 0,000003	< 2,15	> 40	< 0,000003	< 2,15	-	-
	CPT4	> 40	< 0,000003	< 2,15	> 40	< 0,000003	< 2,15	-	+
	CPT5	39,53	0,000004	2,31	40,00	0,000003	2,15	75,00	+
	CPT6	> 40	< 0,000003	< 2,15	> 40	< 0,000003	< 2,15	-	-
	CPT7	37,34	0,000023	3,03	40,00	0,000003	2,15	19,63	+
	CPT8	33,93	0,000307	4,14	36,67	0,000039	3,25	18,69	-
	CPT9	37,33	0,000024	3,03	40,00	0,000003	2,15	19,51	-
	CPT10	39,66	0,000004	2,27	40,00	0,000003	2,15	81,21	+

q-PCR, cuantificación por PCR cuantitativa; OCLA-PCR, aislamiento realizado según el método especificado por la norma UNE-EN ISO 11290-1 (en medio selectivo OCLA) con identificación de cepas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ct = ciclo umbral.

3.3. Susceptibilidad a antibióticos de *L. monocytogenes*

Se analizaron un total de 70 cepas de *Listeria monocytogenes* (5 de cada una de las 14 muestras positivas en medio OCLA y confirmadas por PCR) para determinar su susceptibilidad frente a un panel de 15 antibióticos de importancia clínica, veterinaria y humana (se realizaron 1.050 pruebas en total, considerando el conjunto de cepas y antibióticos ensayados). No se detectaron diferencias ($P > 0,05$) entre países por lo que respecta al porcentaje de pruebas en las que se observó resistencia, susceptibilidad reducida o susceptibilidad (Figura IV.4).

Todas las cepas presentaron multirresistencia (a entre 3 y 8 antibióticos). El valor medio de resistencias por cepa fue de $5,77 \pm 1,22$. El número medio de resistencias fue mayor ($P < 0,001$) en las cepas aisladas en España ($6,20 \pm 1,08$) que en las de Portugal ($5,00 \pm 1,08$). Si se consideran conjuntamente la resistencia y la susceptibilidad reducida, las cifras son de $7,29 \pm 1,16$ (para todo el conjunto de cepas), $7,60 \pm 1,10$ (de origen español) y $6,62 \pm 1,06$ (de origen portugués).

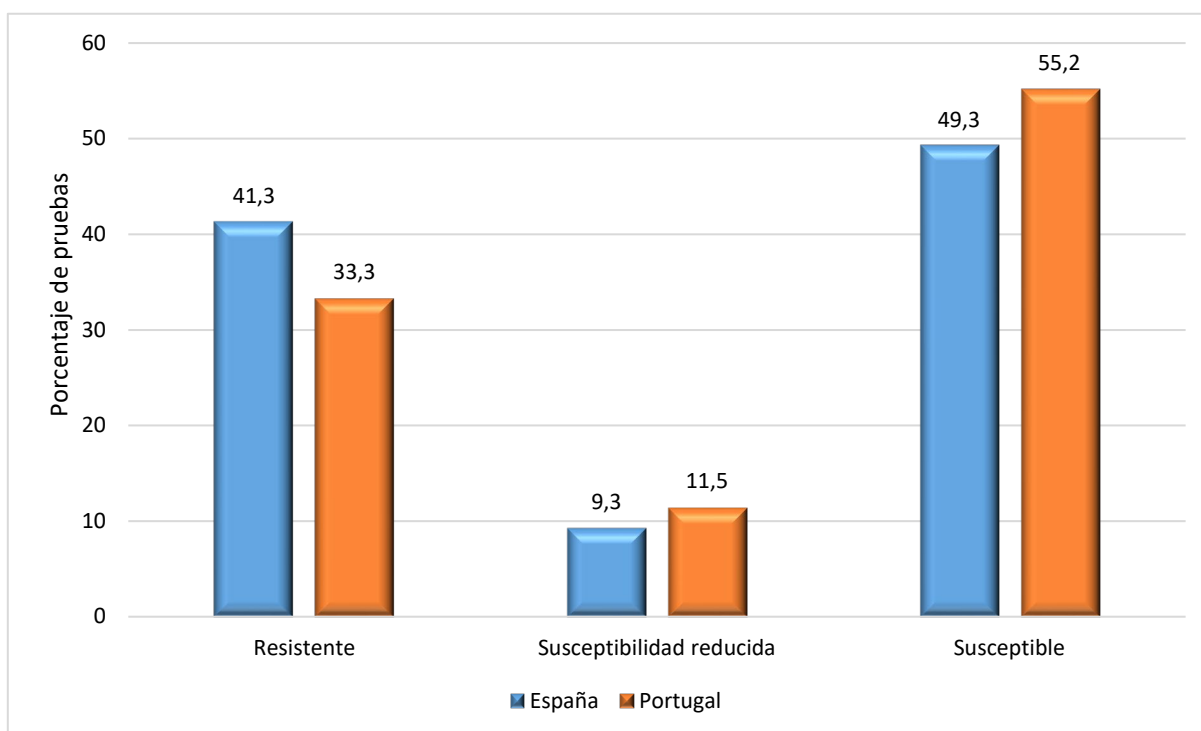


Figura VI.4. Porcentajes de pruebas resistentes, con susceptibilidad reducida o susceptibles en las cepas de *L. monocytogenes* de España y Portugal.

La Tabla VI.5 muestra los patrones de resistencia detectados en las setenta cepas de *L. monocytogenes* estudiadas. El patrón de resistencia observado con mayor frecuencia fue OX-FOX-CTX-FEP-CIP-F, presente en 14 cepas (10 españolas y 4 portuguesas). Otros fenotipos observados con frecuencia fueron OX-FOX-CTX-FEP-CIP (en 7 cepas de origen español y 6 de origen portugués) y OX-FOX-CTX-FEP (en 7 cepas de origen portugués y una de origen español).

La Figura VI.5 muestra los porcentajes de cepas de *L. monocytogenes* resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados. Los resultados fueron similares en ambos países, con porcentajes de cepas resistentes superiores al 95,0% respecto a oxacilina, cefoxitina, cefotaxima y cefepima. Por otro lado, se observaron porcentajes de cepas resistentes inferiores al 25,0% (en España y Portugal, respectivamente) para la ampicilina (0,0% y 0,0%), la gentamicina (2,2% y 0,0%), la eritromicina (15,6% y 0,0%), la vancomicina (0,0% y 0,0%), el trimetoprim-sulfametoxazol (22,2% y 8,0%), la tetraciclina (2,2% y 4,0%) y el cloranfenicol (0,0% y 0,0%). Para el resto de los antibióticos, se observaron porcentajes intermedios de cepas resistentes: ciprofloxacina (17,8% y 52,0%), rifampicina (20,0% y 12,0%) y nitrofurantoína (28,9% y 28,0%).

Tabla VI.5. Patrones de resistencia a los antibióticos mostrados por 70 aislamientos de *Listeria monocytogenes* de muestras de carne de pollo picada de origen español y portugués.

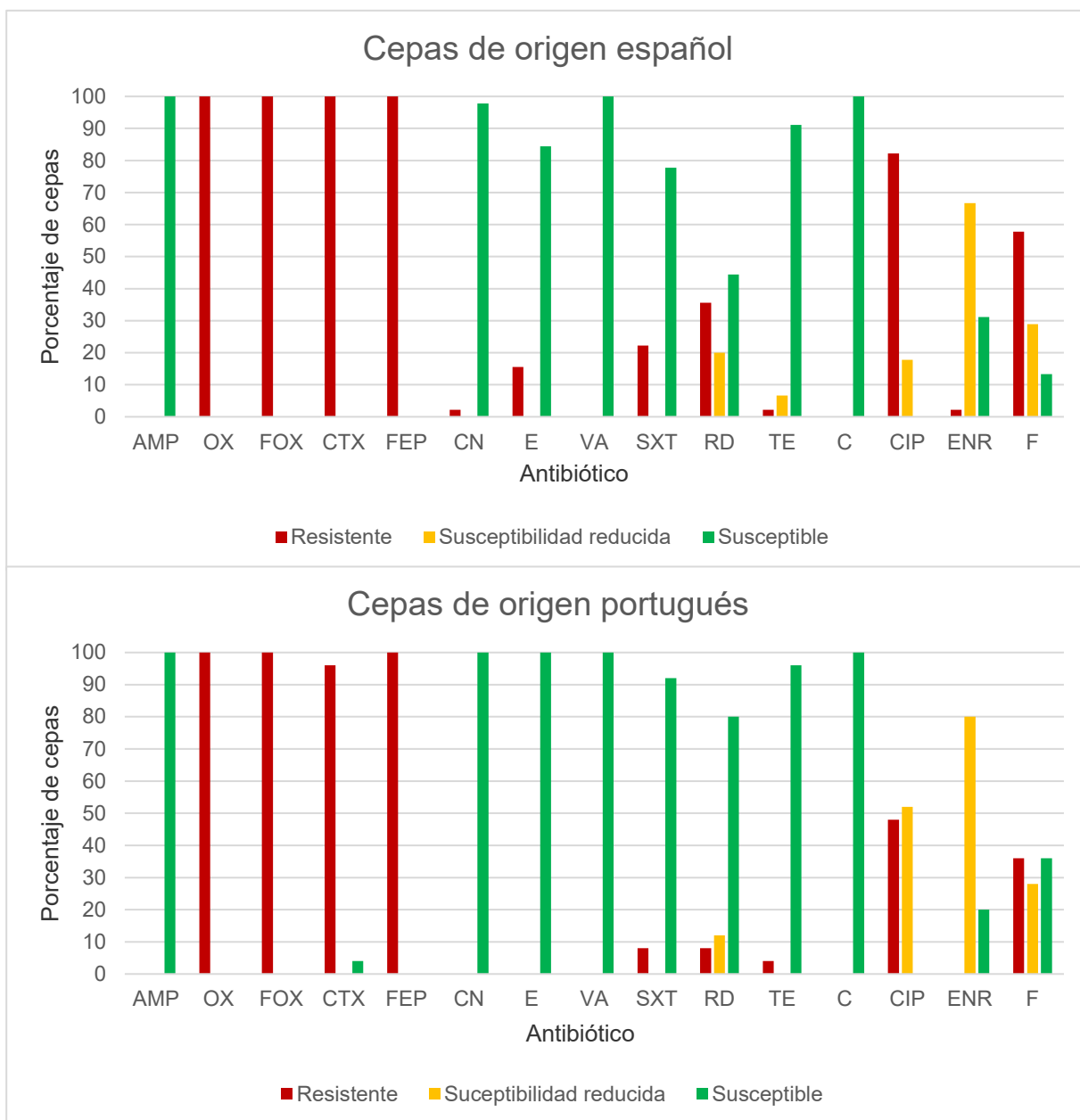
Patrón de resistencia a los antibióticos	Número de aislamientos		
	De origen español	De origen portugués	Totales
OX-FOX-FEP	0	1	1
OX-FOX-CTX-FEP	1	7	8
OX-FOX-CTX-FEP-SXT	0	1	1
OX-FOX-CTX-FEP-CIP	7	6	13
OX-FOX-CTX-FEP-F	3	3	6
OX-FOX-CTX-FEP-E	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-RD	1	1	2
OX-FOX-CTX-FEP-SXT-CIP	2	0	2
OX-FOX-CTX-FEP-RD-CIP	3	0	3
OX-FOX-CTX-FEP-CIP-F	10	4	14
OX-FOX-CTX-FEP-E-RD	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-SXT-CIP-F	2	0	2
OX-FOX-CTX-FEP-RD-CIP-F	5	1	6
OX-FOX-CTX-FEP-E-CIP-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-E-RD-CIP	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-SXT-TE-CIP-F	0	1	1
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-SXT-CIP	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-E-RD-CIP-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-SXT-CIP-ENR-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-SXT-RD-CIP-F	3	0	3
OX-FOX-CTX-FEP-E-SXT-RD-TE	1	0	1

OX (oxacilina, 1 µg), FOX (cefoxitina, 30 µg), CTX (cefotaxima, 30 µg), FEP (cefepima, 30 µg), CN (gentamicina, 10 µg), E (eritromicina, 15 µg), SXT (trimetoprim-sulfametoxazol, 25 µg), RD (rifampicina, 5 µg), TE (tetraciclina, 30 µg), CIP (ciprofloxacina, 5 µg), ENR (enrofloxacina, 5 µg) y F (nitrofurantoína, 300 µg).

Cuando se consideraron simultáneamente las cepas con resistencia y susceptibilidad reducida, el porcentaje de cepas resistentes fue del 100% (tanto en España como en Portugal) para la oxacilina, la cefoxitina y la cefepima. Otros porcentajes encontrados fueron del 100% (España) y el 96,0% (Portugal) para la cefotaxima, el 55,6% (España) y el 20,0% (Portugal) para la rifampicina, el 22,2% (España) y el 8,0% (Portugal) para el trimetoprim-sulfametoxazol, el 2,2% (España) y el 0,0% (Portugal) para la gentamicina, el 15,6% (España) y el 0,0% (Portugal) para la eritromicina y, finalmente, el 8,9% (España) y el 4,0% (Portugal) para la tetraciclina. Ninguna cepa presentó resistencia o susceptibilidad reducida a la ampicilina, la vancomicina o el cloranfenicol.

Las cepas aisladas en España presentaron una mayor prevalencia de resistencia a la eritromicina ($P < 0,001$), al trimetoprim-sulfametoxazol ($P < 0,01$), a la rifampicina ($P < 0,001$), a la ciprofloxacina ($P < 0,001$) y a la nitrofurantoína ($P < 0,001$). Únicamente en el caso de la gentamicina se observó una mayor prevalencia de resistencia en las cepas que se habían aislado en Portugal ($P < 0,001$). El lugar de procedencia de las cepas no influyó en la prevalencia de la resistencia a los demás antibióticos ensayados.

Al agrupar las cepas resistentes con las de susceptibilidad reducida, la prevalencia fue superior en España con respecto a la rifampicina ($P < 0,001$), el trimetoprim-sulfametoxazol ($P < 0,01$) y la eritromicina ($P < 0,001$). En contraposición, las cepas aisladas en Portugal presentaron el mayor porcentaje de resistencia o susceptibilidad reducida a la ciprofloxacina ($P < 0,001$).



Ampicilina (AMP, 10 µg), oxacilina (OX, 1 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), cefepima (FEP, 30 µg), gentamicina (CN, 10 µg), eritromicina (E, 15 µg), vancomicina (VA, 30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 25 µg), rifampicina (RD, 5 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), cloranfenicol (C, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), enrofloxacin (ENR, 5 µg) y nitrofurantoína (F, 300 µg).

Figura VI.5. Porcentaje de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de carne picada de pollo resistentes, con susceptibilidad reducida o susceptibles a cada uno de los antibióticos ensayados. Gráfica superior, cepas de origen español; gráfica inferior, cepas de origen portugués.

4. DISCUSIÓN

4.1. Niveles de microorganismos indicadores de calidad higiénica

En el presente estudio se investigó la calidad microbiológica de muestras de carne de pollo picada adquiridas en diferentes carnicerías de España y Portugal. Para ello, se determinaron los niveles (\log_{10} ufc/g) de microbiota aerobia viable, microorganismos psicrotrofos y enterobacterias.

Los recuentos de microbiota aerobia viable (MAV) son ampliamente utilizados para estimar la contaminación microbiana, de manera general, de los alimentos. Si bien niveles elevados de estos microorganismos no implican necesariamente un riesgo potencial para la salud humana, su importancia radica en que son indicativos de la calidad higiénica de las zonas de procesamiento de alimentos y de los propios productos (Del Río *et al.*, 2007). La microbiota aerobia viable se ha utilizado como criterio para predecir la vida útil de la carne, ya que la presencia de este grupo microbiano en grandes concentraciones puede provocar una alteración rápida de los productos (González-Gutiérrez *et al.*, 2019). Estos microorganismos también pueden ser indicadores de un procesamiento inadecuado, por lo que su cuantificación es una forma de monitorizar, de manera indirecta, las buenas prácticas de fabricación (BPF).

Se han elaborado directrices y recomendaciones para controlar la calidad microbiana de los preparados cárnicos. De acuerdo con las pautas de buenas prácticas de fabricación, el nivel de contaminación microbiológica total (MAV) de las preparaciones de carne crudas no debería exceder de 5 (máximo 7) \log_{10} ufc/g (ICMSF, 2011; IFST, 1997), valores inferiores a los obtenidos en el presente trabajo de investigación. Por otra parte, actualmente se aplica en la Unión Europea un plan de muestreo de tres categorías para MAV en carne picada al final del proceso de fabricación ($n = 5$, $c = 3$, $m = 5,70 \log_{10}$ ufc/g y $M = 6,70 \log_{10}$ ufc/g) (DOUE, 2005). De acuerdo con los criterios señalados, “n” es el número de unidades que componen la muestra y “c” es el número de unidades de muestra en que se permiten valores superiores a “m” (nunca superiores a “M”). Los resultados son satisfactorios si todos los valores (n) observados son inferiores a m, aceptables si un máximo de c valores están entre m y M, e insatisfactorios si algún valor es superior a M o más de c valores son superiores a m. Los valores medios obtenidos en el presente estudio superan el valor de M. Por lo tanto, en base a los criterios microbiológicos señalados, los recuentos obtenidos son excesivamente elevados.

Los niveles de MAV de las muestras adquiridas en España y Portugal ($7,81 \pm 0,85$ y $7,29 \pm 1,12 \log_{10}$ ufc/g, respectivamente; $P > 0,05$) son superiores a los obtenidos previamente en preparados de carne de ave en España (de $6,29 \pm 0,64$ a $7,28 \pm 0,51 \log_{10}$ ufc/g; Álvarez-

Astorga *et al.*, 2002; Buzón-Durán *et al.*, 2017) y en otras zonas de la Unión Europea, como Francia, donde se encontraron valores de $6,05 \pm 0,18 \log_{10}$ ufc/g (Lerasle *et al.*, 2014). Estos niveles tan elevados, especialmente en las muestras adquiridas en España, pueden ser debidos a un procesado inadecuado o a una limpieza deficiente de los equipos e instalaciones utilizados para dicho procesado. En este sentido, hay que señalar también que el triturado de la carne contribuye a su contaminación como consecuencia del contacto con diferentes superficies, de la modificación de la estructura del tejido y de la aireación durante el procesado (Łaszkiwicz *et al.*, 2021). Además, en el presente estudio, el tiempo transcurrido desde el sacrificio (al menos varios días) puede ser en cierta medida una explicación de los altos recuentos obtenidos (Alonso-Calleja *et al.*, 2004).

Los microorganismos psicrotrofos son particularmente relevantes en el caso de los productos que se mantienen refrigerados, una condición de almacenamiento en la que estos microorganismos pueden multiplicarse (González-Gutiérrez *et al.*, 2019). Los resultados del presente estudio se sitúan dentro del amplio rango de valores (entre 3,5 y 10,7 \log_{10} ufc/g) obtenidos por otros autores (Gashe y Mpuchane, 2000) para subproductos avícolas (incluyendo carne picada). No obstante, los recuentos medios (\log_{10} ufc/g) de microorganismos psicrotrofos observados en el presente estudio ($7,13 \pm 1,07$) son más altos que los encontrados previamente por nuestro Grupo de Investigación en muestras de preparados de carne de ave ($6,66 \pm 1,09$; Buzón-Durán *et al.*, 2017), en canales ($4,84 \pm 0,60$; Capita *et al.*, 2001) y en muslos de pollo (entre $4,34 \pm 0,77$ y $7,07 \pm 1,07$; Álvarez-Astorga *et al.*, 2002; Del Río *et al.*, 2007). Cabe señalar que todas las muestras del presente trabajo también excedieron el límite máximo establecido por Pascual-Anderson (1999) para carne de ave en España, que se fija en 5 \log_{10} ufc/g. Es probable que durante el tiempo de almacenamiento a refrigeración en el establecimiento y hasta su adquisición, los niveles de microorganismos psicrotrofos hayan aumentado en relación con los recuentos iniciales, como se ha indicado con anterioridad (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Del Río *et al.*, 2007).

Se observaron diferencias ($P < 0,05$) entre los recuentos de microorganismos psicrotrofos obtenidos en las muestras de carne picada de pollo españolas ($7,56 \pm 0,86$) y portuguesas ($6,64 \pm 1,10$). Los recuentos de psicrotrofos de las muestras de carne picada adquiridas en Portugal se encuentran cercanos a lo observado previamente en preparados de carne de pavo, con valores de $6,27 \pm 1,17 \log_{10}$ ufc/g (Castaño-Arriba *et al.*, 2020). Hay que señalar que ninguna de las muestras adquiridas presentaba signos de alteración, aunque algunos investigadores (Dainty y Mackey, 1992) han observado que niveles de este grupo microbiano de entre 6 y 8 \log_{10} ufc/g son suficientes para modificar el olor y la apariencia de la carne.

El bajo porcentaje de microorganismos psicrotrofos presentes, respecto a la microbiota aerobia viable, (39,81%) en el conjunto de muestras, y especialmente en el conjunto de muestras obtenidas en Portugal (14,13%), hace suponer la existencia de irregularidades en el mantenimiento de la temperatura durante el procesado, almacenamiento, transporte, distribución o exposición en los comercios de estos productos, tal y como se ha sugerido anteriormente (Alonso-Calleja *et al.*, 2004). En este sentido, hay que señalar que, en otros estudios realizados con carne de pollo refrigerada, la concentración de microorganismos psicrotrofos ha superado a la de microbiota aerobia viable (Capita *et al.*, 2001, 2002; Jay, 2002).

La mayoría de las enterobacterias que se encuentran en la carne fresca provienen de contaminación fecal, por lo que su presencia en grandes cantidades puede indicar una mala higiene en el matadero de donde procede la carne, un almacenamiento inadecuado o una combinación de estos factores (Andritsos *et al.*, 2012; Capita *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2004). Por ello, se ha utilizado dicho grupo microbiano como indicador de contaminación fecal en carne fresca. Los recuentos medios de enterobacterias en el presente estudio ($4,23 \pm 0,88 \log_{10}$ ufc/g) se sitúan por encima de los límites utilizados como criterio microbiológico para la carne de aves de corral en España, siendo éstos de $2 \log_{10}$ ufc/g (Pascual-Anderson, 1999).

Los recuentos de enterobacterias en las muestras analizadas en España y Portugal fueron de $4,55 \pm 0,96 \log_{10}$ ufc/g y $4,02 \pm 0,78 \log_{10}$ ufc/g, respectivamente, sin diferencias significativas entre grupos de muestras. Sin embargo, otros autores hacen referencia a niveles más bajos de enterobacterias en carne de ave, tanto en investigaciones realizadas en España ($2,89 \pm 0,77 \log_{10}$ ufc/g; Buzón-Durán *et al.*, 2017) como en otras áreas geográficas de la Unión Europea ($2 \log_{10}$ ufc/g; Fraqueza *et al.*, 2008). Estudios previos realizados también en el noroeste de España (Capita *et al.*, 2020) revelaron una menor carga de enterobacterias en productos preparados a base de carne de vacuno ($1,99 \pm 0,99 \log_{10}$ ufc/g) y cerdo ($1,96 \pm 1,44 \log_{10}$ ufc/g). Este elevado recuento de enterobacterias en los productos de carne de ave en comparación con carne de otras especies puede estar relacionado con el pH inicial más alto del músculo avícola (Säde *et al.*, 2013).

4.2. Prevalencia y niveles de *Listeria monocytogenes*

Todas las colonias con morfología típica de *L. monocytogenes* en medio OCLA se adscribieron a dicha especie mediante la técnica de PCR (con detección del gen *Imo1030*). Estos resultados son coincidentes con los de algunos estudios, donde, al comparar el método clásico con la técnica de PCR para la detección de *L. monocytogenes*, se han obtenido valores

de concordancia de entre el 80% y el 100% (Burbano *et al.*, 2011; De la Rosa Zariñana *et al.*, 2018; Poutou *et al.*, 2005).

Se aislaron cepas de *L. monocytogenes* en el 70% de las muestras de carne de pollo picada (en el 90% de las muestras adquiridas en puntos de venta españoles y en el 50% de las de puntos de venta portugueses). Esta prevalencia encaja en el amplio intervalo de valores obtenidos por otros autores, que oscilan entre el 0% y el 99% de muestras positivas para este tipo de carne (Jamshidi y Zainali, 2019). En estudios previos realizados por nuestro Grupo de Investigación, se han observado prevalencias del 24,5% (Alonso-Hernando *et al.*, 2012) y del 32% (Capita *et al.*, 2001), valores muy inferiores a los del presente estudio. Hay que indicar, no obstante, que dichas investigaciones se realizaron con canales o despieces de pollo y, puesto que durante el picado de la carne se incrementa el riesgo de contaminación con *L. monocytogenes* (Oliveira *et al.*, 2018), era de esperar que la prevalencia encontrada en el presente trabajo fuera mayor que en investigaciones previas. En relación a la prevalencia de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos en Portugal, la prevalencia obtenida (50%) encaja en el rango de valores obtenidos por otros autores en carne de pollo cruda: 19,3% (Gonçalves-Tenório *et al.*, 2018), 41,3% (Antunes *et al.*, 2002) o 60% (Mena *et al.*, 2004).

En las siete muestras que dieron lugar a resultados positivos tanto con OCLA-PCR como con q-PCR, las concentraciones de *L. monocytogenes* estimadas oscilaron entre 2,25 y 4,32 \log_{10} ufc/g. Tales niveles de contaminación son similares a los observados por otros autores en carne de pollo cruda, producto en el que se han obtenido valores inferiores a 3 \log_{10} ufc/g de muestra (Sugiri *et al.*, 2014). Otros investigadores han encontrado concentraciones superiores a 3 unidades logarítmicas, pero sólo en un pequeño porcentaje de muestras (Rørvik e Yndestad, 1991). Los resultados del presente estudio también son similares a los encontrados por otros autores, pero en diferentes alimentos, como en embutidos fermentados, donde el rango fue de 2,85 a 3,38 \log_{10} ufc/g (Martín *et al.*, 2004), o queso fresco, para el que se obtuvo una cifra de 3,60 \log_{10} ufc/g (Rantsiou *et al.*, 2008).

Según el modelo utilizado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), el 92% de los casos de listeriosis invasiva deben atribuirse a dosis de más de 5 \log_{10} ufc por porción consumida. Si se considera que el tamaño promedio de una porción es de 50 gramos, esto equivaldría a una concentración de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo superior a 3,30 \log_{10} ufc/g en el momento de consumo. No obstante, una pequeña proporción de los casos están asociados con tales productos alimenticios que presentan niveles de *L. monocytogenes* más bajos (AESAN, 2019). El Reglamento (CE) n°. 2073/2005 (DOUE, 2005) establece como límite superior asociado a la vida útil del producto una

concentración (en el punto de venta) de $2 \log_{10}$ ufc/g de dicho microorganismo en los alimentos listos para el consumo.

Es cierto que las preparaciones de carne de pollo se cocinan antes de su consumo. Sin embargo, en estos alimentos podrían encontrarse células viables de *L. monocytogenes* como consecuencia de un cocinado inadecuado o de incidentes relacionados con una contaminación cruzada. Además, *L. monocytogenes* es un microorganismo psicrotrofo, por lo que su concentración en carne picada puede aumentar en el transcurso del almacenamiento en refrigeración.

Durante la realización del presente estudio, tres muestras de carne picada de pollo resultaron negativas, tanto con el método clásico de aislamiento (OCLA-PCR) como con q-PCR. Esto puede ser debido a que, o bien dichas muestras no estaban contaminadas con *L. monocytogenes*, o estaban contaminadas sólo con células inactivadas o con células viables no cultivables, y a una concentración inferior al límite de detección para la técnica q-PCR. Siete muestras fueron positivas con OCLA-PCR y negativas con q-PCR. Esto puede deberse al hecho de que cuarenta ciclos de amplificación, equivalentes a $2,15 \log_{10}$ ufc/g (límite de detección para dicha técnica) no fueron suficientes para superar el umbral de fluorescencia. Por lo tanto, se considera que estas muestras estaban contaminadas con células viables y cultivables de *L. monocytogenes*, pero a una concentración inferior a la establecida como límite de detección, destacando que, además, dicho límite fue inferior a los fijados por otros autores, que lo sitúan entre 3 y $4 \log_{10}$ ufc/g o ufc/ml (Rantsiou *et al.*, 2008; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2004, 2005). Finalmente, tres muestras dieron negativo con OCLA-PCR y positivo con q-PCR, pudiendo deberse este hecho a la presencia de células de *L. monocytogenes* viables pero no cultivables, o a que el ADN procedía de bacterias inactivadas.

La limitada sensibilidad de la q-PCR (50,0%) establece que dicho método no es útil para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos cuando los niveles de contaminación son muy bajos, debido al relativamente elevado límite de detección asociado a la técnica ($2,15 \log_{10}$ ufc/g de muestra). Como consecuencia de ello, el valor predictivo de una prueba negativa no supera el 30,0%. Por el contrario, la q-PCR tiene la ventaja sobre el método clásico de que permite la detección de células inactivadas y de células viables no cultivables. Esto es lo que conduce a la baja especificidad de la técnica (50,0%), ya que el método clásico utilizado como referencia considera como negativa cualquier muestra contaminada con células de *L. monocytogenes* que no sean cultivables o estén inactivadas. En particular, en tres muestras del presente estudio se detectaron, por q-PCR (utilizando el marcador de viabilidad PMA_{xx}), células viables de *L. monocytogenes* que no pudieron ser cultivadas en medio OCLA. La

detección y cuantificación de células que son viables, pero no cultivables, es de gran interés, ya que se trata de células vivas que pueden causar infecciones en los consumidores.

Los porcentajes de viabilidad registrados en esta investigación variaron entre 9,3% y 88,5%, no habiéndose encontrado en la bibliografía consultada ninguna investigación sobre *L. monocytogenes* que permitiera una comparación con estos porcentajes. Los resultados se encuentran dentro del rango de valores obtenidos por Zhang *et al.* (2015) para otros microorganismos patógenos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus*, cuya concentración de células viables en la leche en polvo fue del 10% (3×10^2 ufc/g en relación con un total de 3×10^3 ufc/g).

4.2. Susceptibilidad a antibióticos

Se estudió la susceptibilidad de 70 cepas de *L. monocytogenes* (procedentes de carne picada de pollo) frente a 15 antibióticos de importancia clínica. El número medio de resistencias por cepa observado ($5,77 \pm 1,22$; $6,20 \pm 1,08$ para las cepas españolas y $5,00 \pm 1,08$ para las procedentes de Portugal), fue muy superior a los valores registrados en trabajos anteriores con cepas de *L. monocytogenes* procedentes de carne de ave en el noroeste de España, donde se encontró un número medio de 1,60 (en 1993) y de 4,24 (en 2006) resistencias por cepa (Alonso-Hernando *et al.*, 2012). Si bien *L. monocytogenes* es una bacteria que en el pasado se ha mostrado sensible a la mayoría de los antimicrobianos empleados para tratar infecciones por microorganismos Gram-positivos, en los últimos años se ha producido un incremento notable en la prevalencia de resistencia (Fallah *et al.*, 2012), situación que también se pone de manifiesto en los resultados del presente estudio. Entre otras causas, este aumento de la resistencia en *L. monocytogenes* se debe a su progresiva adquisición, a partir de las células de diversos géneros de bacterias, de elementos genéticos móviles, como plásmidos o transposones con genes de resistencia (Olaimat *et al.*, 2018). La resistencia a los antibióticos es un hecho habitual, desde hace años, en otras bacterias Gram-positivas. Así, el número medio de resistencias por cepa observado en este trabajo es similar al encontrado anteriormente para bacterias Gram-positivas presentes en carne de ave del noroeste de España, con valores de 4,50 (Castaño-Arriba *et al.*, 2020) o 5,58 (Cordero *et al.*, 2019) resistencias en cepas de *Enterococcus* spp., y de 6,35 resistencias en el caso de *Staphylococcus aureus* (Buzón-Durán *et al.*, 2017).

Un grupo de expertos internacionales que forman parte de la iniciativa conjunta del Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) y el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) de los Estados Unidos han establecido

una definición estándar de los fenotipos de “multirresistencia” (*multidrug-resistant*, MDR), “resistencia de espectro extendido” (*extensively drug-resistant*, XDR) y “pan-resistencia” (*pandrug-resistant*, PDR) en las bacterias de interés en Salud Pública. El fenotipo MDR se define como no susceptibilidad adquirida a, al menos, un antibiótico en tres o más categorías de antimicrobianos (debiendo aplicarse uno o más de ellos). El fenotipo XDR se define como ausencia de susceptibilidad a, al menos, un agente antimicrobiano de todas las categorías de antimicrobianos, admitiéndose un máximo de dos excepciones. Finalmente, el fenotipo PDR se refiere a ausencia de susceptibilidad a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2012). Este criterio ha sido utilizado para la caracterización del perfil de resistencia a antibióticos de las cepas ensayadas en el presente estudio.

No se encontraron cepas pan-susceptibles, ni con resistencia a un único antibiótico. Una de las cepas analizadas (1,4% del total) mostró resistencia a 3 antibióticos, 8 cepas (11,4%) a 4 antibióticos, 23 cepas (32,9%) a 5 antibióticos, y 38 cepas (54,3%) presentaron un fenotipo multirresistente (MDR). Las cepas asignadas a la categoría MDR presentaron resistencia a 6 (20 cepas; 28,6% del total), 7 (10 cepas; 14,3%) u 8 (8 cepas; 11,4%) compuestos antimicrobianos. La presencia de cepas con resistencia a varios antibióticos constituye un reto crucial para la Salud Pública, ya que muchos antimicrobianos quedarían descartados como opciones terapéuticas en caso de infección (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Más del 50% de las cepas presentaron resistencia a oxacilina, cefoxitina, cefotaxima, cefepima, ciprofloxacina, enrofloxacina y nitrofurantoína. Las cepas de origen español mostraron, además, niveles intermedios de resistencia a tetraciclina (6,7%), rifampicina (20,0%), ciprofloxacina (17,8%), enrofloxacina (66,7%) y nitrofurantoína (28,9%). Estos hallazgos son preocupantes, ya que algunas de las sustancias mencionadas se emplean habitualmente en el tratamiento de la listeriosis, para el cual un betalactámico, generalmente ampicilina, sería el antibiótico de elección, administrado solo o en combinación con gentamicina. En casos de alergia a los betalactámicos, las posibles alternativas incluyen eritromicina, vancomicina, trimetoprim-sulfametoxazol y fluoroquinolonas. En ocasiones, el tratamiento para la listeriosis se realiza con rifampicina, tetraciclina y cloranfenicol (Capita *et al.*, 2019).

Además, algunas sustancias a las que las cepas del presente estudio mostraron una alta prevalencia de resistencia están clasificadas por la Organización Mundial de la Salud como agentes antimicrobianos “de importancia crítica” (AMP, CIP, ENR, FOX, CTX, FEP, RD), “altamente importantes” (OX, SXT) o “importantes” (F) para la medicina humana (WHO, 2019). Hay que señalar que otros antibióticos a los que las cepas estudiadas presentaron cierta resistencia, aunque inferior al 15%, se clasifican como “de importancia crítica” (CN, E, VA) o

"altamente importantes" (TE) en medicina humana. En la lista publicada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE,2018), AMP, OX, CIP, ENR, SXT, CN y TE se consideran antibióticos de "importancia crítica" y RD "importancia elevada" en medicina veterinaria (OIE, 2018).

Diferentes autores han encontrado cepas de *L. monocytogenes* resistentes a uno o más de los antibióticos a los que se observó resistencia en el presente estudio (Adzitey *et al.*, 2013; Alonso-Hernando *et al.*, 2012; Bae *et al.*, 2014; Capita *et al.*, 2019; Doménech *et al.*, 2015; Komora *et al.*, 2017; Olaimat *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2013). Cabe señalar que los antibióticos a los que se observó resistencia son sustancias ampliamente utilizadas en la producción animal (Cameron *et al.*, 2016; De Briyne *et al.*, 2014; Roth *et al.*, 2019). Así, la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos (particularmente cuando éstos se emplean incorrectamente a dosis subinhibitorias) ha sido identificada como la principal causa del marcado aumento en la prevalencia de resistencia a los antibióticos que se ha producido en las últimas décadas (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Conclusiones

Los resultados del presente trabajo de investigación indican que la carne picada de pollo es un alimento de dudosa calidad desde el punto de vista higiénico, dados sus elevados niveles de microbiota aerobia viable, microorganismos psicrotrofos y enterobacterias. Además, este tipo de producto supone un importante reservorio de cepas de *L. monocytogenes* resistentes a múltiples antibióticos de importancia clínica, hecho preocupante en el contexto de la seguridad alimentaria. Esto conlleva la necesidad de que quienes manipulen este tipo de alimentos reciban una formación exhaustiva en materia de higiene alimentaria, con el objetivo de evitar malas prácticas, como el cocinado inadecuado o la contaminación cruzada, reduciendo así el riesgo para los consumidores.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto las limitaciones del método clásico de aislamiento (por doble enriquecimiento y cultivo sobre un medio sólido selectivo y diferencial, confirmando la especie con PCR convencional) y también de la q-PCR en la detección de *L. monocytogenes* en muestras de carne de pollo. El método clásico no permite la detección de células de *L. monocytogenes* que son viables, pero no cultivables. Por otra parte, el método q-PCR no es adecuado para detectar niveles bajos de *L. monocytogenes*, habida cuenta del relativamente elevado umbral de detección de la técnica ($2,15 \log_{10}$ ufc/g). Estos resultados apuntan a la utilidad de combinar las dos técnicas (OCLA-PCR y q-PCR) con vistas a mejorar la detección de *L. monocytogenes* en los alimentos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adzitey, F., Ali, G. R. R., Huda, N., Cogan, T., Corry, J. (2013). Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia. *Food Control* **163**: 607–614. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.016>
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria) (2019). *Listeriosis*. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/listeria.htm (Fecha de último acceso: 21 de septiembre de 2021).
- Alonso-Calleja, C., Martínez-Fernández, B., Prieto, M., Capita, R. (2004). Microbiological quality of vacuum-packed retail ostrich meat in Spain. *Food Microbiology* **21**(2): 241-246. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00060-1)
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2012). Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* **23**(1): 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.006>
- Álvarez-Astorga, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, M. C. (2002). Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science* **62**(1): 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00225-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00225-X)
- Andritsos, N. D., Mataragas, M., Mavrou, E., Stamatiou, A., Drosinos, E. H. (2012). The microbiological condition of minced pork prepared at retail stores in Athens, Greece. *Meat Science* **91**: 480-489. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.036>
- Antunes, P., Réu, C., Sousa, J. C., Pestana, N., Peixe, L. (2002). Incidence of susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. *Journal of Food Protection* **65**(12): 1888-1893. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.12.1888>
- Bae, D., Mezal, E. H., Smiley, R. D., Cheng, C.-M., Khan, A. A. (2014). The sub-species characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from domestic and imported food products from 2004 to 2011. *Food Research International* **64**: 656-663. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.049>
- Baird, R. M., Corry, J. E. J., Curtis, G. D. W. (1987). Pharmacopeia of culture media for food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* **5**: 221-222.

- Barretta, C., Verruck, S., Maran, M. B., Mauricio, L. S., Miroto, L., Vieira, C. R. W., Prudencio, E. S. (2019). *Listeria monocytogenes* survival in raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillet under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions by culture, qPCR and PMA-qPCR detection methods. *LWT* **107**: 132-137. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.015>
- Burbano, E. M., Carrascal, A. K., Mercado, M., Poutou, R. (2011). Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en Leches. *Alimentos Hoy* **10**: 1-10. Disponible en: <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/115/109> (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021).
- Buzón-Durán, L., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2017). Microbial loads and antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* in different types of raw poultry-based meat preparations. *Poultry Science* **96**(11): 4046-4052. <https://doi.org/10.3382/ps/pex200>
- Cameron, A., McAllister, A. A. (2016). Antimicrobial usage and resistance in beef production. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **7**: 68. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0127-3>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**(1): 11-48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Arias, M. T., Moreno, B., García-Fernández, M. C. (2002). Methods to detect the occurrence of various indicator bacteria on the surface of retail poultry in Spain. *Journal of Food Science* **67**(2): 765-771. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10673.x>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, M. C. (2001). Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology* **65**(1-2): 75-82. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00497-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00497-9)
- Capita, R., Castaño-Arriba, A., Rodríguez-Melcón, C., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C. (2020). Diversity, antibiotic resistance, and biofilm-forming ability of enterobacteria isolated from red meat and poultry preparations. *Microorganisms* **8**(8): 1226. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081226>
- Capita, R., Felices-Mercado, A., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. (2019). Characterization of *Listeria monocytogenes* originating from the Spanish meat-processing chain. *Foods* **8**(11): 542. <https://doi.org/10.3390/foods8110542>

- Cardoso Pereira, P. M. C., Baltazar Vicente, A. F. R. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science* **93**(3): 586-592. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>
- Castaño-Arriba, A., González-Machado, C., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2020). Antibiotic resistance and biofilm-forming ability in enterococcal isolates from red meat and poultry preparations. *Pathogens* **9**(12): 1021. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121021>
- CLSI (2018). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. CLSI VET08-ED4 National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania (USA). **28**(8): M31-A3. Disponible en: <http://clsivet.org/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20VET08%20ED4:2018&xormat=SPDF&src=BB> (Fecha de último acceso: 15 de diciembre de 2021).
- CLSI (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania (USA). Disponible en: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf> (Fecha de último acceso: 15 de diciembre de 2021).
- Cordero, J., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Capita, R. (2019). Microbial load and antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* isolates from the meat of wild and domestic pigeons. *Foods* **8**(11): 536. <https://doi.org/10.3390/foods8110536>
- Cousin, M. A., Jay, J. M., Vasavada, P. C. (2001). Psychrotrophic microorganisms. In: Downes, F.P., Ito, K. (eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, D.C., pp. 59-166.
- Dainty, R. H., Mackey, B. M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, **73**(21): 103s-114s. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb03630.x>
- De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludová, L., Borriello, S. P. (2014). Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record* **175**: 325. <https://doi.org/10.1136/vr.102462>
- De la Rosa Zariñana, A. E., Crosby-Galván, M. M., Ramírez-Guzmán, M. E., Hernández-Sánchez, D., Mata-Espinoza, M. A. (2018). Standardization of PCR technique for

- detecting *Listeria monocytogenes* in chicken, beef and pork. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* **5**(13): 25-34. <https://doi.org/10.19136/era.a5n13.1428>
- Del Río, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2007). Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology* **115**(3): 268-280. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.048>
- Doménech, E., Jimenez-Belenguer, A., Amoros, J. A., Ferrus, M. A., Escriche, I. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. *Food Control* **47**: 120-125. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.043>
- DOUE (2005). Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, **L 338**: 1-26. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20180101&rid=1> (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021).
- EFSA y ECDC (2021). The European Union One Health 2020 zoonoses report. *EFSA Journal*, **19**(2): 6406. (Fecha de último acceso: 06 de febrero de 2021) <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- EUCAST (2021). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. V. 11.0. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (Fecha de último acceso: 03 de enero de 2021).
- Fallah, A. A., Saei-Dehkordi, S. S., Rahnema, M., Tahmasby, H., Mahzounieh, M. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria* species isolated from poultry products marketed in Iran. *Food Control* **28**(2): 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.014>
- FAO (2020). Producción y productos avícolas. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Disponible en: <http://www.fao.org/poultry-production-products/production/es/> (Fecha de último acceso: 22 de septiembre de 2021).
- FAOSTAT (2020). Consumo carne de pollo. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL> (Fecha de último acceso: 22 de septiembre de 2021).

- Fraqueza, M. J., Ferreira, M. C., Barreto, A. S. (2008). Spoilage of light (PSE-like) and dark turkey meat under aerobic or modified atmosphere package: microbial indicators and their relationship with total volatile basic nitrogen. *British Poultry Science* **49**: 12-20. <https://doi.org/10.1080/00071660701821675>
- Gashe, B. A., Mpuchane, S. (2000). Prevalence of salmonellae on beef products at butchereries and their antibiotic resistance profiles. *Journal of Food Science* **65**(5): 880-883. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb13604.x>
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., ... Cossart, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**(5543): 849-852. <https://doi.org/10.1126/science.1063447>
- Gonçalves-Tenório, A., Nunes Silva, B., Rodrigues, V., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U. (2018). Prevalence of pathogens in poultry meat: a meta-analysis of European published surveys. *Foods* **7**: 69. <https://doi.org/10.3390/foods7050069>
- González-Gutiérrez, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019). Microbial load and antibiotic resistance in raw beef preparations from northwest Spain. *Food Science and Nutrition* **8**(2): 777-785. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1319>
- ICMSF (2011). *Microorganisms in foods 8. Use of data for assessing process control and product acceptance*. Springer, New York.
- IFST (1997). Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Science and Technology Today* **11**(3): 137-176.
- Jamshidi, A., Zeinali, T. (2019). Significance and characteristics of *Listeria monocytogenes* in poultry products. *International Journal of Food Science* **2019**: 7835253. <https://doi.org/10.1155/2019/7835253>
- Jay, J. M. (2002). A Review of aerobic and psychrotrophic plate count procedures for fresh meat and poultry products. *Journal of Food Protection* **65**(7): 1200-1206. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.7.1200>
- Komora, N., Bruschi, C., Magalhães, R., Ferreira, V., Teixeira, P. (2017). Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. *International Journal of Food Microbiology* **245**: 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.013>

- Łaszkiewicz, B., Szymański, P., Kołożyn-Krajewska, D. (2021). The effect of selected lactic acid bacterial strains on the technological and microbiological quality of mechanically separated poultry meat cured with a reduced amount of sodium nitrite. *Poultry Science* **100**(1): 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.066>
- Lerasle, M., Federighi, M., Simonin, H., Anthoine, V., Rezé, S., Chéret, R., Guillou, S. (2014). Combined use of modified atmosphere packaging and high pressure to extend the shelf-life of raw poultry sausage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **23**: 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.02.009>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* **18**(3): 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- MAPA (2020). Sector avícola de carne de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/avicola-de-carne/> (Fecha de último acceso: 23 de septiembre de 2021).
- Martín, B., Jofré, A., Garriga, M., Hugas, T., Aymerich, T. (2004). Quantification of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages by MPN-PCR method. *Letters in Applied Microbiology* **39**(3): 290-295. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01580.x>
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs, P. A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology* **21**: 213–216. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00057-1)
- Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., Carrique-Mas, J. J. (2017). Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. *Frontiers in Veterinary Science* **4**(8): 1-17. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review in Antimicrobial Resistance. Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf (Fecha de último acceso: 23 de septiembre de 2021).

- OECD (2019). Antimicrobial Resistance. Tackling the Burden in the European Union. Disponible en: <https://www.oecd.org/health/health-systems/AMR-Tackling-the-Burden-in-the-EU-OECD-ECDC-Briefing-Note-2019.pdf> (Fecha de último acceso: 23 de septiembre de 2021).
- OIE (2018). OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. World Organisation for Animal Health. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf (Fecha de último acceso: 22 de septiembre de 2021).
- Olaimat, A. N., Al-Holy, M. A., Shahbaz, H. M., Al-Nabusli, A. A., Abu Goush, M. H., Osaili, T. M., Ayyash, M. M., Holley, R. A. (2018). Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **17**(5): 1277-1292. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12387>
- Oliveira, T. S., Varjão, L. M., da Silva, L. N. N., Pereira, R. C. L., Hofer, E., Vallim, D. C., Almeida, R. C. de C. (2012). *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. *Food Control* **88**: 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.015>
- Pascual-Anderson, M. R. (1999). *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Díaz de Santos, Madrid.
- Poutou, R. M., Burbano, S., Sierra, K., Torres, A., Carrascal, K., Mercado, M. (2005). Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Universitas Scientiarum*, **10**(2): 61-78. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49910207> (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021).
- Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., Cocolin, M. (2008). Detection quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* **21**(1): 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.006>
- Rodríguez-Campos, D., Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019). Persistent *Listeria monocytogenes* isolates from a poultry-processing facility form more biofilm but do not have a greater resistance to disinfectants than sporadic strains. *Pathogens* **8**(4): 250. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040250>

- Rodríguez-Lázaro, D., Jofré, A., Aymerich, T., Garriga, M., Pla, M. (2005). Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in salmon products: evaluation of Pre-Real-Time PCR strategies. *Journal of Food Protection* **68**(7): 1467-1471. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.7.1467>
- Rodríguez-Lázaro, D., Jofré, A., Aymerich, T., Hugas, M., Pla, M. (2004). Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(10): 6299-6301. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6299-6301.2004>
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2017). Lactic acid concentrations that reduce microbial load yet minimally impact colour and sensory characteristics of beef. *Meat Science* **129**: 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.007>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., Carballo, J., García-Fernández, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2018). Structure and viability of 24- and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology* **76**: 513-517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology* **82**: 533-540. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020>
- Rørvik, L. M., Yndestad, M. (1991). *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, **13**(2): 97-104. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90052-Q](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90052-Q)
- Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., Doming, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: a global overview. *Poultry Science* **98**: 1791-1804. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
- Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S.-H., Kim, Y.-R., Kim, H.-Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control* **32**(2): 659-664. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.048>
- Säde, E., Murros, A., Björkroth, J. (2013). Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. *Food Microbiology* **34**(2): 252-258. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.007>

- Selvan, P., Narendra, B. R., Sureshkumar, S., Vankataramanujam, V. (2007). Microbial quality of retail meat products available in Chennai city. *American Journal of Food Technology* **2**(1): 55-59. <https://doi.org/10.3923/ajft.2007.55.59>
- Sugiri, Y. D., Gölz, G., Meeyam, T., Baumann, M. P. O., Kleer, J., Chaisowwong, W., Alter, T. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* on chicken carcasses in Bandung, Indonesia. *Journal of Food Protection* **77**(8): 1407-1410. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-453>
- Wang, X. -M., Lü, X. -F., Yin, L., Liu, H. -F., Zhang, W. -J., Si, W., Tu, S. -Y., Shao, M. -L., Liu, S. -G. (2013). Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. *Food Control* **32**(1): 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.032>
- WHO (2019). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*, 6th ed. World Health Organization (WHO), Geneva (Switzerland). Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf> (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021).
- Wong, T., Whyte, R. J., Cornelius, A. J., Hudson, J. A. (2004). Enumeration of *Campylobacter* and *Salmonella* on chicken packs. *British Food Journal* **106**: 651-662. <https://doi.org/10.1108/00070700410558184>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**: 134. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zhang, Z., Liu, W., Xu, H., Aguilar, Z. P., Nagendra, P. S., Wei, H. (2015). Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products. *Journal of Dairy Science* **98**(3): 1625-1633. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8938>

CAPÍTULO VII

**Efecto de diferentes aditivos alimentarios sobre la
prevalencia y los perfiles de resistencia a antibióticos de
Listeria monocytogenes presente de forma natural en
carne de pollo**

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La producción de aves de corral es una de las más extendidas en todo el mundo, siendo el pollo la especie de cría más común (Nhung *et al.*, 2017), con más de 114 millones de toneladas de carne de pollo producidas en el año 2018 (FAOSTAT, 2020). En 2017, la carne de origen avícola representó cerca del 37% de la producción mundial de carne (MAPA, 2020). Un cierto porcentaje de carne se consume en forma de preparados cárnicos, que el Reglamento (CE) N° 853/2004 define como la carne fresca, incluida la carne que se ha reducido a fragmentos, a la que se le han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos o que se ha sometido a procesos insuficientes para modificar la estructura de la fibra muscular interna de la carne y así eliminar las características de la carne fresca (Capita *et al.*, 2020).

