



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE
BIOPELÍCULAS DE *Salmonella sp.* EN EQUIPO
DE PROCESAMIENTO CÁRNICO DE ACERO
INOXIDABLE**

POR

JOSÉ ALBERTO MOSQUEDA MENDOZA

TESIS APROBADA POR LA

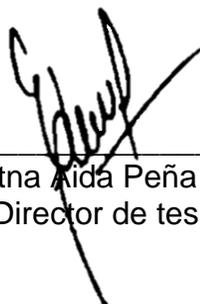
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de José Alberto Mosqueda Mendoza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias, dentro del programa de Maestría en Ciencias del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.



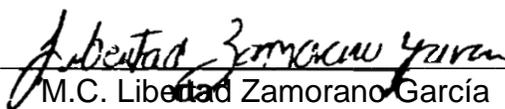
Dra. Etna Aida Peña Ramos
Director de tesis



Dra. Andreia Bianchini Huebner
Asesor

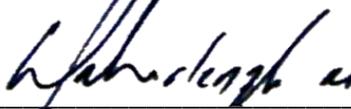


Dra. Susana Scheuren Acevedo
Asesor



M.C. Libertad Zamorano García

Asesor



M.C. Martín Valenzuela Melendres
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenido en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los recursos económicos brindados.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) por permitirme realizar mi Maestría en Ciencias y así lograr una meta más planteada como parte de mi formación profesional.

A la Universidad de Nebraska-Lincoln (UNL), especialmente al Dr. Rolando Flores, por otorgarme la oportunidad de realizar el trabajo de investigación en sus instalaciones, así como por el apoyo económico dado para solventar mi estancia.

A mis asesores de tesis: Dra. Etna Aida Peña Ramos, Dra. Andreia Bianchini, Dra. Susana Scheuren Acevedo, M.C. Libertad Zamorano García y M.C. Martín Valenzuela Melendres; primeramente por su tiempo, guía y recomendaciones dadas en esta investigación, pero sobre todo por su apoyo incondicional durante momentos en los que no parecía que llegaría a este punto, muchas gracias.

A la Dra. Etna Aida Peña Ramos, nuevamente, por su dirección en esta tesis, y la confianza puesta en mí años atrás. Agradezco todo su desempeño, dedicación, aportaciones, consejos, y cariño. De manera particular, quisiera agradecerle por no perder la fe en mí aún cuando yo ya lo había hecho. Por su calidad humana, que había olvidado que aún existía en las personas. Por su insistencia en seguir adelante y ayuda a completar este trabajo, estoy seguro que sin usted no hubiera logrado esta meta.

A la Dra. Andreia Bianchini, por brindarme la gran oportunidad de realizar la estancia en la Universidad de Nebraska-Lincoln de la cual se obtuvo la información experimental de este trabajo, así como las herramientas y equipos necesarios para completar el proceso experimental. Le agradezco su paciencia y tiempo, sus aportaciones en este trabajo y sus llamadas de atención enmarcadas en torno a esta investigación.

Así también, a la M.C. Libertad Zamorano, por su cariño y preocupación por mí, por sus consejos y apoyo.

A la Q.B. Thalia Yamileth Islava Lagarda, por su apoyo, consejos, paciencia y tiempo.

A la Dra. Gloria Yépiz Plascencia, por EL apoyo brindado para lograr completar este trabajo.

A la Dra. Carol Valenzuela Martinez y su esposo, Dr. Mauricio Redondo Solano, muchísimas gracias por toda su ayuda y apoyo brindado durante mi estancia en la ciudad de Lincoln. Por sus tiempo, consejos y amistad.

A la Dra. Jayne Stratton, por su gran apoyo y colaboración durante mi estancia en la Universidad de Nebraska-Lincoln.

De igual manera, a la técnico del laboratorio de análisis microbiológicos, Robin Krokstrom, por su guía en el laboratorio, su ayuda y amistad. Muchas gracias.

Al Dr. You Zhou, por su ayuda y apoyo con las imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía Confocal.

A mis compañeros del laboratorio de análisis microbiológicos: M.C. Bismarck Martínez, M.C. Maricarmen Estrada, M.C. Carmen Cano, M.C. Yulie Meneses, Y Jorge Custódio, por su apoyo y colaboración en el laboratorio, así como sus consejos y ayuda.

DEDICATORIA

A mi abuelo: Jesús Mendoza Frasquillo. Si bien ya no estás aquí, fue la forma en la que viviste - la manera en la que nunca te rendiste a pesar de a adversidad, de siempre buscar una salida - lo que me ayuda a seguir adelante, a seguir tratando, no importa lo difícil que parezca. Si bien nunca tuviste una vida sencilla, tu alegría de vivir es un ejemplo a seguir y tu recuerdo me acompaña todos los días. Muchas gracias por todos los años que estuviste a mi lado, por tus enseñanzas y cariño, esta tesis te la dedico a ti.

A mi abuela: Rosa Amelia Lara Espinoza. Le agradezco por haberme educado y cuidado durante mi niñez, por ser mi segunda mamá. Gracias por su tiempo y su fortaleza. Que Dios le de muchos años más para que esté con nosotros.

A mis padres: Juana Mendoza Lara y Francisco César Mosqueda. Soy lo que soy gracias a ustedes; gracias por su paciencia y comprensión, porque a pesar de todo, han dado su mayor esfuerzo para darme lo mejor. Gracias por los valores inculcados, por el tiempo invertido y por las lagrimas derramadas. Gracias por los abrazos y sonrisas. Gracias por estar conmigo pese a todo.

A mi hermano: Juan Francisco Mosqueda Mendoza. Cuando era niño, recuerdo que en cada oportunidad que tenía, no pedía por ropa o juguetes, sino por un hermanito. Se que ya no somos tan unidos como antes, pero te quiero y te agradezco por estar aquí, por las experiencias que vivimos juntos, por las alegrías y tristezas, gritos y risas. Espero que crezcas a ser un hombre bueno, exitoso y feliz.

A mis tíos, primos y sobrinos. Gracias por todas las experiencias que hemos vivido juntos, por su cariño y ayuda.

A la Dra. Aida y M.C. Libertad, gracias por todo su apoyo y su ayuda incondicional desde que comencé mi tesis de licenciatura, hace 4 años atrás. Gracias por sus conocimientos, consejos y amistad.

A todos mis amigos: gracias por aguantar mi locura y mis bromas. Los quiero.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
ATENCEDENTES.....	4
Biopelículas.....	4
Formación de biopelículas.....	5
Estructuras extracelulares	7
Sustancias poliméricas extracelulares.....	8
Comunicación entre células.....	9
Propiedades de la superficie y parámetros ambientales.....	10
Prevención de biopelículas.....	12
Eliminación de biopelículas.....	13
Proceso de sanitización de la industria alimentaria.....	13
Limpieza.....	14
Desinfectantes químicos.	14
Métodos físicos.....	16
Microorganismos Patógenos Formadores de Biopelículas de Importancia en la Industria Cárnica.....	16
<i>Listeria monocytogenes</i>	17
<i>Salmonella spp</i>	19
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	26
Objetivos Específicos.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27

CONTENIDO (continuación...)

Preparación de Cepas Bacterianas.....	27
Preparación de superficies de acero inoxidable.....	27
Cinética de formación de biopelículas.....	28
Enumeración de biopelículas.....	28
Evaluación de Biopelícula por Microscopía Electrónica de Barrido.....	29
Evaluación de Biopelícula por Microscopía Confocal.....	30
Evaluación de transferencia de células de <i>Salmonella sp.</i> en biopelícula hacia material cárnico.....	30
Evaluación del proceso de sanitización de la industria cárnica.....	31
Diseño experimental y análisis estadístico.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
Cinética de crecimiento de <i>Salmonella</i> Heidelberg y <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	33
Evaluación de Biopelícula por Microscopía Electrónica de Barrido.....	36
Evaluación de Biopelícula por Microscopía Confocal.....	39
Transferencia de <i>Salmonella</i> Heidelberg y <i>Salmonella</i> Typhimurium hacia carne de Pollo.....	42
Efecto del Proceso de Sanitización en la Eliminación de Biopelículas de <i>Salmonella</i> Heidelberg y <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	45
CONCLUSIONES.....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto de la temperatura y tipo de superficie en la velocidad de crecimiento de distintos serovares de <i>Salmonella enterica</i>	20
Cuadro 2. Transferencia celular de biopelículas de <i>Salmonella</i> Heidelberg (S.He) y <i>Salmonella</i> Typhimurium (S.Ty) hacia pechuga de pollo.....	44
Cuadro 3. Efecto de cada paso del proceso de sanitización en el cuenta viable celular de la biopelícula de <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	46
Cuadro 4. Efecto de cada paso del proceso de sanitización en el cuenta viable celular de la biopelícula de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de desarrollo de biopelículas bacterianas.....	6
Figura 2. Cinética de crecimiento de la biopelícula de <i>Salmonella</i> (a) Heidelberg y (b) Typhimurium durante un periodo de 24 h (Log UFC/mL \pm error estándar).....	34
Figura 3. Conformación de biopelículas de <i>Salmonella</i> Heidelberg a las 24 h en superficies de acero inoxidable (a:304, b:316, c:316 pulido) evaluada por microscopía electrónica de barrido. Barra de escala: 10 μ m.....	37
Figura 4. Morfología de biopelículas de <i>Salmonella</i> Typhimurium a las 24 h en superficies de acero inoxidable (a:304, b:316, c:316 pulido) evaluada por microscopía electrónica de barrido. Barra de escala: 10 μ m.....	38
Figura 5. Morfología de biopelículas de <i>Salmonella</i> Heidelberg a las 24 horas en superficies de acero inoxidable a: 304, b: 316, c: 316 pulido evaluada por microscopía confocal. (Barra de escala: 50 μ m)	40
Figura 6. Conformación de biopelículas de <i>Salmonella</i> Typhimurium a las 24 horas en superficies de acero inoxidable (a: 304, b: 316, c: 316 pulido) por microscopía confocal (Barra de escala: 50 μ m)	41
Figura 7. Superficie del acero inoxidable (a) 304, (b) 316 y(c) 316 Pulido (en cada uno de los pasos de sanitización: inicial (I), prelavado (PL), lavado: Foam Chlor 535 (S1) y Sterilex (S2), para <i>Salmonella</i> Heidelberg (escala de las imágenes: 10 μ m).....	49
Figura 8. Superficie del acero inoxidable (a) 304, (b) 316 y(c) 316 Pulido (en cada uno de los pasos de sanitización: inicial (I), prelavado (PL), lavado: Foam Chlor 535 (S1) y Sterilex (S2), para <i>Salmonella</i> Typhimurium (escala de las imágenes: 10 μ m)	50

RESUMEN

Salmonella spp. es uno de los microorganismos patógenos con mayor incidencia de contaminación durante el procesamiento de la carne, ya que tiene la habilidad de crecer a temperaturas de procesamiento y de formar biopelículas sobre diferentes tipos de superficies de contacto. El propósito de este estudio fue evaluar la cinética de formación de biopelículas de *Salmonella enterica* sobre diferentes tipos de acero inoxidable, así como evaluar su facilidad de transferencia hacia un alimento cárnico y la efectividad del proceso de sanitización utilizado por la industria cárnica para poder eliminarlas. La formación de biopelículas de dos serovares, *S. Heidelberg* y *S. Typhimurium*, sobre 3 tipos de acero inoxidable: 304, 316 y 316 pulido, fue evaluada en un bioreactor por 24 h a 37°C y su estructura y conformación fue valorada por microscopía electrónica de barrido (MEB) y por microscopía confocal (MC), respectivamente. Se evaluó el efecto de aplicar presión (10 y 50 g/cm²) sobre la superficie de contacto en la transferencia de células de las biopelículas formadas, hacia un alimento cárnico (pechugo de pollo). Se determinó también la eficacia de las etapas de sanitización: prelavado con agua caliente (50°C), y lavado con un detergente comercial (Foam Chlor o Sterilex) para eliminar las células viables (cuenta microbiana) y las biopelículas formadas (MC) en las diferentes superficies. Los resultados de la cinética de formación mostraron un crecimiento a las 2 h de más de 3 Log UFC/mL, para ambos serovares, independientemente del tipo de acero inoxidable. A las 24 h, el número de microorganismos en las biopelículas formadas por ambos serovares, en todos los tipos de superficies evaluadas, fue similar ($P > 0.05$) con un valor promedio de 5.63 ± 0.41 UFC/mL. Sin embargo, las imágenes de MEB y MC evidenciaron diferencias importantes de estructura y conformación entre serovares y por efecto del tipo y rugosidad del acero inoxidable. Por otro lado, la transferencia bacteriana de las biopelículas con 24 h de formación hacia la carne de pollo, no se vio modificada por el tipo

de acero inoxidable ($P > 0.05$), sin embargo varió entre el 65 y $> 99\%$ en función del serovar y la presión de contacto. *S. Typhimurium* se transfirió con mayor facilidad ($P < 0.05$) que *S. Heidelberg* y su transferencia se incrementó con la presión de contacto ($P < 0.05$). En el proceso de sanitización industrial, el prelavado con agua caliente no redujo la cuenta inicial viable de los microorganismos de ambos serovares, independientemente del tipo de acero inoxidable. En cambio, en la etapa de lavado, la aplicación de Foam Chlor o Sterilex eliminó las células viables de ambos serovares en las superficies estudiadas. No obstante, las imágenes por MC evidenciaron que Foam Chlor fue más efectivo para eliminar los restos celulares en las biopelículas (de ambos serovares) de la superficie, especialmente del acero inoxidable pulido. Por lo anterior, se puede concluir que ambos serovares de *Salmonella enterica*, tiene la habilidad de formar biopelículas sobre diferentes superficies de acero inoxidable en un tiempo menor a 24 h. Sin embargo, el tipo y rugosidad de la superficie modifican su estructura y conformación. Además, se pudo establecer que las células presentes en estas superficies pueden ser transferidas con gran facilidad hacia un producto cárnico. La etapa de lavado con detergentes comerciales eliminó por completo las células viables de estas biopelículas, sin embargo, en superficies de acero rugosas persistió la presencia de material celular.

Palabras clave: Biopelícula, *Salmonella Heidelberg*, *Salmonella Typhimurium*, acero inoxidable, bioreactor, microscopia electrónica, microscopia confocal, transferencia, carne, proceso de sanitización.

ABSTRACT

Salmonella sp. is a pathogenic microorganism with high occurrence in the meat industry, due to its ability to survive processing temperatures and to form biofilms in a wide variety of contact surfaces. The purpose of this study was to evaluate the kinetics of biofilm formation by *Salmonella enterica* on the surface of different types of stainless steel (304, 316 and 316 polished), to evaluate the transferability of the formed biofilms to a meat sample, and to evaluate the biofilm elimination efficiency of the sanitization process used by the meat industry. The biofilm formation of two serotypes of *Salmonella enterica*, Heidelberg and Typhimurium, was evaluated for 24 h at 37°C with the use of a bioreactor. The structure of the biofilm and its conformation on the surface of stainless steel was assessed with a Scanning Electron Microscope (SEM) and a Confocal Microscope (CM), respectively. The effect of applying pressure (10 and 50 g/cm²) to the contact surface on the transferability of *Salmonella* cells from the biofilm to a meat sample (chicken breast) was also evaluated. Finally, the efficiency of different sanitization steps: pre-rinsing with hot water (50°C) and washing with a commercial detergent (Foam Chlor or Sterilex) to eliminate *Salmonella sp.* viable cells (cell count) and the remaining biofilm structures on the different surfaces (using CM) was evaluated as well. Both *Salmonella* serotypes were able to growth more than 3 Log CFU/mL after 2 h, regardless of the type stainless steel. At 24 h, the number of microorganisms, despite of the serotype or stainless steel type, was the same ($P>0.05$), with a mean of 5.63 ± 0.41 CFU/mL. Nevertheless, SEM and CM images showed important differences in structure and conformation of the biofilms, depending on the serotype and the type and finishing of the stainless steel surface. The cell transferability of the 24 h biofilms to the meat sample was between 65 to >99%. This was not affected by the stainless steel type ($P>0.05$); nevertheless, the serotype and applied pressure did have an effect, with a higher cell transfer

($P < 0.05$) observed with *S. Typhimurium* than with *S. Heidelberg* to the chicken sample, characteristic that increased with a higher applied pressure. The evaluation of sanitization process indicated that pre-rinsing with hot water was not effective to decrease the initial viable count ($P > 0.05$) of either serotypes or stainless steel surfaces; the detergent step, instead, was effective to eliminate the viable cells of both serotypes in all surfaces, regardless of the type of commercial detergent used. The images obtained by CM proved, however, that Foam Chlor was more effective than Sterilex in the elimination of cellular remains and other polymeric structures of the biofilm (of both serotypes) in all stainless steel surfaces, especially 316 polished. Overall, it can be concluded that both serotypes of *Salmonella enterica* were able to form biofilms on the different stainless steel surface in less than 24 h. The type of surface and its finishing, nonetheless, had an effect on the biofilm structure and conformation. Also, the cell transferability from the biofilm to a meat sample was very high. And the sanitization process eliminated all viable cells from the biofilm; however, cellular remains persisted in rough surfaces.

KEYWORDS: Biofilm, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Typhimurium, stainless steel, bioreactor, Scanning Electron Microscopy, Confocal Microscopy, transferability, meat, sanitization process.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con lo publicado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), anualmente se presentan cerca de 48 millones de casos de enfermedades ocasionadas por el consumo de alimentos contaminados, de los cuales, 128,000 personas resultan hospitalizadas y aproximadamente 3000 mueren. Los casos de contaminación por *Salmonella* representa la causa principal de todas las enfermedades gastrointestinales reportadas, con aproximadamente 35% de las hospitalizaciones y 28% de las muertes. Esta misma institución reporta que en el año 2013 y hasta mayo del 2014, se han presentado tres botes de intoxicación por el consumo de pollo contaminado por *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, con un total de más de 717 personas infectadas. Por otra parte, otros tres brotes de intoxicación por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se presentaron en el mismo lapso de tiempo, con 415 personas infectadas.

A diferencia de lo que se creía anteriormente, las bacterias que se hallan en la naturaleza no se encuentran aisladas en forma monocelular, sino que forman parte de biopelículas. Éstas, son estructuras bacterianas multicelulares que tienen la capacidad de adherirse a distintas superficies sólidas, en toda clase de medio ambiente y de producir una matriz que rodea a las células bacterianas, que incluye polisacáridos extracelulares, proteínas y ADN (Epstein, Pokroy, Seminara, & Aizenberg, 2011).

Las características propias de las biopelículas dependen de las condiciones ambientales y la superficie donde éstas se desarrollan, los genes bacterianos específicos y los tipos de productos extracelulares que se concentran en la matriz de la biopelícula (Marchand, De Block,

De Jonghe, Coorevits, Heyndrickx, & Herman, 2012). Sin embargo, son las biopelículas formadas por microorganismos altamente patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, entre otras, las que más preocupan a la industria alimentaria, ya que representan un riesgo latente para el consumidor.

En la industria de los alimentos, los utensilios o superficies de contacto pueden estar fabricados con distintos tipos de materiales como plástico, caucho, vidrio, cemento y acero inoxidable. El uso de este último es recomendado debido a su alta resistencia a la corrosión y estabilidad química. Los aceros inoxidables tipo 304 y 316 son los más utilizados para la fabricación de partes de equipos y superficies de contacto, respectivamente (BSSA, 2001). No obstante lo anterior, estas características no hacen a este material inmune al crecimiento de distintos microorganismos, como *Salmonella*, ya que distintos estudios han encontrado que este patógeno tiene la capacidad de formar biopelículas en dichas superficies (O'Leary, Cabe, McCusker, Martins, Fanning, Duffy, 2013; Patel, Singh, Macarisin, Sharma, Shelton, 2013; Schlisselberg & Yaron, 2013).

En Estados Unidos, el proceso de limpieza la industria cárnica está regido por la FSIS/USDA (Food Safety Inspection Service/United States Department of Agriculture), quién dicta las acciones necesarias para asegurar la inocuidad de las plantas procesadoras, así como de los productos cárnicos producidos, y es utilizada como base para distintas normas sanitarias alrededor de mundo. Este proceso puede ser dividido en 6 grandes pasos, que son: 1) Limpieza en seco, 2) Prelavado, 3) Lavado con detergente, 4) Enjuague de detergente, 5) Sanitización con agente químico 6) Enjuague/secado. En el primer paso, se realiza una remoción manual de restos de alimentos mediante cepillados, aspirados o raspados. Una vez realizado este paso, se realiza un prelavado, donde equipos y utensilios son lavados con agua caliente ($T^{\circ}= 40-60^{\circ}\text{C}$). Posteriormente, se utiliza un detergente con un agente espumante, permitiendo que éste se mantenga en contacto por un tiempo determinado con equipos, paredes y pisos. Después, se da una remoción del detergente

mediante un enjuague con agua y se aplica un agente químico (como cloro, sales cuaternarias, peróxido de hidrógeno, entre otros). Finalmente, todas las superficies son enjuagadas y secadas para reanudar el procesado de alimentos (Food Safety Inspection Service, 1999). Sin embargo actualmente, el paso 3 y 5 han sido unificados ya que la mayoría de los detergentes ahora poseen un agente químico, reduciendo así el tiempo de limpieza.

Actualmente, no existen estudios suficientes sobre la factibilidad de formación de biopelículas de *Salmonella enterica* serovar Heidelberg y serovar Typhimurium en distintas superficies de acero inoxidable. Tampoco sobre la capacidad que tienen éstas para liberar células hacia el alimento después de un tiempo mínimo de contacto o qué tan efectivo es el proceso de sanitización utilizado por la industria para la eliminación de estos patógenos, por lo que es fundamental abocar un estudio que resuelva estas interrogantes.