El alto consumo de carne y preparados de carne de ave origina la preocupación de que los productos comercializados sean seguros, tengan una baja tasa de deterioro y presenten una composición y características sensoriales adecuadas. Los productos excesivamente contaminados con microorganismos son indeseables, tanto desde el punto de vista de la Salud Pública como económico (del Río *et al.*, 2007). Tradicionalmente se han utilizado recuentos de microbiota aerobia viable, psicrotrofos, enterobacterias, coliformes fecales, enterococos, pseudomonas, pseudomonas fluorescentes, levaduras y mohos para evaluar la seguridad microbiológica, las condiciones sanitarias durante el procesado, la calidad de conservación de los productos avícolas y la vida útil de los mismos (Álvarez-Astorga *et al.*, 2002; Del Río *et al.*, 2007).

La contaminación de la carne de pollo por microorganismos patógenos es una preocupación a escala mundial (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018). *Listeria monocytogenes* es una bacteria Gram-positiva con forma de bacilo, anaerobia facultativa, no formadora de esporas y responsable de la listeriosis, una infección poco frecuente pero grave, cuya principal vía de transmisión a los seres humanos es a través del consumo de alimentos contaminados (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019). La listeriosis es una zoonosis responsable de aproximadamente 23.000 infecciones invasivas cada año en el mundo (Rodríguez-Campos *et al.*, 2019). Durante el año 2020 se notificaron 1.876 casos de listeriosis invasiva en humanos en la Unión Europea, con una tasa de notificación de 0,42 casos por 100.000 por habitantes (EFSA y ECDC, 2021). El grupo de edad más afectado por la enfermedad fue el de los mayores de 64 años, particularmente el grupo con más de 84 años. La tasa de mortalidad fue alta, de un 13%, lo que hace que la listeriosis sea una de las enfermedades de transmisión alimentaria más graves registradas por la UE.

Un fenómeno observado en los últimos años es la tendencia creciente de resistencia bacteriana a los antibióticos, que supone una amenaza global para la Salud Pública, ya que involucra tanto a los principales microorganismos patógenos como a los diferentes antimicrobianos. La presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en los productos alimenticios es un problema preocupante debido a la posibilidad de que provoquen infecciones humanas. Además, las bacterias resistentes a los antimicrobianos pueden representar un reservorio de genes de resistencia, con posibilidad de ser transferidos a otros grupos microbianos en la cadena alimentaria (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Se estima que, dentro de tres décadas, las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos provocarán en torno a diez millones de muertes cada año en todo el mundo (Capita *et al.*, 2019). Estas cifras deben contrastarse con los 700.000 fallecimientos atribuibles a la resistencia a los antibióticos en 2014 (O'Neill, 2016). Las consecuencias financieras de la resistencia a los antibióticos son también de considerable peso, con estimaciones de que las infecciones por estas bacterias cuestan a los sistemas sanitarios de los países de la UE y del EEE más de 1.000 millones de euros cada año (OECD, 2019).

La resistencia a los antibióticos es un problema multisectorial que comprende la interfaz entre seres humanos, animales y medio ambiente. El hecho de que la salud humana y veterinaria, los sistemas de producción de alimentos y piensos, y los entornos agroecológicos contribuyan a esta resistencia y se vean afectados por ella, apunta a la necesidad de aplicar el enfoque de "One Health", que sea a la vez multisectorial y multidimensional, para mitigar su prevalencia (FAO, 2016).

Los aditivos alimentarios son sustancias que se añaden a los alimentos con un propósito tecnológico (para mejorar su aspecto, textura, inactivar microorganismos, etc.) en distintas etapas de su fabricación, transporte o almacenamiento (AESAN, 2019). De acuerdo con lo establecido por el Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión Europea, existen diversos aditivos que se pueden añadir a la carne para reducir su carga microbiana y prolongar su vida útil. Uno de ellos es el nitrito de sodio (NS), también denominado E 250, utilizado para la elaboración de productos cárnicos curados. En el estudio de Alonso-Hernando *et al.* (2013) se observó una reducción significativa de la carga microbiana en carne de pollo tras la utilización de este compuesto. El aditivo comúnmente utilizado para inhibir la presencia de patógenos alimentarios como *L. monocytogenes* es la nisina, antibiótico peptídico policíclico natural que actúa principalmente contra las bacterias Gram-positivas y conocido como E 234. La nisina actualmente no se encuentra aprobada por la legislación

europea para la aplicación en carne y preparados cárnicos debido a la baja ingesta diaria admisible (IDA), pero sí en países como EE.UU. (Codex Alimentarius, 2013). Otro aditivo muy utilizado es el ácido láctico (AL), denominado a su vez E 270 y empleado habitualmente para pastas alimenticias y alimentos para lactantes, entre otros productos, aplicándose a los alimentos *quantum satis*. Estudios previos (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2017) han demostrado que el ácido láctico a una concentración del 3% reduce significativamente la carga microbiana en las superficies de las canales de vacuno, modificando solo mínimamente sus propiedades organolépticas.

El objetivo principal de este trabajo ha sido comparar la eficacia antimicrobiana de varios aditivos (nitrito sódico, NS; nisina, NI; ácido láctico, AL) en carne picada de pollo procedente de diferentes establecimientos de España y Portugal. Para ello, se han determinado, en los grupos de muestras tratadas con cada uno de los compuestos, 1) los niveles de algunos microorganismos indicadores de calidad higiénica (microbiota aerobia viable, microorganismos psicrotrofos, enterobacterias), 2) la prevalencia de *Listeria monocytogenes* y 3) los niveles de resistencia a antibióticos de este microorganismo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Toma de muestras

Se adquirieron 20 muestras de carne picada de pollo en diferentes establecimientos de la ciudad de León (España; 10 muestras) y la ciudad de Vila Real (Portugal; 10 muestras). Todas las muestras fueron trasladadas, en envoltorios individuales, a los respectivos laboratorios de cada localización geográfica, donde se procesaron de forma inmediata.

2.2. Procesado de las muestras

A partir de cada muestra de carne picada se tomaron 8 alícuotas. El proceso se llevó a cabo utilizando pinzas, cuchara y papel de aluminio estériles y en condiciones de máxima asepsia posible. Cada una de las muestras tenía un peso de $25 \pm 0,5$ g.

De las 8 muestras, 6 de ellas se trataron depositando 2,5 ml de aditivos: dos con nitrito sódico (NS, Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.) a una concentración de 1 g/l (2,5 mg por cada 25 g de muestra; 100 ppm), otras dos con nisina (NI, Sigma Aldrich) a una concentración de 100 mg/l (0,25 mg por cada 25 g de muestra; 10 ppm) y dos más con ácido láctico (AL, Kosher, Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.) a una concentración de 3% (75 mg por cada 25 g de muestra; 3.000 ppm). Las dos últimas muestras se trataron con 2,5 ml de agua del grifo estéril y fueron utilizadas como control. Dentro de cada tratamiento, una alícuota se utilizó para conocer los niveles de contaminación con microorganismos indicadores de calidad higiénica y la otra para determinar la presencia de *L. monocytogenes*. Las soluciones de los aditivos se realizaron utilizando agua del grifo estéril en condiciones asépticas. Las concentraciones empleadas se encuentran dentro de los límites establecidos por la legislación vigente y el *Codex Alimentarius*. Una vez añadidos los aditivos, las muestras se almacenaron durante 24 horas a 4 ± 1 °C antes de proceder a su análisis.

2.3. Determinaciones microbiológicas

Las alícuotas de carne picada utilizadas para determinar los niveles de microorganismos indicadores de calidad higiénica (80 en total) se colocaron en sendas bolsas de homogeneización estériles con filtro. En cada una de las bolsas se depositaron 225 ml de agua de peptona al 0,1% (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido). Todas las muestras se homogeneizaron durante 120 segundos en un homogeneizador de paletas (Masticator IUL Instruments, Barcelona, España). A partir del homogeneizado se realizaron diluciones decimales en el mismo diluyente.

Para los recuentos de microbiota aerobia viable y de microorganismos psicrotrofos se utilizó agar para recuento en placa (PCA; Oxoid), empleando la técnica de siembra en superficie. Las determinaciones de enterobacterias se realizaron en agar bilis rojo neutro cristal violeta con glucosa (VRBGA, Oxoid) utilizando la técnica de siembra en profundidad con adición de sobrecapa. En la Tabla VII.1 se muestran los medios de cultivo, condiciones de incubación y referencias empleados para cada uno de los grupos microbianos examinados.

Tabla VII.1. Medios de cultivo utilizados, temperaturas y tiempos de incubación empleados.

GRUPO MICROBIANO	MEDIO DE CULTIVO	INCUBACIÓN		REFERENCIA
		Tiempo	Temperatura (°C)	
MICROBIOTA AEROBIA VIABLE	PCA	3 días	30 °C	Jay (2002)
MICROORGANISMOS PSICOTROFOS	PCA	10 días	7 °C	Cousin <i>et al.</i> (2001)
ENTEROBACTERIAS	VRBGA	24 horas	37 °C	Baird <i>et al.</i> (1987)

¹, agar para recuento en placa, técnica de siembra en superficie (0,1ml); ², agar cristal violeta, rojo neutro, sales biliares, glucosa, ³ técnica de siembra en profundidad (1 ml) con adición de sobrecapa. Las siembras se realizaron por duplicado.

Las alícuotas de carne picada utilizadas para la detección y el aislamiento de *L. monocytogenes* (80) se homogeneizaron en 225 ml de caldo Half Fraser (Oxoid). Las bolsas se incubaron a 30 °C durante 24h. Transcurrido este tiempo, se transfirieron alícuotas de 100 µl a tubos con 10 ml de caldo Fraser. Los tubos se incubaron a 37 °C. Al cabo de 24 horas se procedió a la siembra en la superficie de agar cromogénico para *Listeria* (OCLA, Oxoid), incubándose las placas a 37 °C durante 48 h. Las colonias azul-verdosas rodeadas de un halo de aclaramiento se consideraron presuntas *L. monocytogenes* o *L. ivanovii*. Las colonias azul-verdosas sin halo se consideraron presuntas listerias pertenecientes a especies no patógenas. A partir de cada muestra que presentaba colonias azul-verdosas con halo se tomaron 5 colonias (o todas las colonias presentes, si el número era inferior a 5), que se conservaron a - 50 °C en TSB (Oxoid) con un 20% de glicerol, para su posterior identificación.

2.4. Identificación de las presuntas cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas

Las colonias aisladas con presunta morfología de *Listeria monocytogenes* se confirmaron por el método molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los

cebadores y condiciones específicas para la detección del gen *lmo1030*. Los cebadores usados para la detección se muestran en la Tabla VII.2.

Tabla VII.2. Genes y cebadores utilizados para identificar las presuntas cepas de *Listeria monocytogenes* por PCR.

Gen	Primer	Secuencia (5' → 3')	Tª de anillamiento (°C) (tamaño de la banda, pb)	Referencia
<i>lmo1030</i>	Lmo1030-F	GCTTGATTTCACTTGGATTTGTCTGG	62 (509)	Ryu <i>et al.</i> , 2013
	Lmo1030-R	ACCATCCGCATATCTCAGCCAACT		

Para extraer el ácido desoxirribonucleico (ADN), se inocularon 20 µl de cada cepa, que se mantenía congelada, en tubos de ensayo con 9 ml de TSB, incubándose durante 24 horas a 37 °C. Una vez transcurrido este periodo, se extrajo el ADN de 1,5 ml del cultivo, realizando dos ciclos de centrifugación a 13.000 rpm durante 60 segundos, y dejándolo en un baño de agua a 100 °C durante 30 minutos. La pureza y la concentración del ADN se determinaron con un espectrofotómetro Nano-Drop One (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, Estados Unidos) utilizándose una longitud de onda de 260 nm. Las muestras cuya concentración de ADN se encontraba en el rango de 80 ng/µl a 180 ng/µl se consideraron aptas para llevar a cabo el estudio.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 µl, utilizando 0,5 µM de cada cebador (Isogen Life Sciences, Barcelona, España), mezcla 0,2 mM de desoxinucleósidos trifosfato (dNTP's) (EUR_x, Gdansk, Polonia), 1× de tampón de reacción (EUR_x, Gdansk, Polonia), 3mM de MgCl₂ (EUR_x, Gdansk, Polonia), 1,25U de ADN Taq polimerasa (Bioron, GbmH, Ludwingshafen, Alemania) y 5 µl de solución extraída de ADN de *L. monocytogenes*. Se completó el volumen final con agua destilada estéril.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Bio-Rad (Hercules, California, EE.UU.), programado de la siguiente manera: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, anillamiento a 62 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 45 segundos), y, por último, una elongación a 72 °C durante 5 minutos.

Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Bioron, GbmH, Ludwingshafen, Alemania) al 1% (peso/volumen) en tampón Tris acetato-EDTA (TAE) 1×, teñido con Symply safe diluido a 1:10.000 (EUR_x, Gdansk, Polonia).

Para la visualización de las bandas de electroforesis se empleó un transiluminador (Gel Doc EZ System, Bio-Rad). El tamaño de cada producto de la PCR se estimó utilizando marcadores de peso molecular estándar (escalera de ADN de 10 kb; Bioron). Se utilizó un tampón de carga consistente en glicerol (Panreac AppliChem, Darmstadt, Alemania) y azul de bromofenol (Panreac Química S. L. U., Barcelona, España). En todos los ensayos de PCR se incluyeron controles negativos (muestras sin ADN) y controles positivos (ADN de *L. monocytogenes* ATCC 13932, de la colección de cepas del grupo SEGURALI de Universidad de León, España).

2.5. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Se determinó la susceptibilidad de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas a 15 antibióticos de interés clínico utilizando la técnica de difusión por disco en agar Mueller Hinton (MHA, Oxoid) (CLSI, 2018). Se utilizaron los siguientes discos de antibióticos (Oxoid): ampicilina (AMP, 10 µg), oxacilina (OX, 1 µg), gentamicina (CN, 10 µg), eritromicina (E, 15 µg), vancomicina (VA, 30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 25 µg), rifampicina (RD, 5 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), cloranfenicol (C, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), enrofloxacina (ENR, 5 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), cefepima (FEP, 30 µg) y nitrofurantoína (F, 300 µg).

Tras la incubación (24 h a 37 °C) se midieron los halos de inhibición y las cepas se clasificaron como susceptibles, con susceptibilidad reducida (intermedias) o resistentes según los criterios de EUCAST (2021) y CLSI (2020).

2.6. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico, los recuentos microbianos se transformaron en unidades logarítmicas (\log_{10} ufc/g) y se compararon utilizando técnicas de análisis de varianza (ANOVA), realizándose la separación de medias con la prueba de Duncan. Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de probabilidad del 5% ($P < 0,05$). El análisis estadístico se realizó con ayuda del programa informático Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Recuentos microbianos

Los niveles microbianos en cada uno de los grupos de muestras analizados se presentan en la Tabla VII.3. Los recuentos de microbiota aerobia viable -MAV- oscilaron entre $5,51 \pm 1,05 \log_{10}$ ufc/g (muestras tratadas con ácido láctico) y $7,49 \pm 1,05 \log_{10}$ ufc/g (muestras control, no tratadas). Por lo que respecta a los microorganismos psicrotrofos, los recuentos oscilaron entre $5,59 \pm 1,14 \log_{10}$ ufc/g (ácido láctico) y $7,12 \pm 1,05 \log_{10}$ ufc/g (control). Finalmente, los niveles de enterobacterias se encontraron entre $2,33 \pm 0,51 \log_{10}$ ufc/g (ácido láctico) y $4,23 \pm 0,88 \log_{10}$ ufc/g (control). Hay que señalar que la carga microbiana disminuyó de forma significativa respecto a las muestras control únicamente en las muestras tratadas con ácido láctico.

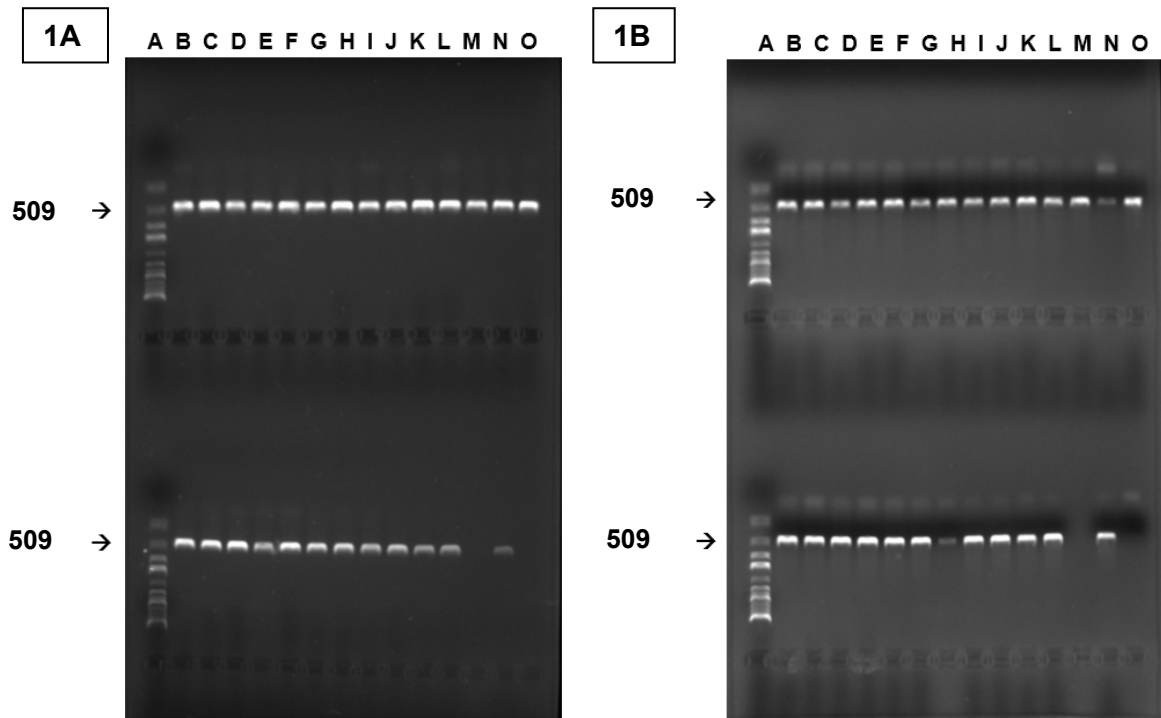
Tabla VII.3. Recuentos microbianos (\log_{10} ufc/g) obtenidos en muestras de carne picada no tratadas y tratadas con diferentes aditivos.

GRUPO MICROBIANO	TRATAMIENTO			
	Control	Nitrito sódico	Nisina	Ácido láctico
MAV	$7,49 \pm 1,05a$	$7,01 \pm 1,23a$	$7,18 \pm 1,24a$	$5,51 \pm 1,05b$
Psicrotrofos	$7,12 \pm 1,05a$	$6,66 \pm 1,18a$	$7,02 \pm 1,16a$	$5,59 \pm 1,14b$
Enterobacterias	$4,23 \pm 0,88a$	$3,78 \pm 1,35a$	$3,96 \pm 0,95a$	$2,33 \pm 0,51b$

MAV, microbiota aerobia viable. Los valores que en la misma fila comparten alguna letra no muestran diferencias significativas entre sí ($P > 0,05$).

3.2. Prevalencia de *Listeria monocytogenes*

Todas las colonias aisladas del medio de cultivo OCLA con morfología característica de *Listeria monocytogenes* (250 en total) presentaron el gen *Imo1030*, lo que las identifica molecularmente como *L. monocytogenes*. Algunos de los resultados de la amplificación del gen *Imo1030* de los aislamientos de *L. monocytogenes* y la cepa ATCC 13932, tomada como control positivo, se muestran en la Figura VII.1.



1A: aislamientos de muestras 6 y 7 de carne picada española (CP) control, tratadas con NS, NI o AL, siendo, por carriles: (peine superior) A = marcador de tamaño (250 a 10000 pb), B = CP6 control LM1, C = CP6 control LM2, D = CP6 control LM3, E = CP6 control LM4, F = CP6 control LM5, G = CP6 NS LM1, H = CP6 NS LM2, I = CP6 NS LM3, J = CP6 NS LM4, K = CP6 NS LM5, L = CP6 NI LM1, M = CP6 NI LM2, N = CP6 NI LM3, O = CP6 NI LM4; (peine inferior) A = control de peso, B = CP6 NI LM5, C = CP6 AL LM1, D = CP6 AL LM2, E = CP6 AL LM3, F = CP6 AL LM4, G = CP6 AL LM5, H = CP7 control LM1, I = CP7 control LM2, J = CP7 control LM3, K = CP7 control LM4, L = CP7 control LM5, M = sin muestra, N = control positivo ATCC 13932, O = control negativo (H₂O MilliQ). **1B:** aislamientos de muestras 4 y 5 de carne picada portuguesa (CPT) control, tratadas con NS, NI o AL, siendo, por carriles: (peine superior) A = marcador de tamaño (250 a 10000 pb), B = CPT4 control LM1, C = CPT4 control LM2, D = CPT4 control LM3, E = CPT4 control LM4, F = CPT4 control LM5, G = CPT4 NS LM1, H = CPT4 NS LM2, I = CPT4 NS LM3, J = CPT4 NS LM4, K = CPT4 NS LM5, L = CPT4 NI LM1, M = CPT4 NI LM2, N = CPT4 NI LM3, O = CPT4 NI LM4; (peine inferior) A = control de peso, B = CPT4 NI LM5, C = CPT4 AL LM1, D = CPT4 AL LM2, E = CPT4 AL LM3, F = CPT4 AL LM4, G = CPT4 AL LM5, H = CPT5 control LM1, I = CPT5 control LM2, J = CPT5 control LM3, K = CPT5 control LM4, L = CPT5 control LM5, M = sin muestra, N = control positivo ATCC 13932, O = control negativo (H₂O MilliQ).

Figura VII.1. Geles de electroforesis que muestran las bandas de amplificación del gen *lmo1030* (509 pb) en cepas de *L. monocytogenes*.

La prevalencia de *L. monocytogenes* en las muestras de carne picada control (sin tratar con aditivos) fue del 70% (14 muestras positivas de las 20 examinadas). Estos valores se redujeron hasta el 60% (12 muestras en el caso de las tratadas con NS), 65% (13 muestras tras el tratamiento con NI) o 50% (10 de las muestras tratadas con AL).

3.3. Susceptibilidad a antibióticos

Se determinó la susceptibilidad de las 250 cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a un panel de 15 antibióticos de importancia clínica. El porcentaje de cepas susceptibles, con susceptibilidad reducida (intermedias) o resistentes (considerando simultáneamente todos los antibióticos) se muestra en la Figura VII.2. Se pudo observar la presencia de cepas resistentes a los antibióticos con anterioridad a los tratamientos con aditivos, siendo los valores obtenidos del 41,33 % en el caso de las cepas aisladas de carne picada procedente de España, y del 33,33% para las cepas aisladas de carne picada portuguesa. Tras el tratamiento durante 24 horas con los aditivos, se observó un aumento del porcentaje de resistencias, que alcanzaron los valores de 43,62% (muestras tratadas con NS), 44,17% (NI) y 49,14% (AL) en el caso de las muestras de origen español, y porcentajes de 40,27% (NS), 40,53% (NI) y 38,40% (AL) por lo que respecta a las muestras procedentes de Portugal.

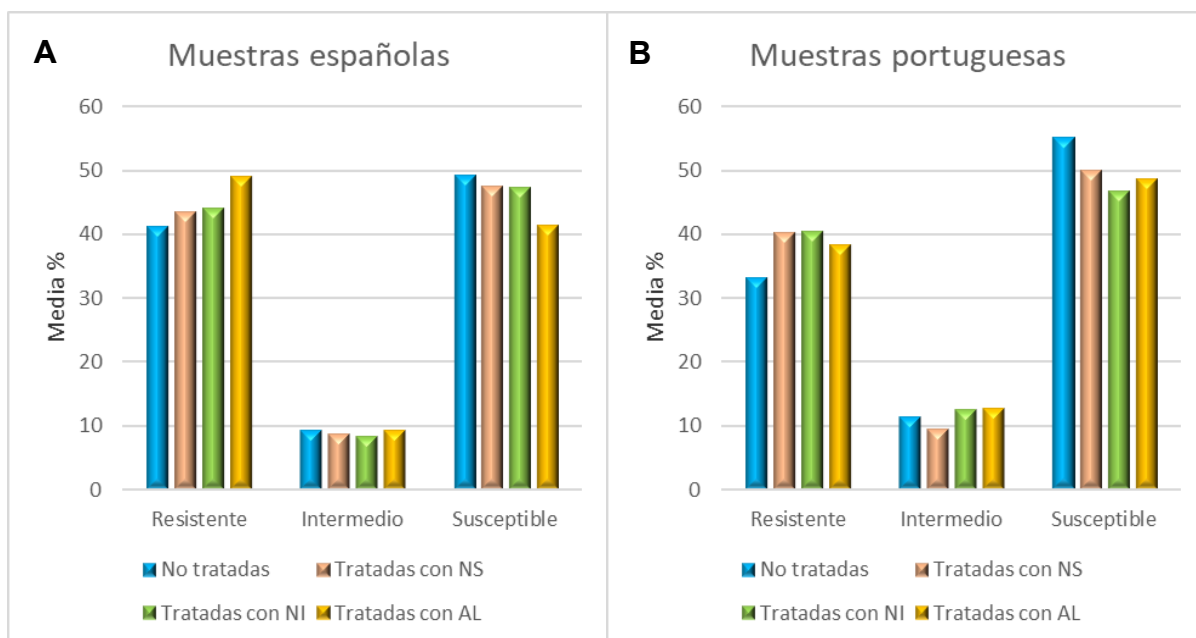


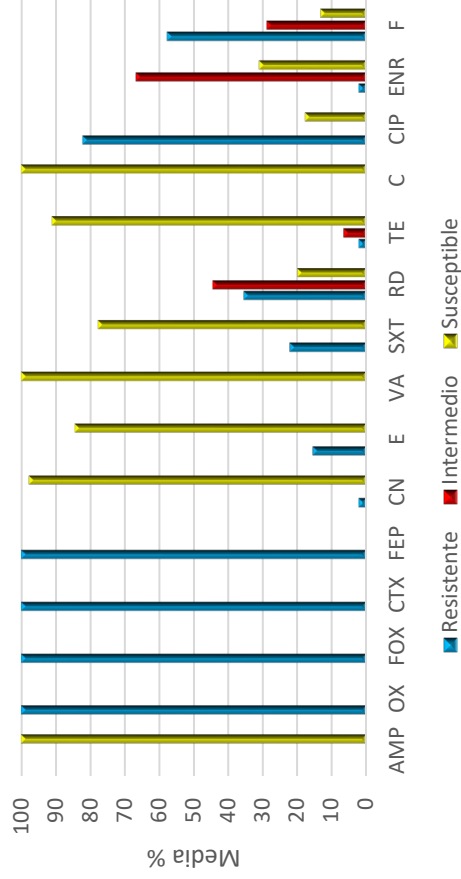
Figura VII.2. Porcentajes medios de resistencia, susceptibilidad reducida (intermedia) o susceptibilidad en cepas de *L. monocytogenes* aisladas de muestras de carne picada española (A) y portuguesa (B) en función del tratamiento recibido. NS, nitrito sódico; NI, nisina; AL, ácido láctico.

Las Figuras VII.3 y VII.4 muestran los porcentajes de cepas resistentes a cada uno de los antibióticos examinados. En las muestras no tratadas se encontraron importantes diferencias entre antibióticos, destacando un 100% de cepas resistentes a OX, FOX, CTX y FEP en las muestras de origen español, y a OX, FOX y FEP en las procedentes de Portugal. Otros

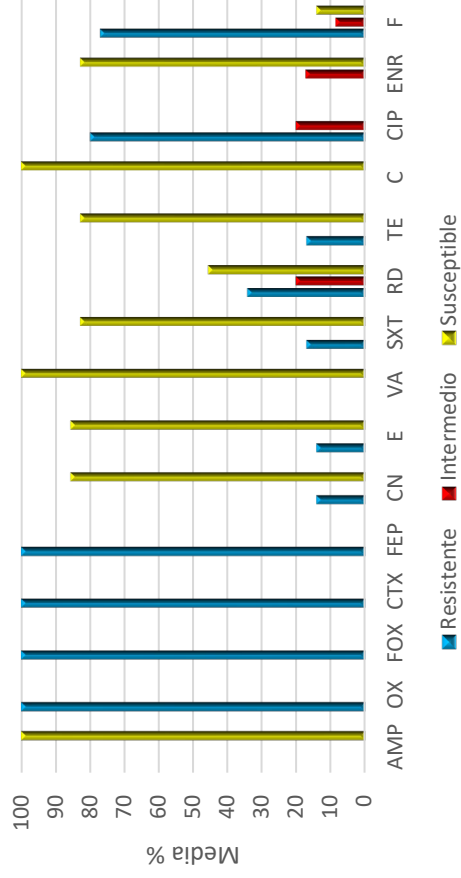
antibióticos a los que se observaron elevadas tasas de resistencia fueron CIP y F, tanto en cepas aisladas de carne picada adquirida en España como en las procedentes de Portugal.

Tras los tratamientos con aditivos se observaron algunos cambios en la resistencia de las cepas. Así, de manera general, después de 24 horas de contacto con estos compuestos se puso de manifiesto un aumento en las resistencias a CN, E, RD y TE en las cepas de origen español, destacando el nitrito sódico y el ácido láctico como aditivos que provocaron los porcentajes más elevados con respecto a las cepas no tratadas. Sin embargo, en cepas de origen portugués se observó una tendencia al aumento de las resistencias a CN, E, SXT y RD con respecto a las procedentes de muestras no tratadas. En este caso destaca el tratamiento con nisina, que también causó un elevado porcentaje de resistencias a TE con respecto a otros tratamientos o muestras no tratadas.

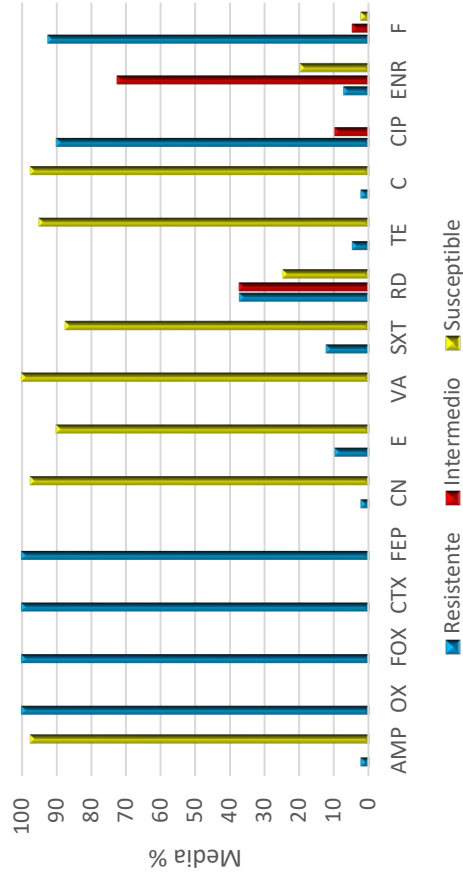
Muestras españolas no tratadas



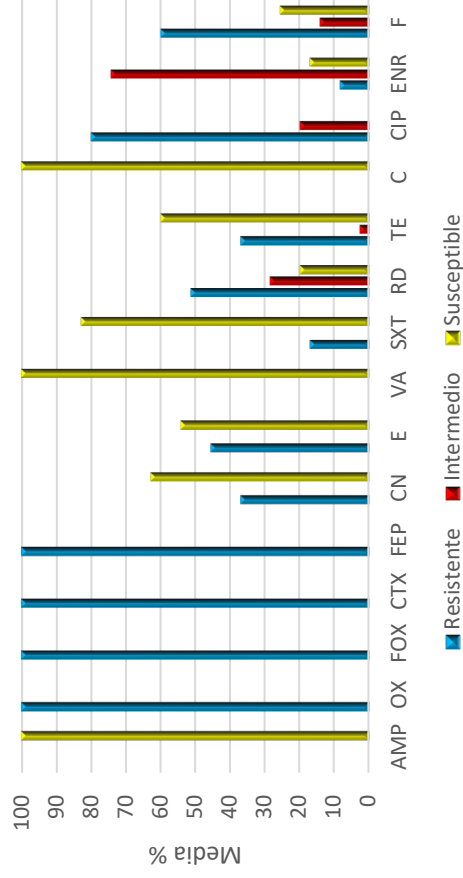
Muestras españolas tratadas con NS



Muestras españolas tratadas con NI



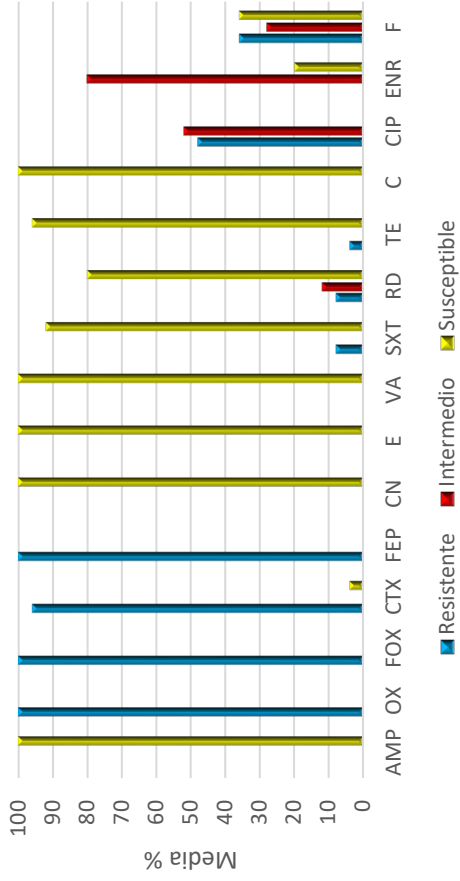
Muestras españolas tratadas con AL



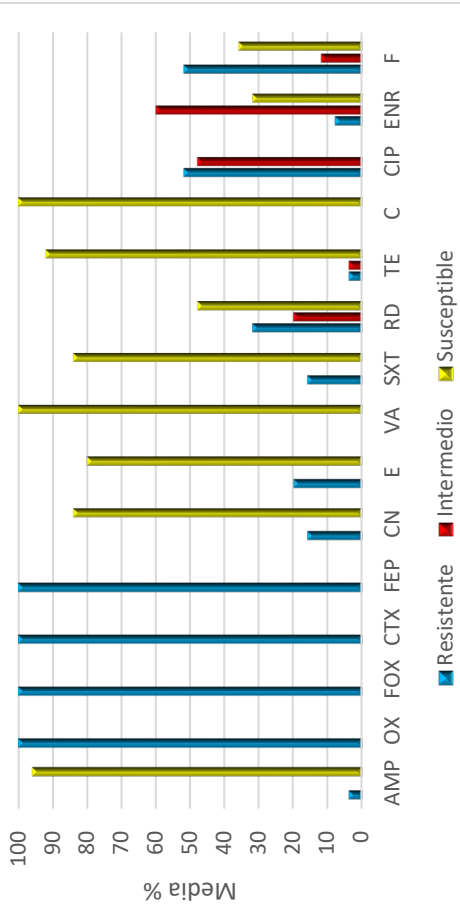
AMP (ampicilina, 10 µg), OX (oxacilina, 1 µg), FOX (cefoxitina, 30 µg), CTX (cefotaxima, 30 µg), FEP (cefepima, 30 µg), CN (gentamicina, 10 µg), E (eritromicina, 15 µg), VA (vancomicina, 30 µg), SXT (trimetoprim-sulfametoxazol, 25 µg), RD (rifampicina, 5 µg), TE (tetraciclina, 30 µg), C (cloranfenicol, 30 µg), CIP (ciprofloxacina, 5 µg), ENR (entofloxacina, 5 µg) y F (nitrofurantoina, 300 µg).

Figura VII.3. Porcentajes medios de susceptibilidad a cada antibiótico ensayado en cepas de *L. monocytogenes* aisladas de muestras de carne de pollo picada de origen español tratadas con aditivos y no tratadas.

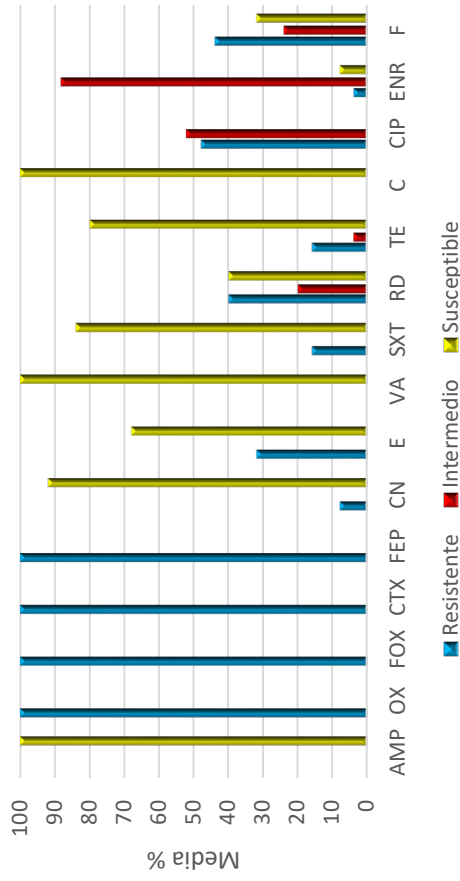
Muestras portuguesas no tratadas



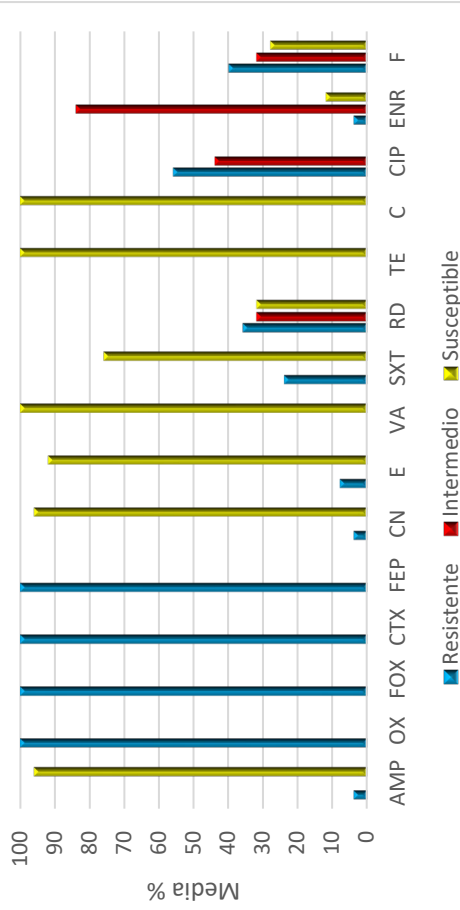
Muestras portuguesas tratadas con NS



Muestras portuguesas tratadas con NI



Muestras portuguesas tratadas con AL



AMP (ampicilina, 10 µg), OX (oxacilina, 1 µg), FOX (cefoxitina, 30 µg), CTX (cefotaxima, 30 µg), FEP (cefepima, 30 µg), CN (gentamicina, 10 µg), E (eritromicina, 15 µg), VA (vancomicina, 30 µg), SXT (trimetoprim-sulfametoxazol, 25 µg), RD (rifampicina, 5 µg), TE (tetraciclina, 30 µg), C (cloranfenicol, 30 µg), CIP (ciprofloxacina, 5 µg), ENR (entofloxacina, 5 µg) y F (nitrofurantoina, 300 µg).

Figura VII.4. Porcentajes medios de susceptibilidad a cada antibiótico ensayado en cepas de *L. monocytogenes* aisladas de muestras de carne de pollo picada de origen portugués tratadas con aditivos y no tratadas.

En la Tabla VII.4 se muestran los diferentes patrones de resistencia a antibióticos encontrados. El más frecuentemente observado fue el patrón OX-FOX-CTX-FEP-CIP-F, mostrado por 43 cepas (32 aisladas de carne picada de origen español y 11 procedentes de carne picada adquirida en Portugal). Otros patrones de resistencia frecuentes fueron: OX-FOX-CTX-FEP-RD-CIP-F (20 cepas), OX-FOX-CTX-FEP-CIP (16 cepas), OX-FOX-CTX-FEP-F (15 cepas) y OX-FOX-CTX-FEP (11 cepas).

Tabla VII.4. Patrones de resistencia a antibióticos de *L. monocytogenes* en carne de pollo picada de origen español y portugués.

Patrón de resistencia a antibióticos	Número de cepas		
	De origen español	De origen portugués	Totales
OX-FOX-CTX-FEP	0	11	11
OX-FOX-CTX-FEP-SXT	0	2	2
OX-FOX-CTX-FEP-RD	0	6	6
AMP-OX-FOX-CTX-FEP	0	1	1
OX-FOX-CTX-FEP-CIP	10	6	16
OX-FOX-CTX-FEP-F	7	8	15
OX-FOX-CTX-FEP-TE-F	2	0	2
OX-FOX-CTX-FEP-ENR-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-SXT-CIP	0	1	1
OX-FOX-CTX-FEP-SXT-RD	0	4	4
OX-FOX-CTX-FEP-E-CIP	0	1	1
OX-FOX-CTX-FEP-RD-F	0	1	1
AMP-OX-FOX-CTX-FEP-E	0	1	1
OX-FOX-CTX-FEP-CIP-F	32	11	43
OX-FOX-CTX-FEP-RD-CIP	1	1	2
OX-FOX-CTX-FEP-CIP-ENR-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-CN-SXT-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-CN-RD-TE	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-SXT-CIP-F	0	2	2
AMP-OX-FOX-CTX-FEP-CIP-F	0	1	1
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-RD	0	1	1
OX-FOX-CTX-FEP-RD-CIP-F	17	3	20
OX-FOX-CTX-FEP-E-CIP-F	3	2	5
OX-FOX-CTX-FEP-E-RD-CIP-F	2	0	2
OX-FOX-CTX-FEP-E-SXT-CIP-F	2	0	2
OX-FOX-CTX-FEP-E-TE-CIP-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-RD-C-CIP-F	1	0	1
AMP-OX-FOX-CTX-FEP-SXT-TE-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-E-RD-TE-CIP	0	1	1
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-SXT-RD	0	1	1

OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-RD-TE	1	1	2
OX-FOX-CTX-FEP-SXT-RD-CIP-F	4	1	5
OX-FOX-CTX-FEP-RD-CIP-ENR-F	1	1	2
OX-FOX-CTX-FEP-SXT-RD-CIP-ENR-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-CN-SXT-RD-TE-CIP	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-SXT-RD-TE	3	0	3
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-RD-TE-CIP	5	0	5
OX-FOX-CTX-FEP-E-RD-TE-CIP-F	0	3	3
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-SXT-RD-CIP	0	1	1
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-SXT-RD-CIP-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-RD-TE-CIP-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-SXT-RD-TE-CIP	2	0	2
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-RD-TE-ENR-F	1	0	1
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-SXT-RD-CIP-ENR	0	3	3
OX-FOX-CTX-FEP-CN-E-SXT-RD-TE-CIP-ENR-F	1	0	1

AMP (ampicilina, 30 µg), OX (oxacilina, 1 µg), FOX (cefoxitina, 30 µg), CTX (cefotaxima, 30 µg), FEP (cefepima, 30 µg), CN (gentamicina, 10 µg), E (eritromicina, 15 µg), SXT (trimetoprim-sulfametoxazol, 25 µg), RD (rifampicina, 5 µg), TE (tetraciclina, 30 µg), CIP (ciprofloxacina, 5 µg), ENR (enrofloxacina, 5 µg) y F (nitrofurantoína, 300 µg).

4. DISCUSIÓN

4.1. Recuentos microbianos

Nuestros resultados, por lo que respecta a MAV y a microorganismos psicrotrofos, los niveles se encuentran dentro del rango de valores (\log_{10} ufc/g) encontrados en preparados de carne de ave procedente de establecimientos de venta al público, tanto en España ($6,29 \pm 0,64$ a $7,28 \pm 0,51$; Álvarez-Astorga *et al.*, 2002) como fuera de nuestras fronteras ($6,05 \pm 0,18$; Lerasle *et al.*, 2014).

Actualmente se aplica en la Unión Europea un plan de muestreo de tres categorías ($n = 5$, $c = 3$, $m = 5,70 \log_{10}$ ufc/g y $M = 6,70 \log_{10}$ ufc/g) para microorganismos psicrotrofos en carne picada al final del proceso de fabricación (DOUE, 2005) siendo “n” el número de unidades que componen la muestra y “c” el número máximo de unidades de muestra que pueden dar valores entre los límites microbiológicos “m” y “M”. Los resultados son satisfactorios si todos los valores (n) observados son inferiores a m, aceptables si un máximo de c valores están entre m y M, e insatisfactorios si más de c unidades dan recuentos superiores a m, o si uno o más de los valores observados son superiores a M. En el presente estudio los recuentos medios de microorganismos psicrotrofos se encuentran entre m y M, por lo que la carne podría considerarse de calidad aceptable. Además de los requisitos legales, se han desarrollado directrices y recomendaciones para monitorizar la calidad microbiológica de la carne (ICMSF, 2011; IFST, 1997). Los recuentos de microorganismos psicrotrofos obtenidos el presente trabajo no encajan en estas directrices internacionales de Buenas Prácticas de Fabricación (niveles deseables de $5 \log_{10}$ ufc/g) y están cerca o por encima del nivel máximo aceptable ($7 \log_{10}$ ufc/g). Hay que señalar que los niveles microbianos superiores a $7 \log_{10}$ ufc por gramo o cm^2 generalmente se asocian con alteraciones sensoriales incipientes (ICMSF, 2011).

Durante el tiempo de almacenamiento a refrigeración en el establecimiento y hasta su adquisición, es probable que los niveles de bacterias aerobias hayan aumentado en relación con los niveles iniciales, como se ha indicado con anterioridad (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Del Río *et al.*, 2007). En este sentido, hay que señalar que no se conoce el tiempo exacto que la carne permaneció en el establecimiento antes de su adquisición.

Los recuentos de enterobacterias oscilaron entre $2,33 \pm 0,51 \log_{10}$ ufc/g (muestras tratadas con ácido láctico) y $4,23 \pm 0,88 \log_{10}$ ufc/g (muestras control). En el caso de las muestras tratadas con NS, se obtuvieron recuentos de $3,78 \pm 1,35 \log_{10}$ ufc/g. Wójciak *et al.* (2019) observaron en carne picada procedente de vacuno y cerdo que los niveles de enterobacterias aumentaban con la disminución del contenido de nitrito de sodio, desde 2,75

\log_{10} ufc/g para el nivel más alto del aditivo hasta 6,03 \log_{10} ufc/g con la menor adición de nitrito. Los resultados obtenidos por estos autores revelaron que la adición de 100 mg/kg de nitrito de sodio (concentración usada en el presente estudio) sería adecuada para la carne picada, sin efectos inesperados significativos sobre el color, la estabilidad oxidativa y la seguridad microbiológica en comparación con la muestra control (Wójciak *et al.*, 2019).

En cuanto a las muestras de carne picada españolas y portuguesas tratadas con nisina, no se observaron diferencias significativas en los recuentos de MAV, psicrotrofos y enterobacterias con respecto a las muestras control. Sin embargo, algunos estudios, como el de Yuste *et al.* (2002), señalan que la adición de concentraciones de 100 o 200 ppm de nisina junto con una presurización de 450 Mpa en muestras de carne de pollo separada mecánicamente reduce significativamente la carga microbiana presente. Hay que señalar que en el presente trabajo de investigación se han empleado concentraciones más bajas, de 10 ppm.

Las muestras tratadas con AL fueron las que presentaron los menores niveles ($P < 0,05$) de todos los grupos microbianos estudiados. En estudios recientes (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2017) se ha demostrado la eficacia de este compuesto antimicrobiano a concentración del 3% como descontaminante de canales de vacuno, sin excesivas modificaciones en los parámetros sensoriales.

4.2. Prevalencia de *Listeria monocytogenes*

Se identificaron, mediante PCR, un total de 250 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de diferentes muestras de carne picada de pollo española y portuguesa, tratadas y no tratadas con aditivos de uso alimentario.

Los resultados obtenidos mostraron un 100% de concordancia entre la metodología de aislamiento en placa por medios cromogénicos (OCLA) y la PCR, ya que todas las colonias aisladas que presentaban la morfología típica de *L. monocytogenes* (colonias azul-verdosas con halo) fueron confirmadas por PCR. Estos resultados son similares a los de otros estudios, en los que se han observado valores de concordancia entre la técnica clásica y la PCR para la detección de *L. monocytogenes* de 100%, 98,4% y 89,4% (Burbano *et al.* 2011; De la Rosa Zariñana *et al.*, 2018; Poutou *et al.* 2005).

La prevalencia de *L. monocytogenes* osciló entre el 50% y el 70% de las muestras de carne picada. Estos valores son similares a los observados en despieces (56,0%; Panera-Martínez *et al.*, 2022). En estudios previos se han obtenido datos de prevalencia de *L. monocytogenes* en carne de pollo en el noroeste de España del 24,5% (Alonso-Hernando *et*

al., 2012) y el 32,0% (Capita *et al.*, 2001). Otros datos de prevalencia encontrados en la bibliografía se indican a continuación: entre el 0,0% y el 58,0% (Jamshidi y Zainali, 2019; Ristori *et al.*, 2014), del 0,2% al 2,5% (Kanarat *et al.*, 2011), del 4,3% al 7,1% (Kosek-Paszowska *et al.*, 2005), del 8,6% al 44,2% (Schäfer *et al.*, 2017), del 9,4% (Osaili *et al.*, 2011), del 11,4% al 14,1% (Fallah *et al.*, 2012), del 12,7% (Bilir Ormanci *et al.*, 2008), del 15,8% (Sugiri *et al.*, 2014), del 17,9% (Oliveira *et al.*, 2018), del 18,0% (Soultos *et al.*, 2003), del 18,2% (Osaili *et al.*, 2011), del 19,2% (Van Nierop *et al.*, 2005), del 19,3% (Gonçalves-Tenorio *et al.*, 2018), del 20,0% (Saludes *et al.*, 2015), del 22,2% (Gudbjörnsdóttir *et al.*, 2004), del 26,4% (Kuan *et al.*, 2013), del 34,0% (Gunasena *et al.*, 1995), del 36,1% (Vitas *et al.*, 2004), del 38,0% (Sakaridis *et al.*, 2011), del 38,2% (Uyttendaele *et al.*, 1999), del 40,0% (Zeinali *et al.*, 2017), del 41,0% (Antunes *et al.*, 2002), del 45,0% (Elmali *et al.*, 2015) y del 58,0% (Ristori *et al.*, 2014). Hay que señalar que las diferencias entre estudios pueden deberse, al menos en parte, al tipo de muestras analizadas, que consisten en despieces o canales en la mayoría de los trabajos consultados. En el presente estudio se empleó carne picada, por lo que es esperable una prevalencia más alta, puesto que, durante el procesado y manipulación necesarios para fabricar preparaciones cárnicas, hay un riesgo alto de contaminación con diferentes microorganismos, incluyendo *L. monocytogenes* (Oliveira *et al.*, 2018).