ANTECEDENTES

Biopelículas

Una fuente de contaminación microbiológica en la industria alimentaria que casi no se toma en cuenta son las biopelículas bacterianas. Si bien un alimento es generalmente considerado como inocuo, es la capacidad que tiene la mayoría de las bacterias para crecer en distintas superficies lo que finalmente pudiera terminar por contaminar a éste, lo que provoca una deterioración prematura del alimento o enfermedades ocasionadas por el consumo del alimento contaminado (Marchand *et al.*, 2012).

Anteriormente se pensaba que las bacterias eran organismos singulares sin ningún tipo de interacción entre ellas. Sin embargo, investigaciones posteriores demostraron que la mayoría de los microorganismos presentes en la naturaleza forman parte de biopelículas – estructuras multicelulares que tienen la capacidad de adherirse a distintas superficies sólidas, en toda clase de medio ambiente y que tiene la capacidad de producir una matriz que rodea a las células bacterianas, que incluye polisacáridos extracelulares, proteínas y ADN (Epstein, Pokroy, Seminara, & Aizenberg, 2011). Se ha establecido que por cada organismo en estado planctónico (o libre) que se detecta, pueden existir cerca de 1000 organismos de la misma especie en biopelículas (Marchand *et al.*, 2012).

Formación de Biopelículas

El desarrollo de una biopelícula es el resultado de la unión y subsecuente crecimiento de microorganismos en una superficie (Figura 1), los cuales pueden ser de una misma y/o diferentes especies de bacterias hasta formar una sola capa de estructuras tridimensionales.

Las biopelículas son ecosistemas bacterianos largos y complejos, los cuales poseen distintos canales de agua en su interior, lo cual permite el tránsito de nutrientes, metabolitos y productos de desecho (Sauer, Rickard, & Davies, 2007). Estas características le confieren a las bacterias que forman las biopelículas una mayor resistencia al estrés provocado por el ambiente, como el estrés oxidativo, falta de nutrimentos, desecación y exposición a los rayos UV, así como a distintos agentes antimicrobianos. Además, se ha observado que una célula dentro de una biopelícula es 1000 veces más resistente a la mayoría de los agentes sanitizantes que su contraparte libre (de la Fuente-Núñez, et al., 2012).

La formación de una biopelícula madura puede tomar desde algunas horas hasta varias semanas, en función del sistema en que va a desarrollarse (Mittelman, 1998). Por ejemplo, se observó que *Pseudomonas aeruginosa*, encontrada en equipo médico, forma una unión con el acero inoxidable dentro de los primeros 30 segundos de exposición (Florjanic & Kristl, 2011). Si bien el crecimiento de una biopelícula puede darse al ritmo dado por la división celular de las bacterias que la componen, ésta liberará periódicamente células “pioneras” para colonizar otros sectores del área donde se encuentra unida (Marchand *et al.*, 2012).

Distintos factores son asociados con el proceso de fijación y desprendimiento de las biopelículas, como la disponibilidad de nutrientes, oxígeno, estrés provocado por el movimiento, la actividad metabólica y la expresión genética de los microorganismos, entre otros (Marchand *et al.*, 2012).

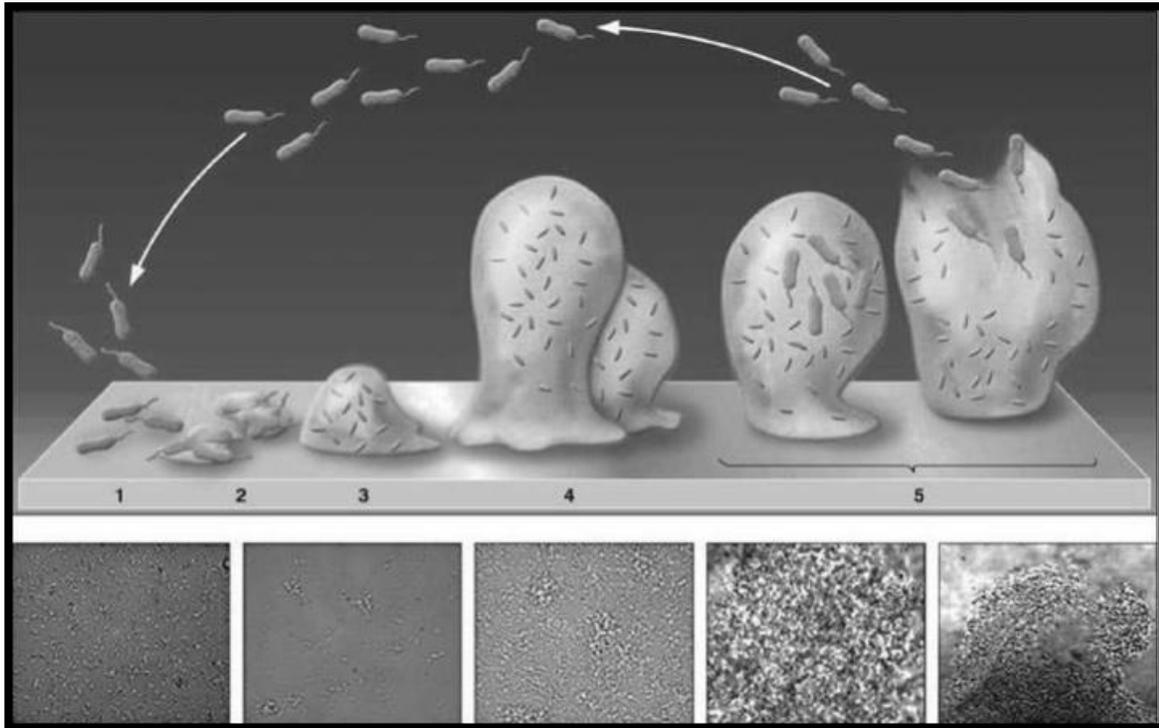


Figura 1. Etapas de desarrollo de biopelículas bacterianas. Etapa 1: Unión inicial de células a la superficie. Etapa 2: producción de polisacáridos extracelulares, resultando en una unión más firme. Etapa 3: Desarrollo de la estructura inicial de la biopelícula. Etapa 4: Maduración de la arquitectura de la biopelícula. Etapa 5: Dispersión de células dentro y fuera de la biopelícula. Las imágenes de la parte inferior muestran las 5 etapas del desarrollo de *P. aeruginosa* (Marchand *et al.*, 2012).

El desprendimiento de las biopelículas se ha dividido en 3 procesos: erosión, abrasión y desprendimiento (Garny, Horn, & Neu, 2008). Las primeras dos se refieren a la liberación continua de células individuales o pequeños pedazos de la biopelícula provocada por efecto del movimiento o presión de algún fluido, así como por la colisión con distintas partículas, la cual tiene un efecto únicamente en la superficie de ésta. El desprendimiento, por otra parte, se refiere a la pérdida instantánea de una gran parte de la biopelícula, lo que tiene un efecto en la estructura completa de ésta (Morgenroth, 2003).

Las características propias de las biopelículas dependen de las condiciones ambientales y la superficie donde ésta se desarrolla, los genes bacterianos específicos y los tipos de productos extracelulares que se concentran en la matriz de la biopelícula (Marchand *et al.*, 2012).

Estructuras extracelulares. Muchas células producen apéndices extracelulares filamentosos, los cuales tienen un papel importante en la unión a las distintas superficies. Entre las estructuras conocidas se encuentran: flagelos, pilis, tallos y rizoides (Harbron & Kent, 1988). Los flagelos son estructuras extracelulares formadas por la proteína flagelina, con una estructura de hélice y se extiende desde el citoplasma hasta la pared celular. Los flagelos son responsables de la movilidad bacteriana y pueden llegar a medir hasta 10 μm . Se cree que la principal función del flagelo en la formación de una biopelícula es la de transportar y comenzar con las interacciones iniciales en la superficie celular (Sauer & Camper, 2001). Se piensa que la movilidad que los flagelos proporcionan logra superar las fuerzas de repulsión de la superficie a la cual la célula quiere unirse, y por lo tanto, es posible la unión de una monocapa de células, el primer paso para la formación de una biopelícula (Daniels, Vanderleyden, & Michiels, 2004).

Los pilis son apéndices filamentosos formados por proteína de una

longitud menor a los flagelos y se encuentran en muchas bacterias gram negativas. La función de estas estructuras no es la movilidad, sino asegurar la adhesión de la célula bacteriana a otras células o a partículas inorgánicas (Harbron & Kent, 1988). Sauer y Camper (2001) sugirieron que estas estructuras son importantes para la adhesión y colonización de superficies, probablemente, una vez que se ha superado la barrera electrostática de repulsión inicial que existe entre la célula y el sustrato.

Sustancias Poliméricas Extracelulares. Las biopelículas logran unirse a distintas superficies mediante la acción conjunta de las estructuras extracelulares (fimbrias, pilis, flagelos), y las sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés), las cuales actúan como un lazo entre las bacterias y el exterior. Las EPS además, tienen la función de mantener las células bacterianas, y otros materiales, unidos entre ellos. La composición de las EPS es de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, fosfolípidos y sustancias húmicas, principalmente. Tuneda y colaboradores (2003) analizaron la composición de las EPS de una biopelícula y encontraron que proteínas y polisacáridos son los componentes mayoritarios, con una proporción de entre 75-89%.

La matriz de EPS actúa como medio de protección para los microorganismos ante condiciones adversas del medio ambiente. La capacidad que tienen las biopelículas para tolerar altas concentraciones de biocidas (sustancias, naturales o sintéticas, que tienen la capacidad de destruir, contrarrestar, neutralizar, o impedir la acción nociva de otro organismo) es un ejemplo de lo anterior. Proteínas y polisacáridos interactúan químicamente con los antimicrobianos, limitando así el contacto de éstos con los microorganismos; además, se ha observado una mutación de las proteínas de membrana de células dentro de una biopelícula, que ocasionan un decremento en la permeabilidad, lo que previene la difusión de estas sustancias hacia el interior de las células (Mah & O'Toole, 2001).

Con excepción de los polisacáridos y proteínas, actualmente no se sabe con exactitud qué papel desempeñan los componentes de la matriz de la biopelícula. Se cree que los lípidos y ácidos nucleicos puedan tener un papel importante en las propiedades reológicas y por consiguiente, un efecto en la estabilidad de la biopelícula. Se ha encontrado que para la formación de biopelículas por parte de *Pseudomonas aeruginosa*, el ADN extracelular es necesario para iniciar la formación de estas macroestructuras, por lo que se piensa que este patrón es seguido por otras bacterias que liberan ADN (Whitchurch, Tolker-Nielsen, Ragas, & Mattick, 2002).

Comunicación entre células. Anteriormente se pensaba que las bacterias eran organismos monocelulares que se adaptaban rápidamente a las diferentes condiciones del ambiente, lo cual les permitía sobrevivir, sin tener algún tipo de comunicación entre ellas. No fue sino hasta los años 60's y 70's que se dieron una serie de descubrimientos de distintas sustancias excretadas por bacterias, que se originó el concepto de comunicación intercelular. Estudios realizados en *Streptomyces griseus*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Vibrio fischeri*, entre otros, encontraron distintas sustancias, autoinductores, que tenían un efecto en la activación de ciertos genes en las bacterias cuando se encontraban en altas concentraciones. A este mecanismo se le conoce como "percepción de quórum o autoinducción" (Anetzberger & Jung, 2009).

Los procesos controlados por autoinducción son aquellos que normalmente no son productivos cuando son realizados por una sola célula pero cuando son realizados por un grupo, son efectivos. Es esta característica, por lo tanto, la que permite a las bacterias actuar como un organismo multicelular. Bioluminiscencia, competencia, diferenciación morfológica, factor de secreción, esporulación y formación de biopelículas, son solo alguna de las funciones que son controladas por la percepción de quórum (Bassler & Losick, 2006).

En la actualidad, aún se están descubriendo nuevas moléculas que

intervienen en el proceso de comunicación celular bacteriano; sin embargo, en general, la autoinducción en bacterias gram negativas se realiza mediante el uso de acil-homoserina lactonas, mientras que las bacterias gram positivas utilizan péptidos cortos con modificaciones químicas. Además, existen familias de compuestos conocidos como autoinductores-2, que se derivan del precursor común 4,5-dihidroxi-2,3 pentanodiona, que intervienen en la comunicación interespecie (Anetzberger & Jung, 2009).

Propiedades de la superficie y parámetros ambientales. El tipo de superficie tiene un efecto directo sobre la facilidad con la cual las células bacterianas se unen a éstas. Se ha observado que dependiendo de la aspereza de la superficie, la facilidad con la que ésta puede ser limpiada y desinfectada, la capacidad de mantener la humedad (determinada por la hidrofobicidad) y la vulnerabilidad al desgaste por el uso, afectan la capacidad de las células bacterianas para adherirse a una superficie en particular, y por lo tanto al desarrollo de una biopelícula (Van Houdt & Michiels, 2010).

En la industria de los alimentos, una amplia variedad de plásticos, caucho, vidrio, cemento y acero inoxidable, son de los materiales más comúnmente utilizados y existen distintos estudios que han tratado de predecir la facilidad con la que las biopelículas pueden formarse en cada uno de estos materiales. Sin embargo, esto no ha sido posible determinarse ya que la facilidad que tiene una biopelícula para formarse en determinada superficie se ve afectada por factores ambientales y por las características propias de la bacteria. Un ejemplo de lo anterior es el efecto que tiene la disponibilidad de nutrientes y la temperatura en la facilidad de adherencia de *L. monocytogenes* al cloruro de polivinilo (PVC), niplon y acero inoxidable, ya que estos dos factores alteran las propiedades fisicoquímicas de la superficie bacteriana (como la hidrofobicidad/hidrofilicidad), así como la carga de ésta (Moltz & Martin, 2005).

En ambientes de procesamiento de alimentos, la unión de bacterias a las distintas superficies se ve afectada además por el efecto de los constituyentes

de la matriz alimenticia. Somers y Wong (2004), observaron que residuos de productos cárnicos de alimentos listos para consumir (extracto de carne, grasa de puerco, etc.), reducía la formación de las biopelículas de *L. monocytogenes* inicialmente. Sin embargo, con el tiempo estos residuos incrementaron el número de células dentro de la biopelícula, además de prolongar la resistencia de ésta en una variedad de materiales en los que se incluía el acero inoxidable, plásticos, concreto, entre otros.

La superficie de contacto más utilizada en la industria de alimentos es el acero inoxidable, específicamente grado 304 y 316, debido a su estabilidad química, mecánica y física a distintas temperaturas de procesamiento, además de su facilidad de limpieza y su alta resistencia a la corrosión (Zottola & Sasahara, 1994). El grado del acero inoxidable indica la composición de éste y ambos tipos pueden ser pulidos, dependiendo de la utilización que se le desee dar a éste. El acero inoxidable 304 es una aleación de hierro con cromo y níquel, mientras que el 316 además de estos tres elementos cuenta con molibdeno, el cual le confiere una mayor resistencia a la corrosión por los alimentos, detergentes y desinfectantes. El acero inoxidable 304, generalmente es utilizado para partes de equipos (componentes que requieran ser moldeados o soldados), así como en pipas, equipos de bombeo, etc., donde el pH es cercano a la neutralidad. La aleación 316, en cambio, es utilizada para superficies que estén en contacto con alimentos corrosivos, como carne o sangre, y que además requieran ser limpiados frecuentemente (BSSA, 2001).

En México, en la Norma Oficial Mexicana NOM-008-ZOO-1994, la cual dicta las especificaciones zoonosanitarias para la construcción y equipamiento para el sacrificio de animales y los dedicados a la industrialización de productos cárnicos, recomienda la utilización de acero inoxidable para las superficies de contacto con alimentos debido a su alta resistencia a la corrosión y facilidad de limpieza (NOM, 1994). De manera similar, en Estados Unidos, el Código de Regulaciones Federales (CFR, por sus siglas en inglés), título 21, parte 110, subíndice C, sección 110.40, detalla las características que deben de tener los equipo y utensilios utilizados por la industria de los alimentos, las cuales deben

estar cubiertas en su totalidad por el acero inoxidable (FDA, 2014).

Las superficies que se encuentran en contacto con los alimentos son tratadas con desinfectantes y agentes sanitizantes que contienen peróxidos, cloroaminas o hipocloritos. Este último puede resultar particularmente agresivo con el acero inoxidable, dependiendo del pH. La liberación de cloro puede causar la formación de pequeñas picaduras en la superficie, lo que facilita la adhesión de bacterias y posterior formación de biopelículas. Es por esto, que es de vital importancia controlar la temperatura a la cual se realizan los tratamientos de limpieza y desinfección, y realizar un lavado completo con agua como el último paso de todo el proceso de sanitización (BSSA, 2001).

Prevención de Biopelículas

La unión microbiana a las superficies, especialmente a las superficies con una fuente de nutrientes alta, como las de procesamiento de alimentos, ocurre de manera relativamente rápida, por lo tanto, resulta imposible limpiar y desinfectar con la suficiente frecuencia para evitar la adhesión bacteriana. No obstante, la limpieza y desinfección es fundamental para así evitar la maduración de la biopelícula, la disponibilidad de los nutrientes y la acumulación de residuos de alimentos, que afecta la inocuidad del material (Van Houdt & Michiels, 2010).

La industria alimentaria ha puesto en marcha distintas estrategias con la finalidad de prevenir o eliminar las biopelículas; algunas de éstas se describen a continuación:

- Usar equipo de racionamiento: Este tipo de equipo permite disminuir el tiempo que el alimento pasa en estado estático. Esto facilita la limpieza, y a su vez puede resultar en una reducción en la unión de microorganismos a la superficie de equipos de procesamiento.
- Uso de materiales sanitarios: Las propiedades sanitarias de un material

pueden ser alteradas mediante la modificación de características específicas, incrementando así su poder antibacteriano o mediante la reducción de la susceptibilidad a unión de microorganismos. Un ejemplo de esto fue evaluado por Dong y colaboradores (2005), quienes aplicaron capas de glicol de polietileno al acero inoxidable, y redujeron la capacidad de *L. monocytogenes* para unirse y formar biopelículas en dicha superficie, con una disminución del 81-96%. Incorporación de antimicrobianos a la superficie. Otra forma con la cual se ha intentado prevenir la formación de biopelículas es aplicar una capa de antimicrobiano. Gottenbos y colaboradores (2001) utilizaron un recubrimiento con amonio cuaternario para reducir la velocidad de infección en implantes de silicón. Por otra parte, otros autores, como Hashimoto (2001) y Klueh y colaboradores (2000), aplicaron plata como agente antimicrobiano en superficies para picar alimentos, con una disminución en la formación de biopelículas de *Staphylococcus epidermidis*.

Además de lo anterior, para asegurar un programa de control eficiente, es necesario tener un sistema de detección de biopelículas adecuado. Existen varios métodos que se utilizan comúnmente, como el conteo de células viables totales, técnicas espectroscopias y microscópicas, entre otras. Cada técnica tiene sus ventajas y desventajas, y una combinación de éstas es la mejor manera de asegurar una detección más eficiente y así valorar la efectividad de las estrategias para evitar o eliminar las biopelículas (Van Houdt & Michiels, 2010).

Eliminación de Biopelículas

Proceso de sanitización en la industria alimentaria. Mediante el uso de buenas prácticas de higiene, parte del programa de buenas practicas de manufactura, es la manera más sencilla de prevenir la formación de biopelículas en el

procesamiento de alimentos. Sin embargo, es el proceso de sanitización, la principal estrategia que tiene implementada la industria alimentaria para eliminar la presencia de biopelículas una vez que éstas han sido formadas. Este proceso contempla diferentes acciones, las cuales van encaminadas a desprender, eliminar y evitar la formación de biopelículas.

Limpieza: El principal objetivo del proceso de limpieza es la remoción de residuos alimenticios así como la eliminación de posibles microorganismos patógenos y deterioradores, en los que se incluyen las biopelículas. Es de vital importancia que los métodos utilizados aseguren la correcta limpieza de los residuos alimenticios depositados en las superficies de contacto con los alimentos ya que una remoción defectuosa facilita la unión de bacterias a la superficie en contacto con los alimentos, así como la formación de biopelículas. Más aún, la efectividad de los desinfectantes también se ven afectada, disminuye su utilidad, cuando existen partículas de alimentos o suciedad en las superficies (Van Houdt & Michiels, 2010).

La mayoría de los métodos usados de manera común, en la mayoría de las industrias alimentarias, se basa en la utilización conjunta de limpieza en seco y húmeda. La primera se da mediante acciones de cepillados, raspados, y aspirados, mientras que la segunda utiliza limpiadores con agentes ácidos o básicos en combinación con el cepillado de la superficie, así como detergentes (Food Safety Inspection Service, 1999).

El uso de agua caliente (40-60°C) por un período mayor a 30 s es sugerido por FSIS (por sus siglas en inglés, Food Safety and Inspection Service) para la remoción de grasas y otros compuestos no polares de las superficies en contacto con los alimentos. Este paso puede incluir la utilización de detergentes, para asegurar la remoción lipídica. Una vez realizado el proceso de limpieza manual, se procede a usar distintos desinfectantes químicos, como cloro, yodo, peróxido de hidrógeno, entre otros, para la eliminación de microorganismos en la superficie.