4.3. Susceptibilidad a antibióticos

Los microorganismos resistentes a los antimicrobianos se pueden desarrollar y transmitir entre los animales destinados a la producción de alimentos y los seres humanos por exposición directa o a través de la cadena alimentaria y el medio ambiente (FAO, 2016). La presencia de bacterias con múltiples resistencias a antibióticos de importancia clínica se ha estudiado previamente en muestras de carne de aves de corral (Alonso-Hernando *et al.*, 2009, 2012; Álvarez-Fernández *et al.*, 2012; Buzón-Durán *et al.*, 2017), obteniéndose, al igual que en el presente estudio, elevadas tasas de resistencia, lo cual implica un desafío crucial para la Salud Pública, ya que muchos antimicrobianos de empleo habitual en la práctica clínica están invalidados como opciones terapéuticas.

En el presente estudio se han observado tasas de resistencia superiores al 50% en el caso de OX, FOX, CTX, FEP y F en las cepas de origen español y OX, FOX, CTX, FEP en las de origen portugués. En estudios previos realizados en el noroeste de España se han observado también cepas de *L. monocytogenes* procedentes de carne de ave con resistencia a los antibióticos señalados (Alonso-Hernando *et al.*, 2012; Capita *et al.*, 2019). La presencia de resistencia a dichos antibióticos es un resultado esperable, debido al uso extensivo de estas sustancias en producción animal (Briyne *et al.*, 2014). En este sentido, cabe señalar que

la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos (particularmente cuando se emplean incorrectamente en dosis subinhibitorias) ha sido identificada como la principal causa del marcado aumento en la prevalencia de resistencia a los antibióticos que ha tenido lugar durante las últimas décadas (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Hay que indicar que los antibióticos a los que se han observado elevadas tasas de resistencia están clasificados como agentes antimicrobianos “de importancia crítica” (AMP, CTX, FEP, VA, RD, CIP), “de elevada importancia” (OX, FOX, TE, C) o “importantes” (F) en medicina humana (WHO, 2018). En la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (antes Oficina Internacional de Epizootias, OIE), AMP, OX, TE y CIP se consideran antibióticos “de importancia crítica”, y RD “de importancia elevada” en medicina veterinaria (OIE, 2018). Además, algunos de estos compuestos se emplean para el tratamiento de la listeriosis humana, donde los antibióticos betalactámicos, generalmente ampicilina, administrada sola o en combinación con gentamicina, son los fármacos de primera elección. En caso de alergia a betalactámicos, las alternativas posibles incluyen eritromicina, vancomicina, trimetoprim/sulfametoxazol y fluoroquinolonas. En ocasiones el tratamiento de la listeriosis se realiza con rifampicina, tetraciclina y cloranfenicol (Capita *et al.*, 2019).

Conclusiones

La carne picada de pollo es un alimento de calidad microbiológica cuestionable, dados los elevados niveles de microorganismos indicadores de calidad higiénica y la alta prevalencia de *Listeria monocytogenes*, que se detectó en el 70% de las muestras examinadas. Asimismo, cabe destacar la elevada prevalencia de resistencia a antibióticos en las cepas de *L. monocytogenes* analizadas. Estos resultados aconsejan seguir unas correctas prácticas higiénicas durante la manipulación de carne picada de pollo, para evitar eventos de contaminación cruzada e insuficiente cocinado, y reducir así el riesgo para el consumidor.

De los tres aditivos ensayados, nitrito sódico, nisina y ácido láctico, este último mostró el mejor comportamiento antimicrobiano, ya que, en las condiciones ensayadas, fue el único que logró reducir, respecto a las muestras no tratadas, los niveles de microbiota aerobia viable, microorganismos psicrotrofos y enterobacterias. Además, permitió obtener la mayor reducción en la prevalencia de *L. monocytogenes*, que pasó del 70% (muestras control) al 50% (muestras tratadas con ácido láctico). Sin embargo, este compuesto provocó un aumento marcado en los niveles de resistencia a antibióticos de las cepas de *L. monocytogenes*, si bien estos resultados deben tomarse con precaución, dado el bajo número de muestras analizadas.

5. Referencias bibliográficas

- AECOSAN (2019). Aditivos alimentarios. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, Madrid. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/aditivos_alimentarios.htm#:~:text=Los%20aditivos%20son%20sustancias%20que%20se%20a%C3%B1aden%20a,distintas%20de%20aditivos%20en%20funci%C3%B3n%20de%20sus%20propiedades (Fecha de último acceso: 18 de febrero de 2021)
- AECOSAN (2020). Listeriosis. Acceso a los subdetalles de Enfermedades de transmisión alimentaria. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, Madrid. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/listeria.htm (Fecha de último acceso: 07 de febrero de 2021)
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. (2009). Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* **20**(12): 1108-1111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.011>
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2012). Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* **23**(1): 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.006>
- Álvarez-Astorga, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, C. (2002). Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science* **62**(1): 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00225-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00225-X)
- Álvarez-Fernández, E., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Capita, R. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology* **153**(3): 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.011>
- Antunes, P., Réu, C., Sousa, J. C., Pestana, N., Peixe, L. (2002). Incidence of susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. *Journal of Food Protection* **65**(12): 1888-1893. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.12.1888>

- Baird, R. M., Corry, J. E. J., Curtis, G. D. W., (1987). Pharmacopeia of culture media for food microbiology. *International Journal of Food Microbiology* **5**: 221-222.
- Barretta, C., Verruck, S., Maran, M. B., Mauricio, L. S., Miroto, L., Werneck Vieira, C. R., Prudencio, E. S. (2019). *Listeria monocytogenes* survival in raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillet under in vitro simulated gastrointestinal conditions by culture, qPCR and PMA-qPCR detection methods. *LWT* **107**: 132-137.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.015>
- Bilir Ormanci, F. S., Erol, I., Ayaz, N. D., Iseri, O., Sariguzel, D. (2008). Immunomagnetic separation and PCR detection of *Listeria monocytogenes* in Turkey meat and antibiotic resistance of the isolates. *British Poultry Science*. **49**(5): 560-565
<https://doi.org/10.1080/00071660802298328>
- Briyne, N., Atkinson, J., Borriello, S. P., Pokludová, L. (2014). Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record* **175**: 325.
<https://veterinaryrecord.bmj.com/content/175/13/325.citation-tools>
- Burbano, E. M., Carrascal, A. K., Mercado, M., Poutou, R. (2011). Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en leches. *Alimentos Hoy* **10**: 1-10. Disponible en: <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/115/109> (Fecha de último acceso: 27 de diciembre de 2021).
- Buzón-Durán, L., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2017). Microbial loads and antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* in different types of raw poultry-based meat preparations. *Poultry Science* **96**(11): 4046-4052.
<https://doi.org/10.3382/ps/pex200>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**(1): 11-48.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, M. C. (2001). Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology* **65**(1-2): 75-82.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00497-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00497-9)
- Capita, R., Castaño-Arriba, A., Rodríguez-Melcón, C., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C. (2020). Diversity, antibiotic resistance, and biofilm-forming ability of enterobacteria

- isolated from red meat and poultry preparations. *Microorganisms* **8**(8): 1226. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081226>
- Capita, R., Felices-Mercado, A., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. (2019). Characterization of *Listeria monocytogenes* originating from the Spanish meat-processing chain. *Foods* **8**(11): 542. <https://doi.org/10.3390/foods8110542>
- Cardoso Pereira, P. M. C., Baltazar Vicente, A. F. R. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, **93**(3): 586-592. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>
- Chairman, C. S. (1997). Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Science and Technology Today* **11**(3): 137-176. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.474.2198&rep=rep1&type=pdf>
- CLSI (2018). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. CLSI VET08-ED4 National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania (USA). **28**(8): M31-A3. Disponible en: <http://clsivet.org/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20VET08%20ED4:2018&xormat=SPDF&src=BB> (Fecha de acceso: 15 de diciembre de 2021)
- CLSI. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania (USA). Disponible en: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf> (Fecha de último acceso: 15 de diciembre de 2021).
- Codex Alimentarius (2013). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del Codex sobre aditivos alimentarios. Propuestas de nuevas disposiciones para la nisina (sin 234) en la categoría de alimentos 0.8 "carne y productos cárnicos, incluidos los de aves de corral y caza" CX/FA 13/45/10. Disponible en: http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFA/ccfa45/fa45_10s.pdf#:~:text=El%20Comit%C3%A9%20Mixto%20FAO%20FOMS%20de%20Expertos%20en%20Aditivos,Monographs%207%20del%20JECFA%20para%20la%20FAO%20%282009%29 (Fecha de último acceso: 18 de febrero de 2021)
- Cousin, M. A., Jay, J. M., Vasavada, P. C. (2001). Psychrotrophic microorganisms. In: Downes, F.P., Ito, K. (eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, D.C., pp. 59-166.

- De la Rosa Zariñana, A. E., Crosby-Galván, M. M., Ramírez-Guzmán, M. E., Hernández-Sánchez, D., Mata-Espinoza, M. A. (2018). Standardization of PCR technique for detecting *Listeria monocytogenes* in chicken, beef and pork. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* **5**(13): 25-34. <https://doi.org/10.19136/era.a5n13.1428>
- Del Río, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2007). Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology*, **115**(3): 268–280. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.048>
- DOUE (2005). Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=ES> (Fecha de último acceso: 18 de febrero de 2021).
- DOUE (2011). Reglamento (UE) nº 1130/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre aditivos alimentarios, para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión autorizados para ser empleados en aditivos alimentarios, enzimas alimentarias, aromas alimentarios y nutrientes. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1130&from=ES> (Fecha de último acceso: 18 de febrero de 2021)
- EFSA y ECDC (2021). The European Union One Health 2019 zoonoses report. *EFSA Journal* **19**(2): e06406. Disponible en: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406> (Fecha de último acceso: 06 de febrero de 2021)
- Elmali, M., Can, Y. H., Yaman, H. (2015). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat. *Food Science and Technology* **35**(4): 672-675. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6808>
- EUCAST (2021). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. V. 11.0. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (Fecha de último acceso: 03 de enero de 2021).
- Fallah, A. A., Saei-Dehkordi, S. S., Rahnama, M., Tahmasby, H., Mahzounieh, M. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria* species isolated from poultry products marketed in Iran. *Food Control* **28**(2): 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.014>

- FAO (2016). Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos (RAM) 2016-2020. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Disponible en: <http://www.fao.org/3/b-i5996s.pdf> (Fecha de último acceso: 06 de febrero de 2021).
- FAOSTAT (2020). Consumo carne de pollo. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL> (Fecha de último acceso: 05 de febrero de 2021).
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T. *et al.* (2001). Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science* **294**(5543): 849-852. <https://doi.org/10.1126/science.1063447>
- Gonçalves-Tenório, A., Nunes Silva, B., Rodriguez, V., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U. (2018). Prevalence of pathogens in poultry meat: A meta-analysis of European published surveys. *Foods* **7**(5): 69 <https://doi.org/10.3390/foods7050069>
- Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M. L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg, A. M., Niclasen, O., Bredholt, S. (2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology* **21**(2): 217-225. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00012-1)
- Gunasena, D., Kodikara, C., Ganepola, K., Widanapathirana, S. (1995). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*. **23**(3): 107-114. <http://dx.doi.org/10.4038/jnsfsr.v23i3.5848>
- IFST (1997). Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Science and Technology Today* **11**(3): 137-176.
- ICMSF (2011). *Microorganisms in Foods. Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance*. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Springer, Boston (MA -USA-). <https://www.springer.com/gp/book/9781441993731>
- Jamshidi, A., Zeinali, T. (2019). Significance and characteristics of *Listeria monocytogenes* in poultry products. *International Journal of Food Science* **2019**: 7835253. <https://doi.org/10.1155/2019/7835253>

- Jay, J. M. (2002). A Review of aerobic and psychrotrophic plate count procedures for fresh meat and poultry products. *Journal of Food Protection* **65**(7): 1200-1206. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.7.1200>
- Kanarat, S., Jitnupong, W., Sukhapesna, J. (2011). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in chicken production chain in Thailand. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* **41**(2): 155-161.
- Kosek-Paszowska, K., Bania, J., Bystroń, J., Molenda, J., Czerw, M. (2005). Occurrence of *Listeria* sp. in raw poultry meat and poultry meat products. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **49**(2): 219-222.
- Kuan, C. H., Goh, S.G., Loo, Y. Y., Chang, W. S., Lye, Y. L., Puspandan, S., Tang, J. Y. H., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Mahyudin, N.A. *et al.* (2013). Prevalence and quantification of *Listeria monocytogenes* in chicken offal at the retail level in Malaysia. *Poultry Science* **92**(6): 1664-1669. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02974>
- Łaszkiwicz, B., Szymański, P., Kolożyn-Krajewska, D. (2021). The effect of selected lactic acid bacterial strains on the technological and microbiological quality of mechanically separated poultry meat cured with a reduced amount of sodium nitrite. *Poultry Science* **100**(1): 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.066>
- Lerasle, M., Federighi, M., Simonin, H., Anthoine, V., Rezé, S., Chéret, R., Guillou, S. (2014). Combined use of modified atmosphere packaging and high pressure to extend the shelf-life of raw poultry sausage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **23**: 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.02.009>
- MAPA (2020). Sector avícola de carne de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), Madrid. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/avicola-de-carne/> (Fecha de último acceso: 06 de febrero de 2021).
- Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., Carrique-Mas, J. J. (2017). Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. *Frontiers in Veterinary Science* **4**(8): 1-17. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Disponible en: <https://amr->

- [review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf](https://www.oecd.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf) (Fecha de último acceso: 08 de febrero de 2021).
- OECD (2019). Antimicrobial Resistance. Tackling the Burden in the European Union. Disponible en: <https://www.oecd.org/health/health-systems/AMR-Tackling-the-Burden-in-the-EU-OECD-ECDC-Briefing-Note-2019.pdf> (Fecha de último acceso: 06 de febrero de 2021).
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (2018). OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf (Fecha de último acceso: 18 de febrero de 2021).
- Oliveira, T. S., Varjão, L. M., da Silva, L. N. N., Pereira, R. D. L., Hofer, E., Vallim, D. C., Almeida, R. C. D. (2018). *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: Occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. *Food Control* **88**: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.015>
- OMS (2012). *Lista de la OMS de antimicrobianos de importancia crítica*. Organización Mundial de la Salud, Ginebra (Suiza). Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf (Fecha de último acceso: 06 de febrero de 2021)
- Osaili, T. M., Alaboudi, A. R., Nesiari, E. A. (2011). Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food Control* **22**(3-4): 586-590. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.008>
- Panera-Martínez, S., Rodríguez-Melcón, C., Serrano-Galán, V., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2022). Prevalence, quantification and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in poultry preparations. *Food Control*, en prensa <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108608>
- Pipek, P., Houška, M., Jeleníková, J., Kýhos, K., Hoke, K., Šikulová, M. (2005). Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray. *Journal of Food Engineering* **67**(3): 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.033>
- Poutou, R. M., Burbano, S., Sierra, K., Torres, A., Carrascal, K., Mercado, M. (2005) Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar

- Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Universitas Scientiarum* **10**: 61-78. ISSN: 0122-7483. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49910207>
- Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., Cocolin, M. (2008). Detection quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *Internacional Journal of Food Microbiology* **21**(1): 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.006>
- Ristori, C. A., Rowlands, R. E. G., Martins, C. G., Barbosa, M. L., Yoshida, J. T. U., De Melo Franco, B. D. G. (2014). Prevalence and populations of *Listeria monocytogenes* in meat products retailed in Sao Paulo, Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease* **11**(12): 969-973. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1809>
- Rodríguez-Campos, D., Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019). Persistent *Listeria monocytogenes* isolates from a poultry-processing facility form more biofilm but do not have a greater resistance to disinfectants than sporadic strains. *Pathogens* **8**(4): 250. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040250>
- Rodríguez-Lázaro, D., Jofré, A., Aymerich, T., Garriga, M., Pla, M. (2005). Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in salmon products: evaluation of Pre-Real-Time PCR strategies. *Journal of Food Protection* **68**(7): 1467-1471. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.7.1467>
- Rodríguez-Lázaro, D., Jofré, A., Aymerich, T., Hugas, M., Pla, M. (2004). Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(10): 6299-6301. <https://aem.asm.org/content/aem/70/10/6299.full.pdf>
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2017). Lactic acid concentrations that reduce microbial load yet minimally impact colour and sensory characteristics of beef. *Meat Science*, **129**: 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.007>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., Carballo, J., García-Fernández, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2018). Structure and viability of 24- and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology* **76**: 513-517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology* **82**: 533-540. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020>

- Ryu, J., Park, Y. S., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., Kim, H. Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control* **32**(2): 659-664. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.048>
- Sakaridis, I., Soutos, N., Iossifidou, E., Papa, A., Ambrosiadis, I., Koidis, P. (2011). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated in chicken slaughterhouses in Northern Greece. *Journal of Food Protection* **74**(6): 1017-1021. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-545>
- Saludes, M., Troncoso, M., Figueroa, G. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in Chilean food matrices. *Food Control*. **50**: 331-335. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.008>
- Schäfer, D. F., Steffens, J., Barbosa, J., Zeni, J., Paroul, N., Valduga, E., Junges, A., Backes, G. T., Cansian, R. L. (2017). Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. *LWT* **86**: 393-398. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.024>
- Selvan, P., Naremdra, B. R., Sureshkumar, S., Vankataramanujam, V. (2007). Microbial quality of retail meat products available in Chennai city. *American Journal of Food Technology* **2**(1): 55-59. <https://krishikosh.egranth.ac.in/display/bitstream?handle=1/5810055828>
- Soutos, N., Koidis, P., Madden, R.H. (2003). Presence of *Listeria* and *Salmonella* spp. in retail chicken in Northern Ireland. *Letters in Applied Microbiology* **37**(5): 421-423. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01423.x>
- Sugiri, Y. D., Gölz, G., Meeyam, T., Baumann, M. P. O., Kleer, J., Chaiswwong, W., Alter, T. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* on chicken carcasses in Bandung, Indonesia. *Journal of Food Protection* **77**(8): 1407-1410. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-453>
- Uyttendaele, M., De Troy, P., Debevere, J. (1999). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *International Journal of Food Microbiology* **53**(1): 75-80. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00155-5)
- Van Nierop, W., Dusé, A. G., Marais, E., Aithma, N., Thothobolo, N., Kassel, M., Stewart, R., Potgieter, A., Fernandes, B., Galpin, J. S., Bloomfield, S. F. (2005). Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology* **99**(1): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.009>

- Vitas, A. I., Aguadi, V., Garcia-Jalon, I. (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology* **90**(3): 349-356 [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00314-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00314-3)
- WHO (2018). *Critically important antimicrobials for human medicine*. World and Health Organization, Geneva (Switzerland). Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1> (Fecha de último acceso: 18 de febrero de 2021)
- Wójciak, K. M., Stasiak, D. S., Kęska, P. (2019). The influence of different levels of sodium nitrite on the safety, oxidative stability, and color of minced roasted beef. *Sustainability* **11**(14): 3795. <https://doi.org/10.3390/su11143795>
- Yuste, J., Pla, R., Capellas, M., Mor-Mur, M. (2002). Application of high-pressure processing and nisin to mechanically recovered poultry meat for microbial decontamination. *Food Control* **13**(6-7): 451-455. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00071-8)
- Zeinali, T., Jamshidi, A., Basami, M., Rad, M. (2017). Isolation and identification of *Listeria* spp. in chicken carcasses marketed in northeast of Iran. *International Food Research Journal* **24**(2): 881-887.

CAPÍTULO VIII

Estructura y viabilidad de las biopelículas formadas durante 24 y 72 h por cuatro bacterias patógenas en superficies de contacto de poliestireno y vidrio

PUBLICACIÓN

Cristina Rodríguez-Melcón, Félix Riesco-Peláez, Javier Carballo, Camino García-Fernández, Rosa Capita, Carlos Alonso-Calleja (2018). Structure and viability of 24- and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology* **76**, 513-517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Salmonella, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y enterococos resistentes a vancomicina (VRE) se encuentran entre las principales bacterias patógenas para el hombre. La salmonelosis y la listeriosis representaron 94.530 y 2.536 casos confirmados de enfermedades transmitidas por alimentos en la Unión Europea (UE) en 2016, con tasas de incidencia de 20,4 y 0,47 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (EFSA y ECDC, 2017). En el caso de la listeriosis, la tasa de letalidad puede superar el 30% (Dussurget, 2008).

MRSA representa un riesgo importante para la Salud Pública, ya que provoca el 44% de las infecciones hospitalarias en humanos (aproximadamente 171.000 cada año) en la UE (Gould *et al.*, 2012). Además de la enfermedad nosocomial, cabe señalar que las infecciones por MRSA de origen alimentario se han demostrado a lo largo de los años mediante estudios epidemiológicos y genéticos (Buzón-Durán *et al.*, 2017). Por su parte, los enterococos, incluidos los VRE, se han identificado cada vez con mayor frecuencia como uno de los agentes responsables de infecciones humanas, tanto nosocomiales como adquiridas en la comunidad. Aunque hay poca evidencia de que las infecciones humanas provocadas por VRE estén directamente relacionadas con el consumo o la manipulación de alimentos contaminados, la presencia de estos microorganismos en los alimentos presenta el riesgo, claramente demostrado, de que los genes de resistencia se transfieran a otras cepas bacterianas a lo largo de la cadena alimentaria, lo que contribuye a la difusión y persistencia de la resistencia a los antibióticos (Guerrero-Ramos *et al.*, 2016).

Las biopelículas son agregados heterogéneos de células microbianas embebidas en una matriz polimérica extracelular autoproducida, que pueden presentarse como estructuras tridimensionales complejas. La formación de biopelículas por bacterias patógenas es una preocupación para la Industria Alimentaria y el Sistema Sanitario, ya que representa una fuente importante de contaminación, lo que conlleva un peligro para la Salud Pública. Además, las biopelículas bacterianas son más resistentes a los desafíos ambientales, incluidos los desinfectantes y los agentes antibacterianos, que sus homólogos planctónicos en suspensión, lo que mejora su supervivencia ambiental (Capita *et al.*, 2014).

Salmonella, *L. monocytogenes*, MRSA y VRE pueden formar biopelículas en diferentes superficies abióticas (Bridier *et al.*, 2010; Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2017; Díez-García *et al.*, 2012; Guerrero-Ramos *et al.*, 2016). En la mayoría de las investigaciones realizadas se han estudiado los biofilms formados sobre un único material, y los datos disponibles son insuficientes para comparar la capacidad de formación de biopelículas de

estas bacterias patógenas en diferentes superficies de contacto, lo que hace imposible realizar comparaciones entre materiales (Bonsaglia *et al.*, 2014).

El objetivo de este estudio fue comparar, mediante microscopía láser confocal de barrido (CLSM), la arquitectura y la viabilidad de las biopelículas formadas por cuatro bacterias patógenas en dos superficies de contacto (poliestireno y vidrio) después de 24 h y 72 h de incubación a 37 °C. Estos materiales fueron seleccionados porque son ampliamente utilizados en la industria alimentaria y tienen diferentes características fisicoquímicas, siendo el poliestireno un material hidrofóbico y el vidrio hidrofílico.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

Se utilizaron cuatro cepas bacterianas previamente aisladas de carne de ave o cerdo, disponibles en nuestro laboratorio: *Salmonella enterica* serotipo Hadar (SH174; carne de pollo), *Listeria monocytogenes* (LM6; carne de cerdo), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA125; carne de pollo) y *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (VRE61s; carne de pollo). Las cepas se conservaron en caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) suplementado con 20% (v/v) de glicerol a - 80 °C. Antes de los experimentos, las células congeladas se subcultivaron dos veces en TSB a 37 °C durante 24 h. Los cultivos se mantuvieron a 4 °C en placas de agar triptona de soja (TSA, Oxoid).

2.2. Formación de biopelículas y análisis de imágenes

Se realizó un análisis de la formación y estructura de las biopelículas utilizando el método descrito previamente por Capita *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Brevemente, las cepas se cultivaron en TSB a 37 °C durante 18 h y se realizaron las diluciones apropiadas (dos diluciones decimales) usando el mismo caldo de cultivo para obtener una concentración de aproximadamente 10^6 ufc/ml. Se agregó un volumen de 125 μ l de la segunda dilución a los pocillos de la placa de microtítulo con fondo de vidrio Corning™ 96-Well Half Area High Content Imaging Glass Bottom Microplate (Fisher Scientific Ireland Ltd., Dublín, Irlanda), y un volumen de 250 μ l a los pocillos de las placas Nunc™ MicroWell™ 96-Well Optical-Bottom Plates with Polymer Base (Thermo Fisher Scientific, New Hampshire, EE.UU.). Ambas microplacas tienen alta calidad óptica, baja fluorescencia y fondo totalmente plano, lo que permitió la obtención de imágenes de alta resolución.

Después de una hora de adhesión a 37 °C, los pocillos se enjuagaron una vez con 125 μ l (Corning™) o 250 μ l (MicroWell™) de NaCl 150 mM para eliminar cualquier bacteria no adherida antes de rellenarlos con caldo de cultivo (TSB) estéril. Posteriormente se incubaron las placas durante 24 h o 72 h a 37 °C y tras ello se enjuagaron los pocillos con 150 mM de NaCl. Se añadió un volumen de 2,0 μ l de una mezcla 1:1 de colorantes fluorescentes SYTO9 y yoduro de propidio (YP) del kit de viabilidad BacLight Viability Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) a 1 ml de TSB; posteriormente se añadieron 125 μ l (Corning™) o 250 μ l (MicroWell™) de esta solución a cada pocillo, según corresponda. La placa se incubó en la oscuridad a 37 °C durante 20 minutos para favorecer la penetración de los componentes fluorescentes en las bacterias. Durante la obtención de las imágenes de CLSM, el SYTO9 emite fluorescencia verde y se usa para identificar microorganismos vivos con una membrana

intacta, mientras que YP emite fluorescencia roja y tiñe las bacterias muertas, que presentan la membrana dañada.

La adquisición de imágenes por CLSM se realizó utilizando un microscopio de barrido láser confocal Nikon Eclipse TE 2000-U equipado con el software EZ-C13.60 (Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE.UU.). Las biopelículas se observaron con el objetivo de 40x. Se detectó fluorescencia por excitación a 488 nm (láser de argón), recogiendo las emisiones con un filtro de paso de banda 590/50 (SYTO9) o 650LP (YP).

Para cada biopelícula se adquirieron tres pilas de imágenes, en tres áreas diferentes del pocillo, de 119 μm x 119 μm en el plano horizontal (correspondientes a 512 x 512 píxeles) con una distancia de 1 μm en el eje z. Se realizaron tres experimentos independientes, en días diferentes, para cada condición. Por lo tanto, se obtuvieron un total de 144 imágenes CLSM. Para el análisis de las imágenes, se reconstruyeron proyecciones tridimensionales de la estructura de las biopelículas utilizando la función Easy3D del software IMARIS 9.0 (Bitplane, Zurich, Suiza).

Los parámetros estructurales cuantitativos de las biopelículas se calcularon utilizando el software BioRCA 1.4, desarrollado por algunos miembros de nuestro Grupo de Investigación utilizando el Entorno de Desarrollo Integrado Lazarus (IDE) (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2017). Desde un valor umbral, cada píxel se etiqueta como vacío, verde (vivo) o rojo (muerto). Con esta información, se genera un modelo tridimensional de la biopelícula en estudio y se calculan los parámetros estructurales. Este programa informático permitió la cuantificación de la población total de las biopelículas (que comprende bacterias vivas y muertas) y de las subpoblaciones independientes representadas por fluorescencia verde emitida por SYTO9 (de células con membranas intactas) y fluorescencia roja emitida por YP (de bacterias con membranas dañadas). El biovolumen representa el volumen total de células (μm^3) en el campo de observación (14.161 μm^2) y proporciona una estimación de la biomasa de la biopelícula. El porcentaje de superficie cubierta (%) refleja la eficiencia de la colonización del sustrato por las poblaciones de bacterias. La rugosidad proporciona una medida de variación del grosor de la biopelícula y, por lo tanto, es un indicador de la heterogeneidad de la biopelícula (Murga *et al.*, 1995). Una rugosidad con un valor de cero indica una biopelícula de espesor uniforme, y un valor cercano a 1 describe una biopelícula irregular. La altura máxima (μm) de las biopelículas se determinó directamente a partir del número de imágenes en el eje z obtenidas con el microscopio.

2.3. Análisis estadístico

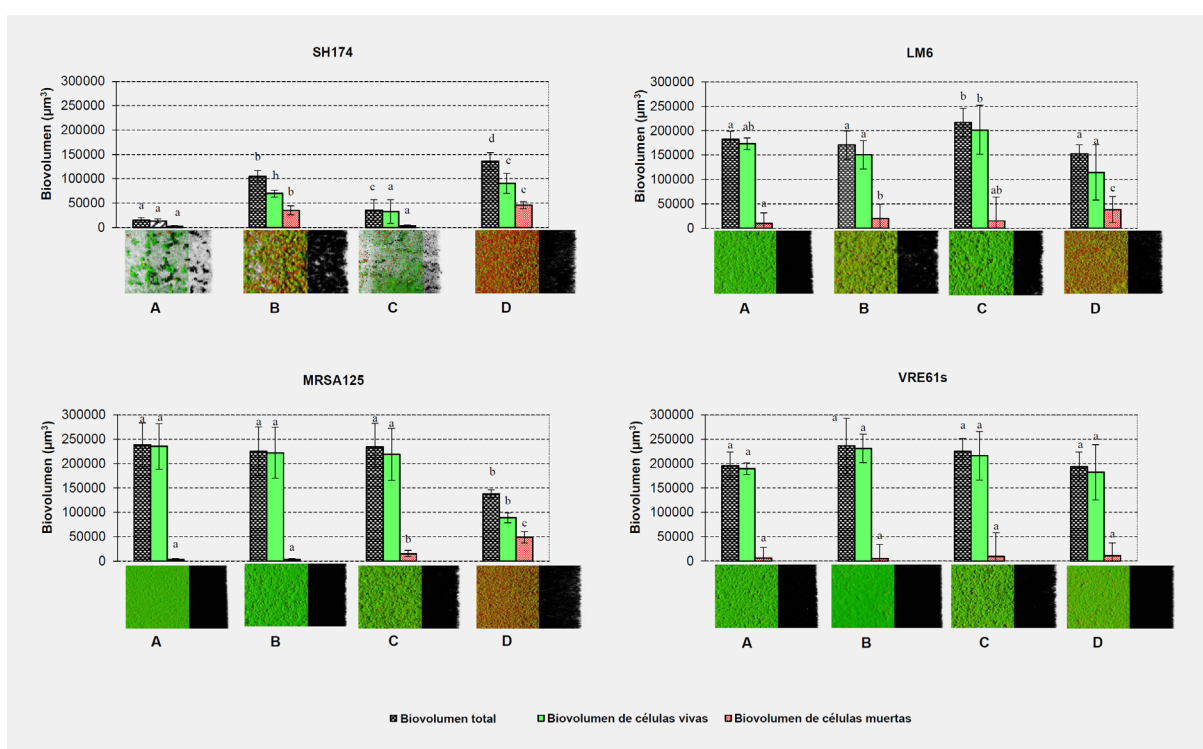
Los parámetros estructurales cuantitativos de las biopelículas se compararon utilizando técnicas de análisis de varianza de una vía (ANOVA). La separación de medias se realizó

utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan. Los datos se procesaron utilizando el software Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, EE. UU.)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Arquitectura y parámetros estructurales de las biopelículas

Se evaluó la arquitectura y la viabilidad de las biopelículas formadas por cuatro cepas de bacterias patógenas procedentes de alimentos (*Salmonella* Hadar, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina) en poliestireno y en vidrio al cabo de 24 h y 72 h de incubación a 37 °C. En la Figura VIII.1 se presentan las estructuras representativas de las biopelículas formadas y su biovolumen para cada una de las cepas y condiciones ensayadas.



A, crecimiento de las biopelículas en poliestireno después de 24 h; B, crecimiento de las biopelículas en poliestireno después de 72 h; C, crecimiento de las biopelículas en vidrio después de 24 h; D, crecimiento de las biopelículas en vidrio después de 72 h. Las barras en el mismo gráfico para el mismo estado fisiológico (células vivas, muertas o totales) sin ninguna letra en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Las imágenes corresponden a reconstrucciones tridimensionales obtenidas por microscopía confocal y procesadas con el software IMARIS 9.0, incluyendo las proyecciones virtuales de las sombras a la derecha.

Figura VIII.1. Biovolumen de las biopelículas formadas por *Salmonella* Hadar (SH174), *Listeria monocytogenes* (LM6), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA125) y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VRE61s) sobre superficies de poliestireno y vidrio a las 24 h y a las 72 h de incubación a 37 °C.

Al igual que en investigaciones previas, todas las especies demostraron ser capaces de formar biopelículas (Bonsaglia *et al.*, 2014; Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2017; Guerrero-Ramos *et al.*, 2016). Sin embargo, las observaciones microscópicas revelaron una marcada variabilidad en la formación y estructura de biopelículas de diferentes cepas y condiciones. Después de 24 h, SH174 había formado pequeños grupos de células dispersas en las superficies de poliestireno y vidrio. Estos hallazgos son coincidentes con las observaciones de Bridier *et al.* (2010) para biopelículas de *Salmonella* cultivadas en poliestireno durante 24 h a 30 °C. Después de 72 h, SH174 había desarrollado biopelículas compactas sobre vidrio y estructuras con una cobertura irregular y áreas de crecimiento confluentes, donde las bacterias formaban grumos cuando se formaban las biopelículas en poliestireno (Figura VIII.1). El marcado aumento en el biovolumen de las biopelículas de SH174 observado entre 24 h y 72 h de incubación podría estar relacionado con variaciones en el número de células muertas o dañadas (teñidas con YP) durante el desarrollo de la biopelícula. Así, las biopelículas SH174 de 24 h de formación mostraron un biovolumen muy bajo de células muertas o dañadas, que aumentó significativamente después de 72 horas (Figura VIII.1). Se ha indicado que la muerte y la lisis de las células bacterianas conducen a la liberación de ADN genómico, que tiene un papel importante en la adhesión intercelular y la estabilidad de biopelículas, promoviendo su formación (Jakubovics *et al.*, 2013).

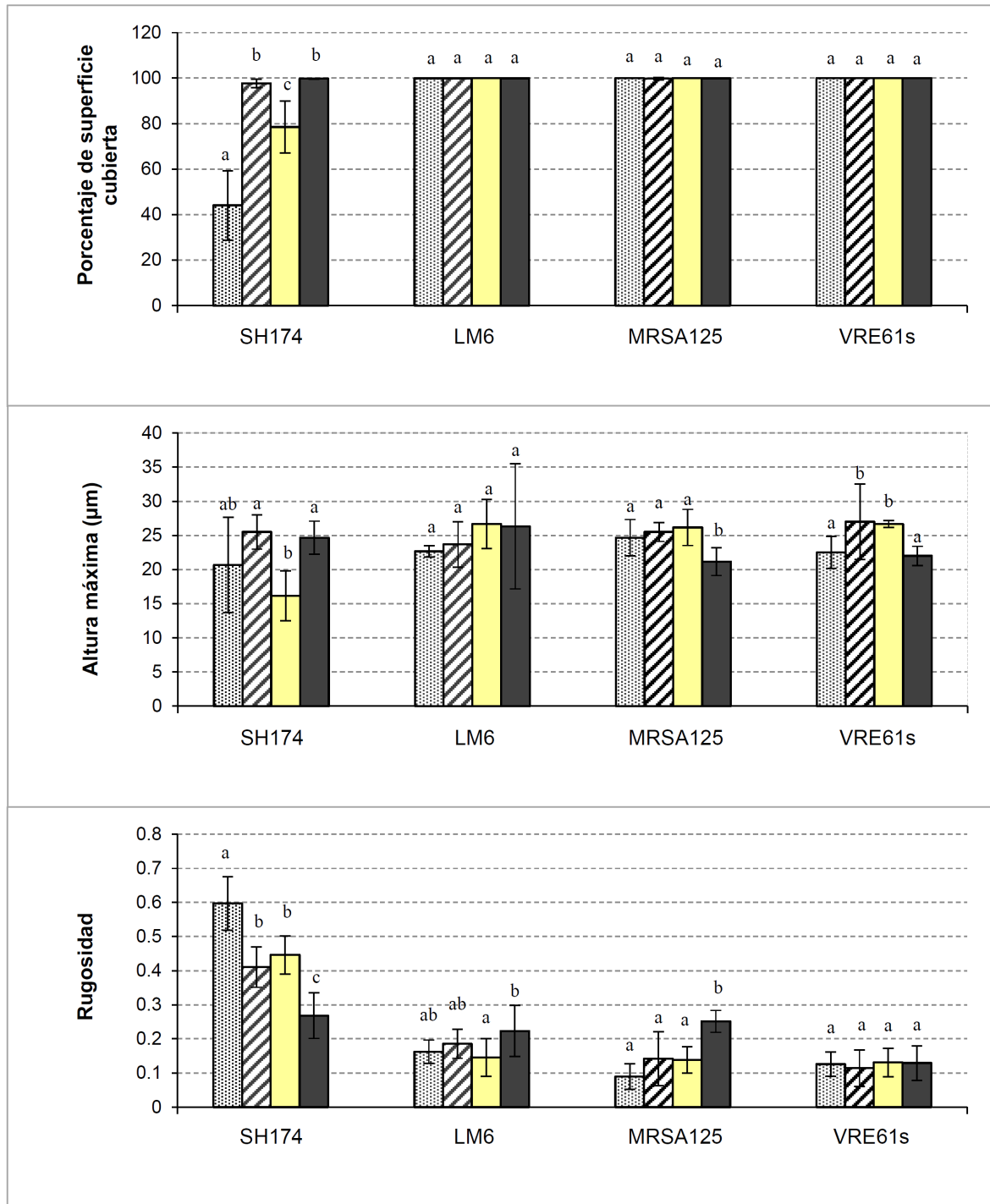
Por otro lado, las cepas LM6, MRSA125 y VRE61s mostraron una marcada capacidad para formar biopelículas y formaron estructuras densas y homogéneas que cubrieron toda la superficie disponible después de 24 h y de 72 h de incubación. De acuerdo con estos hallazgos, Bridier *et al.* (2010) describieron el desarrollo de estructuras compactas y relativamente lisas para *S. aureus* y *Enterococcus* spp. Por el contrario, estos autores observaron que las cepas de *L. monocytogenes* producen biopelículas rugosas que contienen varios agregados pequeños y de espesor variable. La diversidad intraespecífica en la capacidad de *L. monocytogenes* para formar biopelículas es probablemente responsable de las variaciones observadas entre las diferentes publicaciones (Di Bonaventura *et al.*, 2008; Henriques y Fraqueza, 2017; Mosquera-Fernández *et al.*, 2016).

La microscopía láser confocal de barrido junto con el análisis cuantitativo de imágenes permite la determinación de los parámetros estructurales de los biofilms, pudiendo realizarse la comparación cuantitativa de biopelículas de diferentes cepas y en diferentes condiciones. El biovolumen, el porcentaje de superficie cubierta, la altura máxima y la rugosidad se determinaron a partir de la batería de imágenes obtenidas por microscopía. Estos datos numéricos obtenidos confirmaron las observaciones visuales. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, con un biovolumen más bajo ($P < 0,05$) en las biopelículas de *S. Hadar* (promedio $73.073,61 \pm 52.365,90 \mu\text{m}^3$ en el campo de observación de $14.161 \mu\text{m}^2$) en comparación con las biopelículas formadas por *L. monocytogenes* ($180.804,50 \pm 32.554,62 \mu\text{m}^3$), MRSA ($208.605,34 \pm 57.534,93 \mu\text{m}^3$) y VRE ($212.543,91 \pm 39.718,62 \mu\text{m}^3$). SH174

formó biopelículas con menor ($P < 0,01$) altura máxima y porcentaje de superficie cubierta y mayor ($P < 0,01$) rugosidad ($21,75 \pm 5,53 \mu\text{m}$, $79,99 \pm 25,92\%$ y $0,43 \pm 0,13$, respectivamente) que las otras especies (con valores promedio de $24,58 \pm 3,98 \mu\text{m}$, $99,95 \pm 0,16\%$ y $0,15 \pm 0,06$, respectivamente). El análisis estadístico mostró una correlación positiva entre el biovolumen de las biopelículas formadas por las cepas analizadas, su porcentaje de superficie cubierta y su altura máxima ($P < 0,01$), todos ellos inversamente correlacionados con la rugosidad de la biopelícula ($P < 0,01$).

Se utilizaron dos superficies diferentes (poliestireno y vidrio). En general, se asume que el poliestireno es un material hidrófobo, mientras que el vidrio es hidrófilo (Ben Abdallah *et al.*, 2014). Cabe señalar que la hidrofobicidad de los materiales afecta a la unión bacteriana, o la falta de ella, a la superficie y, por lo tanto, afecta la formación de biopelículas (Lee *et al.*, 2015). La producción de biopelículas por SH174 dependió del tipo de superficie de contacto, mostrando una mayor formación de biopelículas (biovolumen y porcentaje de superficie cubierta) en vidrio que en poliestireno (Figuras VIII.1 y VIII.2). Estos resultados coinciden con los de Ben Abdallah *et al.* (2014) en cepas de *Salmonella* aisladas de muestras clínicas y de origen avícola. Por el contrario, De Oliveira *et al.* (2014) observaron que *Salmonella* se adhirió más fácilmente a los materiales hidrófobos (como el poliestireno) que al vidrio. La variabilidad dentro de las especies podría ser la causa de las discrepancias entre las diferentes investigaciones, como ha sido sugerido por los autores antes mencionados. A medida que aumentó el tiempo de incubación, el biovolumen, la altura máxima y el porcentaje de superficie cubierta de las biopelículas SH174 aumentaron en ambas superficies de contacto (Figuras VIII.1 y VIII.2).

LM6, MRSA125 y VRE61 produjeron biopelículas de biovolumen similar en poliestireno y en vidrio. Estos resultados no concuerdan con los hallazgos de otros autores, que observaron, utilizando la técnica de tinción con cristal violeta, biopelículas de mayor tamaño en vidrio en comparación con poliestireno, tanto para *L. monocytogenes* (Bonsaglia *et al.*, 2014; Di Bonaventura *et al.*, 2008) como para *Staphylococcus aureus* (Lee *et al.*, 2015). Algunos autores (Bonsaglia *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015) han indicado que las bacterias se adhieren y forman biopelículas con mayor eficacia en materiales hidrófilos (por ejemplo, vidrio) que en superficies hidrófobas (por ejemplo, poliestireno). Sin embargo, debe señalarse que hay diferentes factores que influyen en la capacidad de formación de biopelículas bacterianas, como son la cepa, los medios de cultivo o la temperatura de incubación. Estos factores, junto con el método utilizado para la cuantificación de biopelículas, podrían ser la causa de las variaciones observadas entre los diferentes estudios (Lee *et al.*, 2015; Reis-Teixeira *et al.*, 2017).



■ Poliestireno-24 h □ Poliestireno-72 h ▨ Vidrio-24 h ■ Vidrio-72 h

Las barras en el mismo gráfico para el mismo parámetro estructural y grupo microbiano que no comparten ninguna letra presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Figura VIII.2. Porcentaje de superficie cubierta, altura máxima y rugosidad de las biopelículas formadas por *Salmonella* Hadar (SH174), *Listeria monocytogenes* (LM6), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA125) y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VRE61s) en superficies de poliestireno y vidrio tras 24 h y 72 h de incubación a 37 °C.

Bajo las condiciones descritas, LM6, MRSA125 y VRE61s desarrollaron una biopelícula robusta con una arquitectura compleja después de 24 h de incubación a 37 °C (los biovolúmenes oscilaron entre $182.704,31 \pm 16.368,36 \mu\text{m}^3$ para LM6 en poliestireno y $238.200,56 \pm 44.819,64 \mu\text{m}^3$ para MRSA125 en poliestireno). Debido a que las biopelículas aumentan la resistencia de las bacterias a los agentes antimicrobianos y dificultan su eliminación (Wang *et al.*, 2012), los resultados de este estudio sugieren la necesidad de desinfectar los equipos de las industrias alimentarias y los dispositivos médicos inmediatamente después del uso para evitar la formación de biopelículas. Esto es especialmente importante para las superficies ubicadas a temperatura ambiente, como las probadas en nuestro estudio, donde la formación de biopelículas probablemente tendrá lugar a un ritmo más rápido que a temperaturas de refrigeración. Además, los datos obtenidos proporcionan una base para futuros estudios con biopelículas de LM, MRSA y VRE, ya que las 24 h se pueden utilizar como un punto de referencia potencial en el tiempo con el fin de obtener biopelículas maduras para estudios de investigación realizados a 37 °C. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que varios factores influyen en la capacidad de formación de biopelículas de las bacterias, por lo que se pueden encontrar distintos resultados utilizando diferentes condiciones (por ejemplo, diferentes cepas bacterianas).

La rápida formación de biopelículas observada en la presente investigación por lo que respecta a LM6, MRSA125 y VRE61, no coincide con los resultados de Reis-Teixeira *et al.* (2017), quienes observaron, por microscopía láser confocal de barrido, que las biopelículas de *L. monocytogenes* incubadas a 25 °C en vidrio durante 96 y 192 h contenían poblaciones bacterianas significativamente más altas que las de 24 h. En este sentido, Seneviratne *et al.* (2013) demostraron, mediante ensayos con cristal violeta y determinaciones microscópicas, que las biopelículas de *E. faecalis* cultivadas en placas de microtítulo de poliestireno a 37 °C alcanzaban la madurez a las 72 h.

El biovolumen de las biopelículas formadas por LM6 y MRSA125 en vidrio disminuyó ($P < 0,05$) después de 72 h de incubación (Figura VIII.1). Sasahara y Zottola (1993) y Bonsaglia *et al.* (2014) han observado una disminución en la biomasa de las biopelículas formadas por *L. monocytogenes* en vidrio después de 48 h de incubación. Este hecho puede ocurrir debido al desprendimiento de células del biofilm con anterioridad a una nueva fase de colonización, como ha sido sugerido con anterioridad (Chavant *et al.*, 2002; Petrova y Sauer, 2016). Por el contrario, se observaron biovolúmenes similares a las 24 h y 72 h para las biopelículas formadas por LM6 y MRSA125 sobre poliestireno, lo que indica que la tasa de multiplicación celular fue similar a la tasa de desprendimiento de las bacterias. Se ha indicado que el desprendimiento puede verse influenciado por las propiedades de la superficie del sustrato, que son diferentes en vidrio y poliestireno (Gottenbos *et al.*, 1999). Sin embargo, los mecanismos exactos responsables de la reducción observada después de 72 h de incubación

a 37 °C en los biovolúmenes de biopelículas formadas por LM6 y MRSA125 en vidrio aún no se han caracterizado.

3.2. Viabilidad celular de biopelículas

Para diferenciar las células vivas de las muertas, se usó el microscopio láser confocal de barrido junto con dos colorantes fluorescentes diferentes (SYTO9 y YP, del BacLight Viability Kit). Las células vivas se tiñen con SYTO9 (verdes) y las células muertas o dañadas se tiñen con YP (rojas). Los porcentajes de células muertas o dañadas en las biopelículas oscilaron entre $11,58 \pm 7,10\%$ (24 h, poliestireno) y $33,28 \pm 6,04\%$ (72 h, poliestireno) para SH174 ($P < 0,05$), entre $5,23 \pm 3,74\%$ (24 h, poliestireno) y $25,08 \pm 2,22\%$ (72 h, vidrio) para LM6 ($P < 0,001$), entre $1,46 \pm 1,15\%$ (24 h, poliestireno) y $35,41 \pm 7,39\%$ (72 h, vidrio) para MRSA125 ($P < 0,001$), y entre $3,02 \pm 4,57\%$ (72 h, poliestireno) y $4,54 \pm 5,01\%$ (72 h, vidrio) para VRE61s ($P > 0,05$). Las células teñidas con YP se distribuyeron homogéneamente en las biopelículas.

En los biofilms de 24 horas únicamente se observaron, para todas las condiciones, unas pocas células muertas o dañadas. Después de 72 h de incubación, las reconstrucciones tridimensionales de las biopelículas formadas por SH174 (vidrio y poliestireno), LM6 (vidrio y poliestireno) y MRSA125 (vidrio) mostraron un aumento ($P < 0,05$) en el biovolumen de células teñidas con YP (Figura VIII.1). Estos hallazgos son congruentes con observaciones previas para diferentes especies bacterianas, incluidas *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus* spp. cultivadas en diferentes condiciones (Mosquera-Fernández *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013), y probablemente estén relacionados con la muerte celular programada asociada con el ciclo de vida bacteriano (Mosquera-Fernández *et al.*, 2016). Por otro lado, los hallazgos obtenidos en la presente investigación no coinciden con los de Reis-Teixeira *et al.* (2017), que estudiaron las biopelículas formadas por *L. monocytogenes* en cupones de vidrio incubados a 25 °C durante 192 h utilizando la técnica de microscopía confocal después de teñir con SYTO9 y YP. Estos autores observaron que la biomasa de las células no viables no aumentaba significativamente en las biopelículas maduras. Debido a que la capacidad de formar biopelículas puede variar entre los diferentes aislamientos dentro de una misma especie (Díez-García *et al.*, 2012), es probable que se puedan obtener resultados diferentes usando diferentes cepas bacterianas.

Conclusiones

Los resultados de este estudio demostraron que el material de contacto juega un papel importante en la formación de biopelículas por *S. Hadar*, y que sobre vidrio se observó una formación de biopelículas más fuerte que sobre poliestireno. Por el contrario, *L. monocytogenes*, MRSA y VRE formaron biopelículas similares en ambas superficies de contacto. Cabe destacar que estas tres cepas formaron rápidamente biopelículas compactas

(24 h). Por lo tanto, este trabajo puede proporcionar una mejor comprensión del proceso de formación de biopelículas por bacterias patógenas, lo que permite la optimización de estrategias para controlar dichos microorganismos en la Industria Alimentaria y el Sistema Sanitario.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ben Abdallah, F., Lagha, R., Said, K., Kallel, H., Gharbi, J. (2014). Detection of cell surface hydrophobicity, biofilm and fimbriae genes in *Salmonella* isolated from Tunisian clinical and poultry meat. *Iranian Journal of Public Health* **43**(4): 423–431. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4433723/>
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes Júnior, A., Araújo Júnior, J. P., Tsunemi, M. H., Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control* **35**(1): 386–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.023>
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., Briandet, R. (2010). The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiology Methods* **82**(1): 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.04.006>
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R., (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**: 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.003>
- Capita, R., Buzón-Durán, L., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C., (2017). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* **14**(6): 350–356. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2241>
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(4): 1268–1280. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.N., Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(2): 728–737. <https://doi.org/10.1128/aem.68.2.728-737.2002>
- De Oliveira, D. C., Fernandes Júnior, A., Kaneno, R., Silva, M. G., Araújo Júnior, J. P., Silva, N. C., Rall, V. L. (2014). Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. *Foodborne Pathogens and Disease* **11**(6): 478–483. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1710>
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'Orio, V., Vergara, A., Conter, M., Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology* **104**(6): 1552–1561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x>

- Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology* **31**(2): 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.012>
- Dussurget, O. (2008). New insights into determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *International Review of Cell and Molecular Biology* **270**: 1–38. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01401-9](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01401-9)
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* **15**(12): 5077. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
- Gottenbos, B., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. (1999). Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods in Enzymology* **310**: 523–534. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)10040-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)10040-5)
- Gould, I. M., David, M. Z., Esposito, S., Garau, J., Lina, G., Mazzei, T., Peters, G., (2012). New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* **39**(2): 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.028>
- Guerrero-Ramos, E., Molina-González, D., Blanco-Morán, S., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2016). Prevalence, antimicrobial resistance, and genotypic characterization of vancomycin-resistant enterococci in meat preparations. *Journal of Food Protection* **79**(5): 748–756. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-390>
- Henriques, A. R., Fraqueza, M. J. (2017). Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from ready-to-eat meat-based food products food chain. *LWT - Food Science and Technology (Lebensmittel-Wissenschaft Technology)* **81**: 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.045>
- Jakubovics, N. S., Shields, R. C., Rajarajan, N., Burgess, J. G. (2013). Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Letters in Applied Microbiology* **57**(6): 467–475. <https://doi.org/10.1111/lam.12134>
- Lee, J. S., Bae, Y. M., Lee, S. Y., Lee, S. Y. (2015). Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* on various surfaces and their resistance to chlorine sanitizer. *Journal of Food Science* **80**(10): M2279–M2286. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13017>
- Mosquera-Fernández, M., Sánchez-Vizueté, P., Briandet, R., Cabo, M. L., Balsa-Canto, E. (2016). Quantitative image analysis to characterize the dynamics of *Listeria monocytogenes* biofilms. *International Journal of Food Microbiology* **236**: 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.015>
- Murga, R., Stewart, P. S., Daly, D. (1995). Quantitative analysis of biofilm thickness variability. *Biotechnology and Bioengineering* **45**: 503–510. <https://doi.org/10.1002/bit.260450607>
- Oliveira, F., Lima, C. A., Brás, S., França, Â., Cerca, N. (2015). Evidence for inter- and intraspecies biofilm formation variability among a small group of coagulase-negative

- staphylococci. *FEMS Microbiology Letters* **362**(20): fnv175. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv175>
- Petrova, O. E., Sauer, K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current Opinion in Microbiology* **30**: 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.004>
- Reis-Teixeira, F. B. D., Alves, V. F., de Martinis, E. C. P. (2017). Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology* **48**(3): 587–591. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.004>
- Sasahara, K. C., Zottola, E. A. (1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal of Food Protection* **56**(12): 1022–1028. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.12.1022>
- Seneviratne, C. J., Yip, J. W., Chang, J. W., Zhang, C. F., Samaranayake, L. P. (2013). Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Archives of Oral Biology* **58**(10): 1327–1334. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.06.017>
- Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., Zhou, G. (2013). In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *International Journal of Food Microbiology* **167**(3): 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.005>
- Wang, Z., Shen, Y., Haapasalo, M. (2012). Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *Journal of Endodontics* **38**(10): 1376-1379. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.06.035>

CAPÍTULO IX

Arquitectura y viabilidad de las biopelículas formadas por nueve cepas de *Listeria* en varios materiales hidrofóbicos e hidrofílicos

PUBLICACIÓN

Cristina Rodríguez-Melcón, Carlos Alonso Calleja, Rosa Capita (2019). Architecture and viability of the biofilms formed by nine *Listeria* strains on various hydrophobic and hydrophilic materials *Applied Sciences* **9**(23), 5256; <https://doi.org/doi:10.3390/app9235256>

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La listeriosis es una enfermedad transmitida por alimentos que causa aproximadamente 23.000 infecciones severas en humanos cada año (Rothrock *et al.*, 2019). Esta infección se caracteriza por diferentes condiciones clínicas como gastroenteritis, meningoencefalitis, septicemia, aborto espontáneo e infecciones graves en los recién nacidos. Los grupos más afectados son los niños, ancianos, inmunocomprometidos y las mujeres embarazadas (Davis *et al.*, 2019; Lanciotti *et al.*, 2019). La listeriosis es un problema relevante ya que presenta una alta tasa de mortalidad (de hasta el 30%), requiere ingreso hospitalario en más del 90% de los casos y tiene una tasa de mortalidad neonatal del 50% (Doijad *et al.*, 2015).

En 2017, se notificaron en la Unión Europea 2.480 casos confirmados de listeriosis invasiva (0,48 casos por cada 100.000 habitantes), con una tasa de letalidad del 13,8%, la más alta entre todas las enfermedades transmitidas por alimentos (EFSA y ECDC, 2018). En los Estados Unidos ocurren aproximadamente 1.600 casos de formas graves de listeriosis humana cada año (con una tasa de incidencia de 0,26 casos por 100.000 habitantes), con una tasa de letalidad de más del 16% (CDC, 2019). Además, existe una tendencia al alza en la prevalencia de la enfermedad, tanto en Europa como en los Estados Unidos (EFSA y ECDC, 2018; Pohl *et al.*, 2017).

El género *Listeria* está compuesto por veinte especies diferentes (Leclercq *et al.*, 2019). *Listeria monocytogenes* es la responsable de la gran mayoría de los casos de listeriosis humana, aunque se han descrito algunos casos de enfermedad humana causados por *Listeria ivanovii* y *Listeria seeligeri* (Orsi *et al.*, 2016; Wagner *et al.*, 2008). *L. monocytogenes* se divide en trece serotipos diferentes basados en antígenos somáticos y flagelares, de los cuales tres (1/2a, 1/2b, 4b) son responsables de más del 90% de los casos de enfermedades humanas en todo el mundo (Capita *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2015).

L. monocytogenes puede persistir durante años en los equipos e instalaciones de la industria alimentaria. Esto se debe principalmente a su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en los entornos de procesamiento de los alimentos bajo condiciones que son estresantes para otras bacterias, como temperaturas de refrigeración, desecación, calor, altas concentraciones de sal y valores de pH extremos, además de su capacidad para formar biopelículas (Rodríguez-López *et al.*, 2018). Las biopelículas son comunidades microbianas estructuradas, embebidas en una matriz autoproducida de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) hidratadas que se adhieren a una superficie inerte o un tejido vivo (González-Rivas *et al.*, 2018). Las bacterias en las biopelículas se vuelven más resistentes que las células planctónicas a diferentes factores de estrés ambiental, como los agentes desinfectantes, lo que facilita la supervivencia bacteriana. Además, las biopelículas pueden ser una fuente continua de contaminación cuando entran en contacto con los alimentos, lo

que puede desencadenar enfermedades humanas (González-Machado *et al.*, 2018; Piercey *et al.*, 2017).

Estudios realizados por otros autores han sugerido que las propiedades físicas y químicas del sustrato, sus características superficiales y las condiciones ambientales pueden alterar la estructura y composición de las biopelículas bacterianas (Liang *et al.*, 2019). *L. monocytogenes* puede formar biopelículas en una gran variedad de superficies (Galié *et al.*, 2018), pero en la mayoría de las investigaciones previas realizadas se ha utilizado un solo material como superficie de contacto para estudiar las biopelículas, con mayor frecuencia vidrio, poliestireno o acero inoxidable. Hasta donde llega nuestro conocimiento, ningún estudio previo ha comparado la arquitectura y la viabilidad de las biopelículas formadas por *Listeria* spp. a temperaturas de refrigeración en vidrio, poliestireno, grafeno y resina. En general, el poliestireno, el grafeno y la resina se consideran materiales hidrófobos, mientras que el vidrio es hidrófilo (Ben Abdallah *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2019; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018a; Yilbas *et al.*, 2018).

Las resinas epoxi se han utilizado ampliamente como recubrimientos, materiales electrónicos, adhesivos y matrices para compuestos reforzados con fibra, debido a sus excelentes propiedades mecánicas, su gran capacidad adhesiva, su buena capacidad para resistir el calor y su alta resistencia eléctrica y química (Jin *et al.*, 2015). Sin embargo, ningún estudio previo se ha centrado en la capacidad de las bacterias patógenas como *Listeria* spp. para formar biopelículas en este material. El grafeno, considerado como el material más delgado del mundo, es una monocapa bidimensional de átomos de carbono fuertemente empaquetados en una estructura plana hexagonal como una red de panal (Kurantowicz *et al.*, 2015). Este material se caracteriza por su actividad antibacteriana y la baja toxicidad para las células humanas (Szunerits *et al.*, 2016). Sin embargo, son escasas las publicaciones que sugieren la capacidad potencial del grafeno para prevenir la formación de biopelículas (Dybowska-Sarapuk *et al.*, 2017). Hasta la fecha, ninguna investigación se ha centrado en estudiar la capacidad de las monocapas de grafeno para inhibir la formación de biopelículas por *Listeria*.

La hidrofobicidad de la superficie celular, que varía entre cepas, desempeña un papel en la unión de las células bacterianas a las superficies abióticas (Choi *et al.*, 2015; Colagiorgi *et al.*, 2017). Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana y la unión a las superficies hidrofóbicas (Takahashi *et al.*, 2010). Sin embargo, la relación entre la capacidad de fijación inicial y la formación de biopelículas entre las cepas de *L. monocytogenes* en superficies abióticas sigue sin estar clara (Lee *et al.*, 2017).

El objetivo del presente trabajo fue comparar la arquitectura y la viabilidad de las biopelículas formadas por nueve cepas de *Listeria* spp. después de 120 h de incubación a

12 °C sobre cuatro superficies, tres de ellas hidrofóbicas (poliestireno, grafeno y resina) y una hidrofílica (vidrio), utilizando microscopía láser confocal de barrido (CLSM). Se eligieron estos materiales porque el vidrio, el poliestireno y la resina se emplean ampliamente en entornos de procesamiento de alimentos. En contraste, el grafeno es un material innovador como recubrimiento de las superficies, y hasta ahora ha sido menos estudiado. También se determinó la relación entre la hidrofobicidad superficial de las células bacterianas y su capacidad para formar biopelículas en las diversas superficies.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se analizaron ocho cepas de *L. monocytogenes* (LM) y una de *L. ivanovii* (LI): LM26 (ATCC-American Type Culture Collection- 19112; serotipo 1/2c), LM28 (ATCC 19111; serotipo 1/2a), LM29 (ATCC 19114; serotipo 4a), LM30 (ATCC 13932; serotipo 4b), LM31 (CECT - Colección Española de Cultivos Tipo- 936; serotipo 1/2b), LM32 (CECT 937; serotipo 3b), LM33 (CECT 938; serotipo 3c), LM34 (ATCC 19117; serotipo 4d) y LI ATCC 19119. Los cultivos bacterianos se almacenaron a - 50 °C en caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) con 20% (vol/vol) de glicerol. Antes de cada experimento, las cepas se inocularon en TSB y se incubaron a 37 °C. Después de 24 h, se sembraron en placas de agar triptona de soja (TSA, Oxoid), que se incubaron a 37 °C durante otras 24 h y posteriormente se almacenaron a 4 °C mientras se realizaban los experimentos.

2.2. Formación de biopelículas

El estudio de la formación y estructura de las biopelículas fue realizado por microscopía láser confocal de barrido utilizando un procedimiento descrito previamente (González-Machado *et al.*, 2018). La microscopía, combinada con un análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas, permitió recopilar datos numéricos usados para calcular los parámetros estructurales de las biopelículas, como el biovolumen, facilitando así la comparación de los diferentes biofilms mediante análisis estadísticos.

Las cepas se incubaron en TSB durante 24 h a 37 °C. A continuación, se realizaron diluciones decimales en el mismo caldo de cultivo hasta conseguir una concentración de 10⁶ ufc/ml. Se añadió un volumen de 125 µl de los cultivos a los pocillos de placas de microtítulo Corning™ 96-Well Half Area High Content Imaging Glass Bottom Microplate (Fisher Scientific Ltd., Dublín, Irlanda), y a los pocillos de las placas de microtítulo con un fondo recubierto de una monocapa de grafeno (Graphenea, San Sebastián, España). Se añadió un volumen de 250 µl a los pocillos de las placas de fondo óptico Nunc™ MicroWell™ 96-Well Optical-Bottom Plates with Polymer Base (Thermo Scientific™, SLU, Waltham, MA, EE.UU.), y a los pocillos de las placas de microtítulo con el fondo recubierto de resina epoxi de uso alimentario (Résinence®, Mormant-sur-Vernisson, Francia).

Las placas de microtítulo se incubaron durante una hora a 12 °C para permitir que la adhesión de las bacterias, y posteriormente los pocillos se enjuagaron una vez con cloruro de sodio 150 mM (NaCl, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EE.UU.) para eliminar cualquier

bacteria no adherida. Posteriormente, se añadió un volumen de 125 μl de TSB estéril en el caso de las superficies de vidrio y grafeno, y 250 μl en el caso del poliestireno y la resina. Las placas se incubaron en condiciones estáticas sin renovación del medio de cultivo durante 120 h a 12 °C.

Se utilizaron dos colorantes, SYTO9 y yoduro de propidio (YP). El primero emite fluorescencia verde durante la obtención de las imágenes por microscopía y se utiliza para identificar microorganismos vivos con una membrana intacta. El segundo emite fluorescencia roja, que tiñe las bacterias muertas con las membranas dañadas. Se añadió, a 1.000 μl de TSB estéril, un volumen de 2,0 μl de una mezcla 1:1 de los colorantes fluorescentes SYTO9 (stock 3,34 mM en DMSO) y YP (stock 20 mM en DMSO) del kit de viabilidad bacteriana BacLight (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), y una cantidad medida de la solución resultante se añadió a cada pocillo: 125 μl para el vidrio y el grafeno, y 250 μl para el poliestireno y la resina. Las placas de microtítulo se incubaron en oscuridad a 37 °C durante 20 minutos para permitir el marcado fluorescente de la bacteria.

Las imágenes de CLSM se realizaron utilizando un microscopio láser confocal de barrido Zeiss LSM 800 Airyscan con el software ZEN 2.3 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). La visualización del modo de canal se realizó utilizando el objetivo 63 \times (0,8 NA) con inmersión en aceite. La Tabla IX.1 muestra los parámetros del microscopio utilizados.

Tabla IX.1. Tinciones y parámetros del microscopio láser confocal de barrido utilizados en el estudio de las biopelículas de *Listeria* spp.

Parámetro	Colorante	
	SYTO9	YP
Tamaño de partícula	44 μm	44 μm
Longitud de onda láser	488 nm: 0,20%	561 nm: 0,20%
Longitud de onda de excitación	483 nm	305 nm
Longitud de onda de emisión	500 nm	617 nm
Longitud de onda de detección	450-560 nm	560–700 nm
Dispositivo de imagen	LSM 800 / GaAsP-Pmt2	LSM 800 / Airyscan
Detector	GaAsP	Airyscan
Ganancia del detector	700 V	700 V

Para cada biopelícula se adquirieron tres pilas de imágenes, en tres áreas diferentes del pocillo escogidas al azar, de 126,8 μm \times 126,8 μm en el plano horizontal (correspondientes a

512 × 512 píxeles) con una distancia de 1 µm en el eje z. Se realizaron tres experimentos independientes, en días distintos, para cada cepa y material de superficie. Por lo tanto, se obtuvieron un total de 324 imágenes CLSM (9 cepas × 4 materiales × 3 superficies en cada pocillo × 3 repeticiones). Los archivos Zeiss originales (formato CZI) se importaron al paquete de software IMARIS 9.1 (Bitplane, Zurich, Suiza) para analizar las imágenes (González-Machado *et al.*, 2018).

2.3. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular

La hidrofobicidad de la superficie celular (CSH) de las bacterias se determinó mediante la prueba de adhesión microbiana a los solventes (MATS) basada en su afinidad con los solventes no polares (Capita *et al.*, 2014). Se usó xileno como la fase de hidrocarburos. Las células de *Listeria* se cultivaron en TSB durante 24 h a 37 °C, se recogieron dos veces tras centrifugación (3.200 × g, 10 min, 4 °C) y se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) estéril (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las células se resuspendieron en TSB a una concentración inicial de 10⁵ ufc/ml. Después de 24 h a 37 °C, las células se centrifugaron, se lavaron dos veces con PBS y se volvieron a resuspender en NaCl 150 mM a una concentración de 10⁸ ufc/ml. Se obtuvo una muestra en fase acuosa (0,4 ml) y se determinó la densidad óptica a 405 nm (DO₄₀₅) (Bioscreen C MBR, Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). La suspensión celular (2,0 ml) se sometió a agitación con 0,33 ml de xileno (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 60 segundos y posteriormente se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, consiguiendo completamente la separación de las dos fases. El porcentaje de células presentes en el solvente se calculó usando la siguiente ecuación: % de afinidad al xileno = 100 × [1 - (A/A₀)], donde A₀ es la DO₄₀₅ de la suspensión original antes de mezclar, y A es la DO₄₀₅ de la fase acuosa. La hidrofobicidad de la superficie celular se agrupó en tres categorías: afinidad débil (< 21%), moderada (21% a 50%) y fuerte (> 50%) para xileno (Capita *et al.*, 2014). Todas las determinaciones se llevaron a cabo ocho veces en cuatro días separados (dos repeticiones cada día).

2.4. Análisis estadístico

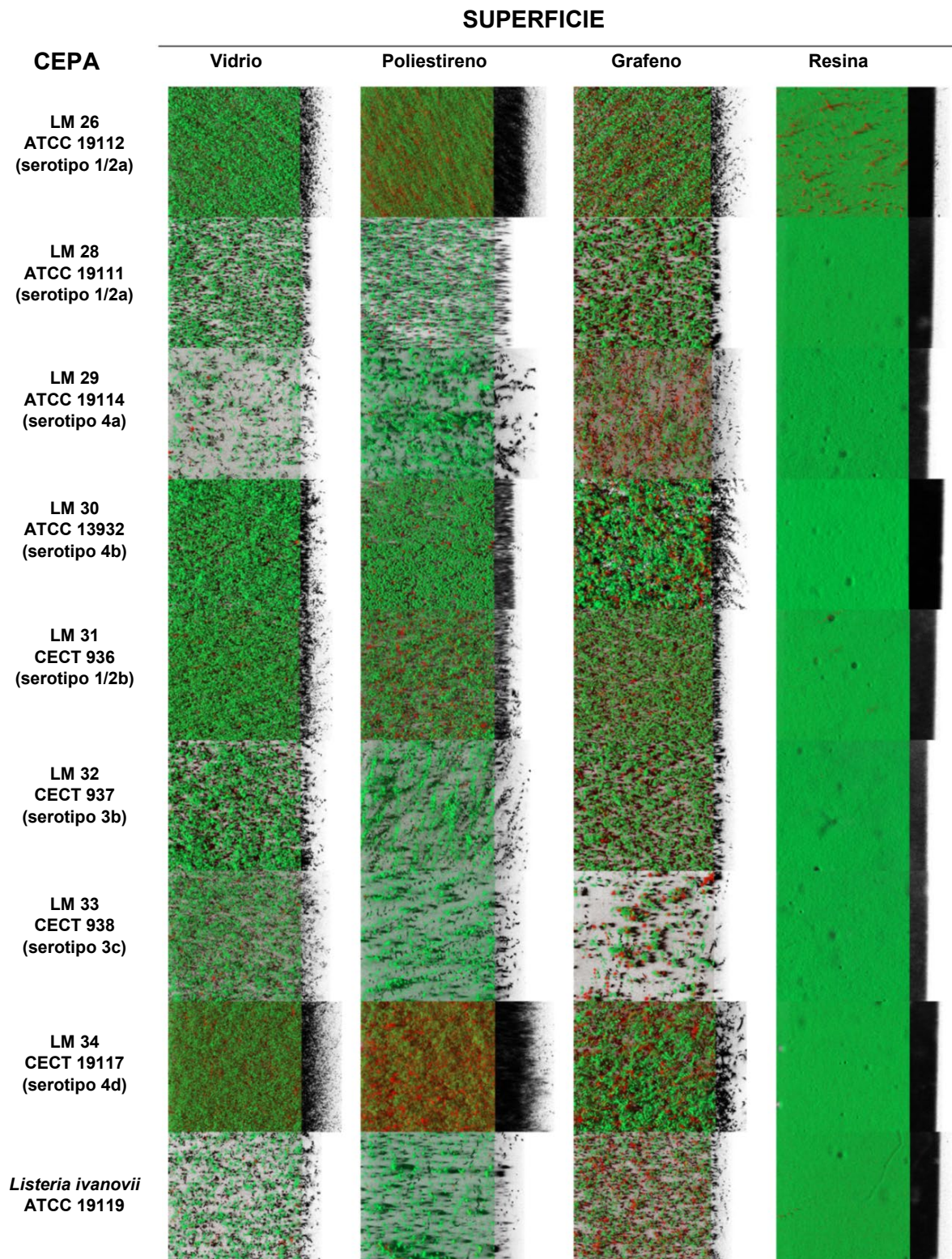
Los parámetros estructurales cuantitativos de las biopelículas y los porcentajes de afinidad al xileno se compararon utilizando técnicas de análisis de varianza de una vía (ANOVA). La separación de medias se realizó usando la prueba de rango múltiple de Duncan. Todo el procesado de datos en este estudio se realizó utilizando el paquete de software Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.). Se establecieron diferencias significativas para un nivel de probabilidad del 5% ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Determinación de las biopelículas

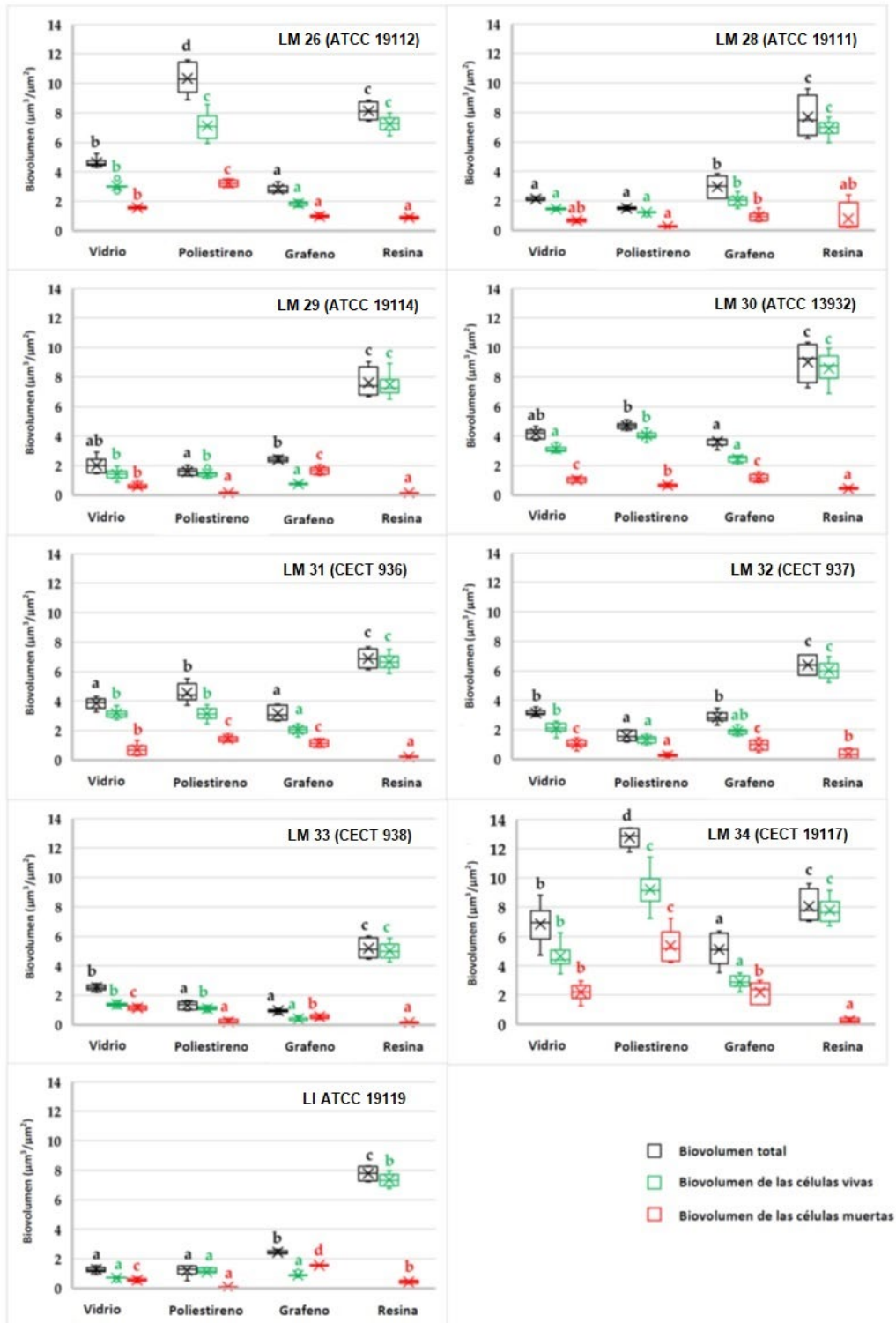
Las imágenes tridimensionales de las biopelículas formadas por nueve cepas de *Listeria* en varias superficies de contacto (vidrio, poliestireno, grafeno y resina) se muestran en la Figura IX.1. En la resina, todas las cepas produjeron estructuras compactas que cubrieron toda la superficie disponible. Sin embargo, se observó una fuerte variación entre cepas por lo que respecta a las estructuras tridimensionales de las biopelículas formadas en vidrio, poliestireno y grafeno. En estos materiales, algunas cepas (LM28, LM29, LM32, LM33 y LI) formaron biopelículas que contenían varios agregados pequeños, mientras que otras (LM26, LM30, LM31 y LM34) produjeron biopelículas rugosas con una cobertura irregular y presentaron áreas de crecimiento confluentes donde la bacteria formó grumos.

Los datos numéricos confirmaron las observaciones visuales. La Figura IX.2 muestra los diagramas de caja y bigotes de la distribución de los valores de biovolumen (biovolumen total, biovolumen de células vivas y biovolumen de células muertas) encontrados para cada cepa y material de superficie. Se observaron diferencias importantes entre las cepas ($P < 0,001$) con respecto a su capacidad para formar biopelículas. Considerando los datos de los cuatro materiales simultáneamente, el biovolumen total osciló entre $2,61 \pm 1,93 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ para LM33 y $8,37 \pm 3,11 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ para LM34. El biovolumen de células vivas osciló entre $2,09 \pm 2,06 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ para LM33 y $6,32 \pm 2,40 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ para LM34, mientras que el biovolumen de las células inactivadas osciló entre $0,52 \pm 0,41 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ para LM33 y $2,51 \pm 1,98 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ para LM34.



Las biopelículas se estudiaron después de 120 h de incubación a 12 °C. Las imágenes (126,8 μm × 126,8 μm) se reconstruyeron a partir de secciones en el eje z tomadas por microscopía confocal de barrido utilizando el software IMARIS, con proyecciones de las sombras a la derecha.

Figura IX.1. Proyecciones tridimensionales de las estructuras de biopelículas formadas por nueve cepas de *Listeria* spp. en cuatro materiales (vidrio, poliestireno, revestimiento monocapa de grafeno y revestimiento de resina epoxi).



Los cuadros van del percentil 25 al 75 y están intersectados por la línea media. Los bigotes se extienden por debajo del rango del cuadro, desde los valores más bajos hasta los más altos, respectivamente. Los valores promedio se indican con (x). Los valores atípicos se indican como puntos de datos individuales (o). Los valores promedio en el mismo gráfico para el mismo estado fisiológico (células totales, células vivas o células muertas) sin letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$). En total, se realizaron nueve determinaciones para cada cepa, material de contacto y estado fisiológico.

Figura IX.2. Diagramas de cajas y bigotes que muestran la distribución de los valores de biovolumen observados para ocho cepas de colección de *L. monocytogenes* (LM) y una cepa de *L. ivanovii* (LI).

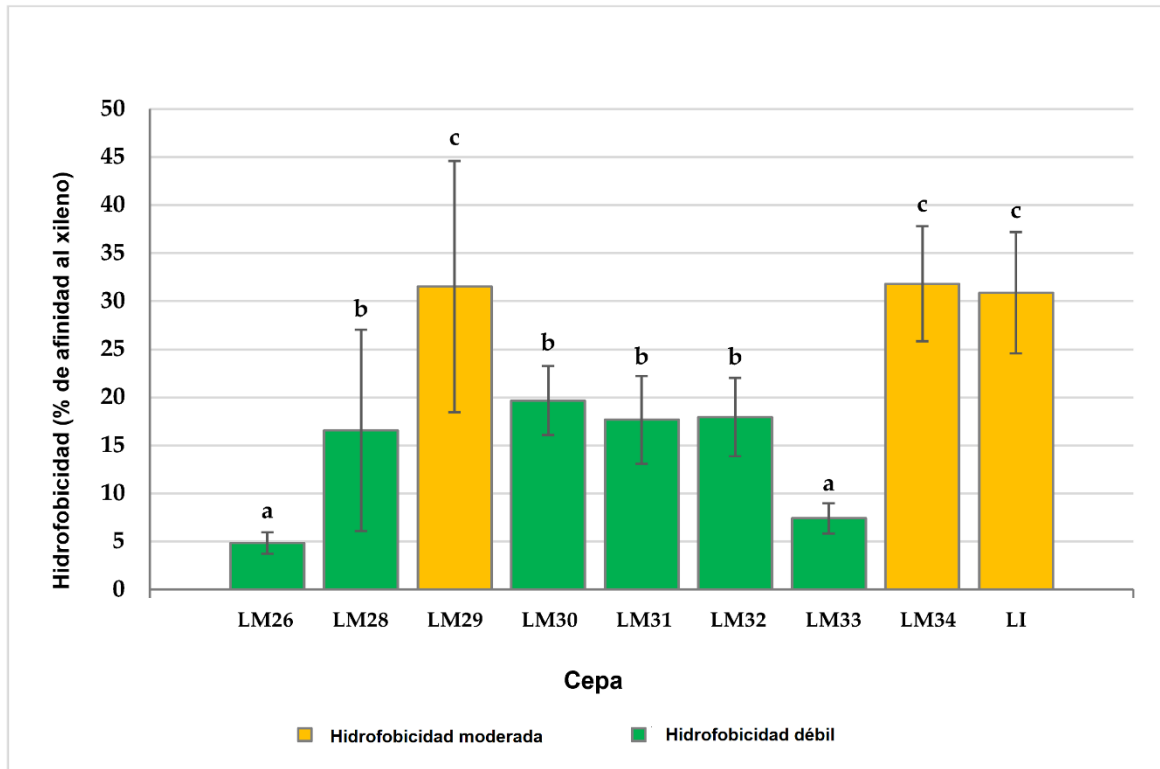
Se observaron valores similares ($P > 0,05$) para el biovolumen total en las biopelículas formadas en vidrio (promedio $3,39 \pm 1,69 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) y revestimiento de monocapa de grafeno ($2,93 \pm 1,14 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). Estas cifras fueron más bajas ($P < 0,05$) que las registradas para el poliestireno ($4,39 \pm 4,14 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). El mayor biovolumen ($P < 0,01$) se encontró en las superficies recubiertas con resina epoxi ($7,35 \pm 1,45 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). También hubo diferencias entre los grupos de muestras ($P < 0,01$) cuando solo se consideraron las células vivas, con el mayor biovolumen encontrado para las biopelículas formadas en resina ($6,97 \pm 1,33 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), seguido de las formadas en poliestireno ($3,30 \pm 2,92 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). Las biopelículas producidas en las superficies de vidrio y grafeno mostraron valores similares ($P > 0,05$) para biovolumen ($2,33 \pm 1,25 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ y $1,69 \pm 0,83 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, respectivamente). Con respecto al biovolumen de las células inactivadas, la cantidad fue menor ($P < 0,001$) en las biopelículas en resina ($0,38 \pm 0,37 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) que en los formados en vidrio, poliestireno y grafeno ($1,06 \pm 0,57 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, $1,30 \pm 1,78 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ y $1,24 \pm 0,56 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, respectivamente; $P > 0,05$).

Se observaron diferencias entre las cepas con respecto a su preferencia por los diferentes materiales (Figura IX.2). Todas las cepas formaron una mayor biopelícula en resina, excepto las cepas LM26 y LM34, que produjeron biopelículas con el mayor biovolumen en poliestireno. La biomasa más pequeña para la mayoría de las cepas (LM26, LM30, LM31, LM33 y LM34) se encontró en el caso de los biofilms formados sobre grafeno.

Las biopelículas en general estaban formadas principalmente por células vivas. Las excepciones fueron las biopelículas producidas por tres cepas (LM29, LM33 y LI) en las superficies de grafeno, donde predominaban las bacterias inactivadas.

3.2. Hidrofobicidad de la superficie celular

Se observaron diferencias sustanciales ($P < 0,001$) entre los valores de hidrofobicidad obtenidos para las diversas cepas de *Listeria* spp. El porcentaje de afinidad por el xileno varió entre $4,84 \pm 1,11\%$ en el caso de LM26 y $31,82 \pm 5,98\%$ para LM34 (Figura IX.3). Seis cepas (66,7% del total) presentaron reacciones débiles ($< 21\%$ de afinidad por el xileno) y otras tres cepas (23,3%) mostraron reacciones moderadas (entre 21% y 50% de afinidad por el xileno). No se encontró relación entre la hidrofobicidad y la capacidad de formar biopelículas en los diversos materiales analizados.



Los datos son medias \pm desviaciones estándar (DE) de ocho determinaciones. Los valores medios sin letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$). LM26 (ATCC-American Type Culture Collection- 19112; serotipo 1/2c), LM28 (ATCC 19111; serotipo 1/2a), LM29 (ATCC 19114; serotipo 4a), LM30 (ATCC 13932; serotipo 4b), LM31 (CECT- Colección Española de Cultivos Tipo- 936; serotipo 1/2b), LM32 (CECT 937; serotipo 3b), LM33 (CECT 938; serotipo 3c), LM34 (ATCC 19117; serotipo 4d), LI (ATCC 19119).

Figura IX.3. Valores de hidrofobicidad de la superficie celular observados para cultivos de ocho cepas de *Listeria monocytogenes* (LM) y una cepa de *Listeria ivanovii* (LI).

4. DISCUSIÓN

La formación de biopelículas por *Listeria* spp. en los entornos de procesado de alimentos es una seria amenaza para la Industria Alimentaria, ya que estas estructuras contribuyen a la persistencia de los microorganismos, aumentando el riesgo de contaminación de los alimentos (Capita *et al.*, 2014). La capacidad de *Listeria* para producir biopelículas a las bajas temperaturas utilizadas durante el procesado y almacenamiento de algunos alimentos (por ejemplo, 12 °C) aumenta la probabilidad de contaminación cruzada.

En línea con los hallazgos anteriores (Ripolles-Avila *et al.*, 2018, 2019; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018a, 2019a, b), todas las cepas de *Listeria* analizadas formaron biopelículas en las condiciones estudiadas. Sin embargo, se observó una fuerte variación entre cepas por lo que respecta a su capacidad de formación de biopelículas (Figura IX.1). Otros autores han observado también una variabilidad intraespecífica en la arquitectura de las mismas. Entre las diferentes estructuras vistas se encuentran películas de una capa, de varias capas sin una estructura dada, estructuras de panal y redes de grupos entrelazados (Alonso-Calleja *et al.*, 2019; Guilbaud *et al.*, 2015; Marsh *et al.*, 2003; Mosquera-Fernández *et al.*, 2014; Norwood *et al.*, 1999; Pang *et al.*, 2019; Reis-Teixeira *et al.*, 2017; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019b). La gran variabilidad observada en la estructura de las biopelículas formadas por *Listeria* spp. muestra que existe una clara necesidad de analizar varias cepas antes de extraer conclusiones sobre la capacidad de estas bacterias para producir biopelículas.

Las imágenes tridimensionales obtenidas muestran variaciones marcadas en la estructura de las biopelículas dependiendo del material de contacto. Mientras que en la resina todas las cepas formaron biopelículas robustas que cubrían toda la superficie, en vidrio, poliestireno y grafeno las biopelículas producidas eran más irregulares y en algunos casos consistían en pequeños grupos de células. La menor producción de biopelícula se encontró en vidrio y, especialmente, en grafeno. Es de destacar que cuanto mayor es la cantidad de biopelícula, mayor es la probabilidad de contaminación cruzada.

Otros estudios también han registrado diferencias importantes entre las superficies de contacto al investigar la formación de biopelículas por *L. monocytogenes*. En investigaciones previas (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018b) realizadas con una cepa de *L. monocytogenes* de origen alimentario (LM6), se observó que las biopelículas formadas a 37 °C mostraron un mayor biovolumen en las superficies de vidrio que en poliestireno. Debe señalarse que esta cepa tenía baja hidrofobicidad (14,8% de afinidad por el xileno), lo que puede explicar su fijación limitada a las superficies hidrofóbicas. Bonsaglia *et al.* (2014) observaron la formación de biopelículas a 4 °C en diferentes superficies, con mayor biomasa obtenida en acero inoxidable y vidrio que en poliestireno. Usando la técnica de ensayo con cristal violeta, Di Bonaventura *et al.* (2008) también observaron que *L. monocytogenes* fue capaz de formar biopelículas a 4 °C y 12 °C, produciendo mayores cantidades en vidrio que en acero inoxidable

y en poliestireno, materiales más hidrófobos. Los resultados antes mencionados no coinciden con los resultados del presente estudio, en el que se puso de manifiesto la mayor producción de biopelícula en los materiales hidrófobos, resina y poliestireno. Las variaciones intraespecíficas en el comportamiento de *L. monocytogenes* podrían ser responsables de las diferencias encontradas entre las diferentes investigaciones consultadas.

Algunos investigadores han demostrado que la hidrofobicidad de la superficie celular microbiana desempeña un papel fundamental en la adherencia de las bacterias a las superficies hidrofóbicas como el poliestireno (Gallardo-Moreno *et al.*, 2002a, b). Debido a que la adhesión bacteriana a la superficie es el primer paso en la formación de biopelículas, es de esperar que un aumento en la hidrofobicidad de la superficie celular se acompañe de una mayor capacidad bacteriana para formar biopelículas en superficies abióticas (Norouzi *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2010). Sin embargo, existen resultados controvertidos sobre la influencia de la hidrofobicidad de la superficie celular sobre la formación de biopelículas en las superficies de contacto, porque ésta depende de varios factores (Dourou *et al.*, 2011), como la temperatura. En este sentido, se ha observado que la formación de biopelículas es mayor a temperaturas superiores a 20 °C que a temperaturas de refrigeración, por ejemplo 12 °C, la temperatura utilizada en este estudio (Chavant *et al.*, 2002; Di Bonaventura *et al.*, 2008; Piercey *et al.*, 2016, 2017).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde no se observó relación entre el porcentaje de afinidad al xileno y la biomasa de las biopelículas, sugieren que la formación de biopelículas en *Listeria* spp. está regulado por factores distintos a la hidrofobicidad, que dependen de la cepa. Esta conclusión se ve corroborada por el hecho de que algunas cepas (LM29 y LI) presentaron valores altos de hidrofobicidad pero escasa formación de biofilm en las superficies hidrofílicas (vidrio) e hidrofóbicas (poliestireno y grafeno). En contraste, LM26 presentó baja hidrofobicidad junto con una alta capacidad para formar biofilm en las cuatro superficies, especialmente en poliestireno. En este sentido, Di Bonaventura *et al.* (2008) señalaron que la formación de biopelículas por diferentes cepas de *Listeria* spp. en vidrio se correlacionó débilmente con la hidrofobicidad de las superficies bacterianas, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio. Asimismo, investigaciones previas (Capita *et al.*, 2014) han encontrado una hidrofobicidad débil pero un elevado porcentaje de superficie cubierto en biopelículas formadas por cepas de *Escherichia coli* en poliestireno. Hay que señalar, no obstante, que las comparaciones entre las diferentes publicaciones señaladas deben hacerse con precaución porque las propiedades de la superficie hidrofóbica de las células bacterianas pueden verse modificadas por diferentes factores, como las características del medio de cultivo, las condiciones de crecimiento y los métodos de estudio utilizados (Patel *et al.*, 2011; Tomičić *et al.*, 2016).

Es importante destacar que las biopelículas con el biovolumen más pequeño se produjeron en las superficies de grafeno. Estos resultados sugieren que los recubrimientos de monocapa de grafeno pueden contener propiedades superficiales que reducen la formación de biopelículas, como han sugerido otros autores (Dong *et al.*, 2015; Yiblas *et al.*, 2018).

Conclusiones

Los biofilms de *Listeria* spp. suponen un gran desafío para la Industria Alimentaria y el Sistema Sanitario. El conocimiento de la influencia de distintos factores, como el material de contacto, en la arquitectura y la viabilidad de las biopelículas, es esencial para optimizar las estrategias para el control de estas estructuras bacterianas. Los resultados de este estudio demuestran que el material juega un papel importante en la formación de biopelículas por cepas de *Listeria*. Las biopelículas alcanzaron su mayor biovolumen en resina, seguida de poliestireno, lo que sugiere que estos materiales no son adecuados para prevenir la formación de biopelículas por *Listeria* spp. En vidrio, y sobre todo en grafeno, las biopelículas producidas tenían un biovolumen más pequeño, por lo que los recubrimientos de monocapa de grafeno pueden ser de utilidad práctica para reducir la formación de biopelículas por *Listeria*. No se observó relación entre la hidrofobicidad de la superficie celular y la capacidad de formación de biopelículas de *Listeria* spp. en las superficies abióticas ensayadas. La presente investigación mejora el conocimiento del proceso de formación de biopelículas por *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* a temperaturas de refrigeración. No obstante, los resultados obtenidos se basaron en experimentos de laboratorio y se requerirían investigaciones adicionales en condiciones reales para confirmar estos hallazgos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Calleja, C., Gómez-Fernández, S., Carballo, J., Capita, R. (2019). Prevalence, molecular typing and determination of the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes* serotypes from poultry meat and poultry preparations in Spain. *Microorganisms* **7**(11): 529. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110529>
- Ben Abdallah, F., Lagha, R., Said, K., Kallel, H., Gharbi, J. (2014). Detection of cell surface hydrophobicity, biofilm and fimbriae genes in *Salmonella* isolated from Tunisian clinical and poultry meat. *Iranian Journal of Public Health* **43**(4): 423–431. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4433723/>
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes, A., Araújo, J. P., Tsunemi, M. H., Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control* **35**(1): 386–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.023>
- Capita, R., Felices-Mercado, A., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. (2019). Characterization of *Listeria monocytogenes* originating from the Spanish meat-processing chain. *Foods* **8**(11): 542. <https://doi.org/10.3390/foods8110542>
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(4):1268–1280. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>
- CDC (2019). *Listeria* (listeriosis). Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/index.html> (Fecha de último acceso: 14 de septiembre de 2019).
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. N., Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(2): 728–737. <https://doi.org/10.1128/aem.68.2.728-737.2002>
- Choi, N.-Y., Bae, Y.M., Lee, S.-Y. (2015). Cell surface properties and biofilm formation of pathogenic bacteria. *Food Science and Biotechnology* **24**: 2257–2264. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0301-y>
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A. (2017). *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of Food Industry. *Pathogens* **6**(3): 41. <https://doi.org/10.3390/pathogens6030041>

- Davis, M. L., Ricke, S. C., Donalson, J. R. (2019). Establishment of *Listeria monocytogenes* in the gastrointestinal tract. *Microorganisms* **7**(3): 75. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030075>
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'Orio, V., Vergara, A., Conter, M., Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology* **104**(6): 1552–1561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x>
- Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Garg, S., Poharkar, K. V., Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Rawool, D. B., Chakraborty, T. (2015). Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. *PLoS ONE* **10**: e0137046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137046>
- Dong, H. S., Qi, S. J. (2015). Realising the potential of graphene-based materials for biosurfaces-A future perspective. *Biosurface and Biotribology* **1**(4): 229–248. <https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.10.004>
- Dourou, D., Beauchamp, C. S., Yoon, Y., Geornaras, I., Belk, K. E., Smith, G. C., Nychas, G.-J. E., Sofos, J. N. (2011). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *International Journal of Food Microbiology* **149**(3): 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.004>
- Dybowska-Sarapuk, Ł., Kotela, A., Krzemiński, J., Wróblewska, M., Marchel, H., Romaniec, M., Łęgosz, P., Jakubowska, M. (2017). Graphene nanolayers as a new method for bacterial biofilm prevention: Preliminary results. *Journal of AOAC International* **100**(4): 900–904. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0164>
- EFSA y ECDC (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* **16**(12): e05500. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology* **9**: 898. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
- Gallardo-Moreno, A. M., González-Martín, M. L., Pérez-Giraldo, C., Bruque, J. M., Gómez-García, A. C. (2002a). Serum as a factor influencing adhesion of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(11): 5784–5787. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5784-5787.2002>

- Gallardo-Moreno, A. M., González-Martín, M. L., Pérez-Giraldo, C., Garduno, E., Bruque, J. M., Gómez-García, A. C. (2002b). Thermodynamic analysis of growth temperature dependence in the adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(5): 2610–2613. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2610-2613.2002>
- González-Machado, C., Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2018). Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella* Agona biofilms at different stages of development. *PLoS ONE* **13**: e0200011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200011>
- González-Rivas, F., Ripolles-Avila, C., Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A. G., Rodríguez-Jerez, J. J. (2018). Biofilms in the spotlight: Detection, quantification and elimination at a food industry level. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **17**(5): 1261–1276. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12378>
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., Briandet, R. (2015). Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype. *Applied and Environmental Microbiology* **81**(5): 1813–1819. <https://doi.org/10.1128/AEM.03173-14>
- Jin, F.-L., Li, X., Park, S.-J. (2015). Synthesis and application of epoxy resins: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **29**: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.03.026>
- Kurantowicz, N., Sawosz, E., Jaworski, S., Kutwin, M., Strojny, B., Wierzbicki, M., Szeliga, J., Hotowy, A., Lipińska, L., Koziński, R., Jagiello, J., Chwalibog, A. (2015). Interaction of graphene family materials with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Nanoscale Research Letters* **10**(23). <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0749-y>
- Lanciotti, R., Braschi, G., Patrignani, F., Gobbetti, M., De Angelis, M. (2019). How *Listeria monocytogenes* shapes its proteome in response to natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology* **10**: 437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00437>
- Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C., Lecuit, M. (2019). *Listeria thailandensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **69**(1): 74–81. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003097>
- Lee, B.-H., Hébraud, M., Bernardi, T. (2017). Increased adhesion of *Listeria monocytogenes* strains to abiotic surfaces under cold stress. *Frontiers in Microbiology* **8**: 2221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02221>
- Liang, X., Peng, L.-H., Zhang, S., Zhou, S., Yoshida, A., Osatomi, K., Bellou, N., Guo, X.-P., Dobretsov, S., Yang, J.-L. (2019). Polyurethane, epoxy resin and polydimethylsiloxane

- altered biofilm formation and mussel settlement. *Chemosphere* **218**: 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.120>
- Marsh, E. J., Luo, H., Wang, H. (2003). A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities. *FEMS Microbiology Letters* **228**(2): 203–210. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00752-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00752-3)
- Mosquera-Fernández, M., Rodríguez-López, P., Cabo, M.L., Balsa-Canto, E. (2014). Numerical spatio-temporal characterization of *Listeria monocytogenes* biofilms. *International Journal of Food Microbiology* **182-183**: 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.005>
- Norouzi, F., Mansouri, S., Moradi, M., Razavi, M. (2010). Comparison of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among ESBL- and non-ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *African Journal of Microbiology Research* **4**(11): 1143–1147. <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000189>
- Norwood, D. E., Gilmour, A. (1999). Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *Journal of Applied Microbiology* **86**(4): 576–582. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00694.x>
- Orsi, R. H., Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**: 5273–5287. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-016-7552-2>
- Pang, X., Wong, C., Chung, H.-J., Yuk, H.-G. (2019). Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and its resistance to quaternary ammonium compounds in a simulated salmon processing environment. *Food Control* **98**: 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.029>
- Patel, J., Sharma, M., Ravishakar, S. (2011). Effect of curli expression and hydrophobicity of *Escherichia coli* O157:H7 on attachment to fresh produce surfaces. *Journal of Applied Microbiology* **110**(3): 737–745. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04933.x>
- Piercey, M. J., Ells, T. C., Macintosh, A. J., Hansen, L. T. (2017). Variations in biofilm formation, desiccation resistance and benzalkonium chloride susceptibility among *Listeria monocytogenes* strains isolated in Canada. *International Journal of Food Microbiology* **257**: 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.025>
- Piercey, M. J., Hingston, P. A., Hansen, T. L. (2016). Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15 °C. *International Journal of Food Microbiology* **223**: 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.009>

- Pohl, A. M., Pouillot, R., Van Doren, J. M. (2017). Changing US population demographics: What does this mean for listeriosis incidence and exposure? *Foodborne Pathogens and Disease* **14**(9): 524–530. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2297>
- Reis-Teixeira, F. B. D., Alves, V. F., de Martinis, E. C. P. (2017). Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology* **48**(3): 587–591. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.004>
- Ripolles-Avila, C., Cervantes-Huaman, B. H., Hascoët, A. S., Yuste, J., Rodríguez-Jerez, J. J. (2019). Quantification of mature *Listeria monocytogenes* biofilms: A comparison of different methods *International Journal of Food Microbiology* **289**: 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.020>
- Ripolles-Avila, C., Hascoët, A. S., Guerrero-Navarro, A. E., Rodríguez-Jerez, J. J. (2018). Establishment of incubation conditions to optimize the in vitro formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. *Food Control* **92**: 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.054>
- Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J. J., Vázquez-Sánchez, D., López-Cabo, M. (2018). Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in food-related environments: Incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. *Foods* **7**(6): 85. <https://doi.org/10.3390/foods7060085>
- Rodríguez-Melcón, C., Capita, R., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. (2018b). Effects of Bacteriophage P100 at different concentrations on the structural parameters of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Food Protection* **81**(12): 2040–2044. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-177>
- Rodríguez-Melcón, C., Capita, R., Rodríguez-Jerez, J. J., Martínez-Suárez, J. V., Alonso-Calleja, C. (2019a). Effect of low doses of disinfectants on the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* **16**(4): 262–268. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2472>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., Carballo, J., García-Fernández, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2018a). Structure and viability of 24- and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology* **76**: 513–517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019b). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology* **82**: 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020>

- Rothrock, M. J., Micciche, A. C., Bodie, A. R., Ricke, S. C. (2019). *Listeria* occurrence and potential control strategies in alternative and conventional poultry processing and retail. *Frontiers in Sustainable Food Systems* **3**: 33. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00033>
- Shi, W., Qingping, W., Jumei, Z., Moutong, C., Zéan, Y. (2015). Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods in China. *Food Control* **47**: 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.028>
- Szunerits, S., Boukherroub, R. (2016). Antibacterial activity of graphene-based materials. *Journal of Materials Chemistry B* **4**: 6892–6912. <https://doi.org/10.1039/C6TB01647B>
- Takahashi, H., Suda, T., Tanaka, Y., Kimura, B. (2010). Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology* **50**: 618–625. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02842.x>
- Tomičić, R. M., Čabarkapa, I. S., Vukmirović, Đ. M., Lević, J. D., Tomičić, Z. M. (2016). Influence of growth conditions on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. *Food and Feed Research* **43**(1): 19–24. <https://doi.org/10.5937/FFR1601019T>
- Wagner, M., McLauchlin, J. (2008). Biology. In: *Handbook of Listeria monocytogenes*, Dongyou, L. (ed.), CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 3–25. <https://www.taylorfrancis.com/books/handbook-listeria-monocytogenes-dongyou-liu/10.1201/9781420051414>
- Yilbas, B. S., Ibrahim, A., Ali, H., Khaled, M., Laoui, T. (2018). Hydrophobic and optical characteristics of graphene and graphene oxide films transferred onto functionalized silica particles deposited glass surface. *Applied Surface Science* **442**: 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.02.176>

CAPÍTULO X

Biovolumen y distribución espacial de bacterias patógenas Gram-negativas y Gram-positivas transmitidas por alimentos en biofilms monoespecie y mixtos

PUBLICACIÓN

Cristina Rodríguez-Melcón, Alicia Alonso-Hernando, Félix Riesco-Peláez, Camino García-Fernández, Carlos Alonso-Calleja, Rosa Capita (2021). Biovolume and spatial distribution of foodborne Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria in mono- and dual-species biofilms. *Food Microbiology* **94**: 103616. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103616>

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que cada año ocurren 600 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo. Estos casos provocan 420.000 muertes y 27.000.000 años de vida perdidos, además de constituir una carga económica importante (Møller *et al.*, 2018).