Desinfectantes químicos: Los desinfectantes químicos son ampliamente utilizados en la industria de los alimentos y pueden dividirse en distintos grupos de acuerdo al tipo de acción: (i) los agentes oxidantes incluyen los compuestos basados en cloro, peróxido de hidrógeno, ozono, entre otros, (ii) compuestos sustractivos incluyen a los compuestos amoniacales cuaternarios y a los ácidos aniónicos, y (iii) yodóforos. La eficacia de cada uno de ellos se ve influenciada por el pH, la temperatura, la concentración, el tiempo de contacto y las sustancias orgánicas que puedan interferir con la acción de éstos, como pueden ser tierra y partículas de alimentos. Es por esto que generalmente los detergentes se combinan con sanitizantes, para así obtener un efecto sinérgico que asegure la eficacia del proceso de desinfección. Es importante mencionar que si bien cierto sanitizante puede ser efectivo para la eliminación de células bacterianas en estado libre, éste mismo puede no ser tan efectivo cuando estas mismas células se encuentran dentro de una biopelícula. Esto se debe parcialmente a la interferencia que presenta la matriz exopolimérica de la biopelícula (Van Houdt & Michiels, 2010). Mayer (2001) realizó un estudio en el cual evaluó la eficacia de los desinfectantes en la eliminación de células en biopelículas, y concluyó que la eficacia incrementaba a partir de los compuestos amoniacales cuaternarios (los menos efectivos), al cloro, biguanidas hasta llegar a ácidos piróxicos (los más efectivos).

En la industria de los alimentos, el uso de ozono ha ganado interés para ser utilizado como sanitizante. Las tres moléculas de oxígeno tienen un fuerte poder oxidante (52% más que el cloro) y ha mostrado ser efectivo para la eliminación de una amplia variedad de microorganismos, más aún que el cloro y otros desinfectantes, con eficacia tanto en células libres como en biopelículas. Sin embargo, actualmente aún no hay información suficiente sobre su efectividad en biopelículas en distintas superficies o el efecto que tiene la temperatura, pH, tiempo de contacto u otras sustancias en la efectividad del ozono (Van Houdt & Michiels, 2010).

Actualmente, existen pocos estudios donde se evalúe la efectividad de sanitizantes comerciales en la eliminación de biopelículas bacterianas, por lo

que es necesario más estudios enfocados a evaluar específicamente en este tema.

Métodos físicos: Además de la utilización de sanitizantes químicos, la industria de los alimentos está en búsqueda de alternativas que sean más rápidas y menos peligrosas. Niemira y Solomon (2005) mostraron que la radiación ionizante tiene una efectividad mayor o igual en contra las biopelículas de *Salmonella sp.* que contra las células libres, por lo que podría ser útil para el tratamiento de sanitización en una gran variedad de superficies en contacto con alimentos. Otra técnica importante es la utilización del ultrasonido, el cual puede incrementar la eficacia de distintos biocidas, como el ozono (Baumann, Martin, & Feng, 2009). Finalmente, otra técnica que incrementa la efectividad de los biocidas y antibióticos es el uso de campos eléctricos. El efecto bioeléctrico se basa en que hay una mejor penetración de los compuestos activos a través de la biopelícula, por lo cual se requiere de una menor concentración de estos para la eliminación de la biopelícula bacteriana, a niveles muy cercanos a los utilizados para las células en estado libre (Van Houdt & Michiels, 2010).

Estos métodos de limpieza son utilizados en general por toda la industria de alimentos, incluida la industria cárnica, para la eliminación de microorganismos que se encuentran en estado libre o protegidas dentro de biopelículas. En la sección siguiente, se puntualizan cuáles son los microorganismos y las biopelículas de particular preocupación para la industria cárnica, debido a su alta patogenicidad y capacidad de crecimiento en ambientes de procesamiento.

Microorganismos Patógenos Formadores de Biopelículas de Importancia en la Industria Cárnica

Distintos microorganismos pueden representar un alto riesgo sanitario en la industria cárnica debido a su facilidad de crecimiento a temperaturas de procesamiento en superficies con nutrientes limitados. Entre éstos, las bacterias con mayor riesgo de inocuidad e incidencia de contaminación en superficies de procesamiento cárnico son *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.* Estos microorganismos, además tienden a formar biopelículas, las cuales le facilitan aún más su desarrollo en dicho ambiente. Estas bacterias, sus características y la formación de biopelículas son descritas a continuación.

Listeria monocytogenes. Bacilo corto, gram positivo, anaerobio facultativo, no esporulado, móvil, que puede crecer a pH entre 4.6 y 9.5, una actividad de agua de hasta 0.92 y temperaturas entre 1-45°C, siendo 30-37°C su temperatura óptima (Pascual Anderson & Calderón , 2000). Esta bacteria puede causar desde una gastroenteritis hasta infecciones severas en el torrente sanguíneo y/o sistema nervioso central, que depende de la susceptibilidad del huésped (Carpentier & Cerf, 2011). En humanos, la listeriosis se caracteriza por encefalitis, meningitis o sepsis. Las mujeres embarazadas infectadas con esta bacteria pueden presentar síntomas similares a la influenza, mientras que el nonato puede infectarse con meningitis o septicemia neonatal, lo que aumenta el riesgo de aborto espontaneo, normalmente en el tercer trimestre de gestación (Taormina & Beauchat, 2002). La letalidad de listeriosis severa oscila entre el 20 y 30% (Buchanan, Lindqvist, Ross, Smith, Todd, & Whiting , 2004).

L. monocytogenes tiene la capacidad de formar biopelículas, las cuales tienden a crecer en las distintas superficies de los equipos utilizados para el procesamiento de la carne. Los mecanismos de formación de esta biopelícula, sin embargo, aún no están bien establecidos, pero gran parte de su fácil formación se adjudica a la alta movilidad conferida por la flagela de la bacteria (Lemon, Higgins, & Kolter, 2007).

En las plantas donde se procesan productos cárnicos, tanto frescos como procesados, se ha observado que una vez que la bacteria ha entrado a la

planta, ésta puede sobrevivir por varios meses, inclusive años, en los desagües del piso. Éstos son excelentes lugares para el crecimiento de distintas biopelículas, como la producida por *Pseudomonas putida*, la cual coloniza superficies húmedas bajas en nutrientes y facilita el crecimiento de *L. monocytogenes* (Berrang, Frank, & Meinsermann, 2010).

Las biopelículas formadas por *L. monocytogenes* se han hecho cada vez más resistentes a bactericidas y otros compuestos utilizados generalmente en la industria para la eliminación de microorganismos patógenos y deterioradores, por lo que es necesario establecer nuevas técnicas de inocuidad y limpieza que aseguren la seguridad del producto alimenticio. Berrang, Frank y Meinersmann (2010) observaron que la adición de iones de plata no afectaba la formación de biopelículas en tablas de plástico utilizadas para el corte de carne fresca. Bonaventura y colaboradores (2008) encontraron que *L. monocytogenes* formaba biopelícula con mayor facilidad en acero inoxidable y vidrio a 37°C. Rodriguez y McLandsborough (2007) encontraron que *L. monocytogenes* se transfiere con una mayor facilidad desde acero inoxidable hacia la *Bolonia*, que desde el polietileno de baja densidad. Además, una baja concentración de humedad facilitaba el traspaso de esta bacteria.

La pérdida del flagelo en la célula de *L. monocytogenes* disminuye la capacidad de unión en la superficie del acero inoxidable; sin embargo, esto genera una biopelícula más resistente (Todhanakasem y Young, 2008). Bremer, Monk y Butler (2002), observaron que cuando el pH del cloro se ajustaba a 6.5, tenía un mejor efecto en la eliminación (92.2-99.8%) de *L. monocytogenes* independientemente de la concentración (200-600 ppm) o tiempo de exposición (0-20 min). Robbins, Fisher, Moltz y Martin (2005), encontraron que 150 ppm de cloro por 5 min a 20°C lograba una eliminación completa (5.79 Log UFC/mL) de esta bacteria en acero inoxidable. Un sanitizante comercial alcalino con hipoclorito de sodio logró reducir más de 3 Log UFC/mL en 86.1% de biopelículas formadas en distintas superficies de un simulante de planta que elaboraba de alimentos listos para consumir (Somers y Wong, 2004). Fatemi y Frank (1999), probaron que 160 ppm de ácido peracético, en combinación con

hipoclorito de sodio, reducía a menos de 3 Log UFC/cm² de *L. monocytogenes* después de 1 minuto. Robbins y colaboradores (2005), observaron que la exposición a 5% de H₂O₂ reduce la presencia de *L. monocytogenes* en acero inoxidable, en 4.14 Log UFC/mL después de 10 min de exposición y una eliminación completa después de 15 min a 20°C. Por otra parte, Pan y colaboradores, en 2006, encontraron que esta bacteria generaba resistencia a tres sanitizantes distintos, donde su ingrediente activo era peróxido de hidrógeno, después de una semana de exposición

Salmonella spp. Gran grupo de bacterias gram negativas las cuales tienen un efecto patógeno tanto en animales como en seres humanos. En 2013, la salmonelosis en Estados Unidos ocupó el primer lugar en enfermedades más comunes, con un total de 7,277 casos confirmados en humanos, y una tasa de mortalidad del 0.1% (Centers for Disease Control and Prevention, 2014). En 2011, esta misma institución reportó que los casos de salmonelosis no han decrecido en los últimos 15 años, sino que ha habido un alarmante aumento del 10% en años recientes, en comparación con otras enfermedades causadas por otros microorganismos, como por la Shiga toxina producida por *E. coli* O157:H7, en las cuales ha habido un decremento. El hábitat de la *Salmonella spp.* es generalmente el tracto digestivo de distintos vertebrados, donde productos derivados de aves de corral, han sido su principal vehículo de contagio (MacDougall *et al.*, 2004).

Este grupo de bacterias tiene la característica de sobrevivir por períodos extensos en ambientes desfavorables. Los serovares de *Salmonella enterica*: Enteritidis, Typhimurium, Newport, Javana, y Heidelberg, son los de mayor preocupación para la industria cárnica de acuerdo a lo reportado por FSIS. Las biopelículas formadas pueden crecer fácilmente en distintas superficies, como acero inoxidable, plástico, vidrio, cemento, mármol y granito, las cuales se encuentran normalmente en granjas, mataderos, industria de alimentos, cocinas, entre otros (Giaouris, Chorianopoulos, Skandamis, & Nychas, 2012).

Cuadro 1. Efecto de la temperatura y tipo de superficie en la velocidad de crecimiento de distintos serovares de *Salmonella enterica*.

Espece	Superficie	Condiciones	Referencia
S. Thyphimurium	Acero inoxidable (304)	18 h a 37°C	Oleary, <i>et al.</i> , 2013; Patel <i>et al.</i> , 2013
	Acero inoxidable (316)	24 h a 24°C	Schlisselberg & Yaron, 2013
	Polietileno	12 h a 28°C	Pui <i>et al.</i> , 2011
	Policarbonato	34 h a 37°C	Patel <i>et al.</i> , 2013
S. Welteveden	Polietileno de alta densidad	48 h a 28°C	Joseph <i>et al.</i> , 2001
S. Typhi	Polietileno	12 h a 28°C	Pui <i>et al.</i> , 2011

Los fluidos provenientes de los alimentos, que contienen distintas concentraciones de nutrientes, entran en contacto con las superficies de procesamiento, pueden ser absorbidos por éstas, y ocasionar que la adherencia de distintas cepas de *Salmonella spp.* sea más fácil. Son las superficies con menos nutrientes donde se da un mayor desarrollo de biopelículas (Stepanović, Cirković, Ranin, & Svabić-Vlahović, 2004). Un estudio realizado por Marin y colaboradores (2009) mostró que los riesgos más importantes de contaminación por *Salmonella* en granjas de aves, eran el polvo, superficies y heces; además, cerca del 50% de las cepas aisladas tenían la capacidad de producir biopelículas, independientemente de la cepa.