La salmonelosis es la zoonosis asociada con el mayor número de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en la Unión Europea y ocupa el segundo lugar después de la campilobacteriosis por lo que respecta al número de casos de enfermedad humana. El número de casos confirmados de salmonelosis en 2018 ascendió a 91.857, con una tasa de notificación de 20,1 por cada 100.000 habitantes (EFSA y ECDC, 2019). *Salmonella* es también la bacteria patógena asociada con el mayor número de notificaciones al Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) de la Unión Europea (European Commission, 2019). En los Estados Unidos, se estima que este microorganismo causa aproximadamente 1,2 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos cada año, que se asocian con alrededor de 23.000 ingresos hospitalarios y aproximadamente 450 muertes (CDC, 2020a).

Listeria monocytogenes es una bacteria transmitida por los alimentos, responsable cada año de unas 23.000 infecciones graves en todo el mundo (Rothrock *et al.*, 2019), con una tasa de mortalidad que puede superar el 30% en grupos de población vulnerables (Capita *et al.*, 2019a). En 2018 se produjeron 2.549 casos confirmados de listeriosis invasiva en la UE, lo que equivale a 0,47 casos por 100.000 habitantes, y su tasa de letalidad fue del 15,6% entre los 1.469 casos confirmados con desenlace conocido, la cifra más alta entre todas las enfermedades transmitidas por alimentos (EFSA y ECDC, 2019). Además, en los últimos diez años se ha producido un aumento sustancial en el número de casos de listeriosis humana en la UE (EFSA, 2010). En los EE.UU. se producen cada año un total anual de aproximadamente 1.600 casos de formas graves de listeriosis humana, una incidencia de 0,26 casos por cada 100.000 habitantes, y de estos pacientes mueren aproximadamente 260 (CDC, 2020b).

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA) es una bacteria relacionada principalmente con los entornos hospitalarios, estando involucrada en el 44% de las enfermedades nosocomiales y causa alrededor de 171.000 infecciones y aproximadamente 5.400 muertes cada año en la UE (Köck *et al.*, 2010). Sin embargo, en las últimas décadas se han observado infecciones graves por MRSA en individuos previamente sanos fuera de cualquier contexto hospitalario (Otter y French, 2010). Los animales productores de alimentos, junto con los alimentos de origen animal, se consideran la vía probable de transmisión comunitaria de MRSA (EFSA, 2009), y esta bacteria se aísla a menudo de dichos alimentos (Buzón-Durán *et al.*, 2017).

Los enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) están asociados con enfermedades humanas, tanto dentro como fuera del ámbito hospitalario. La evidencia científica de un vínculo directo entre la infección por este microorganismo y su presencia en los alimentos es limitada. No obstante, cabe destacar que la detección de VRE a lo largo de la cadena alimentaria ha sido identificada como un riesgo para la salud humana por dos razones; la primera está en relación con la posibilidad de que pueda causar enfermedades humanas directamente y, la segunda, por la frecuente implicación de los enterococos en la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos en diferentes puntos de la cadena de producción de alimentos (Guerrero-Ramos *et al.*, 2016a, b).

Se ha estimado que más del 60% de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos están relacionados con la presencia de biopelículas en los entornos de procesado de alimentos (Piercey *et al.*, 2016). Una biopelícula consiste en células microbianas incrustadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) autoproducidas y adheridas a una superficie, ya sea biótica o abiótica. Las células sésiles son más resistentes a los desinfectantes que las células planctónicas, lo que dificulta su eliminación y les permite sobrevivir en las zonas de producción de alimentos por periodos prolongados (Capita *et al.*, 2014; Piercey *et al.*, 2016; Rodríguez- Melcón *et al.*, 2018a). Además de provocar la contaminación de los alimentos, las biopelículas presentes en la industria alimentaria pueden contribuir a la corrosión de las superficies metálicas y a la disminución de la eficiencia de los equipos (Díez-García *et al.*, 2012).

Las investigaciones anteriores sobre estas estructuras se han centrado en el estudio de biopelículas de una sola especie (Alonso-Calleja *et al.*, 2019; Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2014, 2017, 2019b; Rodríguez-Campos *et al.*, 2019; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018a, 2019a). Sin embargo, en los entornos de procesado de alimentos, las biopelículas suelen estar compuestas por varios grupos diferentes de microorganismos (Puga *et al.*, 2018). La presencia de varias especies afecta a la estructura y funcionamiento de las biopelículas, así como también a su fisiología y resistencia a los antimicrobianos (Giaouris *et al.*, 2013). En esta línea, en comparación con las biopelículas de una sola especie, se sabe que aquellas constituidas por diferentes especies muestran una mayor resistencia a los desinfectantes de uso común (Jahid y Ha, 2014). Esto aumenta la persistencia de las bacterias en la Industria Alimentaria y, consecuentemente, el riesgo de contaminación de los alimentos.

Algunos trabajos de investigación recientes sobre biopelículas, como las compuestas por *L. monocytogenes* y *Pseudomonas fluorescens*, han puesto de manifiesto que las diferentes especies se disponen en capas claramente diferenciadas (Kabir *et al.*, 2014, 2015; Puga *et al.*, 2014). Las células bacterianas situadas en las capas más profundas del biofilm se benefician de una mayor protección contra los tratamientos antimicrobianos. Por lo tanto, el conocimiento del posicionamiento de las bacterias en las biopelículas mixtas es crucial para

diseñar protocolos de desinfección efectivos. Aunque *S. enterica*, *L. monocytogenes*, MRSA y VRE son especies bacterianas identificadas con frecuencia en infecciones asociadas a la presencia de biopelículas, se desconocen las interacciones entre dichas especies en estas estructuras.

El objetivo del presente estudio ha sido determinar cuál es la distribución espacial de las bacterias en biofilms mixtos, formados por una bacteria Gram-negativa (*S. enterica*) y con una bacteria Gram-positiva (*L. monocytogenes*, MRSA o VRE), a lo largo de un tiempo de 240 h de incubación a 10 °C. También se pretendió medir el biovolumen de los cuatro grupos de bacterias en las biopelículas de una o dos especies.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas

Se utilizaron cuatro cepas bacterianas de origen alimentario disponibles en nuestro laboratorio. Estas fueron: *S. enterica* serotipo Agona, cepa S24 (González-Machado *et al.*, 2018; SA), *L. monocytogenes* serotipo 1/2a, cepa LM6 (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019a; LM), *S. aureus* resistente a meticilina, cepa MRSA48a (Buzón-Durán *et al.*, 2017; MRSA) y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, cepa VRE61s (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018a; VRE). Los cultivos bacterianos se almacenaron a -80 °C en caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) con 20% (vol/vol) de glicerol. Antes de cada experimento, se transfirieron 20 µl del cultivo congelado a tubos de ensayo con 5 ml de TSB (Oxoid), que posteriormente se incubaron durante 24 h a 37 °C. A continuación, los cultivos se inocularon en agar triptona de soja (TSA, Oxoid), donde se mantuvieron a 4 °C.

2.2. Formación de biopelículas

La estructura y formación de las biopelículas se estudiaron mediante microscopía láser confocal de barrido (CLSM), siguiendo un procedimiento previamente descrito (Capita *et al.*, 2014) con modificaciones menores. Las cepas se incubaron durante 24 h a 37 °C en tubos de ensayo con 9 ml de TSB (Oxoid). Se realizaron tres diluciones decimales seriadas en este caldo de cultivo hasta alcanzar una concentración de aproximadamente 10⁶ ufc/ml. Se depositaron volúmenes de 250 µl de siete suspensiones bacterianas diferentes en los pocillos de las placas de poliestireno Nunc™ MicroWell™ con fondo óptico de 96 pocillos y base de polímero (código 165305; Thermo Fisher Scientific, New Hampshire, EE.UU.). Estos fueron: *S. enterica*, *L. monocytogenes*, MRSA, VRE, *S. enterica* más *L. monocytogenes*, *S. enterica* más MRSA y *S. enterica* más VRE. Los cultivos mixtos se componían de 250 µl de una mezcla 1:1 (vol/vol) de cada cepa. Las placas se incubaron a 37 °C para mejorar la adhesión de los microorganismos a los pocillos. Después de 60 min, los pocillos se lavaron con una solución de NaCl 150 mM (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, EE. UU.) con el objetivo de eliminar las bacterias no adheridas. Posteriormente, se agregaron 250 µl de TSB estéril (Oxoid) y las placas se incubaron a 10 °C. Transcurridas 12 (H12), 48 (H48), 72 (H72), 120 (H120) o 240 (H240) horas de incubación, los pocillos se lavaron dos veces con NaCl 150 mM. Cada pocillo se llenó con 250 µl de una solución compuesta por 1.750 µl de TSB (Oxoid) y 3,5 µl de una mezcla 1: 1 (vol/vol) de las tinciones 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, disuelto en H₂O) y Texas Red®-X reconstituido con tampón de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) a pH 8,3, del kit ViaGram™ Red+ Bacterial Gram Stain and Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon,

USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El colorante Texas Red®-X se une selectivamente a la superficie de las bacterias Gram-positivas y las tiñe de rojo fluorescente, mientras que la tinción de ácido nucleico con DAPI emite fluorescencia azul durante la obtención de imágenes CLSM y se usa, en combinación con Texas Red®-X, para identificar las bacterias Gram-negativas.

La placa de microtítulo se incubó en la oscuridad a 30 °C durante 60 minutos para estimular la penetración de los componentes fluorescentes en las células bacterianas. Una vez transcurrido este periodo, se eliminó el exceso de líquido de los pocillos y se dejó reposar la placa durante 48 h a 10 °C para potenciar la fluorescencia del componente (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018b).

2.3. Estudio de las biopelículas

Para obtener imágenes de las biopelículas se utilizó un microscopio láser confocal de barrido Nikon Eclipse TE 2000-U (Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE.UU.) con el paquete de software EZ-C13.60. Todas las biopelículas se escanearon a 400 Hz y se observaron con un objetivo de 40×. La fluorescencia se detectó mediante excitación a 408 nm para DAPI, usando un láser de diodo ultravioleta al 125% de intensidad, y a 543 nm para Texas Red®-X, usando un láser de helio-neón al 125% de intensidad. Las emisiones se recogieron con filtros de paso de banda, un filtro 515/30 para DAPI y un filtro de paso largo 650 para Texas Red®-X. Para cada biofilm se adquirieron, en tres áreas diferentes del pocillo, tres pilas de imágenes de plano horizontal de 512 × 512 píxeles, correspondientes a 119 μm × 119 μm, con una distancia de 1 μm en el eje z. Se realizaron, en días diferentes, tres experimentos independientes para cada condición.

El biovolumen de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas en las biopelículas se calculó utilizando el software BioRCA 1.8, desarrollado por miembros de nuestro Grupo de Investigación utilizando el entorno de desarrollo integrado Lazarus (IDE). El biovolumen representa el volumen de células del biofilm formado, medido en micrómetros cúbicos (μm³) dentro del campo de observación de 14.161 μm² y, por tanto, proporciona una estimación de la biomasa de la biopelícula. A partir de un valor de umbral, cada píxel se etiqueta como vacío, azul (teñido con DAPI) o rojo (teñido con Texas Red®-X). Con esta información se genera un modelo tridimensional del biofilm en estudio y se calculan los parámetros estructurales. Por lo tanto, el programa de ordenador permitió la cuantificación de las subpoblaciones independientes representados por fluorescencia azul (*S. enterica*) y fluorescencia roja (bacterias Gram-positivas).

2.4. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular (CSH)

La CSH de las cuatro cepas se determinó mediante la prueba de adhesión microbiana a solventes no polares (MATS; Alonso-Calleja *et al.*, 2015; Capita *et al.*, 2014). Se utilizó xileno como fase hidrocarbonada. Las células bacterianas se cultivaron en TSB (Oxoid) durante 24 h a 37 °C. Las células se recogieron dos veces mediante centrifugación a 3200×g durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C, se lavaron dos veces con una solución salina tamponada con tampón fosfato salino estéril (PBS; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se resuspendieron en NaCl 150 mM a una concentración de 10⁸ ufc/ml. Se obtuvo una muestra en fase acuosa (0,4 ml) y la densidad óptica a 405 nm (DO₄₀₅) se determinó utilizando un Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). La suspensión celular (2,0 ml) se agitó con 0,33 ml de xileno (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en un agitador vórtex durante 60 segundos y luego se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, separando así completamente las dos fases. El porcentaje de células presentes en el solvente se calculó usando la siguiente ecuación: % de afinidad al xileno = 100 × [1 - (A/A₀)], donde A₀ es la DO₄₀₅ de la suspensión original antes de la mezcla, y A es la DO₄₀₅ de la fase acuosa. La hidrofobicidad de la superficie celular se agrupó en tres categorías: afinidad débil (< 21%), moderada (21% - 50%) y fuerte (> 50%) por el xileno (Capita *et al.*, 2014). Todas las determinaciones se llevaron a cabo tres veces durante tres días no consecutivos.

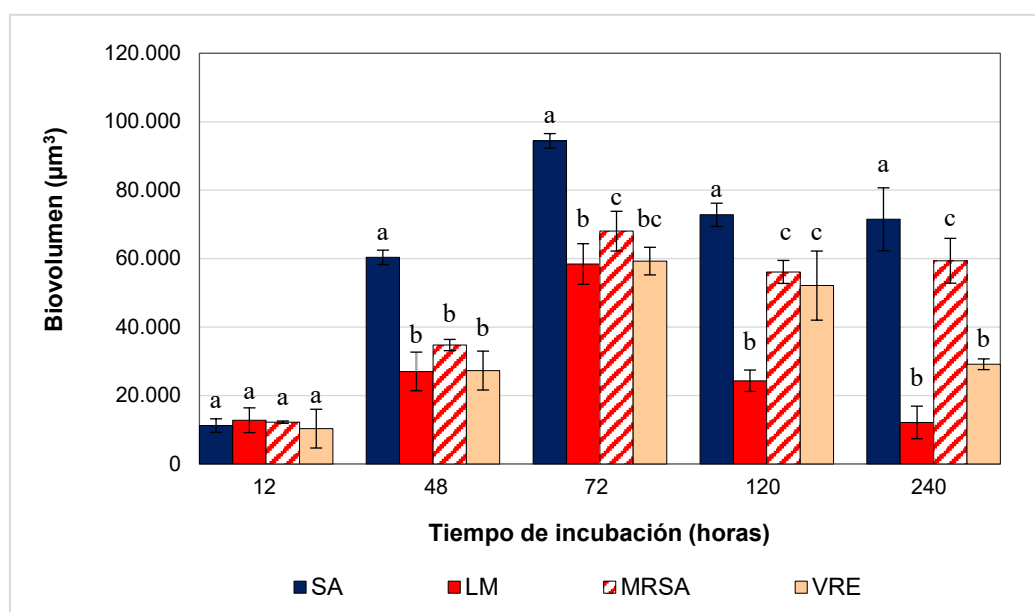
2.5. Análisis estadístico

El biovolumen de las biopelículas y los porcentajes de afinidad por el xileno se compararon mediante técnicas de análisis de varianza de una vía (ANOVA). La separación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Duncan. El procesado de datos en este estudio se llevó a cabo utilizando el paquete de software Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). Se establecieron diferencias significativas para un nivel de probabilidad del 5% ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Biopelículas monoespecie

En el presente estudio, todas las cepas pudieron formar biopelícula en las condiciones experimentales ensayadas (Figura X.1). La capacidad para formar biopelículas en superficies plásticas se ha observado previamente para *S. enterica* (Capita *et al.*, 2017, 2019b; González-Machado *et al.*, 2018), *Cronobacter sakazakii*, *Yersinia enterocolitica* (Capita *et al.*, 2019c), *L. monocytogenes* (Alonso-Calleja *et al.*, 2019; Capita *et al.*, 2019a; Rodríguez-Campos *et al.*, 2019; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018a, 2019a), MRSA (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2018) y VRE (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018a). El hecho de que todas las cepas de bacterias patógenas estudiadas tuvieran la capacidad de producir biopelículas en superficies de poliestireno es motivo de preocupación en el contexto de la Salud Pública. Esto se debe a que los materiales plásticos tienen un uso muy amplio tanto en la Industria Alimentaria como en el Sistema Sanitario.



SA, *Salmonella enterica* serotipo Agona; LM, *Listeria monocytogenes*; MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; VRE, *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina. Las barras, dentro del mismo tiempo de incubación, sin letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura X.1. Biovolumen en el campo de observación de $14.161 \mu\text{m}^2$ de las biopelículas monoespecie formadas por bacterias patógenas sobre poliestireno durante 240 horas de incubación a 10°C .

Varios investigadores han demostrado que existe una correlación positiva entre la producción de biofilm en placas de microtítulo de poliestireno y la formación de biofilms en

diversos materiales utilizados en los entornos de procesado de alimentos (Díez-García *et al.*, 2012). Sin embargo, en algunos trabajos de investigación se encontraron diferencias importantes entre las biopelículas formadas sobre poliestireno y sobre otros materiales diferentes (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019b).

En las biopelículas de una sola especie, el biovolumen de *S. enterica* fue mayor que el de las otras especies desde H48 en adelante (Figura X.1). Este resultado no coincide con otras investigaciones (Bridier *et al.*, 2010; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018a) que registraron que *S. enterica* tenía menos capacidad de formar biofilm que *L. monocytogenes*, *S. aureus* o *Enterococcus* spp. No obstante, cabe señalar que la cepa utilizada para el presente trabajo pertenecía al serotipo *S. Agona*, que incluye cepas con una fuerte capacidad de formación de biopelículas (Capita *et al.*, 2019b; Díez-García *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que la capacidad para formar biopelículas depende de la cepa, lo que puede explicar las diferencias entre estudios (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019b).

El biovolumen de las biopelículas de todas las cepas ensayadas aumentó progresivamente de H12 a H72, pero mostró una tendencia a disminuir a partir de ese punto. Los valores del biovolumen en el campo de observación de $14.161 \mu\text{m}^2$ variaron entre $11.227,6 \mu\text{m}^3 \pm 1.968,7 \mu\text{m}^3$ en H12 y $94.409,0 \mu\text{m}^3 \pm 2.131,0 \mu\text{m}^3$ en H72 para *S. enterica*. Para *L. monocytogenes* las cifras correspondientes fueron $12.780,9 \mu\text{m}^3 \pm 3.615,4 \mu\text{m}^3$ en H12 y $58.418,3 \mu\text{m}^3 \pm 5.944,9 \mu\text{m}^3$ en H72. En el caso de MRSA las cifras aumentaron desde $12.217,4 \mu\text{m}^3 \pm 338,5 \mu\text{m}^3$ en H12 hasta $68.020,8 \mu\text{m}^3 \pm 5.812,3 \mu\text{m}^3$ en H72, y para VRE pasaron de $10.321,4 \mu\text{m}^3 \pm 5.663,2 \mu\text{m}^3$ en H12 a $59.280,0 \mu\text{m}^3 \pm 4.032,9 \mu\text{m}^3$ en H72 (Tabla X.1). Estos resultados son coincidentes con los resultados de otras investigaciones (Chavant *et al.*, 2002; González-Machado *et al.*, 2018; Petrova *et al.*, 2016; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018a), en las que el mayor biovolumen de las biopelículas se detecta después de 48-72 h de incubación. El aumento del biovolumen a lo largo del tiempo se debe a un crecimiento de componentes tanto celulares como extracelulares (González-Machado *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2017). La tendencia a la reducción del biovolumen de biofilm observada a partir de H72 probablemente se deba al desprendimiento de células previo a una nueva fase de colonización (González-Machado *et al.*, 2018).

3.2. Biopelículas de dos especies

La estructura y las propiedades funcionales de las biopelículas de múltiples especies son en gran medida el resultado de interacciones entre las diferentes especies coexistentes. Estas interacciones pueden ser antagónicas, sinérgicas o neutrales, según las cepas y el entorno (por ejemplo, el medio de cultivo), y varían con el tiempo (Tan *et al.*, 2017). Tales interacciones

entre especies pueden influir en la dinámica de formación de las biopelículas (Giaouris *et al.*, 2013).

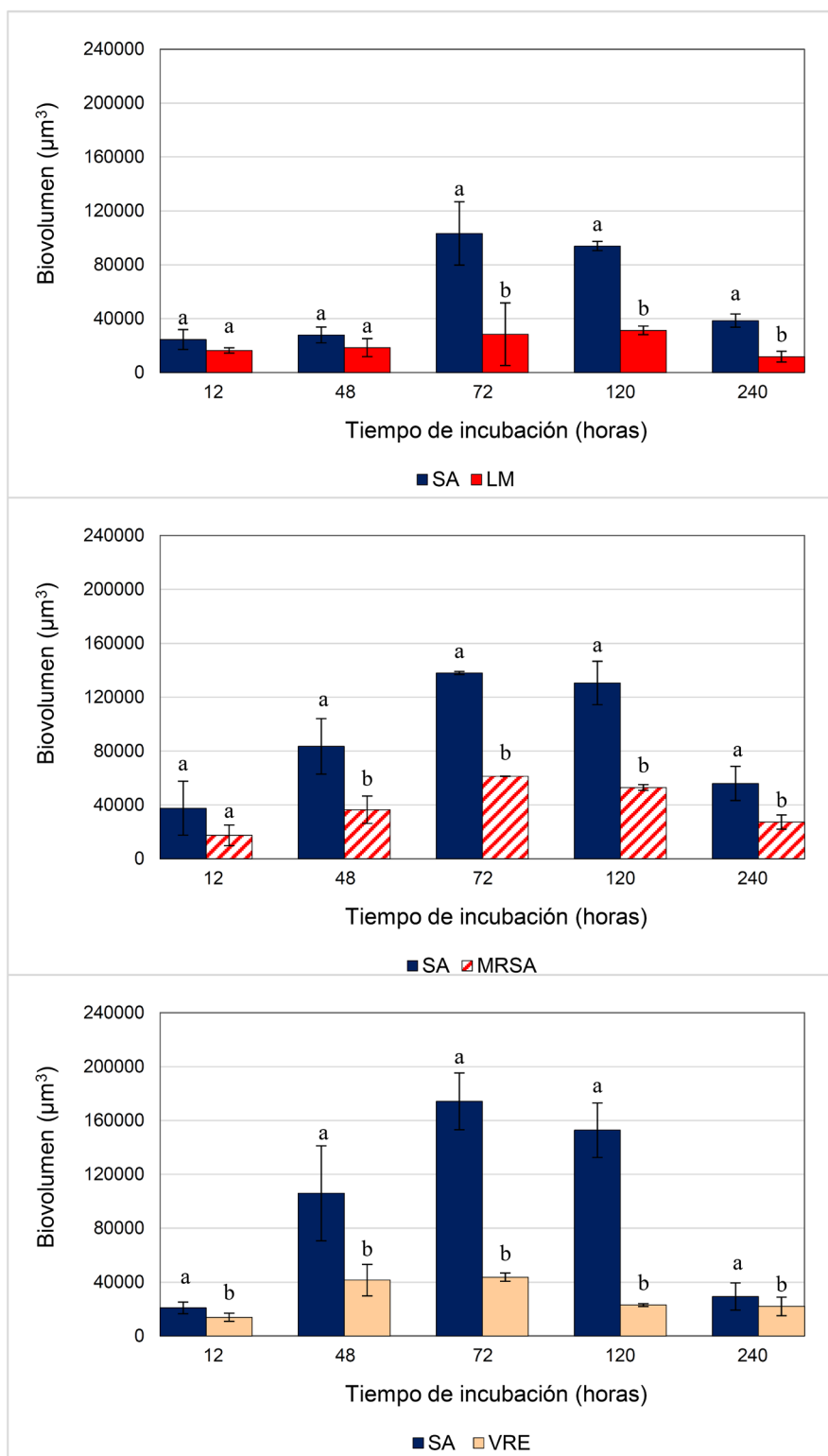
La Figura X.2 muestra el biovolumen de cada especie en los diferentes biofilms mixtos estudiados. La biomasa de *Salmonella* fue mayor ($P < 0,05$) que la de las bacterias Gram-positivas a partir de H72 en el caso de *L. monocytogenes*, de H48 para MRSA y de H12 para VRE.

El biovolumen de las biopelículas de *S. Agona* fue mayor en las biopelículas de dos especies que en las biopelículas de una sola especie en H12 en presencia de MRSA, en H48 cuando se combina con VRE y en H72 y H120 tanto con MRSA como con VRE (Tabla X.1 y Figura X.3). Cabe señalar que en presencia de *L. monocytogenes*, el biovolumen de *S. Agona* fue menor entre H48 y H120 que en combinación con las otras bacterias Gram-positivas (Tabla X.1). El efecto de la presencia de otras especies sobre las características de las biopelículas formadas por *Salmonella* es un aspecto controvertido. Hay informes de que la formación de biopelículas por este patógeno puede verse favorecida por la presencia de otras bacterias, pero otros autores afirman lo contrario. De manera similar, se han publicado tanto los efectos tanto sinérgicos como antagónicos de *Salmonella* spp. sobre las biopelículas de otras bacterias (Gkana *et al.*, 2017).

Tabla X.1. Biovolumen en el campo de observación de 14.161 μm^2 de biopelículas de una y dos especies de bacterias patógenas formadas sobre poliestireno durante 240 horas de incubación a 10 °C.

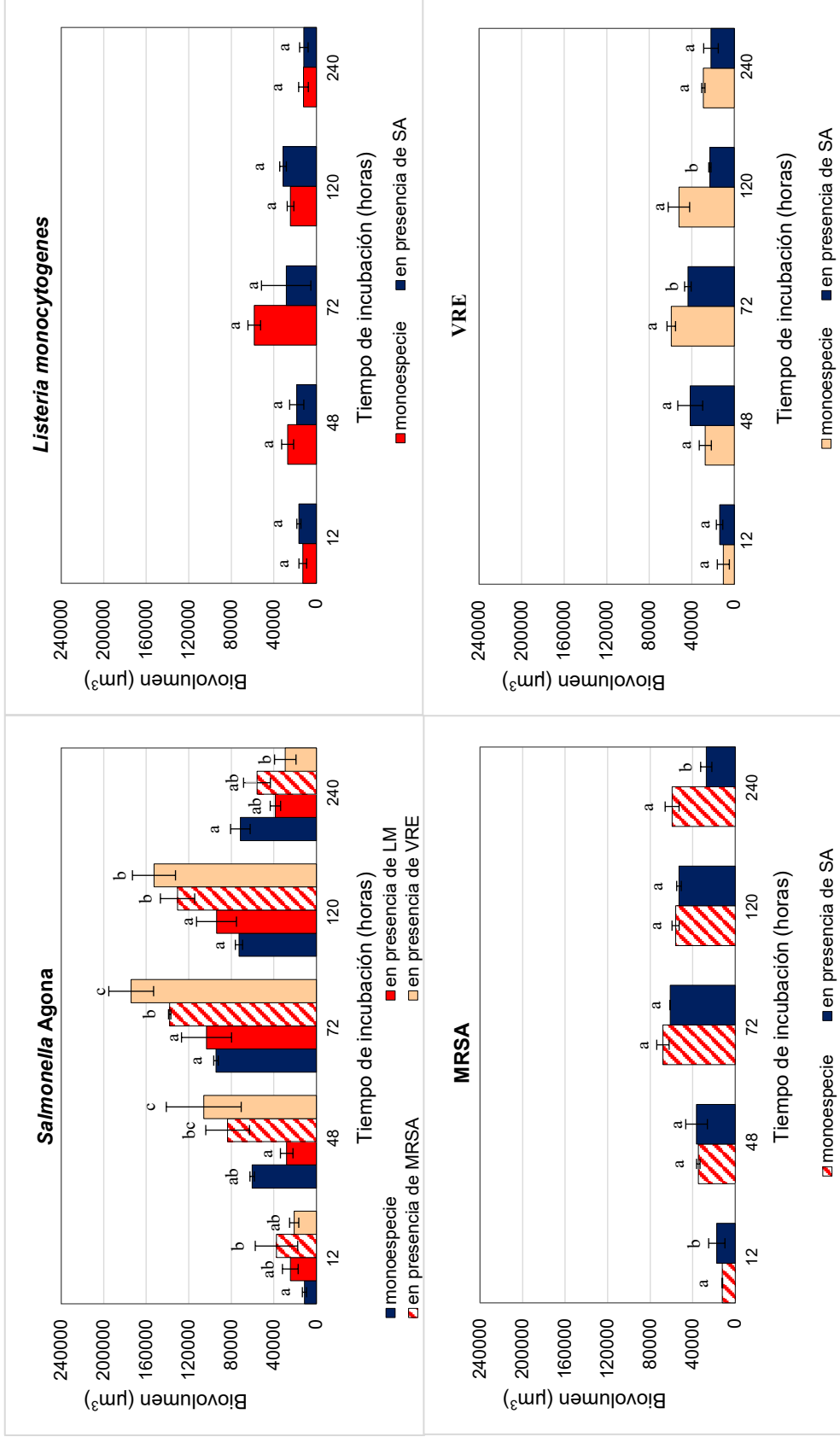
Grupo bacteriano	Tiempo de incubación (horas)			
	12	48	72	240
Salmonella Agona				
Monoespecie	11,227,6 ± 1,968,7 ^a	60,369,2 ± 2,110,7 ^{ab}	94,409,0 ± 2,131,0 ^{ba}	72,794,1 ± 3,400,3 ^{aba}
Mixto (con LM)	24,528,1 ± 7,391,5 ^{ab}	27,907,5 ± 5,903,1 ^a	103,299,1 ± 23,540,3 ^{ba}	93,937,9 ± 18,778,6 ^{ba}
Mixto (con MRSA)	37,528,4 ± 19,956,8 ^{ab}	83,477,6 ± 20,549,9 ^{abc}	137,939,8 ± 1,109,3 ^{bb}	130,566,9 ± 16,119,6 ^{bb}
Mixto (con VRE)	20,889,0 ± 4,324,1 ^{ab}	105,913,0 ± 35,217,5 ^{bc}	174,150,1 ± 21,062,3 ^c	152,729,7 ± 20237,3 ^{cb}
Listeria monocytogenes				
Monoespecie	12,780,9 ± 3,615,4 ^a	27,036,7 ± 5,645,6 ^{ba}	58,418,3 ± 5,944,9 ^{ca}	24,319,1 ± 3,119,3 ^{ba}
Mixto (con SA)	16,451,3 ± 1,929,7 ^a	18,492,8 ± 6,681,8 ^a	28,418,4 ± 23,212,1 ^a	31,342,8 ± 3,127,0 ^a
MRSA				
Monoespecie	12,217,4 ± 338,5 ^a	34,754,1 ± 1,639,6 ^{ba}	68,020,8 ± 5,812,3 ^{ca}	56,118,3 ± 3,358,1 ^{da}
Mixto (con SA)	17,364,2 ± 7,646,2 ^a	36,393,5 ± 10,174,0 ^a	61,225,1 ± 16,68 ^{ba}	52,927,5 ± 2,163,5 ^{ba}
VRE				
Monoespecie	10,321,4 ± 5,663,2 ^a	27,287,5 ± 5,686,0 ^{ba}	59,280,0 ± 4,032,9 ^{ca}	52,116,7 ± 10,097,1 ^{ca}
Mixto (con SA)	13,861,7 ± 3,021,8 ^a	41,448,2 ± 11,712,7 ^{ba}	43,662,4 ± 3,105,6 ^{bb}	22,957,2 ± 1,056,3 ^{ab}

SA, *Salmonella enterica* serotipo Agona, LM, *Listeria monocytogenes*; MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina; VRE, *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina. Los datos muestran la media aritmética ± desviación estándar de 9 determinaciones. Los datos en la misma fila sin letras en común (superíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Los datos en la misma columna para el mismo grupo microbiano sin letras en común (subíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$).



SA, *Salmonella enterica* serotipo Agona; LM, *Listeria monocytogenes*; MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina; VRE, *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina. Las barras en el mismo gráfico que, para un mismo tiempo de incubación, no comparten ninguna letra, presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Figura X.2. Biovolumen en el campo de observación de $14.161 \mu\text{m}^2$ de biopelículas de dos especies formadas por bacterias patógenas sobre poliestireno durante 240 horas de incubación a 10°C .



SA: *Salmonella enterica* serotipo Agona; LM, *Listeria monocytogenes*; MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; VRE, *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina. Los biovolúmenes en biopelículas de una sola especie y de dos especies se comparan para cada cepa. Las barras en el mismo gráfico que, para un mismo tiempo de incubación, no comparten ninguna letra, presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Figura X.3. Biovolumen en el campo de observación de 14.161 μm^2 de biopelículas formadas por cuatro bacterias patógenas sobre poliestireno durante 240 horas de incubación a 10 °C.

Como se observó en el presente estudio, varios autores han indicado que la producción de biofilm por *S. enterica* puede ser mejorada por la presencia de otras bacterias (Iñiguez-Moreno *et al.*, 2018; Makovcova *et al.*, 2017). Por el contrario, otros investigadores han observado mecanismos de inhibición que afectan a las biopelículas mixtas (Chen *et al.*, 2015). Gkana *et al.* (2017) evaluaron la formación de biopelículas por *S. Typhimurium* y *S. aureus* en biofilms monoespecie y mixtos, encontrando que cuando en el biofilm estaban presentes ambas especies, el número de células de cada microorganismo eran menor que en el caso de las biopelículas de una sola especie. Según Iñiguez-Moreno *et al.* (2018), las diferencias en los resultados de los distintos estudios pueden estar relacionadas con las variaciones intraespecíficas en el comportamiento de *L. monocytogenes*. Por lo tanto, la densidad celular de cada microorganismo probablemente dependa de la capacidad de la cepa para formar biopelículas en cocultivo.

Con respecto a las bacterias Gram-positivas, este trabajo observó poca diferencia entre el biovolumen de una sola especie y de los biofilms mixtos. Sin embargo, en H12 las bacterias Gram-positivas mostraron una tendencia a formar mayor biovolumen en presencia de *S. enterica* que en su ausencia, hallazgo que concuerda con los resultados de Puga *et al.* (2014). Estos autores observaron que la bacteria Gram-positiva *L. monocytogenes* forma biopelículas más robustas en biofilms mixtos, con la participación de *L. monocytogenes* y *P. fluorescens*, que en biofilms de una sola especie, lo que indica que el factor principal en este efecto sinérgico es la gran cantidad de EPS producida por *P. fluorescens*, que mejora la fijación física y protege a *L. monocytogenes*. Otro efecto positivo que *S. enterica* podría proporcionar a las bacterias Gram-positivas estaría relacionado con la capacidad de esta enterobacteria para expresar proteinasas extracelulares que pueden ayudar a movilizar aminoácidos esenciales. Las bacterias Gram-negativas, cuando se encuentran a bajas temperaturas, suelen producir ciertas enzimas extracelulares como las proteinasas, lipasas y otras hidrolasas, contribuyendo así a un mejor aprovechamiento de las fuentes de nutrientes (Sorhaug y Stepaniak, 1997). También puede haber mecanismos de interacción ecológica que involucren la comunicación de célula a célula (*quorum sensing*) (Elias y Banin, 2012). Es probable que este fenómeno sea más efectivo dentro de biofilms que en un contexto planctónico, ya que las distancias más cortas entre células permitirían mayores concentraciones de productos metabólicos finales, que podrían actuar como precursores o inhibidores, como enzimas y otros, realizando así una función sintrófica (Morris *et al.*, 2013). En esta línea, Giaouris *et al.* (2013) observaron que las superficies ya colonizadas por otras bacterias pueden incrementar significativamente la adherencia y la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*.

Se observó menos biomasa en biopelículas mixtas que en especies únicas en H72 y H120 en el caso de VRE, y en H240 en el caso de MRSA. Sin embargo, no se observaron tales

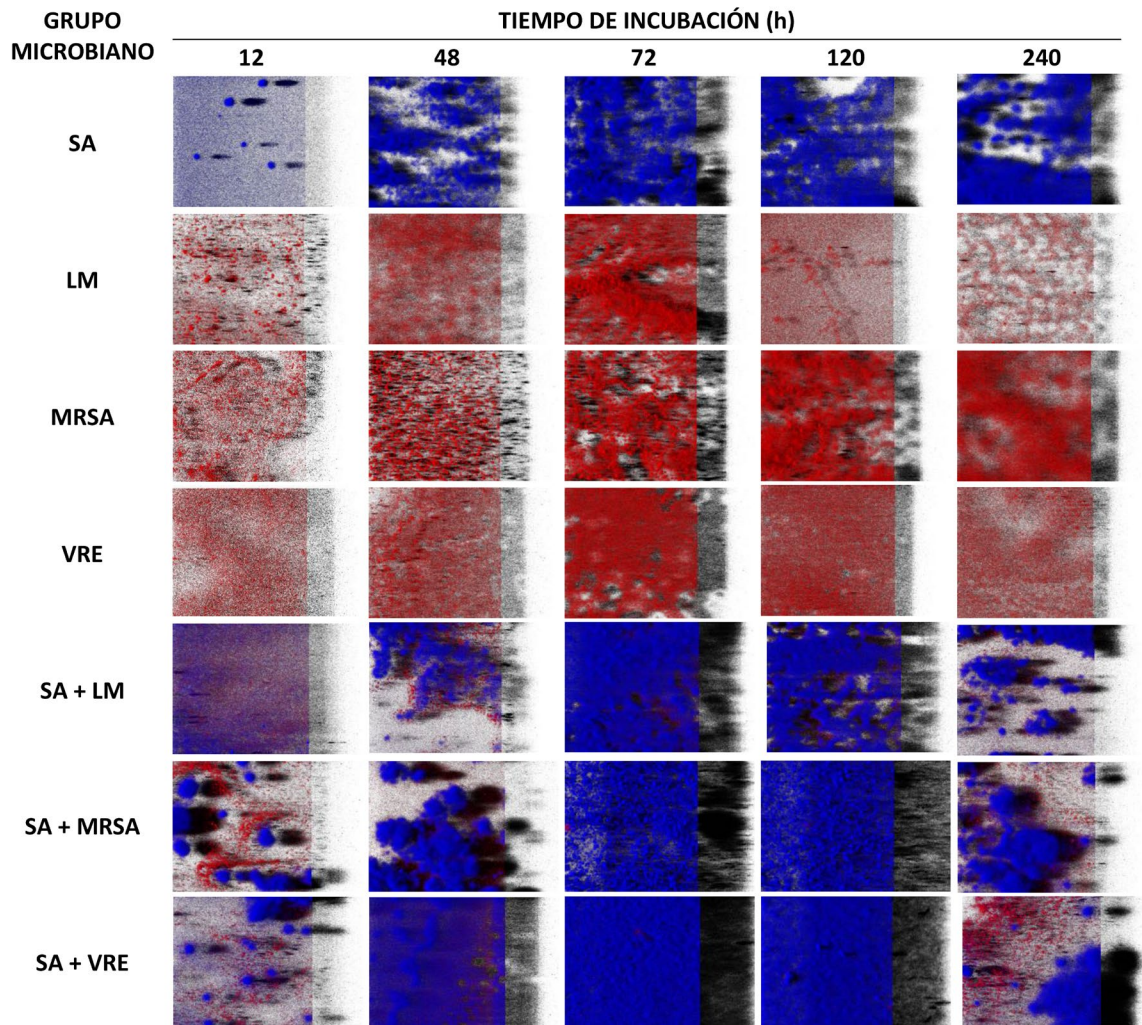
diferencias para *L. monocytogenes*, cuyo biovolumen fue similar ($P > 0,05$) en biopelículas de una y dos especies. Se ha sugerido que a pesar de la capacidad limitada de *L. monocytogenes* para formar biopelículas en relación con la de otras especies bacterianas, esta bacteria parece adaptarse adecuadamente a las biopelículas mixtas, principalmente porque la colonización de las superficies por bacterias Gram-negativas es beneficiosa para la unión de *L. monocytogenes* (Puga *et al.*, 2014).

3.3. Distribución espacial de las bacterias en la biopelícula

Para comprender el proceso de desarrollo de biofilms mixtos, es fundamental definir sus características estructurales y la ubicación de las células (Liu *et al.*, 2018). Se ha observado que las bacterias pueden alterar sus rasgos biológicos para adaptarse a los ambientes locales, y esta adaptación se refleja en la distribución espacial de las especies en una comunidad estructurada (Hansen *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018). Las interacciones célula a célula en un biofilm, que dependen de la cepa, influyen en la organización temporal y espacial de la arquitectura del mismo. En este estudio, la tinción diferencial de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas permitió la identificación de sus respectivas ubicaciones en la estructura de la biopelícula.

En las reconstrucciones tridimensionales de los biofilms, el único color visible en algunas biopelículas de dos especies era el azul, de las células teñidas con DAPI, lo que podría sugerir que sólo estaba presente *S. enterica* (Figura X.4). Sin embargo, estas observaciones visuales se contraponían con los datos numéricos (Figura X.2), según los cuales parte del biovolumen de las biopelículas mixtas corresponde a bacterias Gram-positivas, teñidas con Texas Red®-X, y por tanto de tonalidad roja.

Cuando se giró la proyección tridimensional de las biopelículas de dos especies (ver ejemplo en la Figura X.5), se puede ver en todos los casos que las bacterias se encuentran en dos capas claramente diferenciadas. Las células de *S. enterica* se ubicaron en la capa superficial de la biopelícula mixta, mientras que las bacterias Gram-positivas se colocaron en la parte inferior. Este posicionamiento espacial de *S. enterica* mejora la competencia por los recursos, incluido el oxígeno (se ha observado que *Salmonella* requiere oxígeno para producir biopelículas; Scher *et al.*, 2005). La evidencia de tal ventaja competitiva fue proporcionada por el mayor biovolumen de la población de *S. enterica* en los biofilms de dos especies (Tabla X.1).



Las imágenes ($119 \mu\text{m} \times 119 \mu\text{m}$) se obtuvieron mediante microscopía láser confocal de barrido (CLSM) y se reconstruyeron utilizando el software IMARIS, con proyecciones de las sombras a la derecha. SA, *Salmonella enterica* serotipo Agona; LM, *Listeria monocytogenes*; MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; VRE, *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina. SA se tiñó de azul con la tinción fluorescente de ácido nucleico DAPI, y las bacterias Gram-positivas se tiñeron de rojo con el colorante Texas Red®-X.

Figura X.4. Proyecciones tridimensionales de estructuras de las biopelículas de una y dos especies formadas por cuatro bacterias patógenas sobre poliestireno. Las biopelículas se estudiaron a lo largo de 240 horas de incubación a $10 \text{ }^\circ\text{C}$.

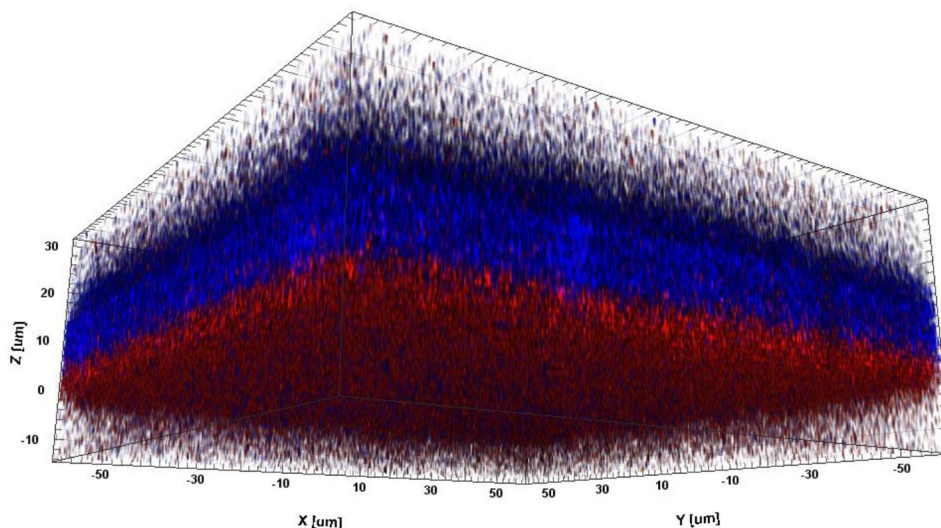


Figura X.5. Proyecciones tridimensionales de un biofilm mixto formado por *Salmonella* Agona (teñida de azul con colorante DAPI) y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VRE, teñido de rojo con colorante Texas Red®-X) tras 120 horas de incubación a 10 °C. La imagen se obtuvo mediante microscopía láser confocal de barrido (CLSM) y se reconstruyó utilizando el software IMARIS.

El trabajo de otros investigadores también respalda esta estructura espacial de doble capa (Almeida *et al.*, 2011; Habimana *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Puga *et al.* (2014) se observó que, durante las primeras etapas de formación de las biopelículas, las bacterias Gram-positivas se encontraban en las capas inferiores de las biopelículas de dos especies, tal como se vio en el presente trabajo. Según los autores citados, la formación de esta doble capa es una forma característica de distribución espacial que puede ser la clave para descifrar interacciones específicas entre especies Gram-positivas y Gram-negativas cuando viven juntas en las biopelículas. Del mismo modo, Govaert *et al.* (2019) también observaron que, en el biofilm de dos especies, *L. monocytogenes* se encontraba principalmente en la capa inferior, mientras que *Salmonella* Typhimurium se encontraba principalmente en la capa superior. En un estudio previo sobre la formación de biopelículas de cultivos mixtos en acero inoxidable por *Salmonella* spp. y *S. aureus* se puso de manifiesto que las salmonelas persistían solo en los estratos superiores y, a diferencia de los estafilococos, estas bacterias no se detectaron en absoluto en la profundidad del biofilm (Knowles *et al.*, 2005). Del mismo modo, Phalak *et al.* (2016) encontraron que *P. aeruginosa* se acumulaba en la parte superior del biofilm e inhibía la oxigenación de *S. aureus*, situado en la parte inferior.

La distribución espacial de las bacterias en dos capas puede atribuirse a la mayor tasa de crecimiento exhibida por una de las dos especies, a la movilidad de algunas especies, a las diferentes necesidades de oxígeno, a la naturaleza hidrófoba de las membranas celulares o a fenómenos de *quorum sensing*. Sin embargo, en este trabajo todas las especies estudiadas produjeron cantidades similares de biopelícula en las primeras etapas, y las células planctónicas presentaban tasas de crecimiento similares en TSB (datos no mostrados). Además, *L. monocytogenes* tiene motilidad mediada por flagelos y es una bacteria microaerófila (Buchrieser *et al.*, 2003), lo que podría explicar su presencia en capas inferiores, pero MRSA y VRE no tienen movilidad y crecen mejor en condiciones aeróbicas, lo que no explica su presencia en los estratos inferiores del biofilm. Cabe señalar, en particular, que el oxígeno puede desarrollar gradientes pronunciados, con ambientes anóxicos en regiones más profundas de la matriz del biofilm, como consecuencia de la escasa solubilidad en agua de este gas y la alta tasa a la que es utilizado por los microorganismos (Knowles *et al.*, 2005).

Además, los valores de hidrofobicidad para *S. enterica* observados en este estudio fueron más altos ($P < 0,01$), $45,74 \pm 2,57$, que los de los microorganismos restantes, con cifras de hidrofobicidad de $14,37 \pm 1,06$ para *L. monocytogenes*, $13,09 \pm 1,55$ para MRSA y $1,62 \pm 0,51$ para VRE. Estos resultados dejan claro que no existe relación entre los valores de hidrofobicidad y el posicionamiento de las bacterias en el biofilm, ya que las bacterias Gram-positivas, al tener valores más bajos de hidrofobicidad, en el sentido de una débil afinidad por el xileno, se ubicaron en contacto con el poliestireno, que es un material hidrofóbico. Por el contrario, *S. enterica*, con cifras más altas de hidrofobicidad y una afinidad moderada por el xileno, no entró en contacto con la superficie de poliestireno. A la luz de lo anterior, es posible que la presencia de dos capas en el biofilm mixto sea el resultado de una respuesta de *quorum sensing* (Puga *et al.*, 2018). En esta línea, los autores antes mencionados observaron que las células de *L. monocytogenes* fueron capaces de colonizar biopelículas preformadas de *Pseudomonas*, desplazándose hacia las capas inferiores de estas películas, lo que sugiere alguna forma de trofismo. Estos autores especulan con que las células de *L. monocytogenes* son atraídas por moléculas de señalización de *Pseudomonas* que están concentradas en la parte inferior de la biopelícula.

Varios autores (Fatemi y Frank, 1999; Ibusquiza *et al.*, 2012; Lourenço *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2009; Van der Veen y Abee, 2011) han observado que algunas especies bacterianas, como *L. monocytogenes*, muestran mayor resistencia al daño físico y químico, incluido el infringido por los antimicrobianos, en biopelículas mixtas que en biopelículas de una sola especie. La resistencia incrementada, observada en las biopelículas de múltiples especies, de las bacterias ubicadas en la parte inferior de la estructura de la biopelícula está relacionada con la difusión limitada de componentes reactivos en la matriz de la biopelícula tridimensional, con la disminución de la actividad metabólica de las células ubicadas en las capas inferiores, o con ambas circunstancias (Kumar y Anand, 1998). Además, a medida que

evoluciona la biopelícula, las células situadas en los niveles superiores se dispersan, mientras que las células de las capas inferiores permanecen protegidas y prácticamente inalterables (Petrova y Sauer, 2016; Puga *et al.*, 2016). Esta estructura de dos capas puede explicar, al menos en parte, la considerable persistencia de *L. monocytogenes* en los entornos de procesado de alimentos.

Conclusiones

Este trabajo de investigación aporta información adicional sobre las biopelículas formadas por bacterias patógenas transmitidas por los alimentos. Se demostró que las cuatro bacterias investigadas eran capaces de formar biopelículas sobre poliestireno a 10 °C, aunque *S. Agona* presentaba la mayor capacidad para formar estas estructuras, tanto en biofilms monoespecie como mixtos (formados por dos especies). El biovolumen de *S. Agona* fue mayor en biofilms mixtos que en biofilms monoespecie. En los biofilms mixtos se observó un modelo espacial de doble capa, con las bacterias Gram-positivas en el fondo del biofilm, en un entorno con poco oxígeno, lo que probablemente da como resultado una baja actividad metabólica. Con mayor acceso al oxígeno, las células de *S. enterica* situadas la capa superior del biofilm podrían mantener un nivel más alto de actividad metabólica. Las interacciones microbianas entre *S. enterica* y bacterias Gram-positivas son responsables de crear la estructura de doble capa descrita para los biofilms mixtos. Son necesarios más estudios para dilucidar las causas de la formación de esta doble capa.

El patrón de distribución en dos capas observado puede orientar el desarrollo de procedimientos de limpieza de superficies más efectivos en la Industria Alimentaria, donde se deben redoblar los esfuerzos para eliminar las bacterias ubicadas en los estratos inferiores del biofilm, más resistentes a los antimicrobianos. Además, los resultados de esta investigación deben tenerse en cuenta en estudios adicionales destinados a comprender la persistencia de *L. monocytogenes* en las instalaciones de procesado de alimentos.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, C., Azevedo, N. F., Santos, S., Keevil, C. W., Vieira, M. J. (2011). Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH). *PLoS ONE* **6**(3): e14786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014786>
- Alonso-Calleja, C., Gómez-Fernández, S., Carballo, J., Capita, R. (2019). Prevalence, molecular typing and determination of the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes* serotypes in poultry meat and poultry preparations in Spain. *Microorganisms* **7**(11): 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110529>
- Alonso-Calleja, C., Guerrero-Ramos, E., Alonso-Hernando, A., Capita R. (2015). Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control* **56**: 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.012>
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., Briandet, R. (2010). The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiological Methods* **82**(1): 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.04.006>
- Buchrieser, C., Rusniok, Ch., The *Listeria* Consortium, Kunst, F., Cossart, P., Glaser, P. (2003). Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **35**(3): 207-213. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00448-0](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00448-0)
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**: 294-301 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.003>
- Capita, R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Alonso-Calleja, C. (2019a). Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports* **9**: 15905 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51907-1>
- Capita, R., Fernández-Pérez, S., Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C. (2019b). Effect of sodium hypochlorite and benzalkonium chloride on the structural parameters of the biofilms formed by ten *Salmonella enterica* serotypes. *Pathogens* **8**(3): <https://doi.org/10.3390/pathogens8030154>
- Capita, R., Buzón-Durán, L., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2017). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* **14**(6): 350-356 <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2241>

- Capita, R., Felices-Mercado, A., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. (2019c). Characterization of *Listeria monocytogenes* originating from the Spanish meat-processing chain. *Foods* **8**(11): 542. <https://doi.org/10.3390/foods8110542>
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(4): 1268–1280. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>
- CDC (2020a). Centers for disease control and prevention. *Salmonella*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html> (Fecha de último acceso: 4 de mayo de 2021).
- CDC (2020b). Centers for disease control and prevention. *Listeria*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/index.html> (Fecha de último acceso: 4 de mayo de 2021).
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. N., Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(2): 728–737. <https://doi.org/10.1128/aem.68.2.728-737.2002>
- Chen, D., Zhao, T., Doyle, M. P. (2015). Single- and mixed-species biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*, and their sensitivity to levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate. *Food Control* **57**: 48-53 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.006>
- Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology* **31**: 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.012>
- EFSA y ECDC (2010). Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* **8**(1): 1496. 368 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
- EFSA y ECDC (2019). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal* **17**(2): 5598, 278 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5598>
- EFSA (2009). Assessment of the Public Health significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *EFSA Journal* **7**(3): 993, 73 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.993>
- Elias S., Banin E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews* **36**(5): 990-1004 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x>

- European Commission. (2019). The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), 2018 Annual Report. European Union, Luxembourg. Available online. <https://op.europa.eu/o/opportal-service/download-handler?identifier=c3318331-d9c4-11e9-9c4e-01aa75ed71a1&format=pdf&language=en&productionSystem=cellar&part=>
- Fatemi, P., Frank J. F. (1999). Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *Journal of Food Protection* **62**(7): 761-765. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.7.761>
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., Nychas G.-J. (2013). Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. *PLoS ONE* **8**(10): e77276 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077276>
- Gkana, E. N., Giaouris, E. D., Doulgeraki, A. I., Katharinos, S., Nychas, G.-J. E. (2017). Biofilm formation by *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* on stainless steel under either mono- or dual-species multi-strain conditions and resistance of sessile communities to sub-lethal chemical disinfection. *Food Control* **73**(B): 838-846 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.038>
- González-Machado, C., Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2018). Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella* Agona biofilms at different stages of development. *PLoS ONE* **13**(7): e0200011 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200011>
- Govaert, M., Smet, C., Walsh, J. L., Impe, J. F. M. V. (2019). Dual-species model biofilm consisting of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium: development and inactivation with cold atmospheric plasma (CAP). *Frontiers in Microbiology* **10**: 2524 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02524>
- Guerrero-Ramos, E., Cordero, J., Molina-González, D., Poeta, P., Igrejas, G., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2016a). Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain. *Food Microbiology* **53**(B): 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.007>
- Guerrero-Ramos, E., Molina-González, D., Blanco-Morán, S., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2016b). Prevalence, antimicrobial resistance, and genotypic characterization of vancomycin-resistant enterococci in meat preparations. *Journal of Food Protection* **79**(5): 748-756. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-390>
- Habimana, O., Guillier, L., Kulakauskas, S., Briandet, R. (2011). Spatial competition with *Lactococcus lactis* in mixed-species continuous-flow biofilms inhibits *Listeria monocytogenes* growth. *Biofouling - The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* **27**(9): 1065-1072. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.626124>

- Hansen, L. B. S., Ren, D., Burmølle, M., Sørensen, S. J. (2017). Distinct gene expression profile of *Xanthomonas retroflexus* engaged in synergistic multispecies biofilm formation. *The ISME Journal* **11**: 300-303. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.107>
- Ibusquiza, P. S., Herrera, J. J., Vázquez-Sánchez, D., Cabo, M. L. (2012). Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed species biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*. *Food Control* **25**(1): 202-210. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.002>
- Iñiguez-Moreno, M., Gutiérrez-Lomelí, M., Guerrero-Medina, P. J., Avila-Novoa M. G. (2018). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. *Brazilian Journal of Microbiology* **49**(2): 310-319. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.002>
- Jahid, I. K., Ha S. D. (2014). The paradox of mixed species biofilms in the context of food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**(5): 990-1011 <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12087>
- Kabir, I. J., Han, N., Zhang, C., Ha, S. (2015). Mixed culture biofilms of *Salmonella* Typhimurium and cultivable indigenous microorganisms on lettuce show enhanced resistance of their sessile cells to cold oxygen plasma. *Food Microbiology* **46**: 383-394. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.003>
- Kabir, I. J., Han, N., Srey, S., Ha, S. (2014). Competitive interactions inside mixed-culture biofilms of *Salmonella* Typhimurium and cultivable indigenous microorganisms on lettuce enhance microbial resistance of their sessile cells to ultraviolet C (UV-C) irradiation. *Food Research International* **55**: 445-454. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.042>
- Knowles, J. R., Roller, S., Murray, D. B., Naidu, A. S. (2005). Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(2): 797-803. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.797-803.2005>
- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R. L., Struelens, M. Tacconelli, J. E., Navarro Torné, A., Witte, W., Friedrich, A. W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveillance* **15**(41): pii=19688. <https://doi.org/10.2807/ese.15.41.19688-en>
- Kumar, C. G., Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* **42**(1-2): 9-27. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00060-9)

- Liu, W. Z., Russel, J., Burmolle, M., Sorensen, S. J., Madsen, J. S. (2018). Microscale intermixing: a requisite for stable and synergistic co-establishment in a four-species biofilm. *The ISME Journal* **12**: 1940-1951. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0112-2>
- Loureço, A., Machado, H., Brito L. (2011). Biofilms of *Listeria monocytogenes* produced at 12 °C either in pure culture or in co-culture with *Pseudomonas aeruginosa* showed reduced susceptibility to sanitizers. *Journal of Food Science* **76**(2): M143-M148. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02011.x>
- Makovcova, J., Babak, V., Kulich, P., Masek, J., Slany, M., Cincarova, L. (2017). Dynamics of mono- and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria. *Microbial Biotechnology* **10**(4): 819-832. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12705>
- Møller, F. T., Mølbak, K., Ethelberg, S. (2018). Analysis of consumer food purchase data used for outbreak investigations, a review. *Euro Surveillance* **23**(24): pii=1700503. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.24.1700503>
- Morris, B. E. L., Henneberger, R., Huber, H., Moissl-Eichinger, C. (2013). Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiology Reviews* **37**(3): 384-406. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12019>
- Otter, J. A., French, G. L. (2010). Molecular epidemiology of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet Infectious Diseases* **10**(4): 227-239. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70053-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70053-0)
- Petrova, O. E., Sauer, K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersión. *Current Opinion in Microbiology* **30**: 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.004>
- Phalak, P., Chen, J., Carlson, R. P., Henson, M. A. (2016). Metabolic modelling of a chronic wound biofilm consortium predicts spatial partitioning of bacterial species. *BMC Systems Biology* **10**(90): <https://doi.org/10.1186/s12918-016-0334-8>
- Piercey, M. J., Hingston, P. A., Hansen, L. T. (2016). Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15 °C. *International Journal of Food Microbiology* **223**: 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.009>
- Puga, C. H., Rodríguez-López, P., Cabo, M. L., SanJose, C., Orgaz, B. (2018). Enzymatic dispersal of dual-species biofilms carrying *Listeria monocytogenes* and other associated food industry bacteria. *Food Control* **94**: 222-228. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.017>

- Puga, C. H., SanJose, C., Orgaz B. (2014). Spatial distribution of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* in mixed biofilms. In: E.C. Hambrick (ed.), *Listeria monocytogenes, Food Sources, Prevalence and Management Strategies*, Nova Publishers, New York, pp. 115-131. Disponible en: https://novapublishers.com/wp-content/uploads/2019/05/978-1-63117-054-6_ch6.pdf (Fecha de último acceso: 26 de diciembre de 2021).
- Puga, C. H., SanJose, C., Orgaz, B. (2016). Biofilm development at low temperatures enhances *Listeria monocytogenes* resistance to chitosan. *Food Control* **65**: 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.012>
- Rodríguez-Campos, D., Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019). Persistent *Listeria monocytogenes* isolates from a poultry-processing facility form more biofilm but do not have a greater resistance to disinfectants than sporadic strains. *Pathogens* **8**(4): 250. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040250>
- Rodríguez-Lázaro, D., Alonso-Calleja, C., Oniciuc, E. A., Capita, R., Gallego, D., González-Machado, C., Wagner, M., Barbu, V., Eiros-Bousa, J. M., Nicolau, A. I., Hernández, M. (2018). Characterization of biofilms formed by foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology* **9**: 3004 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03004>
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019a). Architecture and viability of the biofilms formed by nine *Listeria* spp. strains on different hydrophobic and hydrophilic surface materials. *Applied Sciences* **9**(23): 5256. <https://doi.org/10.3390/app9235256>
- Rodríguez-Melcón, C., Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2018a). Effects of bacteriophage P100 at different concentrations on the structural parameters of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Food Protection* **81**(12): 2040-2044. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-177>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., Carballo, J., García-Fernández, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2018b). Structure and viability of 24- and 72-hour-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology* **76**: 513-517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2019b). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology* **82**: 533-540. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020>
- Rothrock, M., Micciche, A. C., Bodie, A. R., Ricke, S. C. (2019). *Listeria* occurrence and potential control strategies in alternative and conventional poultry processing and retail. *Frontiers in Sustainable Food Systems* **3**: 33. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00033>

- Scher, K., Romling, U., Yaron, S. (2005). Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(3): 1163-1168. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1163-1168.2005>
- Simões, M., Simões, L. C., Vieira, M. J. (2009). Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Research* **43**(1): 229-237. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.010>
- Sorhaug, T., Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science & Technology* **8**(2): 35-41. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01006-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01006-6)
- Tan, Y., Leonhard, M., Moser, D., Schneider-Stickler, B. (2017). Evaluation of culture conditions for mixed biofilm formation with clinically isolated non-*albicans* *Candida* species and *Staphylococcus epidermidis* on silicone. *Microbial Pathogenesis* **112**: 215-220. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.002>
- Van der Veen, S., Abee, V. T. (2011). Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology* **144**(3): 421-431. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.029>

CAPÍTULO XI

Susceptibilidad de cultivos planctónicos y biopelículas de *Listeria monocytogenes* a hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio

PUBLICACIÓN

Cristina Rodríguez-Melcón, Félix Riesco-Peláez, Camino García-Fernández, Carlos Alonso-Calleja, Rosa Capita (2019). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology* **82**, 533-540. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020>

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Listeria monocytogenes es una bacteria anaerobia facultativa, no formadora de esporas, Gram-positiva y responsable de la listeriosis, una zoonosis cuya principal ruta de transmisión al ser humano es a través del consumo de alimentos contaminados (Ryser y Marth, 2007). En 2017 se notificaron 2.480 casos confirmados de listeriosis humana invasiva en la Unión Europea (0,48 casos por cada 100.000 personas). La tasa de letalidad fue del 13,8% (225 muertes entre los 1.633 casos confirmados con desenlace conocido), el valor más alto de todas las enfermedades transmitidas por los alimentos (EFSA y ECDC, 2018). Cada año tienen lugar en los Estados Unidos aproximadamente 1.600 infecciones y 260 muertes por listeriosis, con una tasa de incidencia de 0,26 por 100.000 individuos en 2014 (Gurtler *et al.*, 2017). Los ancianos, las mujeres embarazadas, los recién nacidos y los adultos inmunocomprometidos son los más afectados por esta enfermedad, tanto por lo que respecta a frecuencia como a gravedad, aunque las personas sin estos factores de riesgo también pueden infectarse. Algunas afecciones clínicas comunes son la septicemia, la meningitis, la encefalitis, el aborto espontáneo y la muerte fetal (Capita *et al.*, 2001).

L. monocytogenes es una bacteria ubicua, que puede crecer en diferentes condiciones ambientales adversas, incluyendo las bajas temperaturas (de 0,4°C a 4°C), valores de pH (4,0 - 9,6), alto contenido de sal (10% - 20%) y bajos niveles de oxígeno, y constituye una preocupación importante para la Industria Alimentaria (Sadekuzzaman *et al.*, 2017). *L. monocytogenes* es capaz de adherirse y formar biopelículas en la mayoría de las superficies que se encuentran en las instalaciones de procesamiento de alimentos, como el poliestireno, el vidrio o el acero inoxidable (Di Bonaventura *et al.*, 2008). Las biopelículas son comunidades microbianas estructuradas e incrustadas en una matriz autoproducida de sustancias poliméricas extracelulares hidratadas (EPS), que pueden adherirse a una superficie inerte o un tejido vivo (González-Machado *et al.*, 2018). La capacidad de formar biopelículas es un factor clave en la persistencia de *L. monocytogenes* en los entornos alimentarios durante largos períodos, y estas estructuras representan una fuente potencial de contaminación de los productos alimenticios, lo que genera problemas críticos en términos de Salud Pública e impacto económico (Pilchová *et al.*, 2014). En general, las células bacterianas sésiles (que se encuentran formando parte de las biopelículas) muestran una mayor resistencia a los desafíos ambientales, como la desecación, la luz ultravioleta o los desinfectantes, que sus homólogos planctónicos de vida libre (Capita *et al.*, 2014). En consecuencia, el control de las biopelículas es difícil.

Los desinfectantes a base de cloro, como el hipoclorito de sodio, son compuestos oxidantes ampliamente utilizados en la Industria Alimentaria debido a sus actividades bactericidas de amplio espectro, alta eficacia y bajo coste (Waghmare y Annapure, 2015). Los

compuestos de amonio cuaternario (QAC), como el cloruro de benzalconio, son tensioactivos catiónicos que actúan a través de la disrupción de las bicapas de la membrana lipídica, siendo efectivos frente a diferentes microorganismos, especialmente bacterias Gram-positivas (Ortiz *et al.*, 2014). Como ha sido sugerido con anterioridad (Capita *et al.*, 2014), en ocasiones los desinfectantes se usan en las industrias de procesado de alimentos por debajo de las concentraciones inhibitorias (por ejemplo, por no aplicar una dosis adecuada de desinfectante, por realizar una limpieza insuficiente antes de la desinfección o por un almacenamiento inapropiado de biocidas, que provoca su pérdida de efectividad). Es de vital importancia comprender la respuesta de *L. monocytogenes* a las condiciones que pueden darse en el entorno de procesado de alimentos, ya que ello podría ayudar en el desarrollo de estrategias efectivas de desinfección. Sin embargo, son inexistentes las investigaciones que han evaluado cuantitativamente el efecto de concentraciones subinhibitorias de HS y CB en los parámetros estructurales (por ejemplo, biovolumen, porcentaje de superficie cubierta, altura máxima o rugosidad) y la viabilidad celular de las biopelículas de *L. monocytogenes*.

En este contexto se ha planteado el presente estudio, cuyo objetivo ha sido utilizar la microscopía láser confocal de barrido (CLSM), y posterior análisis de imagen, para evaluar el efecto de varias concentraciones (0,5MIC, 1MIC y 1,5 MIC) de dos biocidas comúnmente utilizados en la industria alimentaria (hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio) sobre los parámetros estructurales y la viabilidad celular de las biopelículas formadas en poliestireno por cuatro cepas de *L. monocytogenes*. Además, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) y las concentraciones mínimas bactericidas (MBC) de dichos biocidas para cultivos planctónicos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas de *L. monocytogenes* y condiciones de cultivo

Se utilizaron cuatro cepas aisladas de *L. monocytogenes* (serotipo 1/2a) procedentes de carne de cerdo (LM2, LM6, LM7 y LM12). Las cepas se mantuvieron a -80 °C en caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) suplementado con 20% (v/v) de glicerol. Antes de los experimentos, las células congeladas se subcultivaron dos veces en TSB a 37 °C. Los cultivos de trabajo se mantuvieron a 4 °C ± 1 °C en placas de agar triptona de soja (TSA, Oxoid) y se subcultivaron mensualmente.

2.2. Biocidas

Se ensayaron dos compuestos: hipoclorito de sodio (10% de cloro activo; HS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y cloruro de benzalconio (CB, Fluka, Deisenhofen, Alemania). Las soluciones de los productos químicos se prepararon asépticamente en agua destilada estéril inmediatamente antes de comenzar los experimentos. Se usaron biocidas activos puros para obtener una mejor estimación de la susceptibilidad de *L. monocytogenes* a dichos compuestos, en lugar de probar desinfectantes comerciales que incluyen múltiples sustancias.

2.3. Determinación de MIC y MBC

Se determinó la susceptibilidad de células de *L. monocytogenes* tanto planctónicas como sésiles para mejorar el conocimiento sobre el comportamiento de este microorganismo (tanto de las células de vida libre como de las que forman parte de los biofilms) en presencia de desinfectantes de amplio uso en la Industria Alimentaria. Los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para las células planctónicas de *L. monocytogenes* se establecieron utilizando un método de microdilución en caldo de acuerdo con las directrices de CLSI (2013).

Para el experimento, se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Se tomaron cinco colonias de cada cepa, previamente cultivadas en placas de TSA, y se inocularon en tubos con 10 ml de TSB (Oxoid), que se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Experimentos previos habían demostrado que después de este tiempo de incubación, tales cultivos bacterianos contienen aproximadamente 5×10^8 ufc/ml. Se realizaron tres diluciones decimales en TSB. Los pocillos se llenaron con 20 µl de la solución química (se usó un rango de concentraciones para cada biocida, de 250

ppm a 5.000 ppm, a intervalos de 250 ppm, para HS, y de 1 ppm a 20 ppm, a intervalos de 1 ppm, para CB) y 180 μ l de la tercera dilución de este cultivo bacteriano, para obtener una concentración final en el pocillo de aproximadamente 5×10^5 ufc/ml. La concentración de inóculo se confirmó mediante siembra en placa. Las placas de microtítulo se incubaron a 37 °C en el sistema automatizado basado en turbidimetría Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd.). Se incluyeron controles positivos (200 μ l de inóculo a 5×10^5 ufc/ml) en cada experimento, así como controles negativos (180 μ l de TSB y 20 μ l de solución del desinfectante). Se realizaron cinco repeticiones de los experimentos en días no consecutivos. La MIC se estableció como la concentración de biocida mínima necesaria para impedir el crecimiento después de 48 h de incubación (Capita *et al.*, 2014), siendo el crecimiento de la cepa determinado midiendo las densidades ópticas (DO) a 580 nm.

Para los cálculos de las concentraciones mínimas bactericidas (MBC), se tomaron 100 μ l de los pocillos sin crecimiento observable y se depositaron por siembra en la superficie de placas de TSA, que se incubaron a 37 °C durante 72 h. La MBC se estableció como la concentración de biocida más baja necesaria para prevenir el crecimiento en TSA, es decir, para reducir al menos 10.000 veces la concentración de *L. monocytogenes* en el pocillo (de 10^5 ufc/ml a menos de 10 ufc/ml). Para el cálculo de la MIC y la MBC, se realizaron cinco experimentos independientes para cada cepa y compuesto químico en diferentes días.

2.4. Formación de biofilms

Se realizó un análisis de la estructura de las biopelículas utilizando el método descrito previamente por Capita *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Brevemente, los cultivos se incubaron a 37 °C durante 18 h, y se realizaron dos diluciones decimales en TSB para obtener una concentración final de aproximadamente 10^6 ufc/ml. Se añadió un volumen de 250 μ l a los pocillos de las placas de fondo óptico Nunc™ MicroWell™ 96-Well Optical-Bottom Plates with Polymer Base (Thermo Fisher Scientific, New Hampshire, EE.UU.), con alta calidad óptica, fondo de baja fluorescencia y plano, lo que permitió la obtención de imágenes de alta resolución. Después de una hora de adhesión a 37 °C, los pocillos se enjuagaron con NaCl 150 mM para eliminar cualquier bacteria no adherida, antes de rellenarse con 250 μ l de TSB, y se incubaron durante 24 h a 37 °C.

2.5. Tratamiento de biopelículas

Los pocillos se enjuagaron con 150 mM de NaCl y se rellenaron con TSB (control) o con TSB que contenía HS o CB a diferentes concentraciones (se usaron 0,5MIC, 1MIC y 1,5MIC).

Después de 10 minutos de exposición a temperatura ambiente, los pocillos se enjuagaron con 150 mM de NaCl.

2.6. Análisis de imagen

Para diferenciar entre bacterias vivas y muertas, se utilizaron dos colorantes fluorescentes, SYTO9 y yoduro de propidio (YP). El YP (fluorescencia roja) penetra solo en las células que tienen membranas dañadas. Por el contrario, el colorante con fluorescencia verde SYTO9 ingresa tanto en las células bacterianas vivas como en las muertas. La señal fluorescente del SYTO9 se potencia mucho cuando se une al ácido nucleico y muestra una señal de fluorescencia intrínseca baja cuando no se une. Cuando ambos colorantes están presentes, el YP exhibe una afinidad más fuerte por los ácidos nucleicos que SYTO9 y, por lo tanto, el SYTO9 es desplazado por el YP. Por ello, las células viables que tienen una membrana intacta emiten una fluorescencia verde, mientras que las bacterias muertas que tienen una membrana dañada emiten una fluorescencia roja (Buzón-Durán *et al.*, 2017).

Se añadió a 1.000 μ l de TSB un volumen de 2 μ l de una mezcla 1: 1 de SYTO9 (stock 3,34 mM en DMSO) y yoduro de propidio (YP; stock 20 mM en DMSO) del kit de viabilidad BacLight (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.), y se agregaron 250 μ l de esta solución a cada pocillo. La placa se incubó en la oscuridad a 37 °C durante 20 minutos para permitir el marcado fluorescente de las bacterias.

La adquisición de imágenes se realizó utilizando un microscopio láser confocal de barrido Nikon Eclipse TE 2000-U con el software EZ-C13.60 (Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE.UU.). Las biopelículas se observaron con una lente de 40 aumentos (40x). Se detectó fluorescencia por excitación a 488 nm (láser de argón), y las emisiones se recogieron con un filtro de paso de banda 590/50 (SYTO9) o 650LP (YP).

Para cada biopelícula se adquirieron tres pilas de imágenes, en tres áreas diferentes del pocillo, de 119 μ m \times 119 μ m en el plano horizontal (correspondientes a 512 \times 512 píxeles) con una distancia de 1 μ m en el eje z. Se realizaron tres experimentos independientes, en días diferentes, para cada cepa y tratamiento químico. Por lo tanto, se obtuvieron un total de 252 imágenes: 4 cepas \times 7 tratamientos (2 productos químicos \times 3 concentraciones + control) \times 3 réplicas \times 3 experimentos. Para el análisis de las imágenes se reconstruyeron proyecciones tridimensionales de la estructura de las biopelículas utilizando la función Easy3D del paquete de software IMARIS 9.0 (Bitplane, Zurich, Suiza).

Los parámetros estructurales cuantitativos de las biopelículas se calcularon utilizando el software BioRCA 1.4, desarrollado por algunos miembros de nuestro Grupo de Investigación (SEGURALI) utilizando el Entorno de Desarrollo Integrado Lazarus (IDE) (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2017). En base a los valores umbral, cada píxel se etiqueta como vacío,

verde (vivo) o rojo (muerto). Con esta información, se genera un modelo tridimensional de la biopelícula en estudio y se calculan los parámetros estructurales. Este programa informático permitió la cuantificación de la población total de la biopelícula (que comprende bacterias vivas y muertas) y de las subpoblaciones independientes representadas por fluorescencia verde emitida por SYTO9 (de células con membranas intactas) y fluorescencia roja emitida por YP (de bacterias con membranas dañadas). El biovolumen representa el volumen total de células (μm^3) en el campo de observación ($14.161 \mu\text{m}^2$) y proporciona una estimación de la biomasa en la biopelícula. El porcentaje de superficie cubierta (%) refleja la eficiencia de la colonización del sustrato por las poblaciones de bacterias. La rugosidad proporciona una medida de cuánto varía el grosor de la biopelícula y, por lo tanto, es un indicador de la heterogeneidad de la biopelícula (Murga *et al.*, 1995). Una rugosidad con un valor de cero indica una biopelícula de espesor uniforme, y un valor cercano a 1 describe una biopelícula irregular. La altura máxima (μm) de las biopelículas se determinó directamente a partir del número de imágenes en el eje z obtenidas por microscopía.

2.7. Análisis estadístico

Los parámetros estructurales cuantitativos de las biopelículas se compararon para el análisis estadístico utilizando técnicas de análisis de varianza de una vía (ANOVA). La separación de medias se obtuvo usando la prueba de rango múltiple de Duncan, y se establecieron diferencias significativas para un nivel de probabilidad del 5% ($P < 0,05$). Los datos se procesaron utilizando el paquete de software Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Susceptibilidad de los cultivos planctónicos a HS y CB

La Tabla XI.1 muestra los valores de MIC y MBC del HS y el CB obtenidos para *L. monocytogenes*. La respuesta de las cepas a HS, expresada en valores MIC o MBC, fue menos variable que a CB. Para el HS, los valores de la MIC fueron de 3.500 ppm para todos los aislamientos. Los datos obtenidos para el HS no se correlacionaron con los observados para el CB. Este último mostró un rango de eficacia antimicrobiana, con valores de MIC que oscilaron entre 3 ppm (LM2) y 13 ppm (LM6). Por lo que respecta a la MBC, en el caso del HS los valores oscilaron entre 3.500 ppm (LM6 y LM7) y 4.500 ppm (LM2 y LM12), y los valores de MBC para el CB entre 3 ppm (LM2) y 14 ppm (LM6). Los valores de MBC fueron mayores o iguales que los valores de MIC para todas las cepas.

Tabla XI.1. Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC, ppm) y concentración mínima bactericida (MBC, ppm) de hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio para cuatro cepas de *L. monocytogenes*.

Parámetro	Cepa			
	LM2	LM6	LM7	LM12
MIC _{HS}	3.500	3.500	3.500	3.500
MBC _{HS}	4.500	3.500	3.500	4.500
MIC _{CB}	3	13	10	9
MBC _{CB}	3	14	12	9

Se realizaron 5 repeticiones para cada condición; LM, *Listeria monocytogenes*; MIC_{HS}, concentración mínima inhibitoria de hipoclorito sódico; MBC_{HS}, concentración mínima bactericida de hipoclorito sódico; MIC_{CB}, concentración mínima bactericida de cloruro de benzalconio; MBC_{CB}, concentración mínima bactericida de cloruro de benzalconio.

3.2. Capacidad de *L. monocytogenes* para formar biopelículas

Las biopelículas se ensayaron en placas de microtítulo con fondo de poliestireno plano para facilitar la obtención de imágenes por microscopía. En la Figura XI.1 se muestran las estructuras representativas de las biopelículas de 24 horas observadas usando CLSM para las cuatro cepas en estudio. Todos los aislamientos formaron biopelículas rugosas de

biovolumen moderado que cubrieron la mayor parte de la superficie disponible después de 24 h de incubación.

Los parámetros estructurales (biovolumen, porcentaje de superficie cubierta, altura máxima y rugosidad) se obtuvieron a partir de la batería de imágenes adquiridas por microscopía confocal, y permitieron cuantificar las biopelículas con datos numéricos que posibilitan la realización de análisis estadístico. Los resultados obtenidos revelaron una marcada variabilidad en la estructura de las biopelículas entre las cuatro cepas. En el caso de las biopelículas no tratadas, los datos oscilaron entre $103.928,3 \pm 6.730,2 \mu\text{m}^3$ (LM12) y $276.030,9 \pm 42.291,9 \mu\text{m}^3$ (LM2) en el campo de observación ($14.161 \mu\text{m}^2$) para biovolumen, entre $93,95 \pm 6,48\%$ (LM7) y $99,99 \pm 0,01\%$ (LM2 y LM6) para porcentaje de superficie cubierta, de $16,10 \pm 0,24 \mu\text{m}$ (LM12) a $31,23 \pm 2,07 \mu\text{m}$ (LM2) para altura máxima, y de $0,1039 \pm 0,0009$ (LM6) a $0,3267 \pm 0,1453$ (LM7) para rugosidad, respectivamente (Tablas XI.2-XI.5). Aunque todas las cepas colonizaron eficientemente el poliestireno, mostrando diferencias mínimas en la cobertura de la superficie, las biopelículas formadas por las cepas LM2 y LM6 mostraron el mayor biovolumen, principalmente debido a su mayor altura máxima.

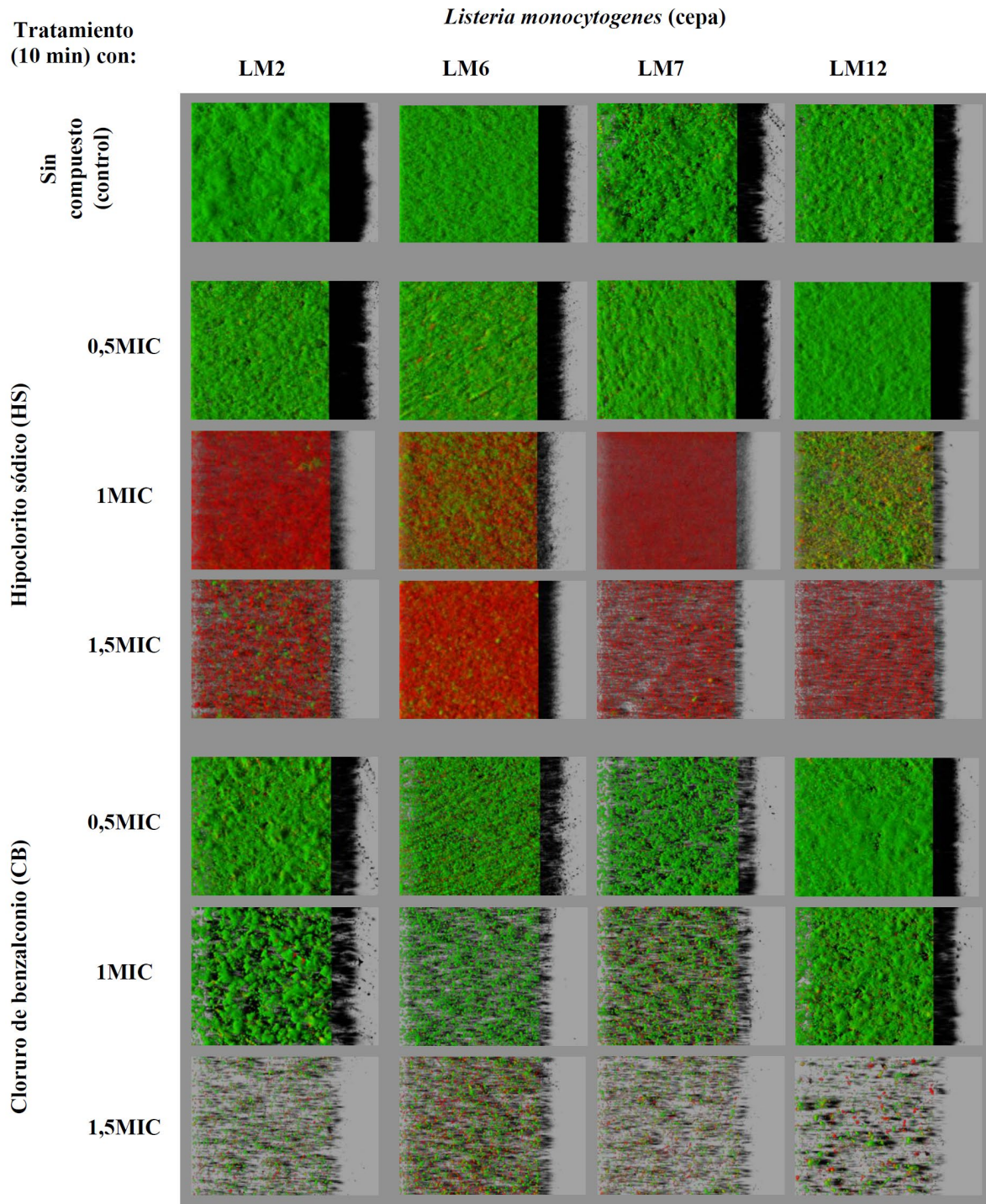


Figura XI.1. Proyecciones tridimensionales de las estructuras de las biopelículas formadas por cuatro aislamientos de *L. monocytogenes* después del tratamiento durante 10 minutos con hipoclorito de sodio (HS) o cloruro de benzalconio (CB) a diferentes concentraciones. Las imágenes (119 μm \times 119 μm), obtenidas por microscopía láser confocal de barrido, se reconstruyeron utilizando el software IMARIS, con las proyecciones de sombra a la derecha.

Tabla XI.2. Valores de biovolumen (μm^3) en el campo de observación ($14.161 \mu\text{m}^2$) obtenidos para las biopelículas de cuatro cepas de *L. monocytogenes* después de la exposición durante 10 minutos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio o cloruro de benzalconio.

Tratamiento (10 min) con:	<i>Listeria monocytogenes</i> (cepa)				
	LM2	LM6	LM7	LM12	
Sin compuesto (control)	276.030,9±42.291,9 ^a	224.684,4±5.190,3 ^b	129.028,1±58.348,9 ^c	103.928,3±6.730,2 ^c	
Hipoclorito sódico (HS)	0,5MIC	145.730,2±26.417,0 ^b	153.628,0±4.225,1 ^b	147.023,4±31.614,0 ^a	219.509,8±16.390,8 ^b
	1MIC	89.065,8±40.853,6 ^{bc}	108.928,9±35.742,9 ^{cd}	21.033,7±10.098,9 ^b	54.484,6±20.416,3 ^{bc}
	1,5MIC	27.402,2±2.738,7 ^c	122.920,3±12.910,1 ^b	19.223,3±589,1 ^a	26.459,5±2.595,5 ^{cd}
Cloruro de benzalconio (CB)	0,5MIC	50.763,4±44.097,4 ^c	86.593,4±16.910,5 ^d	52.501,0±46.237,4 ^b	74.377,8±55.580,6 ^{ac}
	1MIC	66.737,8±32.950,7 ^c	26.241,1±5.639,9 ^e	22.952,5±11.663,4 ^b	69.368,7±19.632,0 ^{ac}
	1,5MIC	34.227,8±34.442,5 ^c	14.538,2±6.411,5 ^e	20.745,8±24.752,4 ^a	10.495,6±1.028,1 ^d

Los datos son la media \pm DE de 9 determinaciones. MIC, concentración mínima inhibitoria. Los valores medios en la misma fila que no comparten ninguna letra (superíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Los valores medios en la misma columna que no comparten ninguna letra (subíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabla XI.3. Valores de porcentaje de superficie cubierta (%) en el campo de observación ($14.161 \mu\text{m}^2$) obtenidos para las biopelículas de cuatro cepas de *L. monocytogenes* después de la exposición durante 10 minutos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio o cloruro de benzalconio.

Tratamiento (10 min) con:	<i>Listeria monocytogenes</i> (cepa)				
	LM2	LM6	LM7	LM12	
Sin compuesto (control)	99,99±0,01 ^a	99,99±0,01 ^a	93,95±6,48 ^{ab}	97,99±0,37 ^a	
Hipoclorito sódico (HS)	0,5MIC	99,43±0,87 ^a	99,97±0,01 ^a	99,61±0,58 ^a	99,99±0,00 ^a
	1MIC	95,94±5,44 ^{ab}	99,72±0,32 ^a	55,62±10,12 ^{cd}	82,86±9,17 ^b
	1,5MIC	76,53±2,38 ^{ab}	99,97±0,04 ^b	72,86±0,79 ^{ac}	59,90±3,77 ^c
Cloruro de benzalconio (CB)	0,5MIC	62,18±30,30 ^{bc}	94,53±3,71 ^a	63,44±33,29 ^{bcd}	76,45±19,92 ^b
	1MIC	83,21±9,34 ^{ac}	50,36±6,05 ^b	41,31±17,14 ^{cd}	80,05±12,13 ^a
	1,5MIC	50,17±39,65 ^b	31,33±9,96 ^c	37,00±36,46 ^d	21,21±3,29 ^d

Los datos son la media \pm DE de 9 determinaciones. MIC, concentración mínima inhibitoria. Los valores medios en la misma fila que no comparten ninguna letra (superíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Los valores medios en la misma columna que no comparten ninguna letra (subíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabla XI.4. Valores de altura máxima (μm) obtenidos para las biopelículas de cuatro cepas de *L. monocytogenes* después de la exposición durante 10 minutos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio o cloruro de benzalconio.

Tratamiento (10 min) con:		<i>Listeria monocytogenes</i> (cepa)			
		LM2	LM6	LM7	LM12
Sin compuesto (control)		31,23 \pm 2,07 ^a	23,76 \pm 0,52 ^b	22,28 \pm 2,71 ^b	16,10 \pm 0,24 ^c
Hipoclorito sódico (HS)	0,5MIC	21,01 \pm 2,00 ^a	21,23 \pm 0,58 ^a	20,17 \pm 2,04 ^a	25,25 \pm 1,52 ^b
	1MIC	17,56 \pm 2,52 ^a	17,35 \pm 1,53 ^a	11,23 \pm 1,15 ^b	15,1 \pm 0,08 ^a
	1,5MIC	15,67 \pm 3,79 ^a	17,62 \pm 1,56 ^a	9,25 \pm 0,57 ^c	12,50 \pm 0,50 ^b
Cloruro de benzalconio (CB)	0,5MIC	18,87 \pm 2,08 ^a	20,24 \pm 5,46 ^a	16,40 \pm 3,93 ^a	16,43 \pm 2,41 ^a
	1MIC	20,57 \pm 6,03 ^a	14,28 \pm 0,56 ^b	14,00 \pm 1,63 ^b	17,53 \pm 0,58 ^a
	1,5MIC	13,50 \pm 2,12 ^a	14,29 \pm 1,55 ^a	12,68 \pm 1,08 ^a	14,57 \pm 0,48 ^a

Los datos son la media \pm DE de 9 determinaciones. Los valores medios en la misma fila que no comparten ninguna letra (superíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Los valores medios en la misma columna que no comparten ninguna letra (subíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Tabla XI.5. Valores de rugosidad obtenidos para las biopelículas de cuatro cepas de *L. monocytogenes* después de la exposición durante 10 minutos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio o cloruro de benzalconio.

Tratamiento (10 min) con:		<i>Listeria monocytogenes</i> (cepa)			
		LM2	LM6	LM7	LM12
Sin compuesto (control)		0,1462 \pm 0,069 ^a	0,1039 \pm 0,0009 ^a	0,3267 \pm 0,1453 ^b	0,2818 \pm 0,0125 ^b
Hipoclorito sódico (HS)	0,5MIC	0,2231 \pm 0,0604 ^a	0,1876 \pm 0,0080 ^a	0,2005 \pm 0,0450 ^a	0,1137 \pm 0,0204 ^b
	1MIC	0,3743 \pm 0,1194 ^a	0,2650 \pm 0,0752 ^a	0,4910 \pm 0,0359 ^b	0,4386 \pm 0,0614 ^b
	1,5MIC	0,5126 \pm 0,0032 ^a	0,2067 \pm 0,0253 ^b	0,4298 \pm 0,0038 ^b	0,4947 \pm 0,0069 ^a
Cloruro de benzalconio (CB)	0,5MIC	0,5095 \pm 0,1411 ^a	0,4702 \pm 0,0539 ^a	0,4712 \pm 0,1399 ^a	0,4295 \pm 0,1823 ^a
	1MIC	0,5403 \pm 0,0355 ^a	0,5433 \pm 0,0057 ^a	0,5823 \pm 0,0743 ^a	0,4198 \pm 0,0577 ^b
	1,5MIC	0,5233 \pm 0,1039 ^a	0,5784 \pm 0,0056 ^a	0,5333 \pm 0,0915 ^a	0,6213 \pm 0,0193 ^a

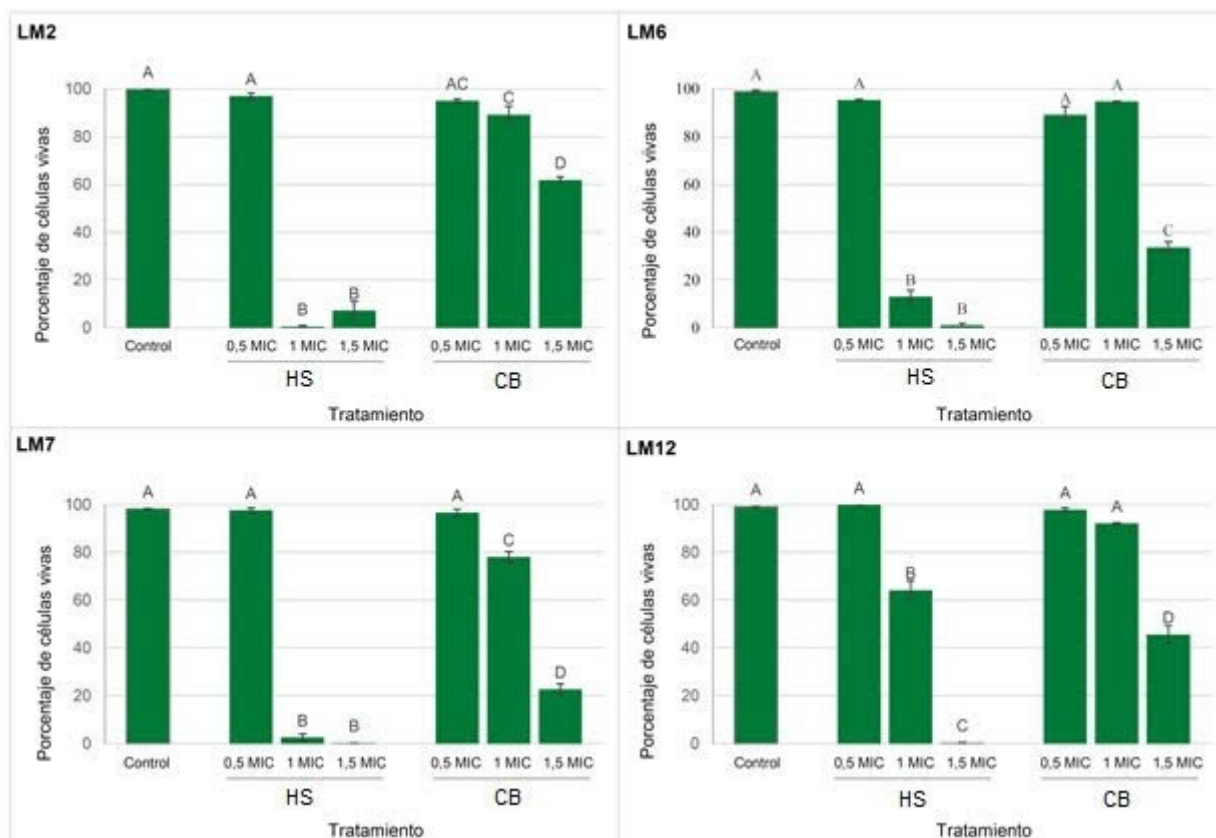
Los datos son la media \pm DE de 9 determinaciones. Los valores medios en la misma fila que no comparten ninguna letra (superíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Los valores medios en la misma columna que no comparten ninguna letra (subíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

3.3. Efecto del hipoclorito sódico y del cloruro de benzalconio sobre los parámetros estructurales y la viabilidad de las biopelículas formadas por *L. monocytogenes*.

En el presente trabajo se analizó el efecto de dos desinfectantes comúnmente utilizados en las instalaciones de procesamiento de alimentos (hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio) sobre las biopelículas formadas por cuatro cepas de *L. monocytogenes* de origen alimentario. Las biopelículas se expusieron durante 10 minutos a diferentes concentraciones (0,5MIC, 1MIC o 1,5MIC) de HS o CB. Se evaluó, mediante microscopía láser confocal de barrido, la arquitectura y la viabilidad de las biopelículas tratadas con los dos desinfectantes. Las imágenes representativas de las biopelículas obtenidas se muestran en la Figura XI.1, y los parámetros estructurales se proporcionan en las Tablas XI.2-XI.5.

Los antimicrobianos aplicados a 0,5MIC redujeron el biovolumen de las biopelículas ($P < 0,05$) en el caso de LM2 y LM6 (HS), y LM2, LM6 y LM7 (CB). Por otro lado, los desinfectantes a 1MIC o 1,5MIC (especialmente CB a 1,5MIC) redujeron sustancialmente el biovolumen, la superficie cubierta y la altura máxima de las biopelículas, al tiempo que incrementaron su rugosidad.