Debido a la alta incidencia de *Salmonella* en la cadena de alimentos, así como su capacidad de formar biopelículas en ambientes de procesamiento de alimentos, éste microorganismo se ha convertido en un factor de riesgo importante para la salud, que es necesario controlar. De acuerdo con lo reportado por Hood y Zottola (1997), el medio de crecimiento y las condiciones de la superficie, afectan la facilidad de adhesión de *S. Typhimurium*. Además, un estudio realizado con 122 cepas de *Salmonella* mostró que generalmente, había una mayor producción de biopelículas cuando había un bajo nivel de nutrientes, que es generalmente el caso en la industria de alimentos (Stepanovic, Cirkovic, Mijac, & Svabic-Vlahovic, 2003).

El crecimiento de biopelículas también puede ser afectado por el tipo de superficie y la temperatura (cuadro 1). Oleary y colaboradores (2013), así como Patel y colaboradores (2013) observaron que *S. Typhimurium* formaba una biopelícula después de 18 horas de crecimiento en una superficie de acero inoxidable 304, cuando la temperatura era de 37°C. Este mismo serovar, sin embargo, requería de un mayor tiempo de crecimiento (24 horas) cuando la temperatura decrecía a 24°C, en el acero inoxidable 316 (Schlisselberg & Yaron, 2013). En el caso de una superficie plástica, *S. Typhimurium* requirió de

12 horas a 28°C y de 34 horas a 37°C para formar una biopelícula en polietileno y policarbonato, respectivamente (Pui *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2013). Las investigaciones publicadas hasta el momento en acero inoxidable se han enfocado al estudio de biopelículas después de 18 horas de crecimiento, por lo que es necesario un mayor enfoque a las primeras horas de formación, ya que el proceso de sanitización en la industria de alimentos generalmente se realiza cada cambio de turno.

Como ya se mencionó anteriormente, las propiedades de la superficie y las características fisicoquímicas influyen la adherencia de las biopelículas. Sinde y Carballo (2000) observaron que la hidrofobicidad y energía libre no afectan la unión de *Salmonella* al acero inoxidable, caucho y politetrafluoretileno. Sin embargo, Ukuku y Fett (2002) encontraron una correlación lineal positiva entre la hidrofobicidad de la superficie de la superficie bacteriana y la fuerza que las biopelículas de *Salmonella* se unían a la superficie de melón. Abban, Jakobsen, y Jespersen (2012), observaron por otra parte, que una menor hidrofobicidad de la superficie bacteriana favorecía la formación de biopelícula de *S. Typhimurium* P6 en la superficie de aluminio, plástico y acero inoxidable, independientemente de la rugosidad.

Existen distintos factores que contribuyen a la tasa de transferencia de un microorganismo desde una superficie al alimento, como son: la composición del alimento, el tipo de superficie, el tiempo de residencia de la bacteria en la superficie y el tiempo de contacto entre el alimento y la superficie. De acuerdo a lo reportado por Moore y colaboradores (2003), el número de células de *Salmonella* Typhimurium que se transfiere de cupones de acero inoxidable a lechuga, varía dependiendo si esta está seca o húmeda, siendo mayor cuando ésta estaba seca (65% más).

El estar dentro de una biopelícula le confiere a las células de *Salmonella* una resistencia significativamente mayor a antibióticos y sanitizantes al compararse con las células libres (Giaouris, Chorianopoulos, Skandamis, & Nychas, 2012). Se han realizado diversas investigaciones para evaluar el efecto de diferentes sanitizantes para eliminar estas macromoléculas. Otta,

Karunasagar, y Karunasagar (2001), observaron que la aplicación de 100 ppm de cloro por 15 min lograba la eliminación completa (3×10^5 UFC/cm²) de *Salmonella weltevreden* de una superficie de acero inoxidable. Lapidot, Romling y Yaron (2006), de manera similar, encontraron que la utilización de 100 y 200 ppm de cloro lograba una reducción de 2.0 y 1.9 Log UFC/g de *S. Typhimurium* ATCC 14028. Nguyen y Yuk (2013) evaluaron la resistencia a sanitizantes comerciales (compuestos amoniacales, mezcla de ácido peroxiacético y ácidos orgánicos, e hipoclorito de sodio) de biopelículas de *S. Typhimurium* desarrolladas a 37°C en acero inoxidable y encontraron que entre mayor fue el tiempo de desarrollo previo a ser expuestas al sanitizante, estas eran más resistentes al ataque de éste, sin haber alguno que fuera particularmente más efectivo.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente no existe información suficiente sobre la habilidad de *Salmonella sp.* para formar, en tiempos cortos, biopelículas en distintos tipos de superficies de acero inoxidable. Así como tampoco, de la facilidad de contaminación desde la biopelícula al alimento, particularmente a un alimento cárnico; ni si el proceso de sanitización que se emplea en la industria cárnica es suficiente para la completa eliminación de las biopelículas que puede formar este patógeno.

HIPÓTESIS

El tipo de superficie de acero inoxidable afecta la cinética de formación, así como la estructura y conformación de las biopelículas de *Salmonella sp.* y estas biopelículas tienen la capacidad de contaminar a un alimento cárnico y de ser eliminadas por el proceso de sanitización industrial.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la formación y eliminación de biopelículas de *Salmonella sp.* en superficies de acero inoxidable de equipo de procesamiento cárnico, así como determinar la capacidad de contaminación de estas biopelículas a un producto cárnico.

Objetivos Específicos

- Determinar la cinética de formación de biopelículas de *Salmonella sp.* en diferentes superficies de acero inoxidable.
- Determinar la transferencia de células de la biopelícula de *Salmonella sp.* hacia un alimento cárnico.
- Evaluar el efecto de un proceso de limpieza industrial en la eliminación de las biopelículas *Salmonella sp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de Cepas Bacterianas

Para la realización de este experimento, se utilizaron los serovares Heidelberg de *Salmonella enterica* y Typhimurium, los cuales fueron obtenidos de distintas granjas avícolas en Estados Unidos, A cada serovar se le permitió crecer por un período de 24 h a 37°C en 10 mL de caldo soya triptica (Acumedia[®], Bruton, MI, USA), hasta obtener una cuenta de 10⁸ UFC/mL (Bremer y colaboradores, 2002) previo a su utilización en la evaluación de la cinética de formación de biopelículas. Puesto que se usaron dos serovares de la misma subespecie de *Salmonella enterica*, las cepas estudiadas a partir de este punto se referirán simplemente como *Salmonella* Heidelberg y *Salmonella* Typhimurium.

Preparación de Superficies de Acero Inoxidable

El crecimiento de *Salmonella* Heidelberg y *Salmonella* Typhimurium fue evaluado sobre tres superficies de acero inoxidable tipo 304, 316, y 316 pulido, estos dos últimos con rugosidades distintas (BioSurface Technologies, Bozeman, MT, USA) de 1 cm de diámetro por 0.2 cm de grosor. Éstas fueron colocados en tubos y lavados con detergente (Alconox[®], White Plains, NY, USA) por un período de 10 min bajo sonicación (Brason[®] 1210, Danbury, CT, USA). Posteriormente, el detergente fue decantado y 9 mL de agua destilada fueron agregados dentro de cada tubo con el cupón, y se sonicó por 2 min

adicionales. Finalmente, los tubos fueron decantados de nuevo y se realizó una limpieza final con agua destilada, para asegurar la remoción completa del detergente (Pui y colaboradores, 2011).

Cinética de formación de biopelículas

Para evaluar la cinética de formación de biopelículas de *Salmonella* en las diferentes superficies de acero inoxidable se utilizó un bioreactor (Biosurface Technologies, modelo 90, Bozeman, MT, USA) con la capacidad de albergar hasta 24 cupones dentro de un contenedor de policarbonato. Se colocaron 500 mL de caldo soya tripticasa dentro del bioreactor y se agregó 1 mL del inoculo de *Salmonella* Heidelberg o 1 mL de inóculo de *Salmonella* Typhimurium. La cinética de formación de la biopelícula en las superficies de acero inoxidable, dentro del bioreactor, se evaluó por un período de 24 h. Las condiciones de operación del bioreactor fueron: flujo de bombeo (Cole-Parmer[®], Masterflex L/S, Vernon Hills, IL, USA) de 2.9 mL/min de caldo soya tripticasa al 33%, con una agitación de 160 rpm y una temperatura de 37°C. Los cupones fueron analizados a las 2, 4, 6, 8, 16 y 24 h. Una vez transcurrido cada tiempo de crecimiento, los cupones fueron removidos del bioreactor y se realizó un lavado con 2 mL de agua peptonada por cupón, para la remoción de células microbianas no contenidas en la biopelícula. Finalmente se realizó un conteo en placa mediante el proceso que se describe a continuación. Este experimento se realizó por triplicado.

Enumeración de células viables

Una vez que los cupones fueron lavados para remover células sueltas, éstos fueron colocados en tubos con 10 mL de búfer de fosfato y puestos en

un sonicador (Brason 1210, Danbury, CT, USA) por un tiempo de 10 min, para posteriormente hacer las diluciones pertinentes y finalmente realizar una enumeración en placa con agar soya tripticasa. Las placas fueron incubadas (Thermo Scientific Precision mod. 39359-25, Waltham, MA USA) por 24 h a 37°C, con un límite de detección >100 UFC/mL.

Evaluación de Biopelícula por Microscopía Electrónica de Barrido

La evaluación de la biopelícula por microscopía electrónica de barrido se realizó con la finalidad de observar su morfología después de 24 h de crecimiento. Para esto, una vez que se lavaron los cupones con agua peptonada para remover células sueltas, se procedió a realizar una fijación de la biopelícula a la superficie de cada cupón con una solución de glutaraldehído al 2.5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) en un buffer de fosfato 0.1 M, donde permanecieron en refrigeración (10°C) en una placa estéril de 12 pozos, hasta su evaluación. Antes de colocarse en el microscopio, los cupones fueron secados completamente mediante el método de punto crítico, con alcohol etílico en concentraciones de 50-100% de manera consecutiva, utilizando un equipo para punto crítico Balzers CPD 030 (Balzers, Fürstentum Liechtenstein) en combinación con dióxido de carbono a una temperatura de 31.1°C y 72.9 atm de presión. Finalmente, los cupones fueron recubiertos con iones oro (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) en un equipo de recubrimiento, Pelco Sputter Coater, Modelo 3 (Redding, CA, USA) para asegurar la conductividad eléctrica, y se colocaron en un microscopio electrónico de barrido de presión variable marca Hitachi modelo S-3000N a una presión de 270 Pa, un voltaje de 5 KV y una resolución de 10 y 50 µm (Bray, 2000). La escala utilizada fue de 10 µm.