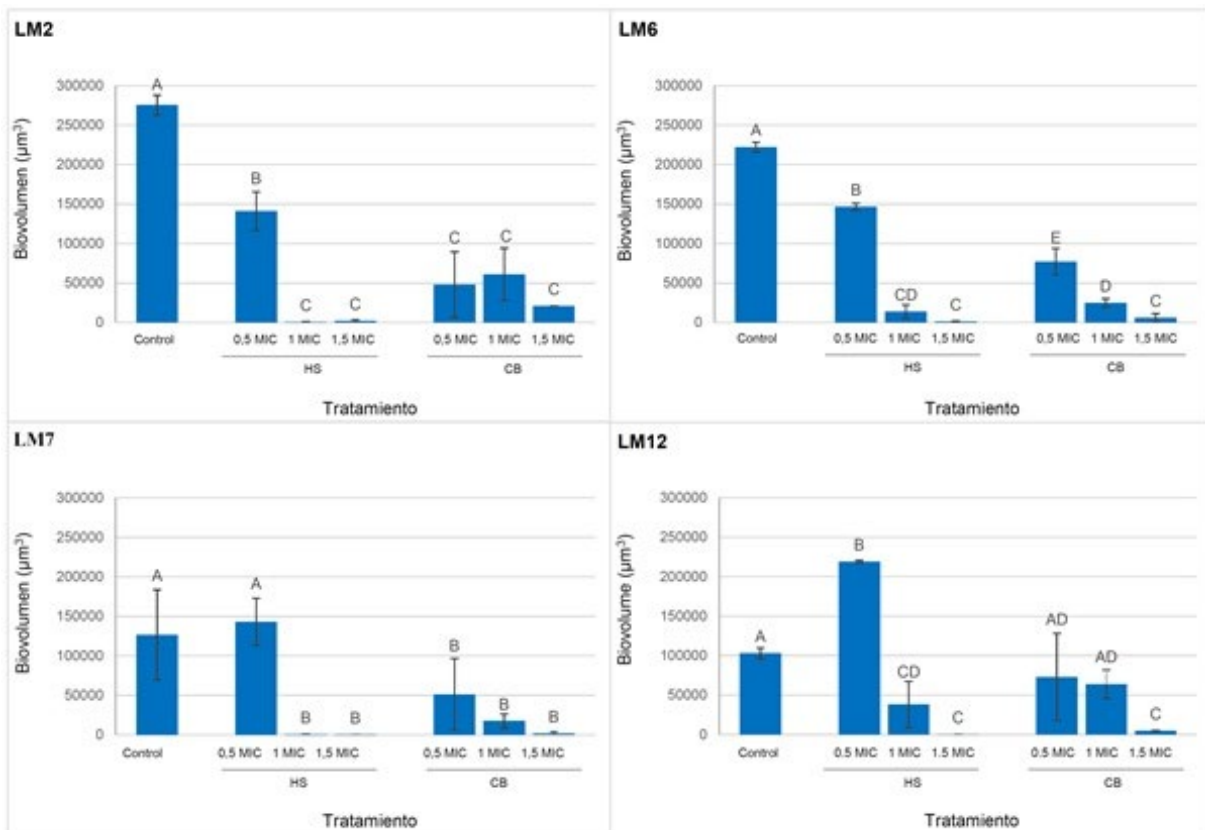
Se observaron dos tipos de células: las células verdes representaban bacterias intactas o viables, mientras que las células rojas representaban bacterias muertas con membranas dañadas. Se observaron estructuras verdes en las biopelículas control (no expuestas a los desinfectantes) (Figura XI.1). A su vez, se observó una matriz de células verdes con algunas rojas en los pocillos expuestos a 0,5MIC de HS. Por el contrario, se observó un mayor número de bacterias rojas en las muestras tratadas con HS a 1MIC o 1,5MIC. El CB solo redujo ligeramente la viabilidad celular en la biopelícula. La Figura XI.2 muestra los porcentajes de células vivas y muertas para cada cepa y tratamiento químico. Las tasas de supervivencia de las células en las biopelículas variaron ampliamente entre las cepas y con el tipo de tratamiento aplicado. El porcentaje de células muertas (teñidas de rojo) en las biopelículas control (no tratadas) varió de $0,21 \pm 0,12\%$ (LM2) a $1,77 \pm 0,20\%$ (LM7). La viabilidad celular de los biofilms apenas se vio afectada por la exposición a HS o CB a baja concentración (0,5MIC). El tratamiento con HS a 1MIC o 1,5MIC tuvo como resultado una muerte celular significativa y de amplio rango (de $35,84 \pm 24,00\%$ para LM12 a $99,00 \pm 0,95\%$ para LM7). La viabilidad de las biopelículas también disminuyó después de la exposición a CB a 1,5MIC (los datos para las células muertas oscilaron entre $38,12 \pm 1,42\%$ para LM2 y $77,32 \pm 22,34\%$ para LM7).



Las barras en el mismo gráfico sin letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Los datos son la media \pm DE de 9 determinaciones. LM, *Listeria monocytogenes*; MIC, concentración mínima inhibitoria. HS, hipoclorito sódico; CB, cloruro de benzalconio.

Figura XI.2. Porcentaje de células vivas en las biopelículas de cuatro cepas de *Listeria monocytogenes* antes del tratamiento (control) o después del tratamiento durante 10 minutos con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (HS) o cloruro de benzalconio (CB).

Debido a que solo las células vivas son potencialmente peligrosas, se cuantificó por microscopía confocal el biovolumen de las células vivas (verdes) en las biopelículas control y tratadas (Figura XI.3). El tratamiento con HS a 0,5MIC no redujo el biovolumen de las células vivas, en relación con los biofilms no tratados, formados por LM7 y LM12. En contraste, los tratamientos restantes (HS a 1MIC o 1,5MIC y CB a 0,5MIC, 1MIC y 1,5MIC) redujeron ($P < 0,05$) el biovolumen de células vivas en las biopelículas formadas por todas las cepas.



Las barras en el mismo gráfico sin letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Los datos son la media \pm DE de 9 determinaciones. LM, *Listeria monocytogenes*; MIC, concentración mínima inhibitoria. HS, hipoclorito sódico; CB, cloruro de benzalconio.

Figura XI.3. Biovolumen de células vivas en las biopelículas de cuatro cepas de *Listeria monocytogenes* antes del tratamiento (control) o después del tratamiento durante 10 minutos con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (HS) o cloruro de benzalconio (CB).

4. DISCUSIÓN

4.1. Susceptibilidad de los cultivos planctónicos a hipoclorito sódico y cloruro de benzalconio

Varios autores han evaluado la resistencia a los biocidas de las cepas de *L. monocytogenes*. Sin embargo, parece que este es el primer trabajo que determina simultáneamente el efecto de dos biocidas utilizados habitualmente en las industrias alimentarias (HS y CB) sobre cultivos planctónicos y las biopelículas de varias cepas de *L. monocytogenes* de origen alimentario.

Los valores de MIC observados para HS fueron similares a los datos encontrados por otros investigadores que ensayaron cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos o de colecciones de cultivos (512 ppm de Gao y Liu, 2014; 2.500 ppm de Lundén *et al.*, 2003). Los valores observados en este estudio para las MIC de CB (3-13 ppm) también están en consonancia con los hallazgos de otros autores que usaron cepas de *L. monocytogenes* de diferentes orígenes: de 4 ppm a 7 ppm (Aase *et al.*, 2000), de 0,63 ppm a 5 ppm (Lundén *et al.*, 2003), de 1,87 ppm a 15 ppm (Soumet *et al.*, 2005) o de 1,25 ppm a 10 ppm (Piercey *et al.*, 2017).

A diferencia de lo que ocurre con los antibióticos, no se han definido para los desinfectantes valores límite que permitan clasificar las bacterias como susceptibles, de susceptibilidad reducida o resistentes a dichos compuestos. La determinación de un punto de corte de resistencia a menudo se define arbitrariamente. Varios autores consideran que las bacterias son resistentes si sus valores de MIC son al menos entre dos y cuatro veces más altos que los encontrados en las cepas más susceptibles (Soumet *et al.*, 2005). De acuerdo con este criterio, se han identificado dos poblaciones de cepas en el presente estudio: cepas susceptibles a CB, con un valor de MIC de 3 ppm, y cepas resistentes a CB, con valores de MIC ≥ 9 ppm. Este punto de corte coincide con los resultados de Lemaître *et al.* (1998), Soumet *et al.* (2005) y Piercey *et al.* (2017), que indicaron que las cepas con valores de MIC superiores a 8 ppm, 7,5 ppm y 7,5 ppm de CB, respectivamente, eran resistentes a este compuesto.

En el presente estudio, los valores de MIC y MBC estuvieron por debajo de las concentraciones de uso recomendadas para HS (800 ppm - 2000 ppm de cloro libre; Henriques y Fraqueza, 2017; Norwood y Gilmour, 2000) y formulaciones de compuestos de amonio cuaternario (1.000 ppm a 5.000 ppm; Henriques y Fraqueza, 2017; Poimenidou *et al.*, 2016; Tamburro *et al.*, 2015). Sin embargo, el nivel de exposición a los desinfectantes en las plantas de procesamiento de alimentos depende principalmente de los lugares que puedan albergar las células bacterianas. Las cepas pueden encontrar bajas concentraciones de biocidas en algunas circunstancias (por ejemplo, uso inadecuado, almacenamiento

inapropiado o cantidades excesivas de materia orgánica, que inactivan varios biocidas) (Capita *et al.*, 2014), y es muy difícil cuantificar la concentración de biocidas presentes en diferentes ubicaciones en las instalaciones de procesamiento de alimentos. En tal escenario, el HS y el CB se probaron para obtener una mejor comprensión de la susceptibilidad de las células planctónicas y sésiles de *L. monocytogenes* a bajas concentraciones de los biocidas, lo que permitirá una mejor optimización de las estrategias para controlar este importante problema para las industrias de alimentos.

4.2. Capacidad de *L. monocytogenes* para formar biopelículas

El control de *L. monocytogenes* en los entornos de procesamiento de alimentos puede ser un desafío importante para la Industria Alimentaria, y la formación de biopelículas es un aspecto relacionado con este problema. La microscopía láser confocal de barrido (CLSM) permite obtener imágenes ópticas tridimensionales de las biopelículas utilizando colorantes específicos. El CLSM junto con el análisis cuantitativo de imágenes posibilita la determinación automática de los parámetros estructurales de las biopelículas (por ejemplo, biovolumen, porcentaje de superficie cubierta, altura máxima o rugosidad) y de la viabilidad celular mediante datos numéricos. Este enfoque permite el análisis estadístico y la comparación de biopelículas en diferentes condiciones (por ejemplo, diferentes tratamientos de desinfección).

Las observaciones microscópicas realizadas para las biopelículas de *L. monocytogenes* mostraron una estructura tridimensional densa, resultado coincidente con los hallazgos de otros autores (Borucki *et al.*, 2003). La capacidad de *L. monocytogenes* para formar biopelículas moderadas o fuertes ha sido observada previamente por otros autores después de 24-48 h de incubación en superficies de acero inoxidable (Rieu *et al.*, 2008), vidrio (Bridier *et al.*, 2010) o plástico, incluido el poliestireno (Chavant *et al.*, 2002; Guilbaud *et al.*, 2015; Torlak y Sert, 2013). Este es un hallazgo preocupante, ya que las biopelículas facilitan la persistencia de este patógeno en las industrias alimentarias, causando contaminación de los alimentos durante el procesamiento de los mismos, lo que representa un peligro para la Salud Pública.

La diversidad intraespecífica observada en el presente estudio por lo que respecta a la biomasa de las biopelículas formadas por *L. monocytogenes* es coincidente con los hallazgos de otras investigaciones en las que se utilizaron métodos cuantitativos para evaluar la formación de biopelículas (Borucki *et al.*, 2003; Di Bonaventura *et al.*, 2008; Guilbaud *et al.*, 2015; Henriques y Fraqueza, 2017; Kadam *et al.*, 2013; Mosquera-Fernández *et al.*, 2016).

4.3. Efecto del hipoclorito sódico y del cloruro de benzalconio sobre los parámetros estructurales y la viabilidad de los biofilms formados por *L. monocytogenes*

Para ser útiles contra las biopelículas, los desinfectantes deben poseer actividad bactericida y/o capacidad de remoción del biofilm. Se evaluó el efecto del tratamiento (10 min) con HS o CB a diferentes concentraciones (0,5MIC, 1MIC o 1,5MIC) en biopelículas preformadas de *L. monocytogenes* de 24 h de maduración. Se encontró que el tratamiento con HS (1MIC o 1,5MIC) o CB (0,5MIC, 1MIC o 1,5MIC) redujo ($P < 0,05$) el número de bacterias vivas en las biopelículas. Estos resultados indicaron que estas sustancias tienen propiedades antibiofilm a bajas concentraciones. Sin embargo, no se logró la erradicación bacteriana.

En este estudio, el hipoclorito sódico a concentraciones de 1MIC o 1,5MIC redujo la viabilidad celular en más del 90% en comparación con las biopelículas no tratadas, lo que sugiere que este desinfectante tiene un mecanismo de acción sobre *L. monocytogenes* que estaría relacionado principalmente con el daño a la integridad de la membrana, como se ha indicado anteriormente para diferentes grupos microbianos (Capita *et al.*, 2014). Por otro lado, los resultados demostraron que el cloruro de benzalconio fue capaz de eliminar la mayor parte de la masa del biofilm, pero redujo la viabilidad celular en menor medida. Estos resultados sugieren que el cloruro de benzalconio fue capaz de inducir un desprendimiento considerable de células vivas de los biofilms. Este es un hallazgo preocupante, ya que los fragmentos desprendidos de la biopelícula podrían colonizar otras superficies. Después del tratamiento con CB, más del 50% de las células de las biopelículas eran viables (Figura XI.2). Es posible que la fuerte eficacia de eliminación del CB haya impedido la detección de más células muertas en las imágenes de los biofilms tratados con CB obtenidas por microscopía confocal.

Conclusiones

Listeria monocytogenes supone un importante desafío para la Industria Alimentaria. En este contexto, se deben estudiar los efectos frente a esta bacteria de diferentes concentraciones y tipos de desinfectantes de grado alimentario, con el objetivo de lograr un mayor grado de optimización de las estrategias usadas para controlar este problema en los entornos de procesamiento de alimentos. Este estudio puso de manifiesto las diferencias entre cepas de *L. monocytogenes* por lo que respecta a la susceptibilidad al CB de las células planctónicas. *L. monocytogenes* puede adherirse y producir biopelículas densas en poliestireno, un material comúnmente utilizado en entornos de procesamiento de alimentos. Con concentraciones de hasta 1,5MIC, ninguno de los desinfectantes ensayados (HS y CB) logró la erradicación completa de las biopelículas. Sin embargo, el tratamiento con biocidas resultó

en una reducción de la viabilidad de los biofilms (marcada en el caso del HS). Además, la biomasa de las biopelículas disminuyó significativamente después de la exposición a biocidas (especialmente CB). Este hecho implica que puede producirse el desprendimiento de células vivas de las biopelículas tratadas con bajas concentraciones de desinfectantes, principalmente CB, lo que lleva a una posible propagación de las bacterias vivas dentro de la planta de procesamiento de alimentos y la posterior contaminación de los productos alimenticios, lo cual es un importante motivo de preocupación. Los resultados de esta investigación pueden contribuir a una mejor comprensión de la supervivencia y el comportamiento de *L. monocytogenes* en presencia de dos desinfectantes comúnmente utilizados en las industrias alimentarias.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., Rørvik, L. M. (2000). Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **62**(1–2): 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00357-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00357-3)
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(12): 7336–7342. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7336-7342.2003>
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., Briandet, R. (2010). The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high through put CLSM method. *Journal of Microbiological Methods* **82**(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.04.006>
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**, 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.003>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., García-Fernández, M. C. (2001). Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology* **65**(1–2): 75–82. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00497-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00497-9)
- Capita, R., Buzón-Durán, L., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2017). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* **14**(6): 350–356. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2241>
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(4): <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. N., Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(2): 728–737. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.728-737.2002>
- CLSI (2013). *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals*, 4rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania (USA). Approved Standard VET01-A4. https://clsi.org/media/1531/vet01a4_sample.pdf

- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'Orio, V., Vergara, A., Conter, M., Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology* **104**(6): 1552–1561. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03688.x>
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal* **16**(12) 5500: 262 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Gao, H., Liu, C. (2014). Biochemical and morphological alteration of *Listeria monocytogenes* under environmental stress caused by chloramine-T and sodium hypochlorite. *Food Control* **46**: 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.016>
- González-Machado, C., Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2018). Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella* Agona biofilms at different stages of development. *PLoS ONE* **13**(7): e0200011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200011>
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., Briandet, R. (2015). Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype. *Applied and Environmental Microbiology* **81** (5): 1813–1819. <https://doi.org/10.1128/AEM.03173-14>
- Gurtler, J. B., Doyle, M. P., Kornacki, J. L. (2017). *Foodborne Pathogens. Virulence Factors and Host Susceptibility*. Springer, Cham, Switzerland. <https://www.springer.com/gp/book/9783319568348>
- Henriques, A. R., Fraqueza, M. J. (2017). Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from ready-to-eat meat-based food products food chain. *LWT - Food Science and Technology* **81**: 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.045>
- Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., Van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology* **165** (3): 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>
- Lemaître, J.-P., Echchannaoui, H., Michaut, G., Divies, C., Rousset, A. (1998). Plasmid mediated resistance to antimicrobial agents among *Listeriae*. *Journal of Food Protection* **61**(11): 1459–1464. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.11.1459>

- Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology* **82**(3): 265–272. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00312-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00312-4)
- Mosquera-Fernández, M., Sánchez-Vizueté, P., Briandet, R., Cabo, M. L., Balsa-Canto, E. (2016). Quantitative image analysis to characterize the dynamics of *Listeria monocytogenes* biofilms. *International Journal of Food Microbiology* **236**, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.015>
- Murga, R., Stewart, P. S., Daly, D. (1995). Quantitative analysis of biofilm thickness variability. *Biotechnology and Bioengineering* **45**(6): 503–510. <https://doi.org/10.1002/bit.260450607>
- Norwood, D. E., Gilmour, A. (2000). The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology* **88**(3): 512–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00990.x>
- Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J. V. (2014). The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **189**: 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.007>
- Piercey, M. J., Ells, T. C., Macintosh, A. J., Hansen, L. T. (2017). Variations in biofilm formation, desiccation resistance and benzalkonium chloride susceptibility among *Listeria monocytogenes* strains isolated in Canada. *International Journal of Food Microbiology* **257**, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.025>
- Pilchová, T., Hernould, M., Prévost, H., Demnerová, K., Pazlarová, J., Tresse, O. (2014). Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **35**(1): 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.021>
- Poimenidou, S. V., Chryssadakou, M., Tzakoniati, A., Bikouli, V. C., Nychas, G. -J., Skandamis, P. N. (2016). Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology* **237**: 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.029>
- Rieu, A., Lemaître, J. P., Guzzo, J., Piveteau, P. (2008). Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* **126** (1–2), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.006>

- Ryser, E. T., Marth, E. H. (2007). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, third ed. CRC, Boca Raton, FL (USA). <https://www.routledge.com/Listeria-Listeriosis-and-Food-Safety/Ryser-Ryser-Marth/p/book/9780824757502>
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, F. R., Kim, H.- S., Ha, S.- D. (2017). Effectiveness of a phage cocktail as a biocontrol agent against *L. monocytogenes* biofilms. *Food Control* **78**: 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.056>
- Soumet, C., Ragimbeau, C., Maris, P. (2005). Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. *Letters in Applied Microbiology* **41**(3): 291–296. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01763.x>
- Tamburro, M., Ripabelli, G., Vitullo, M., Dallman, T. J., Pontello, M., Amar, C. F. L., Sammarco, M. L. (2015). Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **40**: 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.03.004>
- Torlak, E., Sert, D. (2013). Combined effect of benzalkonium chloride and ultrasound against *Listeria monocytogenes* biofilm on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology* **57**(3): 220–226. <https://doi.org/10.1111/lam.12100>
- Waghmare, R. B., Annapure, U.S. (2015). Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. *Food Packaging and Shelf Life* **3**: 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.11.001>

CAPÍTULO XII

Efecto de dosis bajas de desinfectantes sobre la capacidad de formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes*

PUBLICACIÓN

Cristina Rodríguez-Melcón, Rosa Capita, Juan José Rodríguez-Jerez, Joaquín V. Martínez-Suárez, Carlos Alonso-Calleja (2019). Effect of low doses of disinfectants on the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* **16**(4), 262-268. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2472>

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Listeria monocytogenes es una bacteria de gran importancia zoonótica en el ámbito mundial. En el año 2016 este microorganismo fue responsable en la Unión Europea de 2.536 casos confirmados de listeriosis invasiva en humanos, con una tasa de incidencia de 0,47 casos por 100.000 habitantes (EFSA y ECDC, 2017). Ocasionalmente se ha informado de una tasa de mortalidad de hasta el 30% para la listeriosis invasiva (Drevets y Bronze, 2008). Esta bacteria es muy ubicua en el medio ambiente, puede sobrevivir y crecer en condiciones adversas, y tiene la capacidad de adherirse y desarrollar biopelículas en instalaciones de procesamiento de alimentos y equipos. Esto da como resultado la persistencia del microorganismo en toda la cadena de producción y la posterior contaminación de los alimentos, que puede desencadenar una enfermedad humana (Piercey *et al.*, 2017). Las células de las biopelículas muestran una mayor resistencia a los desafíos ambientales que las bacterias de vida libre y, como consecuencia, son difíciles de erradicar en la industria alimentaria. Existen varios compuestos comúnmente utilizados como antimicrobianos para desinfectar las superficies de contacto con alimentos (Buzón-Durán *et al.*, 2017). Los desinfectantes a base de cloro, como el hipoclorito de sodio (HS), son compuestos oxidantes que muestran una actividad bactericida de amplio espectro, alta eficacia y bajo coste (Waghmare y Annapure, 2015). Los compuestos de amonio cuaternario como cloruro de benzalconio (CB), son tensioactivos catiónicos que actúan destruyendo las bicapas de la membrana lipídica, siendo eficaz contra una serie de microorganismos patógenos, especialmente bacterias Gram-positivas (Henriques y Fraqueza, 2017).

El uso inapropiado de biocidas (por ejemplo, dosis incorrectas, almacenamiento inadecuado o limpieza insuficiente antes de la desinfección), así como el empleo de los desinfectantes en los puntos de difícil acceso donde no llega la concentración adecuada y las células bacterianas pueden encontrar refugio (por ejemplo, las superficies internas de las tuberías), puede causar exposición de las bacterias a concentraciones inferiores a las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) (Capita *et al.*, 2014). Estudios previos en los que se han evaluado las estructuras de los biofilms utilizando la microscopía láser confocal de barrido han demostrado que la exposición a sub-MICs de algunos biocidas de uso alimentario mejora la capacidad para producir biopelículas en el caso de *Salmonella*, *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2014, 2017). Existen escasos estudios que evalúen cuantitativamente el efecto de sub-MICs del HS y el CB en los parámetros estructurales (por ejemplo, biovolumen, porcentaje de superficie cubierta, altura máxima o rugosidad) y la viabilidad celular de las biopelículas de *L. monocytogenes*. En este contexto se ha planteado la presente investigación, con el objetivo de evaluar, mediante microscopía láser confocal de barrido (CLSM), el efecto de bajas

concentraciones (0,5MIC, 1MIC y 1,5MIC) de dos desinfectantes comúnmente empleados en instalaciones de procesamiento de alimentos (HS y CB) sobre la arquitectura y la viabilidad de las biopelículas formadas por cuatro cepas de *L. monocytogenes*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas

Se ensayaron cuatro cepas de *L. monocytogenes* del serotipo molecular 1/2a. Tres de ellas procedían de una planta de procesamiento de carne de cerdo (López-Alonso *et al.*, 2015; Ortiz *et al.*, 2014, 2016): S2-1 (cepa susceptible a CB), S2-2 (cepa resistente a CB que alberga el gen *qacH* del transposón Tn6188) y S2^{BAC} (mutante de laboratorio resistente a CB de S2-1, con un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos *-multidrug resistance phenotype*; MDR- debido a la sobreexpresión de bombas de expulsión endógenas después de la exposición *in vitro* a compuestos de amonio cuaternario). También se probó una cepa de *L. monocytogenes* resistente a CB aislada de salmón ahumado y que alberga el *casette* de resistencia *bcrABC* (cepa CDL 69; Müller *et al.*, 2013). Las cepas se mantuvieron en caldo triptona de soja (TSB; Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) suplementado con glicerol al 20% (v/v) a -80 °C. Antes de cada experimento, las células congeladas se subcultivaron dos veces en TSB a 37 °C y posteriormente se mantuvieron a 4 °C en placas de agar triptona de soja (TSA; Oxoid).

2.2. Desinfectantes

Se ensayaron dos biocidas: hipoclorito sódico (HS; 10% de cloro activo; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y cloruro de benzalconio (CB; Fluka, Deisenhofen, Alemania). Se prepararon soluciones estériles de los compuestos en agua destilada inmediatamente antes de cada experimento.

2.3. Determinación de las MIC

Se tomaron cinco colonias de cada cepa a partir de las placas TSA y se subcultivaron dos veces en 10 ml de TSB a 37 °C durante 18 h. Se estimó la concentración de células bacterianas después de la incubación de dos formas. En primer lugar, enumerando las células viables en agar para recuento en placa (PCA; Oxoid), tras hacer diluciones decimales en agua de peptona (Oxoid) al 0,1% (p/vol) y realizando el recuento de las colonias visibles después de 48 h de incubación a 37 °C; en segundo lugar, midiendo las densidades ópticas (DO) utilizando un filtro de banda ancha (área de banda 420–580 nm; DO_{420–580}) en un equipo de turbidimetría Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia).

Con anterioridad a los experimentos se demostró que tales cultivos contienen, como promedio, $9,48 \pm 0,15 \log_{10}$ ufc/ml, y tienen una DO_{420–580} de $0,666 \pm 0,015$. A partir de los

cultivos se realizaron tres diluciones decimales en TSB (Oxoid). Cada uno de los 100 pocillos de las microplacas de poliestireno (Oy Growth Curves Ab) se llenaron con 20 μl de las soluciones químicas, utilizándose para cada desinfectante un rango de concentraciones, de 250 a 5.000 ppm, a intervalos de 250 ppm, para HS, y de 1 a 20 ppm, a intervalos de 1 ppm, para CB, y 180 μl de la tercera dilución de este cultivo bacteriano. Se obtuvo como resultado una concentración final en el pocillo de aproximadamente 6,5 \log_{10} ufc/ml. La concentración se confirmó mediante siembra en placa. Las placas de microtítulo se incubaron a 37 °C en un Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab). En cada experimento se incluyeron controles positivos (200 μl de inóculo a 6,5 \log_{10} ufc/ml) y controles negativos (180 μl de TSB y 20 μl del compuesto químico). Los experimentos se repitieron cinco veces en días no consecutivos. La MIC se estableció como la concentración de biocida más baja necesaria para evitar el crecimiento tras 48 h de incubación. Se consideró una $\text{DO}_{420-580}$ de 0,200 como el límite de crecimiento bacteriano (Alonso-Calleja *et al.*, 2015).

2.4. Formación y análisis de los biofilms

Se realizó un análisis de la estructura de los biofilms utilizando el método previamente descrito por Capita *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Inicialmente, se tomaron cinco colonias de cada cepa a partir de las placas de TSA y se subcultivaron dos veces en 10 ml de TSB a 37 °C durante 18 h. Posteriormente, se hicieron dos diluciones en TSB para obtener una concentración de aproximadamente 7,5 \log ufc/ml. Se añadieron 250 μl de esta segunda dilución a los pocillos de placas de 96 pocillos con fondo óptico Nunc MicroWell Plates with Polimer Base (Thermo Fisher Scientific, New Hampshire, Reino Unido), que poseen una alta calidad óptica, y un fondo plano de baja fluorescencia, lo que permite la obtención de imágenes de alta resolución.

Después de 1 h de adhesión a 37 °C en condiciones estáticas, los pocillos se enjuagaron con NaCl 150 mM para eliminar las bacterias no adheridas, antes de rellenar con 250 μl de TSB o TSB con desinfectante (HS o CB a concentraciones de 0,5MIC, 1MIC y 1,5MIC). Después de la incubación durante 24 h a 37 °C, los pocillos se enjuagaron con NaCl 150 mM. Para la tinción, se empleó un volumen de 2 μl de una mezcla 1:1 de los colorantes fluorescentes SYTO 9 (stock 3,34 mM en dimetilsulfóxido [DMSO]) y yoduro de propidio (YP; stock 20 mM en DMSO) del kit de viabilidad BacLight (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), que se añadió a 1.000 μl de TSB, depositándose un volumen de 250 μl de esta solución en cada pocillo. Posteriormente, la placa se incubó en la oscuridad a 37 °C durante 20 minutos para promover la penetración de los componentes fluorescentes en las bacterias. Para determinar el número de células adheridas a los pocillos de poliestireno antes de la formación de las

biopelículas, se tiñó un pocillo en cada experimento inmediatamente después de la adhesión y el aclarado.

La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio láser confocal de barrido Nikon Eclipse TE 2000-U con Software EZ-C13.60 (Nikon Instruments, Inc., Nueva York, EE.UU.). Las biopelículas se observaron con una lente de cuarenta aumentos (40×). La fluorescencia se detectó por excitación a 488 nm (láser de argón), y las emisiones se recogieron con un 590/50 (SYTO9) o un filtro de paso de banda 650LP (YP). Para cada biopelícula se obtuvieron, en tres áreas diferentes del pocillo, tres pilas de imágenes de 512 × 512 píxeles (correspondientes a 119 × 119 μm) en el plano horizontal, a una distancia de 1 μm en el eje z. Se realizaron, en días diferentes, tres experimentos independientes para cada cepa y tratamiento químico. Se obtuvieron así, en total, 126 imágenes. Se realizó el análisis de imágenes como se describió anteriormente (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2018) utilizando el paquete de software IMARIS 9.1 (Bitplane, Zurich, Suiza) para la reconstrucción de las proyecciones tridimensionales de la estructura de las biopelículas.

2.5. Análisis estadístico

Los parámetros estructurales de las biopelículas se compararon mediante técnicas de análisis de varianza (ANOVA) de una vía. La separación de medias se realizó utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan. Se llevó a cabo un análisis de correlación para determinar la relación entre los diferentes parámetros estructurales de las biopelículas. Los datos se procesaron utilizando el paquete informático Statistica 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.).

3. RESULTADOS

3.1. Efecto de los desinfectantes usados a 0,5MIC

Usando el método de microdilución en caldo, el valor de MIC del HS para las células planctónicas de *L. monocytogenes* fue de 3.500 ppm (350 ppm de cloro libre). Las MIC para CB fueron de 3 ppm (S2-1), 13 ppm (S2-2), 10 ppm (CDL 69) o 9 ppm (S2^{BAC}). Para determinar si la concentración de 0,5MIC de HS o CB influiría en la producción de biopelículas, se estudiaron, por microscopía láser confocal de barrido, los parámetros estructurales (biovolumen, porcentaje de superficie cubierta, altura máxima y rugosidad) y la viabilidad celular de las biopelículas formadas por células de *L. monocytogenes* en ausencia de biocidas (control) o en presencia de HS a 1.750 ppm y CB a 1,5 ppm (S2-1), 6,5 ppm (S2- 2), 5 ppm (CDL 69) o 4,5 ppm (S2^{BAC}). Cuando se cultivaron biopelículas en ausencia de biocidas, las células de *L. monocytogenes* produjeron estructuras densas y homogéneas que cubrían más del 90% de la superficie disponible. El biovolumen más alto ($P < 0,05$) en el campo de observación ($14.161\mu\text{m}^2$) se obtuvo para los biofilms formados por la cepa S2-1 ($276.030,9 \pm 42.291,9 \mu\text{m}^3$). La cepa S2-2 mostró un biovolumen $224.576,0 \pm 5.362,3 \mu\text{m}^3$, que fue mayor que los observados para CLD 69 ($129.028,1 \pm 58.348,9 \mu\text{m}^3$) y para S2^{BAC} ($103.928,3 \pm 6.730,2 \mu\text{m}^3$) (Figura XII.1). La Figura XII.2 muestra el porcentaje de superficie cubierta, la altura máxima y la rugosidad de las biopelículas de *L. monocytogenes*. Los cultivos expuestos a HS a 0,5MIC produjeron biopelículas con similar (S2-2 y CLD 69) o menor ($P < 0,05$; S2-1 y S2^{BAC}) biovolumen que los cultivos no expuestos (control) (Figura XII.2); los datos del biovolumen fueron $198.044,7 \pm 11.072,2 \mu\text{m}^3$ (S2-1), $212.619,9 \pm 86.675,0 \mu\text{m}^3$ (S2-2), $174.989,4 \pm 26.055,4 \mu\text{m}^3$ (CDL 69) y $59.636,1 \pm 15.259,0 \mu\text{m}^3$ (S2^{BAC}). La exposición a 0,5MIC de HS redujo el espesor máximo de las biopelículas formadas por S2-1 ($P < 0,01$; $24,15 \pm 3,36 \mu\text{m}$ vs $31,23 \pm 2,07 \mu\text{m}$), a la vez que redujo la superficie cubierta ($P < 0,05$; $82,33 \pm 6,38\%$ vs $98,00 \pm 0,37\%$) y aumentó la rugosidad ($P < 0,001$; $0,5768 \pm 0,0400$ vs $0,2818 \pm 0,0125$) de biopelículas por S2^{BAC}.

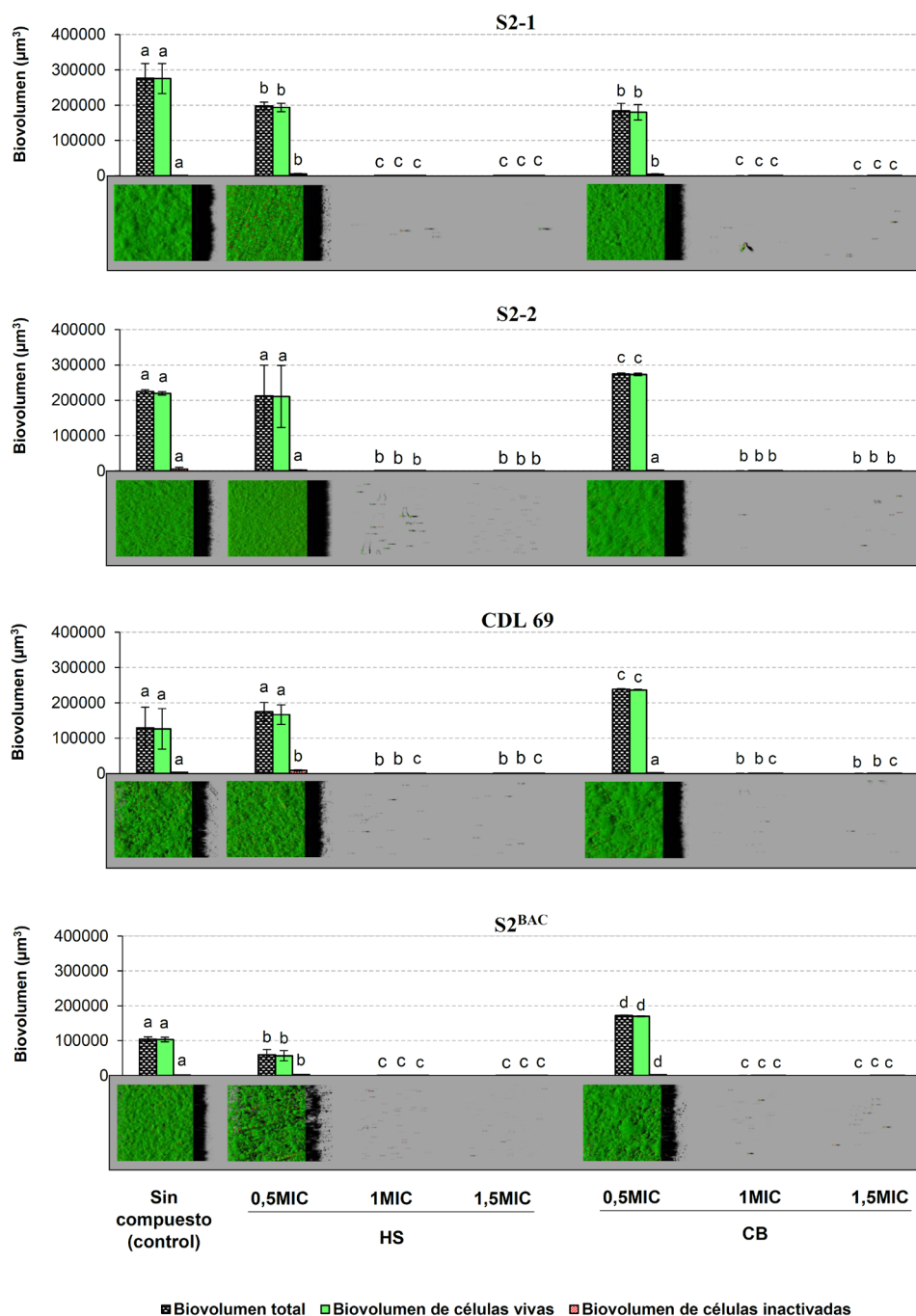
Por otro lado, el CB a 0,5MIC redujo ($P < 0,05$) el biovolumen de las biopelículas formadas por S2-1 (susceptibles a CB; $184.035,5 \pm 21.115,0 \mu\text{m}^3$) y aumentó la biomasa de biopelículas formadas por cepas resistentes a CB (S2-2, CLD 69 y S2^{BAC}), que mostraron un biovolumen mayor ($P < 0,05$) ($274.521,6 \pm 2.901,6 \mu\text{m}^3$, $238.496,3 \pm 1.583,4 \mu\text{m}^3$, y $172.029,6 \pm 1.348,6 \mu\text{m}^3$, respectivamente) y una mayor ($P < 0,05$) altura máxima ($29,14 \pm 1,70 \mu\text{m}$, $29,20 \pm 0,35 \mu\text{m}$ y $24,96 \pm 1,95 \mu\text{m}$, respectivamente) que las cepas no expuestas ($23,76 \pm 0,52 \mu\text{m}$, $22,28 \pm 2,71 \mu\text{m}$, y $16,10 \pm 0,24 \mu\text{m}$ para las cepas S2-2, CLD 69 y S2^{BAC}, respectivamente).

El porcentaje de bacterias muertas o dañadas en las biopelículas (calculado como el biovolumen de células teñidas con YP en relación con el biovolumen total) aumentó en

presencia de concentraciones subinhibitorias de CB. En presencia de CB a 0,5MIC, el porcentaje de células teñidas con YP se vio aumentado en las biopelículas formadas por S2-1 (cepa susceptible a CB). Por el contrario, en el caso de las cepas resistentes a CB (S2-2, CLD 69 y S2^{BAC}), el porcentaje de células muertas o dañadas no difirió significativamente ($P > 0,05$) entre las biopelículas crecidas en ausencia de biocidas y en presencia de dosis subinhibitorias de CB. Los porcentajes de células teñidas con YP en las biopelículas control (no expuestas) oscilaron entre $0,21 \pm 0,11\%$ (S2-1) y $2,40 \pm 0,91\%$ (CLD 69). En el caso de los biofilms formados en presencia de 0,5MIC de HS, los valores variaron entre $1,48 \pm 1,42\%$ (S2-2) y $4,99 \pm 0,49\%$ (S2^{BAC}). Para las biopelículas que se desarrollaron en presencia de CB a 0,5MIC, los valores variaron de $0,52 \pm 0,37\%$ (S2-2) a $2,27 \pm 0,79\%$ (S2^{BAC}).

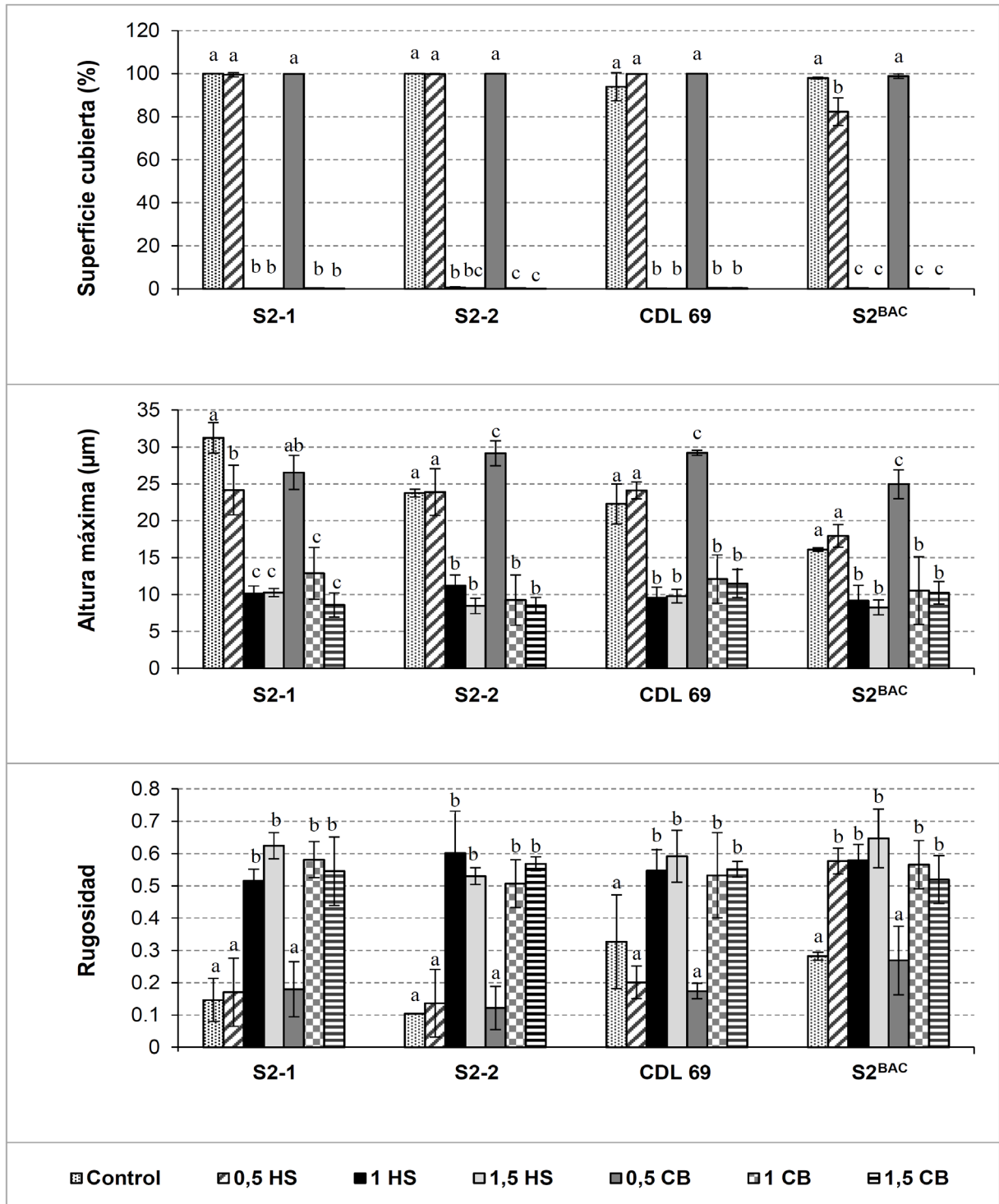
3.2. Efecto de los desinfectantes usados a 1MIC o 1,5MIC

Cuando los cultivos se expusieron a los biocidas a concentraciones de 1MIC o 1,5MIC, la formación de biopelículas se inhibió y solo se detectaron unos pocos agregados celulares pequeños y dispersos en el campo de observación de $14.161 \mu\text{m}^2$, con biovolúmenes que oscilaron entre $6,4 \pm 4,2 \mu\text{m}^3$ y $266,3 \pm 77,2 \mu\text{m}^3$, y un porcentaje de superficie cubierta que varió desde $0,10 \pm 0,07\%$ a $0,62 \pm 0,34\%$. Considerando todas las condiciones (exposición a HS y CB a 0,5MIC, 1MIC y 1,5MIC) para todas las cepas simultáneamente, se encontró correlación (de 0,799 a 0,918; $P < 0,001$) entre biovolumen, porcentaje de superficie cubierta y altura máxima de las biopelículas. Todos estos parámetros fueron negativamente correlacionados con la rugosidad del biofilm (de -0,835 a -0,603; $P < 0,01$). Se obtuvieron porcentajes más altos ($P < 0,001$) de bacterias muertas en presencia de 1MIC o 1,5MIC de HS o CB (las cifras oscilaron entre $23,57 \pm 4,14\%$ y $93,68 \pm 2,85\%$ para HS, y entre $32,60 \pm 21,36\%$ y $57,40 \pm 7,30\%$ para CB) que en ausencia de biocidas o en presencia de dichos compuestos a 0,5MIC.



Las barras en el mismo gráfico para el mismo estado fisiológico (células totales, células vivas o células muertas) que no comparten ninguna letra son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Las biopelículas se tiñeron en verde con SYTO9 y en rojo con yoduro de propidio. Las imágenes se corresponden con las reconstrucciones tridimensionales obtenidas por microscopía confocal y analizadas usando el programa informático IMARIS 9.1, incluyendo las proyecciones virtuales de las sombras a la derecha. HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; MIC, concentración mínima inhibitoria.

Figura XII.1. Biovolumen en el campo de observación ($14.161 \mu\text{m}^2$) de biopelículas de 24 h formadas por cuatro cepas de *Listeria monocytogenes* del serotipo molecular 1/2a (S2-1, S2-2, CDL 69 y S2^{BAC}) en ausencia de desinfectantes (control) o en presencia de HS o CB a 0,5MIC, 1MIC o 1,5MIC.



Las barras en el mismo gráfico para la misma cepa (S2-1, S2-2, CDL 69 o S2^{BAC}) que no comparten ninguna letra presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$); HS, hipoclorito de sodio; CB, cloruro de benzalconio; MIC, concentración mínima inhibitoria.

Figura XII.2. Porcentaje de superficie cubierta, espesor máximo y rugosidad de biopelículas de 24 h formadas por cuatro cepas de *L. monocytogenes* de serotipo molecular 1/2a (S2-1, S2-2, CDL 69 y S2^{BAC}) en ausencia de desinfectantes (control) o en presencia de HS o CB a 0,5MIC, 1MIC o 1,5MIC.

4. DISCUSIÓN

4.1. Efecto de los desinfectantes a concentraciones inferiores a la MIC

Los valores MIC de HS y CB observados en el presente estudio para los cultivos de células plactónicas de *L. monocytogenes* son similares a los datos obtenidos por otros autores, que oscilaron entre 512 y 2.500 ppm para HS (Gao y Liu, 2014; Lundén *et al.*, 2003), y entre 0,63 y 15 ppm en el caso del CB (Lundén *et al.*, 2003; Soumet *et al.*, 2005). Las cepas de *L. monocytogenes* ensayadas se clasificaron como susceptible (S2-1) o resistentes (S2-2, CDL 69 y S2^{BAC}) al CB (Martínez-Suárez *et al.*, 2016). Las cuatro cepas fueron capaces de producir biopelículas en poliestireno. Sin embargo, hubo variabilidad entre las cepas. En ausencia de biocidas, el aislamiento susceptible a CB (S2-1) produjo biopelículas más fuertes que las cepas de *L. monocytogenes* resistentes a CB (S2-2, CDL 69 y S2^{BAC}). Por otro lado, la exposición a dosis subinhibitorias de CB aumentó el desarrollo de biopelículas de las cepas resistentes a este desinfectante, y redujo el biofilm producido por S2-1. Estos resultados son coincidentes con observaciones de otros autores, en las que se evaluó la capacidad de formación de biopelículas por cepas de *L. monocytogenes* realizando ensayos de tinción con cristal violeta (Ortiz *et al.*, 2014), sugiriéndose que para las cepas resistentes a CB, las concentraciones subinhibitorias de dicho desinfectante pueden representar una ventaja y compensar el nivel débil de formación de biopelículas que podría estar asociado con la resistencia.

Nuestros hallazgos son también coincidentes con los datos cuantitativos obtenidos en estudios anteriores utilizando diferentes especies bacterianas y compuestos antimicrobianos, en los que se ha observado que la formación de biopelículas se incrementa en condiciones que son potencialmente tóxicas para las células, como la presencia de dosis subinhibitorias de desinfectantes (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2014, 2017). El incremento de la capacidad para formar biopelículas en presencia de dosis bajas de antimicrobianos puede representar una respuesta adaptativa al estrés, y es probable que esté relacionada con alteraciones en la morfología o composición celular (por ejemplo, características químicas y físicas de la superficie celular), el aumento de la expresión de genes específicos (por ejemplo, aquellos involucrados en el *quorum sensing*), o el aumento en la producción de sustancias poliméricas extracelulares en la matriz del biofilm (Bisbiroulas *et al.*, 2011; Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2014; Kumar y Ting, 2013). En el caso de la cepa S2^{BAC}, con fenotipo de multiresistencia, se ha sugerido previamente una asociación entre las bombas de expulsión y la producción de biopelículas (Ortiz *et al.*, 2014).

Varios elementos reguladores podrían estar relacionados con las observaciones de este estudio. Por ejemplo, los factores reguladores que controlan la formación de biopelículas en

L. monocytogenes podrían verse afectados por el HS y el CB a 0,5MIC. Sin embargo, el incremento de la capacidad para formar biopelículas solo se observó para CB y cepas resistentes a este desinfectante. Las tres cepas resistentes a CB, a pesar de ser genéticamente diferentes, podrían compartir un mecanismo de resistencia similar: las bombas de expulsión. Para la cepa S2^{BAC}, tanto el *cassette* de resistencia *bcrABC* (en la cepa CDL 69) como el gen *qacH* del transposón Tn6188 (en la cepa S2-2) son ejemplos de determinantes genéticos de transportadores pertenecientes a la familia de pequeñas proteínas de multiresistencia (*small multidrug resistance proteins*, SMRP; Müller *et al.*, 2013). En el caso de S2^{BAC}, la sobreexpresión de bombas de eflujo endógenas puede estar relacionada con su fenotipo de multiresistencia (Ortiz *et al.*, 2016). Por lo tanto, se sugiere que los elementos reguladores que afectan a la actividad de las bombas de expulsión podrían afectar a la formación de biopelículas de diferentes cepas resistentes al CB. Sin embargo, el mecanismo exacto responsable del incremento de la capacidad de formación de biopelículas de los cultivos de *L. monocytogenes* expuestos a CB debe ser confirmado. En este sentido, cabe señalar que han de realizarse nuevos estudios para dilucidar los posibles cambios morfológicos, bioquímicos o moleculares que ocurren en los biofilms de *L. monocytogenes* como consecuencia del contacto con concentraciones subinhibitorias de este desinfectante.

La formación de biopelícula inducida por CB, demostrada en este estudio para las cepas de *L. monocytogenes* resistentes a CB, sugiere que el uso de este compuesto a dosis inapropiadas en la Industria Alimentaria puede aumentar la capacidad de *L. monocytogenes* para producir biopelículas. Esto plantea preocupaciones en el ámbito de la Seguridad Alimentaria, debido a que los biofilms juegan un papel importante en la persistencia de bacterias y la contaminación de los alimentos (Capita *et al.*, 2017; Ripolles-Avila *et al.*, 2018). Estos hallazgos tienen implicaciones prácticas, puesto que los niveles de CB con los que se potencia la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* se pueden encontrar en los entornos de procesado de alimentos en algunas circunstancias, como se ha indicado con anterioridad (Capita *et al.*, 2014). Por lo tanto, los datos de este estudio sugieren la importancia de mantener dosis de desinfectantes superiores a las MIC para lograr una prevención eficaz de la formación de biopelículas por *L. monocytogenes*. El bajo porcentaje de células muertas o dañadas observado en las biopelículas cultivadas en ausencia de biocidas o en presencia de 0,5MIC de HS o CB indica que las membranas de la mayoría de las células no se ven comprometidas en tales circunstancias, como se ha observado previamente para varios grupos bacterianos cuando los biocidas se utilizan en dosis bajas (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Capita *et al.*, 2017).

4.2. Efecto de los desinfectantes a concentraciones de 1MIC o 1,5MIC

Solo se detectaron unos pocos agregados celulares en los pocillos expuestos durante 24 horas a desinfectantes a concentraciones de 1MIC o 1,5MIC. Puesto que se observó un número similar de células en los pocillos analizados inmediatamente después de la adhesión y el enjuagado (antes de la incubación; datos no mostrados), se sugiere que los agregados celulares presentes en el pocillos incubados durante 24 h en presencia de biocidas a 1MIC (350 ppm de cloro libre o 9-13 ppm de CB) o 1,5MIC (525 ppm de cloro libre o 13,5-19,5 ppm de CB) probablemente hayan sido células que fueron inoculadas y que quedaron adheridas al fondo del pocillo tras realizar el enjuague. Así, los hallazgos de este estudio muestran que el HS y el CB pueden ser capaces de prevenir el desarrollo de las biopelículas incluso cuando están por debajo las concentraciones utilizadas convencionalmente. Estas son 800 – 2.000 ppm de cloro libre para compuestos a base de cloro, como HS (Henriques y Fraqueza, 2017; Norwood y Gilmour, 2000) y 1.000 – 5.000 ppm para los compuestos de amonio cuaternario, como CB (Henriques y Fraqueza, 2017; Poimenidou *et al.*, 2015; Tamburro *et al.*, 2015).

Conclusiones

Este estudio sugiere que, si bien el HS y el CB pueden contribuir a la prevención de la formación de biopelículas por *L. monocytogenes* a dosis iguales o superiores a la MIC (incluso cuando las dosis están por debajo de las concentraciones de uso recomendadas), las concentraciones subinhibitorias de CB pueden incrementar el desarrollo de biopelículas en cepas resistentes a CB, en diferente medida según los marcadores genéticos o mecanismos de resistencia involucrados. Este fenómeno es destacable, teniendo en cuenta que la formación de biopelículas juega un papel importante en la persistencia de *L. monocytogenes*. Por lo tanto, los hallazgos de este trabajo suscitan preocupación por el uso inadecuado de los desinfectantes y sugieren la importancia de mantener, en la Industria Alimentaria, concentraciones de biocidas más altas que las MIC para combatir la listeriosis asociada a las biopelículas de *L. monocytogenes*. Sin embargo, cabe señalar que los resultados de esta investigación deben interpretarse con cautela, habida cuenta de que sólo se ensayaron cuatro cepas de *L. monocytogenes* del serotipo 1/2a. Se deben realizar más estudios para dilucidar los mecanismos a través de los cuales las células de *L. monocytogenes* pueden ver incrementada su capacidad de formación de biopelículas en presencia de concentraciones subinhibitorias de CB.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Calleja, C., Guerrero-Ramos, E., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2015). Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control* **56**: 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.012>
- Bisbiroulas, P., Psylou, M., Lliopoulou, I., Diakogiannis, A., Berberi, A., Mastronicolis, S. K. (2011). Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. *Letters in Applied Microbiology* **52**(3): 275–280. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02995.x>
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita, R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**: 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.003>
- Capita, R., Buzón-Durán, L., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2017). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* **14**(6): 350–356. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2241>
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(4): 1268–1280. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>
- Drevets, D. A., Bronze, M. S. (2008). *Listeria monocytogenes*: Epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **53**(2): 151–165. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00404.x>
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* **15**(12): 5077. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
- Gao, H., Liu, C. (2014). Biochemical and morphological alteration of *Listeria monocytogenes* under environmental stress caused by chloramine-T and sodium hypochlorite. *Food Control* **46**: 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.016>
- Henriques, A. R., Fraqueza, M. J. (2017). Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the ready-to-eat meat-based food products food chain. *LWT - Food Science and Technology* **81**: 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.045>

- Kumar, A., Ting, Y-P. (2013). Effect of sub-inhibitory antibacterial stress on bacterial surface properties and biofilm formation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **111**(1): 747–754. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.011>
- López-Alonso, V., Ortiz, S., Martínez-Suárez, J. V. (2015). Genome sequences of five disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two Iberian pork-processing plants. *Genome Announcements* **3**(2): e00077-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00077-15>
- Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology* **82**(3): 265–272. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00312-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00312-4)
- Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., López-Alonso, V. (2016). Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Frontiers in Microbiology* **7**: 638. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00638>
- Müller, A., Rychli, K., Muhterem-Uyar, M., Zaiser, A., Stesl, B., Guinane, C. M., Cotter, P. D., Wagner, M., Schmitz-Esser, S. (2013). Tn6188-a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. *PLoS ONE* **8**: e76835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076835>
- Norwood, D. E., Gilmour, A. (2000). The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology* **88**: 512–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00990.x>
- Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J. V. (2014). The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **189**: 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.007>
- Ortiz, S., López-Alonso, V., Rodríguez, P., Martínez-Suárez, J. V. (2016). The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: Evidence from comparative genome analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **82**: 308–317. <https://doi.org/10.1128/AEM.02824-15>
- Piercey, M. J., Ells, T. C., Macintosh, A. J., Hansen, L.T. (2017). Variations in biofilm formation, desiccation resistance and benzalkonium chloride susceptibility among *Listeria monocytogenes* strains isolated in Canada. *International Journal of Food Microbiology* **257**: 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.025>

- Poimenidou, S. V., Chrysadaku, M., Tzakoniati, A., Bikouli, V. C., Nychas, G. J., Skandamis, P. N. (2016). Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology* **237**: 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.029>
- Ripolles-Avila, C., Hascoët, A. S., Guerrero-Navarro, A. E., Rodríguez-Jerez, J. J. (2018). Establishment of incubation conditions to optimize the in vitro formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. *Food Control* **92**: 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.054>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., Carballo, J., García-Fernández, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2018). Structure and viability of 24- and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology* **76**: 513–517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>
- Soumet, C., Ragimbeau, C., Maris, P. (2005). Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. *Letters in Applied Microbiology* **41**(3): 291–296. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01763.x>
- Tamburro, M., Ripabelli, G., Vitullo, M., Dallman, T.J., Pontello, M., Amar, C.F.L., Sammarco M. L. (2015). Gene expression in *Listeria monocytogenes* exposed to sublethal concentration of benzalkonium chloride. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **40**: 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.03.004>
- Waghmare, R. B., Annapure, U. S. (2015). Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. *Food Packaging and Shelf Life* **3**: 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.11.001>

CAPÍTULO XIII

Efecto del bacteriófago P100 a diferentes concentraciones sobre los parámetros estructurales de las biopelículas de *Listeria monocytogenes*

PUBLICACIÓN

Cristina Rodríguez-Melcón, Rosa Capita, Camino García-Fernández, Carlos Alonso-Calleja (2018). Effects of bacteriophage P100 at different concentrations on the structural parameters of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Food Protection* **81**(12), 2040-2044. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-177>

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Listeria monocytogenes es la bacteria responsable de la listeriosis humana, enfermedad de origen alimentario potencialmente mortal que afecta principalmente a personas mayores, mujeres embarazadas, neonatos y adultos con sistema inmunológico debilitado (Miguéis *et al.*, 2017). En 2016, la listeriosis fue la quinta infección zoonótica más común en la Unión Europea, con 2.536 casos invasivos de enfermedad en humanos. La tasa de notificación en la Unión Europea fue de 0,47 casos por 100.000 habitantes, lo que supuso un aumento del 9,3% respecto a 2015 (EFSA y ECDC, 2017). Aunque la listeriosis ocurre con poca frecuencia, es una de las principales enfermedades transmitidas por alimentos debido a su alta tasa de mortalidad, que puede superar el 30% (Montañez-Izquierdo *et al.*, 2012). En los Estados Unidos, se ha descrito un escenario similar, con aproximadamente 1.600 infecciones y 260 muertes por listeriosis al año y una tasa de incidencia de 0,26 casos por cada 100.000 habitantes en 2014 (Gurtler *et al.*, 2017).

L. monocytogenes tiene la capacidad de adherirse y desarrollar biopelículas en la mayoría de las superficies de los equipos e instalaciones de procesamiento de alimentos, incluyendo acero inoxidable, caucho y polímeros (Sadekuzzaman *et al.*, 2017). La capacidad para formar biofilms es la principal característica de este patógeno a la hora de facilitar su propagación ambiental y convertirse así en una posible fuente de contaminación de los alimentos (Díez-García *et al.*, 2012). De hecho, se ha estimado que la presencia de biopelículas en los entornos de procesamiento de alimentos es la causa de casi el 60% de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Midelet *et al.*, 2004). Con respecto a la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo se ha propuesto, como medida de control de la listeriosis, una política de tolerancia cero en los Estados Unidos y un límite de 100 ufc/g en la Unión Europea (Sadekuzzaman *et al.*, 2017).

Las células de *L. monocytogenes* presentes en biopelículas muestran mayor resistencia a los antimicrobianos y otros factores de estrés ambiental que las células presentes en estado planctónico. Una vez se ha desarrollado una biopelícula, es difícil eliminarla por completo mediante el uso de procedimientos normales de limpieza y desinfección. Así, las biopelículas pueden ayudar a *L. monocytogenes* a sobrevivir durante períodos prolongados de tiempo en plantas de producción de alimentos (Ferreira *et al.*, 2014). Por esta razón, los esfuerzos para encontrar estrategias alternativas efectivas para el control de las biopelículas han aumentado considerablemente durante la última década.

Debido a su seguridad y naturaleza ubicua, los bacteriófagos son un enfoque prometedor para controlar y erradicar las biopelículas. Estos virus son inofensivos para los seres humanos, animales y plantas, porque atacan y matan específicamente bacterias, incluidas las

resistentes a los desinfectantes tradicionales (Gutiérrez *et al.*, 2016, 2017). Se ha indicado que los fagos son los organismos más abundantes del planeta (Miguéis *et al.*, 2017), pudiendo encontrarse en concentraciones de hasta 10^8 partículas de fagos en 1 g de suelo o agua, y estos organismos también se han aislado de diferentes alimentos, como productos cárnicos, lácteos y vegetales (Soni y Nannapaneni, 2010b).

El bacteriófago P100 es un fago formulado bajo el nombre comercial Listex P100 que ha recibido el estatus de producto GRAS (generalmente reconocido como seguro) por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en 2006. Está permitido como coadyuvante tecnológico aplicado directamente a productos alimenticios para controlar la contaminación por *L. monocytogenes* en los Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda (EFSA, 2016). En la Unión Europea, está disponible un proyecto de reglamento que permite el uso de Listex P100 para la reducción de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (*RTE, ready-to-eat*) de origen animal (EU, 2017). El bacteriofago P100 es letal para una célula bacteriana una vez que se ha establecido la infección, y cuenta con una amplia gama de hospedadores dentro del género *Listeria* (Carlton *et al.*, 2005). Además, no se han observado evidencias de que el este fago genere resistencias bacterianas (Carlton *et al.*, 2005; Holck y Berg, 2009). Varios investigadores han puesto de manifiesto la eficacia del bacteriófago P100 frente a células de *L. monocytogenes* presentes en queso (Carlton *et al.*, 2005), pescado (Soni y Nannapaneni, 2010a), carne (Chibeu *et al.*, 2013; Iacumin *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2011), frutas frescas y zumos de fruta (Oliveira *et al.*, 2014), verduras (Oliveira *et al.*, 2015), jamón (Figueiredo y Almeida, 2017; Gutiérrez *et al.*, 2017) y diferentes alimentos listos para el consumo (Guenther *et al.*, 2009, Miguéis *et al.*, 2017). Sin embargo, son escasas las publicaciones que abordan la eficacia de las suspensiones del fago P100 frente a las biopelículas presentes en las superficies en contacto con alimentos (Gutiérrez *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2017; Iacumin *et al.*, 2016; Montañez-Izquierdo *et al.*, 2012). Además, el efecto de diferentes concentraciones de este bacteriófago en los parámetros estructurales y la arquitectura de las biopelículas de *L. monocytogenes* no ha sido estudiado hasta ahora.

En el presente estudio se evaluó, mediante microscopía láser confocal de barrido y técnicas de análisis de imagen, el efecto de 12 concentraciones diferentes (de 10^0 a 10^{11} ufp/ml) del bacteriófago P100 sobre los parámetros estructurales de las biopelículas de 24 horas formadas por una cepa de *L. monocytogenes* de origen alimentario en superficies de poliestireno. Estos datos pueden contribuir al desarrollo futuro estrategias de eliminación de los biofilms basadas en el empleo de bacteriófagos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepa de *L. monocytogenes* y preparación de los bacteriófagos

Se utilizó una cepa de *L. monocytogenes* del serotipo 1/2a (LM6), previamente aislada de carne de cerdo. La cepa se almacenó en el laboratorio a -80 °C en caldo triptona de soja (TSB; Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido), suplementado con glicerol al 20% (v/v). Antes de llevar a cabo los experimentos, las células congeladas se subcultivaron dos veces en TSB a 30 °C. Los cultivos de trabajo se mantuvieron a 4 ± 1 °C en placas de agar triptona de soja (TSA; Oxoid).

La preparación comercial Listex P100 (fago P100) se obtuvo de Microcos Food Safety (Wageningen, Holanda) en concentraciones de 10^{11} unidades formadoras de placas por mililitro (ufp/ml). A partir de ella se prepararon, inmediatamente antes de su empleo, diluciones decimales (de 10^{10} a 10^0 ufp/ml) en tampón fosfato salino (PBS; Calbiochem KGaA, Darmstadt, Alemania).

2.2. Formación de biofilm, tratamiento y análisis de imagen

La cepa de *L. monocytogenes* se cultivó en TSB a 30 °C durante 18 h, y posteriormente se hicieron diluciones decimales en TSB para obtener una concentración de aproximadamente 10^6 ufc/ml. Se añadió un volumen de 250 μ l a los pocillos de placas Nunc™ MicroWell™ 96-Well Optical-Bottom Plates with Polymer Base (Thermo Fisher Scientific, New Hampshire, EE.UU.). Estas placas son de alta calidad óptica y tienen un fondo plano de baja fluorescencia, lo que permitió obtener imágenes de alta resolución. Después de una hora de adhesión bacteriana a 30 °C, los pocillos se enjuagaron con NaCl 150 mM para eliminar cualquier bacteria no adherida a la superficie, antes de ser rellenados con 250 μ l de TSB. Después de la incubación durante 24 h a 30 °C, los pocillos se enjuagaron con NaCl 150 mM, se rellenaron con 250 μ l de diferentes suspensiones de fagos (de 10^0 a 10^{11} ufp/ml) o con 250 μ l de PBS (control) y se incubaron a 30 °C. Después de 24 h, los pocillos se enjuagaron dos veces con NaCl 150 mM y se rellenaron con 250 μ l de TSB que contiene 1 μ l/ml del colorante Texas Red-X con WGA (Kit de viabilidad ViaGram™ Red+ Bacterial Gram Stain; Invitrogen, Carlsbad, CA) previamente reconstituido siguiendo las instrucciones del fabricante. Este colorante fluorescente se une selectivamente a la superficie de las bacterias Gram positivas y las tiñe de color rojo. No se utilizaron colorantes con afinidad a los ácidos nucleicos para evitar la tinción de los bacteriófagos. A continuación, se incubó la microplaca en la oscuridad a 30 °C y, después de 60 minutos, los pocillos se vaciaron y la microplaca se incubó durante 48 horas a 7 °C para permitir el acceso del colorante a las capas más profundas del biofilm.

La adquisición de imágenes por CLSM se realizó utilizando un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-U CLSM con software EZ-C13.60 (Nikon Instruments Inc., Melville, Nueva York). Las biopelículas se observaron con un objetivo de 40×. La fluorescencia se detectó por excitación a 543 nm (láser HeNe), y la emisión se recogió con un filtro de paso de banda de 650LP. Para cada biopelícula se adquirieron tres pilas de imágenes, en tres áreas diferentes del pocillo, de 119 μm \times 119 μm en el plano horizontal (correspondientes a 512 \times 512 píxeles) con una distancia de 1 μm en el eje z. Se realizaron tres experimentos independientes, en días diferentes, para cada concentración de fago. El análisis de las imágenes se llevó a cabo utilizando el paquete de software IMARIS 9.1 (Bitplane, Zürich, Suiza) para las reconstrucciones tridimensionales de las proyecciones de las biopelículas (Buzón-Durán *et al.*, 2017, Capita *et al.*, 2017).

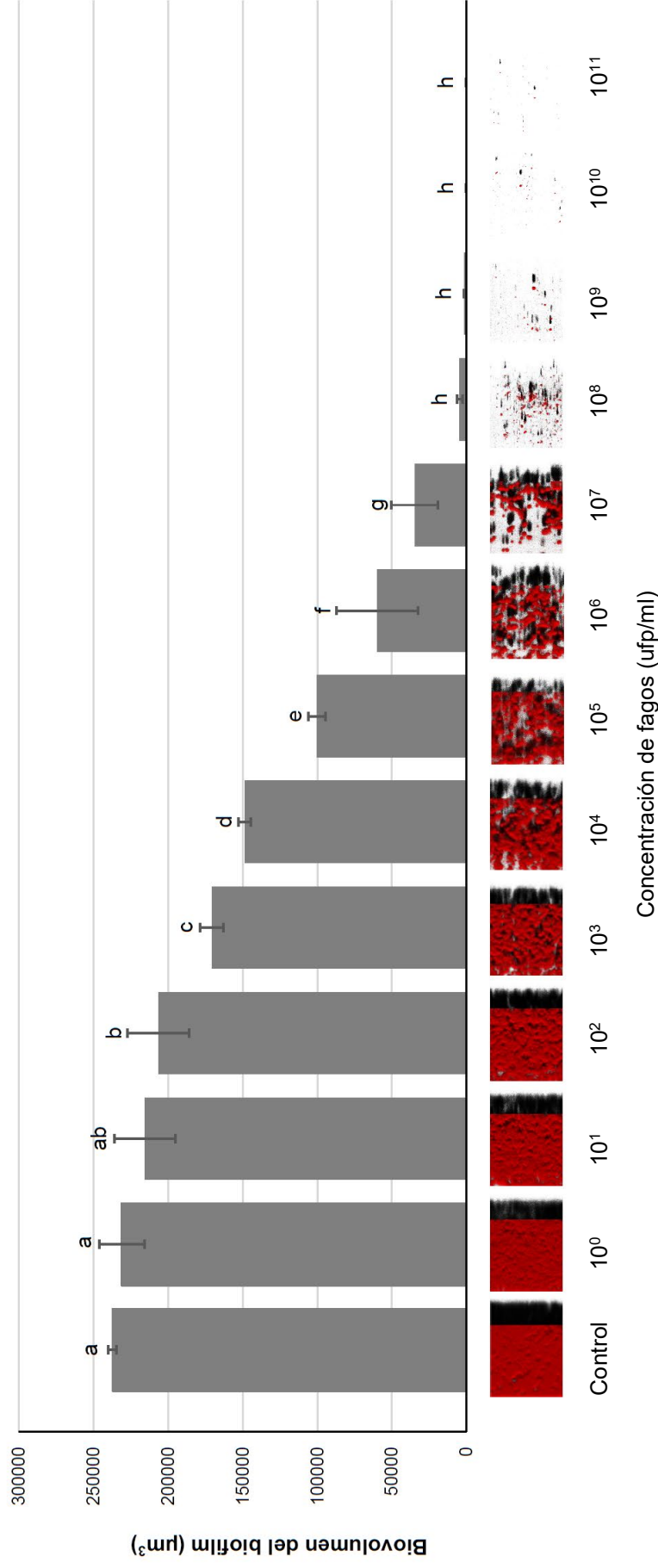
2.3. Análisis estadístico

Los parámetros estructurales cuantitativos de las biopelículas se compararon para determinar las diferencias significativas utilizando técnicas de análisis de varianza. La separación de medias se llevó a cabo mediante la prueba de rango múltiple de Duncan. Se realizó un análisis de correlación para determinar la relación entre la concentración de fagos y los parámetros estructurales de las biopelículas. El procesado de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete informático Statistica 8.0 (StatSoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las biopelículas son uno de los factores implicados en la persistencia de las bacterias en los ambientes alimentarios, debido a que las células sésiles muestran una mayor resistencia a los desinfectantes comúnmente utilizados en la industria alimentaria que las células planctónicas (Soni y Nannapaneni, 2010b). En este contexto, los bacteriófagos han sido propuestos como alternativas naturales para el control de biopelículas formadas por bacterias patógenas. El mecanismo de acción real de los bacteriófagos sobre la cinética del biofilm todavía no se ha estudiado completamente. Se cree que los bacteriófagos pueden difundir a través de los poros y canales de las biopelículas para alcanzar diferentes capas de estas estructuras. Además, se ha demostrado que las enzimas derivadas de los fagos descomponen la matriz polimérica extracelular de los biofilms. Como resultado, los bacteriófagos pueden alcanzar y destruir las células bacterianas presentes en las biopelículas (Sadekuzzaman *et al.*, 2017).

Para mejorar la aceptación de los tratamientos basados en fagos que actúan contra las biopelículas se necesitan nuevos ensayos para predecir su comportamiento. En el presente estudio, el bacteriófago P100 (presente en el producto comercial Listex P100) se probó a diferentes concentraciones con la finalidad de determinar su capacidad para eliminar las biopelículas de *L. monocytogenes* previamente formadas sobre poliestireno. Hasta donde llega nuestro conocimiento, esta parece ser la primera vez que se han evaluado los parámetros estructurales de las biopelículas tratadas con fagos mediante microscopía confocal y procesado digital de imágenes. La Figura XIII.1. muestra el biovolumen de biopelículas de 24 h de maduración formadas por *L. monocytogenes* sobre poliestireno y posteriormente expuestas durante 24 horas más a PBS (control) o a 12 concentraciones diferentes (de 10^0 ufp/ml a 10^{11} ufp/ml) del bacteriófago P100. A su vez, se muestran las reconstrucciones tridimensionales obtenidas en cada caso con el programa IMARIS 9.1, incluidas las proyecciones virtuales de las sombras a la derecha.



Las barras (media ± desviación estándar) sin letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Las imágenes (119 por 119 µm) corresponden a las reconstrucciones tridimensionales obtenidas con el software IMARIS 9.1 a partir de las imágenes obtenidas por microscopía confocal, con proyecciones virtuales de las sombras a la derecha.

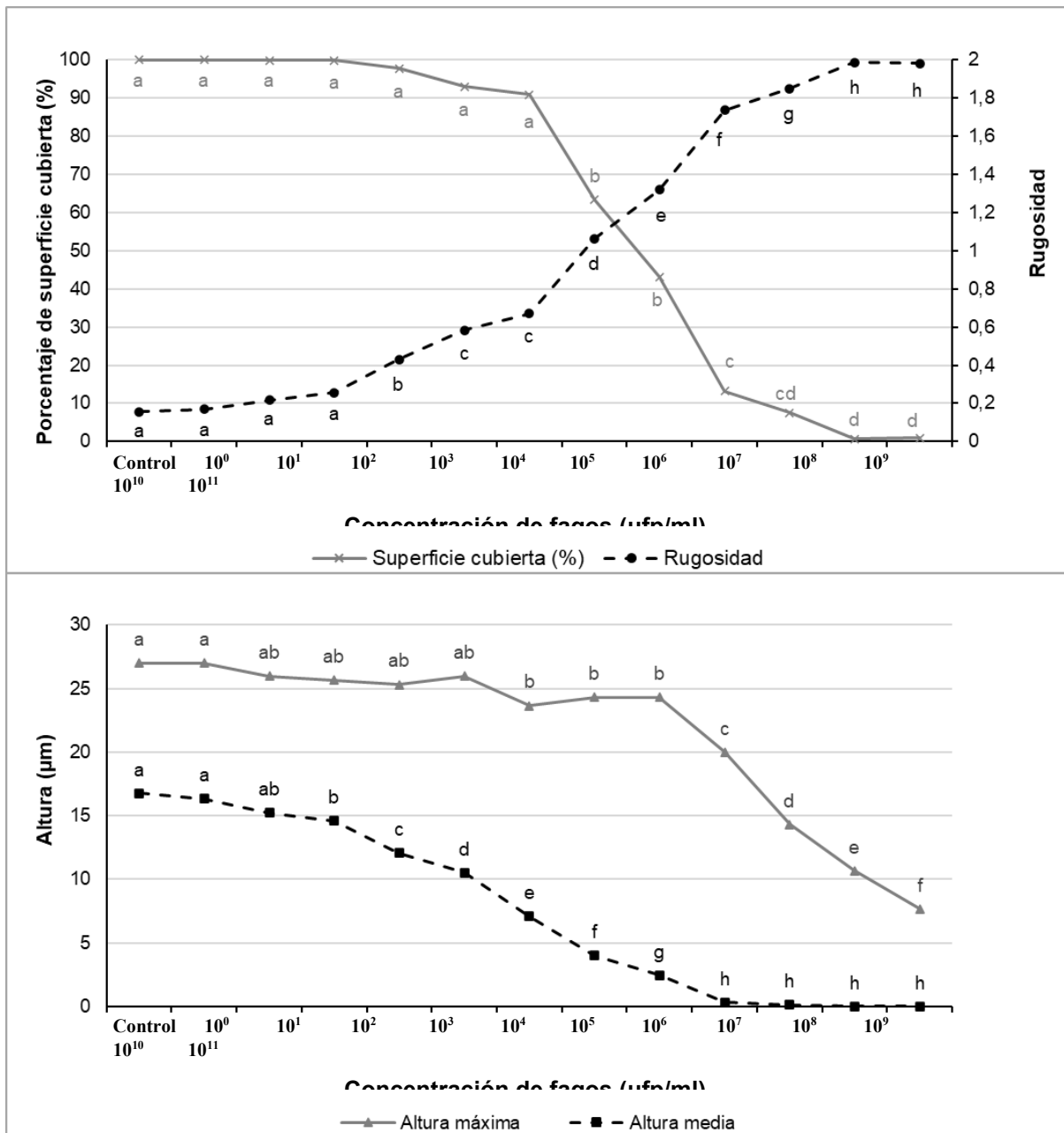
Figura XIII. 1. Biovolumen de biopelículas de 24 h de maduración formadas por *Listeria monocytogenes* en poliestireno y expuestas durante 24 h más a varias concentraciones del bacteriófago P100 o de tampón fosfato salino (PBS; control).

La cepa LM6 formó de manera eficiente biopelículas bajo las condiciones experimentales ensayadas. Este microorganismo produjo estructuras compactas después de 24 h de incubación, con un biovolumen en el campo de observación ($14.121 \mu\text{m}^2$) de $237.333,1 \pm 2.692,6 \mu\text{m}^3$, cubriendo la mayor parte de la superficie ensayada ($99,89\% \pm 0,09\%$). La rugosidad de los biofilms formados por LM6 fue de $0,156 \pm 0,052$, su altura máxima fue $27,00 \pm 1,00 \mu\text{m}$, y su altura media de $16,76 \pm 0,19 \mu\text{m}$ (Figura XIII.2). En líneas similares a los resultados de este estudio, en otras investigaciones se ha observado que las cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes al serotipo 1/2a muestran una elevada capacidad para formar biofilms, más fuerte que otros serotipos (Borucki *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2007; Soni y Nannapaneni, 2010b).

Si bien no se logró la eliminación completa de las biopelículas formadas por LM6, la exposición al bacteriófago P100 en concentraciones iguales o superiores a 10^2 ufp/ml, provocó una reducción significativa de la biomasa de las biopelículas en las condiciones experimentales ensayadas (Figura XIII.1). El tratamiento con la suspensión fágica también redujo el porcentaje de superficie cubierta (a partir de 10^6 ufp/ml), la altura máxima (a partir de 10^5 ufp/ml) y la altura media (a partir de 10^2 ufp/ml). También aumentó el aplanamiento del biofilm a concentraciones de 10^3 ufp/ml y superiores (Figura XIII.2).

En las biopelículas tratadas, el biovolumen osciló entre $164,7 \pm 89,0 \mu\text{m}^3$ (biopelículas expuestas a 10^{10} ufp/ml) y $231.170,5 \pm 15.142,0 \mu\text{m}^3$ (10^0 ufp/ml), el porcentaje de superficie cubierta entre $0,72\% \pm 0,27\%$ (10^{10} ufp/ml) y $99,98\% \pm 0,01\%$ (10^0 ufp/ml), la rugosidad entre $0,169 \pm 0,012$ (10^0 ufp/ml) y $1,986 \pm 0,005$ (10^{10} ufp/ml), la altura máxima entre $7,67 \pm 1,53 \mu\text{m}$ (10^{11} ufp/ml) y $27,00 \pm 1,73 \mu\text{m}$ (10^0 ufp/ml) y la altura media entre $0,02 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (10^{11} ufp/ml) y $16,32 \pm 1,07 \mu\text{m}$ (10^0 ufp/ml).

La efectividad del bacteriófago P100 frente a los biofilms de *L. monocytogenes* muestra resultados de gran interés, considerando que las cepas persistentes de *L. monocytogenes* tienden a ser más tolerantes a los desinfectantes de uso frecuente en la industria alimentaria, especialmente una vez que se han desarrollado las biopelículas (Montáñez-Izquierdo *et al.*, 2012). Sin embargo, estos resultados deben considerarse con precaución, ya que derivan de experimentos de laboratorio. Se necesitan más investigaciones realizadas *in vivo* (es decir, en superficies y equipos presentes en las instalaciones de procesamiento de alimentos) para fundamentar estos hallazgos. La eficacia antimicrobiana de las suspensiones de fagos debe probarse a diferentes temperaturas y tiempos de aplicación. También son necesarias investigaciones adicionales para dilucidar el efecto de mezclas de bacteriófagos en biopelículas compuestas por cepas mixtas de *L. monocytogenes* y en biopelículas de múltiples especies.



Lo datos dentro del mismo parámetro estructural sin letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura XIII.2. Porcentaje de superficie cubierta, rugosidad, altura máxima y altura media de biopelículas de 24 h de maduración formadas sobre poliestireno por *Listeria monocytogenes*, después de la exposición durante 24 horas adicionales a diversas concentraciones de bacteriófago P100 o PBS (control).

Soni y Nannapaneni (2010b) observaron, al igual que en el presente estudio, reducciones en el biovolumen de los biofilms de 21 cepas de *L. monocytogenes* de 13 serotipos diferentes formados en poliestireno al cabo de 24 horas de incubación. Los autores mencionados trataron los biofilms con el fago P100 a una concentración de 10⁹ ufp/ml y, para su cuantificación, usaron la técnica de tinción con cristal violeta. Por su parte, Montáñez-

Izquierdo *et al.* (2012) utilizaron la técnica de microscopía de epifluorescencia directa y un método de cultivo, que revelaron reducciones en la biomasa de las biopelículas de 3 días formadas por *L. monocytogenes* ATCC 15313 en superficies de acero inoxidable cuando dichas biopelículas eran tratadas con el bacteriófago P100 a concentraciones de 6, 7 u 8 log ufp/ml. Según estos hallazgos, los autores mencionados anteriormente sugieren que P100 podría ser utilizado en entornos de procesamiento de alimentos para reemplazar o complementar los métodos de desinfección tradicionales.

Una ventaja del ensayo de bacteriófagos a diferentes concentraciones es que permite la identificación de las concentraciones más adecuadas para su uso. En la presente investigación, la concentración de fagos influyó significativamente ($P < 0,05$) en el biovolumen de las biopelículas de LM6 entre 10^0 y 10^8 ufp/ml. Por otro lado, concentraciones de 8, 9, 10 y 11 log ufp/ml produjeron una eliminación similar ($P > 0,05$) de las biopelículas. Por tanto, para una eficacia óptima, la concentración del fago P100 no debe ser inferior a 8 log ufp/ml. El límite crítico de 8 log ufp/ml (o gramo o centímetro cuadrado) ha sido previamente establecido para un tratamiento anti-*Listeria* efectivo tanto de biopelículas (Montáñez-Izquierdo *et al.*, 2012) como de alimentos (Carlton *et al.*, 2005; Guenther *et al.*, 2009; Iacumin *et al.*, 2016).

Se observó una correlación inversa entre la concentración de fagos (unidades logarítmicas) y biovolumen de las biopelículas ($-0,965$; $P < 0,001$). Estos resultados concuerdan con hallazgos previos de otros investigadores, que demostraron que concentraciones de fagos más altas fueron más efectivas en erradicar *L. monocytogenes* tanto en biopelículas (Montáñez-Izquierdo *et al.*, 2012) como en productos alimenticios (Carlton *et al.*, 2005; Guenther *et al.*, 2009; Iacumin *et al.*, 2016; Miguéis *et al.*, 2017). En este sentido, se ha señalado que la proporción entre fagos y células bacterianas es fundamental para el éxito del tratamiento con bacteriófagos (EFSA, 2009). Las concentraciones (unidades logarítmicas) del bacteriófago P100 también mostraron una relación inversa significativa ($P < 0,001$) con superficie cubierta ($r = -0,939$), altura máxima ($r = -0,853$) y altura media ($r = -0,965$). Por otro lado, la concentración de fagos se correlacionó positivamente ($P < 0,001$) con la rugosidad ($r = 0,976$); un cambio positivo en el coeficiente de rugosidad indica un aumento de la heterogeneidad de la biopelícula. Por tanto, a medida que aumentaba la concentración de fagos, las imágenes de los biofilms obtenidas por CLSM se transformaban de un plano compacto a estructuras de microcolonias con formas irregulares. En las biopelículas tratadas con entre 8 y 11 log ufp/ml, solo se observaron un número limitado de células bacterianas que forman pequeños racimos (Figura XIII.1).

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en el que se utiliza la microscopía láser confocal de barrido y el análisis digital de imágenes para explorar los efectos del bacteriófago de amplio espectro P100 (Listex P100) a diferentes concentraciones sobre los parámetros

estructurales de las biopelículas formadas por una cepa de *L. monocytogenes* aislada de alimentos. Esta investigación revela la potencialidad de este bacteriófago para posicionarse como una estrategia alternativa eficaz para el control y erradicación de los biofilms formados por *L. monocytogenes*, con óptimos resultados a concentraciones iguales o superiores a 8 log ufp/ml. Aunque se necesitan más estudios en condiciones reales, los datos de esta investigación pueden ayudar en el diseño de métodos útiles de desinfección para la Industria Alimentaria basados en fagos.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7336–7342. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7336-7342.2003>
- Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., Riesco-Peláez, F., Capita R. (2017). Effect of sub-inhibitory concentrations of biocides on the architecture and viability of MRSA biofilms. *Food Microbiology* **65**: 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.003>
- Capita, R., Buzón-Durán, L., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C. (2017). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the structural parameters and viability of the biofilms formed by *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease* **14**(6): 350–356. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2241>
- Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., de Meester, E. D., Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analysis, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **43**(3): 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.08.005>
- Chibeu, A., Agius, L., Gao, A., Sabour, P. M., Kropinski, A. M., Balamurugan, S. (2013). Efficacy of bacteriophage LISTEX™ P100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. *International Journal of Food Microbiology* **167**(2): 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.018>
- Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology* **31**(2): 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.012>
- EFSA y ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* **15**(12): 5077. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009). Scientific Opinion on the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on the use and mode of action of bacteriophages in food production. *EFSA Journal* **10**(76): 1–26. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1076>
- EFSA (European Food Safety Authority) (2016). Scientific opinion on the evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for reduction of pathogens on different ready-to-eat (RTE) food products. *EFSA Journal* **14**(8): 4565. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.107610.2903/j.efsa.2016.4565>
- EU (European Union) (2017). Draft regulation. Commission Regulation on the use of Listex™ P100 against *Listeria* in ready-to-eat food products. Disponible en: https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/initiatives/ares-2017-3512172_en (Fecha de último acceso: 27 de julio de 2018).

- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection* **77**(1): 150–170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- Figueiredo, A. C. L., Almeida, R. C. C. (2017). Antibacterial efficacy of nisin, bacteriophage P100 and sodium lactate against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat sliced pork ham. *Brazilian Journal of Microbiology* **48**(4): 724–729. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.010>
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard S., Loessner, M. J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(1): 93–100. <https://doi.org/10.1128/AEM.01711-08>
- Gurtler, J. B., Doyle, M. P., Kornacki, J. L. (2017). *Foodborne pathogens: virulence factors and host susceptibility*. Springer, Cham, Switzerland. <https://www.springer.com/gp/book/9783319568348>
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Fernández, L., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P. (2017). Applicability of commercial phage based products against *Listeria monocytogenes* for improvement of food safety in Spanish dry-cured ham and food contact surfaces. *Food Control* **73**: 1474–1482. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.007>
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P. (2016). Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology* **7**: 825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825>
- Harvey, J., Keenan, K. P., Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology* **24**(4): 380–392. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.06.006>
- Holck, A., Berg, J. (2009). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(21): 6944–6966. <https://doi.org/10.1128/AEM.00926-09>
- Iacumin, L., Manzano, M., Comi, G. (2016). Phage inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele dry-cured ham and elimination of biofilms from equipment and working environments. *Microorganisms* **4**(1): 4. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010004>
- Midelet, G., Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology* **97**(2): 262–270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02296.x>
- Miguéis, S., Saraiva, C., Esteves, A. (2017). Efficacy of LISTEX P100 at different concentrations for reduction of *Listeria monocytogenes* inoculated in sashimi. *Journal of Food Protection* **80**(12): 2094–2098. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-098>
- Montañez-Izquierdo, V. Y., Salas-Vázquez, D. I., Rodríguez-Jerez, J. J. (2012). Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling

- Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. *Food Control* **23**(2): 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.016>
- Oliveira, M., Abadias, M., Colás-Medá, P., Usall, J., Viñas, I. (2015). Biopreservative methods to control the growth of foodborne pathogens on fresh-cut lettuce. *International Journal of Food Microbiology* **214**: 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.015>
- Oliveira, M., Viñas, I., Colàs, P., Anguera, M., Usall, J., Abadias, M. (2014). Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiology* **38**: 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.018>
- Rossi, L. P. R., Almeida, R. C. C., Lopes, L. S., Figueiredo, A. C. L., Ramos, M. P. P., Almeida, P. F. (2011). Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian fresh sausage and control of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100. *Food Control* **22**(6): 954–958. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.001>
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., Kim, H.-S., Ha, S.-D. (2017). Effectiveness of a phage cocktail as a biocontrol agent against *L. monocytogenes* biofilms. *Food Control* **78**: 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.056>
- Soni, K. A., Nannapaneni, R. (2010a). Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *Journal of Food Protection* **73**(1): 32–38. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.1.32>
- Soni, K. A., Nannapaneni, R. (2010b). Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *Journal of Food Protection* **73**(8): 1519–1524. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.8.1519>

CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

PRIMERA. La elevada prevalencia de resistencia a antibióticos observada en las cepas de *Listeria monocytogenes* estudiadas pone de manifiesto la importancia de adoptar medidas encaminadas a controlar la resistencia de este microorganismo a los antimicrobianos, especialmente teniendo en cuenta la necesidad de tratamiento con antibióticos en los casos de listeriosis invasiva. Las correlaciones positivas encontradas entre las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y las concentraciones mínimas bactericidas (MBCs) de biocidas y antibióticos con distintos modos de acción apuntan a la presencia de mecanismos de resistencia cruzada o de co-resistencia.

SEGUNDA. El contacto de diferentes grupos de bacterias patógenas con concentraciones subinhibitorias de biocidas de uso habitual en la Industria Alimentaria (aditivos, descontaminantes o desinfectantes) provoca una reducción de la susceptibilidad de las cepas a los compuestos, la adaptación cruzada a otros biocidas y un aumento de su resistencia a los antibióticos, a la vez que modifica la hidrofobicidad de la superficie celular (aspecto que se encuentra relacionado con la capacidad de las bacterias para formar biofilm). Por ello, debería evitarse el uso de concentraciones subinhibitorias de biocidas en los entornos de procesado de alimentos.

TERCERA. La citometría de flujo es una técnica útil, rápida y sencilla, para estudiar la resistencia a los antibióticos de las bacterias sometidas a diferentes condiciones. Mediante este método se ha observado que el contacto de *Listeria monocytogenes* con dosis bajas de cloruro de benzalconio y, especialmente, de ácido peracético, incrementa la resistencia de las células bacterianas a la tetraciclina, lo que supone un hallazgo preocupante, ya que se trata de un antibiótico frecuentemente utilizado para el tratamiento de la listeriosis humana.

CUARTA. El método clásico de detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos (UNE-EN ISO 11290-1) tiene la limitación de que no permite detectar las células viables no cultivables. Por otro lado, la q-PCR, técnica para la que se ha establecido un límite de detección de 2,15 log₁₀ ufc/g, no es útil cuando esta bacteria se encuentra en bajas concentraciones. Estas circunstancias ponen de manifiesto la conveniencia de combinar ambas técnicas (clásica y molecular) para mejorar la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

QUINTA. Los elevados niveles microbianos (microbiota aerobia viable, microorganismos psicrotrofos y enterobacterias) encontrados en carne de pollo picada ponen de manifiesto la dudosa calidad higiénica de este alimento. Además, se trata de un reservorio importante de cepas de *Listeria monocytogenes* resistentes a múltiples antibióticos de importancia clínica.

Por ello, es necesario que el manipulador de este producto adopte unas correctas prácticas higiénicas, evitando el insuficiente cocinado de la carne y la contaminación cruzada, con objeto de reducir así el riesgo de listeriosis para el consumidor. De los tres aditivos alimentarios añadidos a la carne picada de pollo, nitrito sódico, nisina y ácido láctico, únicamente el último redujo los niveles microbianos en las condiciones de aplicación. Por otro lado, los tres compuestos provocaron un aumento de los niveles de resistencia a antibióticos en las cepas de *Listeria monocytogenes* presentes de forma natural en la carne.

SEXTA. El análisis de los parámetros estructurales y de las reconstrucciones tridimensionales de los biofilms de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium*, analizados por microscopía láser confocal de barrido, indican que estos microorganismos forman biopelículas compactas sobre poliestireno y vidrio en 24 horas, hecho que enfatiza la necesidad de realizar la desinfección de las superficies y equipos inmediatamente tras su uso con el objeto de prevenir la formación de biofilms por estas bacterias patógenas.

SÉPTIMA. El material de contacto juega un papel importante en la formación de biopelículas por *Listeria*. De los diferentes materiales ensayados, las biopelículas alcanzan su mayor biovolumen en resina, seguida de poliestireno. En vidrio, y sobre todo en grafeno, las biopelículas producidas presentan el menor biovolumen, por lo que los recubrimientos de monocapa de grafeno pueden ser de utilidad práctica para reducir la formación de biopelículas por esta bacteria.

OCTAVA. El biovolumen y la distribución de las bacterias en los biofilms depende de la presencia de otros grupos microbianos. Se ha observado que los biofilms mixtos presentan un modelo espacial de doble capa, con las bacterias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* o *Enterococcus faecium*) en el fondo del biofilm y las células de *Salmonella enterica* situadas la capa superior. Este patrón de distribución en dos capas debería tenerse en cuenta a la hora de desarrollar procedimientos efectivos de desinfección.

NOVENA. A concentraciones de 1,5MIC, el cloruro de benzalconio reduce marcadamente la biomasa, pero no la viabilidad, de las biopelículas de *Listeria monocytogenes*. Estos resultados sugieren que podría producirse el desprendimiento de células vivas de las biopelículas tratadas con concentraciones bajas de este desinfectante, lo que implicaría la posible diseminación de bacterias vivas a partir del biofilm, con el consiguiente riesgo para la Salud Pública.

DÉCIMA. Las concentraciones subinhibitorias de cloruro de benzalconio pueden favorecer el desarrollo de biopelículas en cepas de *Listeria monocytogenes* resistentes a este compuesto, en diferente medida según los mecanismos de resistencia involucrados. Se trata de un

hallazgo destacable, teniendo en cuenta que la formación de biopelículas juega un papel importante en la persistencia de este microorganismo en las instalaciones de procesamiento de alimentos. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de aplicar concentraciones de biocidas adecuadas con el objeto de prevenir la formación de biopelículas por *Listeria monocytogenes*.

DECIMOPRIMERA. Se ha demostrado la potencial utilidad del bacteriófago P100 como una estrategia alternativa eficaz para el control y erradicación de los biofilms formados por *Listeria monocytogenes*, con óptimos resultados a concentraciones iguales o superiores a $8 \log_{10}$ ufp/ml.

DECIMOSEGUNDA. Los resultados de esta Tesis Doctoral encajan en el enfoque Una Salud, y permiten una mejor comprensión de los fenómenos de resistencia a los antibióticos, tolerancia a los biocidas y capacidad para formar biofilm en bacterias zoonóticas sometidas a diferentes condiciones. Este conocimiento puede ser de utilidad para optimizar las estrategias encaminadas al control de estos desafíos para la Salud Pública tanto en la Industria Alimentaria como en el Sistema Sanitario.

CONCLUSIONS

FIRST. The elevated resistance to antibiotics observed in the strains of *Listeria monocytogenes* studied highlights the importance of adopting measures designed to control the antimicrobial resistance of this microorganism, especially considering the need for treatment with antibiotics in cases of invasive listeriosis. The positive correlations found between the minimal inhibitory concentrations (MICs) and the minimal bactericidal concentrations (MBCs) of the biocides and antibiotics with different modes of action point to the presence of cross-resistance or co-resistance mechanisms.

SECOND. Contact of different groups of pathogenic bacteria with subinhibitory concentrations of biocides frequently used in the food industry (additives, decontaminants or disinfectants) reduces the susceptibility of the strains to the compounds and causes cross-adaptation to other biocides and an increase in their resistance to antibiotics, while also modifying the hydrophobicity of the cellular surface (an aspect found to be related to the capacity of the bacteria to form biofilm). Therefore, the use of subinhibitory concentrations of biocides in food processing environments must be avoided.

THIRD. Flow cytometry is a useful, fast and simple technique to study the resistance to antibiotics of bacteria subject to different conditions. With this method, it has been observed that contact between *Listeria monocytogenes* and low doses of benzalkonium chloride, and especially of peracetic acid, increases the resistance of the bacterial cells to tetracycline, which is a worrying finding because this antibiotic is frequently used to treat human listeriosis.

FOURTH. The classic method to detect *Listeria monocytogenes* in food (UNE-EN ISO 11290-1) has the limitation that it cannot detect the non-cultivable viable cells. Furthermore, q-PCR, a technique for which a detection limit of $2.15 \log_{10}$ cfu/g has been established, is not useful when this bacterium is found in low concentrations. These circumstances highlight the advisability of combining the two techniques (classic and molecular) to improve the detection of *Listeria monocytogenes* in food.

FIFTH. The elevated microbial levels (viable aerobic microbiota, psychrotrophs and enterobacteria) found in minced chicken show the questionable hygienic quality of this foodstuff. Furthermore, it is an important reservoir of strains of *Listeria monocytogenes* that are resistant to many clinically important antibiotics. Therefore, handlers of this product must adopt appropriate hygienic practices, avoid undercooking the meat and cross-contamination, with the aim of reducing the risk of listeriosis for the consumer. Of the three additives used in minced chicken, sodium nitrite, nisin and lactic acid, only the latter reduced microbial levels in

the conditions of application. Furthermore, all three compounds caused an increase in the levels of resistance to antibiotics in the strains of *Listeria monocytogenes* naturally present in meat.

SIXTH. Analysis of the structural parameters and tridimensional reconstructions of the biofilms of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* analysed by confocal laser scanning microscopy indicate that these microorganisms form compact biofilms on polystyrene and glass in 24 hours, emphasising the need to disinfect surfaces and equipment immediately after their use to prevent the formation of biofilms by these pathogenic bacteria.

SEVENTH. The contact material plays an important role in the formation of biofilms by *Listeria*. Of the different materials trialled, the biofilms reach their largest biovolume in resin, followed by polystyrene. The biofilms produced on glass and especially on graphene present the smallest biovolume, so single-layer graphene covers can be of practical use to reduce the formation of biofilms by this bacterium.

EIGHTH. The biovolume and distribution of bacteria in biofilms depend on the presence of other microbial groups. It has been observed that mixed biofilms present a double layered spatial model with Gram-positive bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* or *Enterococcus faecium*) at the bottom of the biofilm and cells of *Salmonella enterica* in the upper layer. This pattern of distribution in two layers must be considered when developing effective disinfection procedures.

NINTH. At concentrations of 1.5MIC, benzalkonium chloride markedly reduces the biomass but not the viability of biofilms of *Listeria monocytogenes*. These results suggest that the detachment of live cells from biofilms treated with low concentrations of this disinfectant could occur, implying the possible dissemination of live bacteria from the biofilm, with the consequent public health risk.

TENTH. Subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride could facilitate the development of biofilms in strains of *Listeria monocytogenes* resistant to this compound, in different measures depending on the mechanisms of resistance involved. This is an important finding considering that the formation of biofilms plays an important role in the persistence of this microorganism in food processing plants. These results show the importance of applying adequate concentrations of biocides with the aim of preventing the formation of biofilms by *Listeria monocytogenes*.

ELEVENTH. The potential usefulness of the bacteriophage P100 as an effective alternative strategy to control and eradicate biofilms formed by *Listeria monocytogenes* has been demonstrated, with optimum results at concentrations equal to or greater than $8 \log_{10}$ pfu/ml.

TWELFTH. The results of this doctoral thesis fit in the One Health approach and allow a better understanding of the phenomena of resistance to antibiotics, tolerance to biocides, and the capacity to form biofilm of zoonotic bacteria subject to different conditions. This knowledge could be useful to optimise strategies designed to control these public health challenges in both the food industry and the health system.

ANEXO I: PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN 1 (CAPÍTULO I)

Cristina Rodríguez-Melcón, Carlos Alonso-Calleja, Camino García-Fernández, Javier Carballo, Rosa Capita (2022). Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for twelve antimicrobials (biocides and antibiotics) in eight strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology* **11**(1), 46. <https://doi.org/10.3390/biology11010046>

PUBLICACIÓN 2 (CAPÍTULO VIII)

Cristina Rodríguez-Melcón, Félix Riesco-Peláez, Javier Carballo, Camino García-Fernández, Rosa Capita, Carlos Alonso-Calleja (2018). Structure and viability of 24- and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology* **76**, 513-517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>

PUBLICACIÓN 3 (CAPÍTULO IX)

Cristina Rodríguez-Melcón, Carlos Alonso Calleja, Rosa Capita (2019). Architecture and viability of the biofilms formed by nine *Listeria* strains on various hydrophobic and hydrophilic materials *Applied Sciences* **9**(23), 5256. <https://doi.org/doi:10.3390/app9235256>

PUBLICACIÓN 4 (CAPÍTULO X)

Cristina Rodríguez-Melcón, Alicia Alonso-Hernando, Félix Riesco-Peláez, Camino García-Fernández, Carlos Alonso-Calleja, Rosa Capita (2021). Biovolume and spatial distribution of foodborne Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria in mono- and dual-species biofilms. *Food Microbiology* **94**, 103616. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103616>

PUBLICACIÓN 5 (CAPÍTULO XI)

Cristina Rodríguez-Melcón, Félix Riesco-Peláez, Camino García-Fernández, Carlos Alonso-Calleja, Rosa Capita (2019). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* planktonic cultures and biofilms to sodium hypochlorite and benzalkonium chloride. *Food Microbiology* **82**, 533-540. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.020>

PUBLICACIÓN 6 (CAPÍTULO XII)

Cristina Rodríguez-Melcón, Rosa Capita, Juan José Rodríguez-Jerez, Joaquín V. Martínez-Suárez, Carlos Alonso-Calleja (2019). Effect of low doses of disinfectants on the biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* **16**(4), 262-268. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2472>

PUBLICACIÓN 7 (CAPÍTULO XIII)

Cristina Rodríguez-Melcón, Rosa Capita, Camino García-Fernández, Carlos Alonso-Calleja (2018). Effects of bacteriophage P100 at different concentrations on the structural parameters of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Food Protection* **81**(12), 2040-2044. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-177>