Evaluación de Biopelícula por Microscopía Confocal

La evaluación de la biopelícula por microscopía confocal se realizó con la finalidad de observar la conformación de la biopelícula a lo largo de la superficie de acero inoxidable después de 24 h de crecimiento. Para esto cada cupón fue sumergido en una solución de glutaraldehído al 2.5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) con un buffer de fosfato 0.1 M por al menos 15 min. Posteriormente, cada cupón fue lavado en una solución de alcohol etílico al 30% por 15 min adicionales. Después, éstos fueron teñidos utilizando una solución de 3 ppm de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) por 0.5 min. Finalmente, los cupones fueron lavados con agua peptonada para su evaluación al microscopio. Se utilizó un microscopio confocal invertido marca Olympus modelo IX 81 con un láser a una longitud de onda de 514 nm. La escala utilizada fue de 50 μm .

Evaluación de Transferencia de Células de *Salmonella sp.* en biopelícula hacia material cárnico

Para la evaluación de la transferencia de células de *Salmonella* hacia un producto cárnico, se siguió el protocolo establecido por Flores y colaboradores (2006). Como material cárnico se utilizaron filetes de pechuga de pollo, los cuales fueron adquiridos en un mercado local. Se pesaron 5 g de carne, con una dimensión de 2 cm^2 x 0.5 cm de grosor, y se colocó en una superficie estéril. Posteriormente, un cupón con una biopelícula con 24 h de maduración, previamente lavado con agua peptonada, se colocó sobre la pechuga de pollo y se aplicó una presión de contacto de 10 o 50 g/cm^2 por 15 s a temperatura ambiente. Después de transcurrido este tiempo, se procedió a realizar una dilución 1:10 de la muestra cárnica con agua peptonada (5 g de carne/45 g de agua peptonada). Finalmente, se realizó una homogenización (Seward

Stomacher® 400, Davie, FL, USA) por 1 min y se procedió a hacer un conteo por placa vaciada en agar selectivo para *Salmonella* XLD 4 (Acumedia®, Bruton, MI, USA). Las placas fueron incubadas por 24 h a 37°C, con un límite de detección >10 UFC/mL.

Evaluación del Proceso de Sanitización usado en la Industria Cárnica

Las superficies 304, 316 y 316 pulido con biopelículas de 24 h de formación fueron utilizadas para la evaluación la efectividad de los dos pasos principales del proceso de sanitización establecidos por FSIS/USDA: prelavado con agua destilada caliente (50°C por 2 min) y lavado con detergente comercial por 10 min. Superficies de cada tipo de acero inoxidable con el mismo tiempo de crecimiento (24 h) fueron utilizadas para conocer el número de células presentes al comienzo de la evaluación.

La evaluación de la etapa de lavado con detergente se realizó determinando la efectividad individual de dos detergentes comerciales, Foam Chlor 535 (Birko®, Henderson, CO, USA) y Sterilex Ultra (Sterilex®, Hunt Valley, MD, USA). Estos detergentes fueron aplicados y preparados de acuerdo a las especificaciones del fabricante: 30 mL de Foam Chlor 535 en 1000 mL de agua destilada con una aplicación a 50°C; y 100 mL de solución desinfectante limpiadora Sterilex más 100 mL de solución activadora Sterilex en 1000 mL de agua destilada, aplicado a temperatura ambiente (25°C). Posterior a cada paso del proceso de sanitización se realizó una enumeración en placa con agar soya tripticasa de la población microbiana viable presente en los cupones, siguiendo las especificaciones expuestas anteriormente con un límite de detección >10 UFC/mL.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para la cinética de formación de la biopelícula se realizó un diseño experimental completo al azar con un arreglo factorial 2x3x6 (dos tipos de cepa: *S. Heidelberg* y *S. Typhimurium*, tres tipos de superficie: 304, 316 y 316 P y seis tiempos de muestreo: 2, 4, 6, 8, 16 y 24 h). Log UFC/mL, así como las imágenes obtenidas por las dos técnicas microscópicas fueron la variable respuesta.

El experimento de evaluación de la transferencia de células de *Salmonella* hacia el alimento, tuvo un diseño completo al azar con arreglo factorial 2x3x2 (dos tipos de cepa: *S. Heidelberg* y *S. Typhimurium*, tres tipos de superficie: 304, 316 y 316 P y la aplicación de 2 niveles de presión de contacto: 10 y 50 g/cm²). Este experimento solo tuvo , Log UFC/mL, como variable respuesta.

Para evaluar la efectividad del proceso de sanitización en la eliminación de las biopelículas formadas para cada tipo cepa, se utilizó un diseño experimental completo al azar con arreglo factorial 4x3 (cuatro etapas de sanitización: inicial o referencia, prelavado, sanitizante 1 [Foam Chlor] y sanitizante 2 [Sterilex] y tres tipos de superficie: 304, 316 y 316 P). Las variables respuesta son nuevamente Log UFC/mL Y las imágenes obtenidas por las microscopía confocal.

Para determinar el efecto de los factores sobre los cambios de las variables respuesta cuantificables se realizó un análisis de la varianza de los datos y cuando el efecto de los factores fue significativo ($P > 0.05$), se realizó una comparación de medias por Duncan, con el paquete estadístico NCSS del 2007.

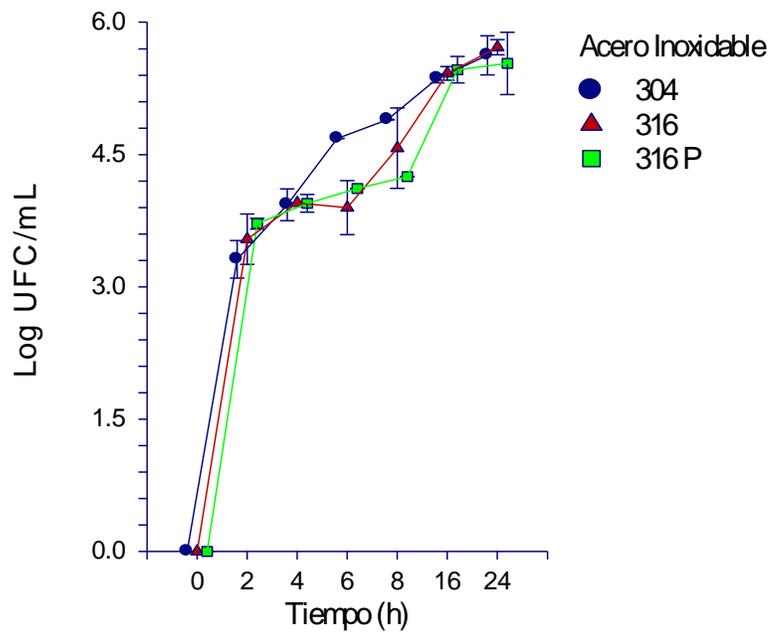
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de crecimiento de *Salmonella* Heidelberg y *Salmonella* Typhimurium

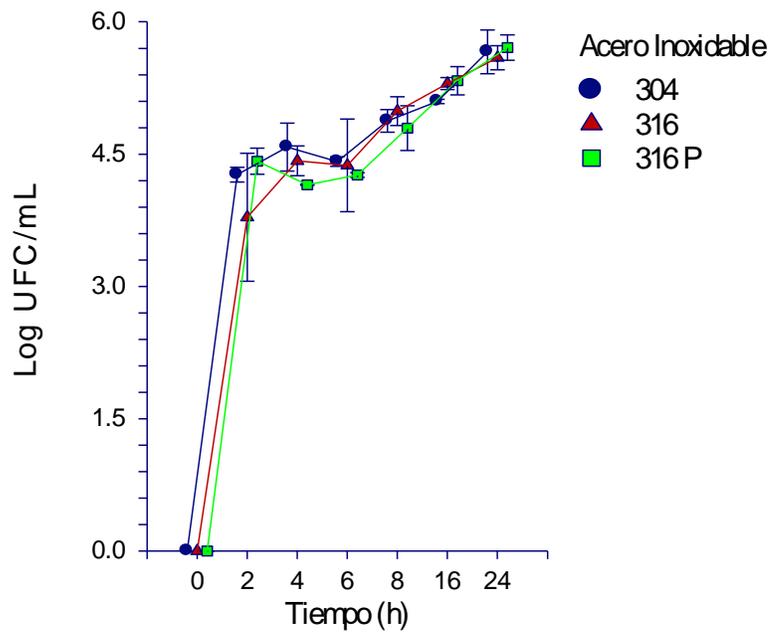
La Figura 2, muestra la cinética de crecimiento para las biopelículas de *S. Heidelberg* y *S. Typhimurium* en un período de 24 h. El número en logaritmos de UFC/ml de *S. Heidelberg* (Figura 2a) no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las superficies de acero inoxidable para cada tiempo de medición, con excepción de la medición obtenida a las 6 horas de formación, EL número de células bacterianas en el cupón de acero inoxidable 304 fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la presentada en los otros dos metales (316 y 316 pulido).

De igual forma, el número de microorganismos del serovar Typhimurium (Figura 2b), con la excepción del cupón de acero inoxidable 316 pulido al tiempo 4 h, fue similar ($P > 0.05$) en las tres superficies de acero inoxidable en los distintos tiempos de muestreo. El acero inoxidable 316 P presentó, a las 4 h de crecimiento, una formación de biopelícula menor ($P < 0.05$) que la obtenida en el acero inoxidable 304 y 316.

La diferencia que se presentó en las primeras horas de formación de la biopelícula en las superficies 304 en comparación con la 316 pulido que se observó en ambos serovares, puede deberse a la diferencia de aspereza que posee la superficie del acero inoxidable 304 en comparación con la 316. Sinde y Carballo (2000), encontraron que una mayor aspereza, como la encontrada en las superficies de acero inoxidable 304, aumenta la facilidad de unión por parte de las células bacteriana. Por otro parte, Schlisselberg y Yaron (2013),



(a)



(b)

Figura 2. Cinética de crecimiento de la biopelícula de *Salmonella* (a) Heidelberg y (b) Typhimurium durante un periodo de 24 h (Log UFC/mL \pm error estándar).

observaron que la cuenta microbiana de *S. Typhimurium* al acero inoxidable 316 era similar en las primeras 24 horas de crecimiento independientemente de la rugosidad del acero inoxidable. Este comportamiento es similar a lo encontrado en esta investigación.

Por otro lado, al comparar la cinética de crecimiento de *S. Heidelberg* con la de *S. Typhimurium* es posible notar que esta última tuvo un crecimiento mayor en los metales 304 y 316 pulido en las primeras horas de crecimiento. Estos resultados contrastan con lo reportado con Díez-García, Capita y Alonso-Calleja (2012) quienes midieron el crecimiento (Log UFC/mL) de distintos serovares de *Salmonella enterica* en superficies de poliestireno, por 48 h, haciendo una cuenta celular cada 2 h, y no encontraron diferencias significativas en la cinética de formación de biopelículas para ningún tipo de serovar. Lo anterior puede deberse primeramente a que el tipo de material fue diferente, por lo que la interacción entre las biopelículas y la superficie difiere; Además, el estudio realizado por Díez-García y colaboradores fue en microplaca, donde el caldo se mantuvo estático, mientras que en el presente estudio fue en un bioreactor con un flujo continuo.

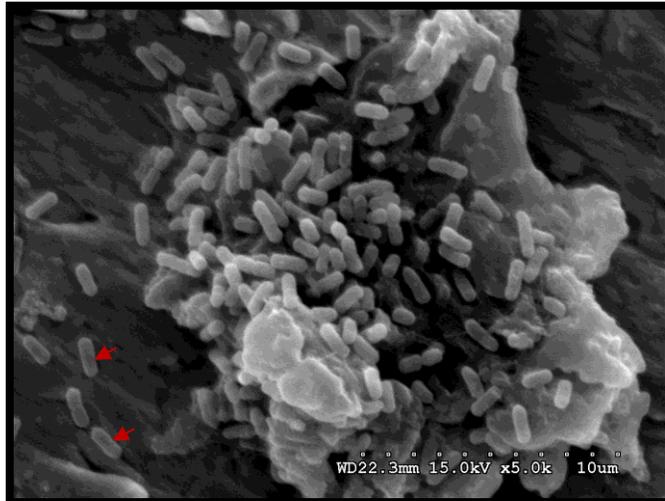
El rango de crecimiento bacteriano, independientemente del serovar estudiado y del tipo de acero evaluado osciló entre 5.53 y 5.71 Log UFC/mL al final de las 24 h. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Wang y colaboradores (2013), Otta y colaboradores (2001) y Chorianopoulos y colaboradores (2010) para la superficie de acero inoxidable 304. En superficies de acero inoxidable 316, Corcoran, y colaboradores (2013) reportaron una cuenta de 5.80 Log UFC/cm² y 5.71 Log UFC/cm² para *S. Angora* y *S. Typhimurium*, respectivamente, por un período de 48 h, valores similares con los encontrados en la presente investigación. Lo anterior permite aseverar que es en las primeras 24 h de crecimiento cuando se da la mayor formación de biopelículas de *Salmonella*.

Evaluación de Biopelícula por Microscopía Electrónica de Barrido

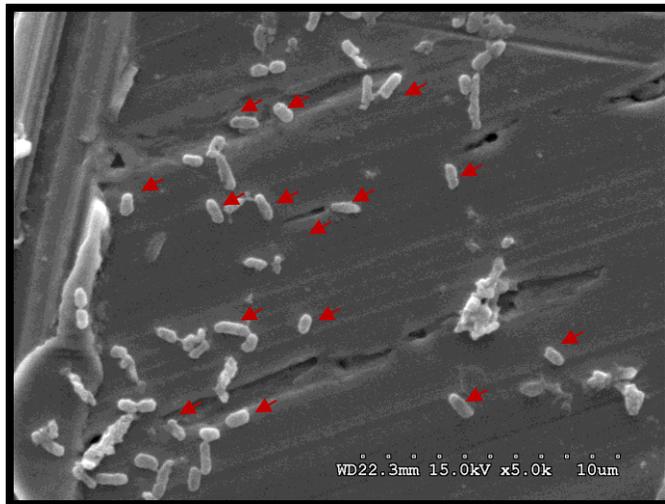
Mediante el uso del microscopio electrónico de barrido se buscó definir las estructuras formadas por ambos serovares a las 24 h de crecimiento. El estudio cinético demostró que no existen diferencias ($P < 0.05$) en la cuenta bacteriana de las biopelículas formadas en las diferentes superficies o serovares evaluados. Sin embargo, se puede observar en las Figuras 3 y 4 que la morfología y las estructuras encontradas en la que estos microorganismos se desarrollaron en los distintos metales, no fue la misma.

En la Figura 3a se puede apreciar como *S. Heidelberg* en el acero inoxidable 304, a las 24 h ya ha formado una biopelícula donde las sustancias poliméricas extracelulares cubren gran parte de los microorganismos, y posee solo una pequeña cantidad de células sueltas (señaladas con rojo). Por otro lado y de manera contrastante, en el acero 316 (Figura 3b) existió un gran número de células sueltas o agrupaciones pequeñas, distribuidas por toda la superficie del metal. Finalmente, la estructura celular en el acero 316 pulido (Figura 3c), permitió apreciar como existió un gran número de células unidas entre ellas en unidades pequeñas, sin llegar a formar biopelículas maduras, puesto que las células bacterianas eran aún discernibles; además, una gran parte de ellas tenían una estructura plana. Este fenómeno podría deberse a la escasez de nutrientes acumulados ocasionado por la falta de rugosidad de este tipo de acero, o también pudo ser ocasionado por el proceso de secado aplicado durante la preparación de la superficie para su evaluación microscópica.

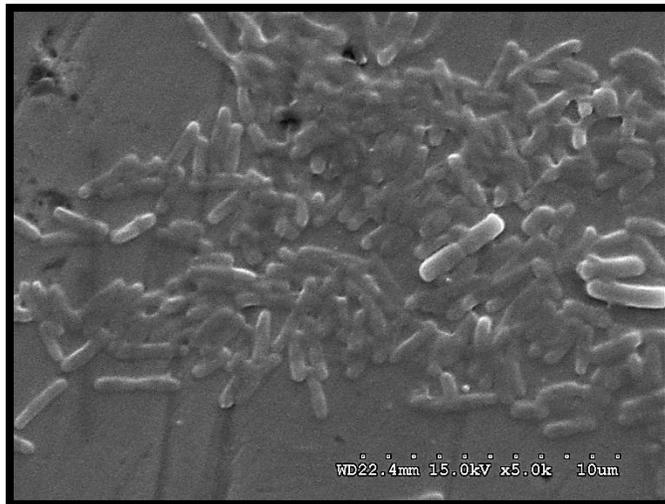
A diferencia de lo observado en *S. Heidelberg* en el acero inoxidable 304, *S. Typhimurium* mostró (Figura 4a) un número considerable de células agrupadas, sin evidenciar aún la formación de sustancias poliméricas extracelulares. En el cupón 316 (Figura 4b) podemos ver como nuevamente existen sólo células sueltas (indicadas con flechas rojas), sin embargo, los espacios entre células son mucho más grandes que en la superficie 304.



(a)

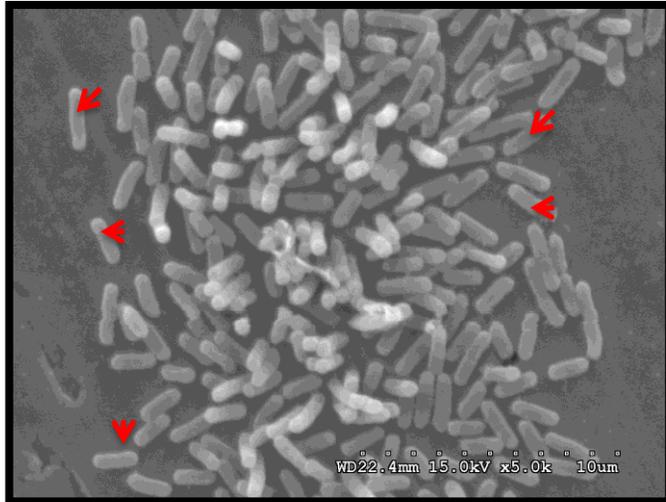


(b)



(c)

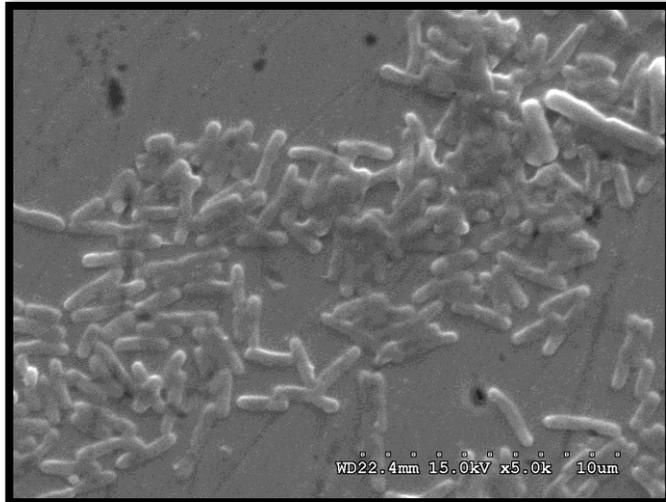
Figura 3. Morfología de biopelículas de *Salmonella* Heidelberg a las 24 h en superficies de acero inoxidable (a:304, b:316, c:316 pulido) evaluada por microscopía electrónica de barrido. Barra de escala: 10 μ m



(a)



(b)



(c)

Figura 4. Morfología de biopelículas de *Salmonella* Typhimurium a las 24 h en superficies de acero inoxidable (a:304, b:316, c:316 pulido) evaluada por microscopía electrónica de barrido. Barra de escala: 10 μ m

En cambio la estructura de *S. Typhimurium* en el acero inoxidable 316 pulido, fue muy similar al que se presentó en el serovar Heidelberg, es decir hubo una gran cantidad de células unidas, sin llegar a ser biopelículas maduras, con estructura plana.

Evaluación de Biopelícula por Microscopía Confocal

Con la técnica de imagen por microscopia confocal fue posible corroborar las diferencias en las conformaciones de las biopelículas de ambos serovares que se desarrollaron en la totalidad del cupón, de las diferentes superficies de acero inoxidable evaluadas (Figuras 5 y 6 respectivamente). Esta técnica microscópica tiñe el ADN de las células microbianas y permite observar las biopelículas a distintos niveles, lo cual se denota por la intensidad del color: cuando el color es más oscuro indica que la biopelícula está localizada hacia el fondo de la biopelícula y cuando éste es más tenue, denota que las células ha comenzado a tener un crecimiento vertical.

En la Figura 5 se observa la conformación de *S. Heidelberg* en los cupones 304, 316 y 316 pulido. Con esta técnica microscópica se puede observar como este serovar crece de manera extendida formando distintas biopelículas (señaladas en verde), en toda la superficie de acero inoxidable 304 (Figura 5a). Además se puede notar por la tonalidad oscura que se observa en la mayor parte de la Figura 5a que el crecimiento fue muy pegado a la superficie, y existieron un número considerable de unidades celulares pequeñas. En el acero 316 (Figura 5b), también se puede observar la formación dispersa de varias biopelículas a distintos niveles en el cupón, sin embargo con un menor número de unidades celulares libres, es decir, la mayor parte de las células presentes se encontraban unidas a las biopelículas.

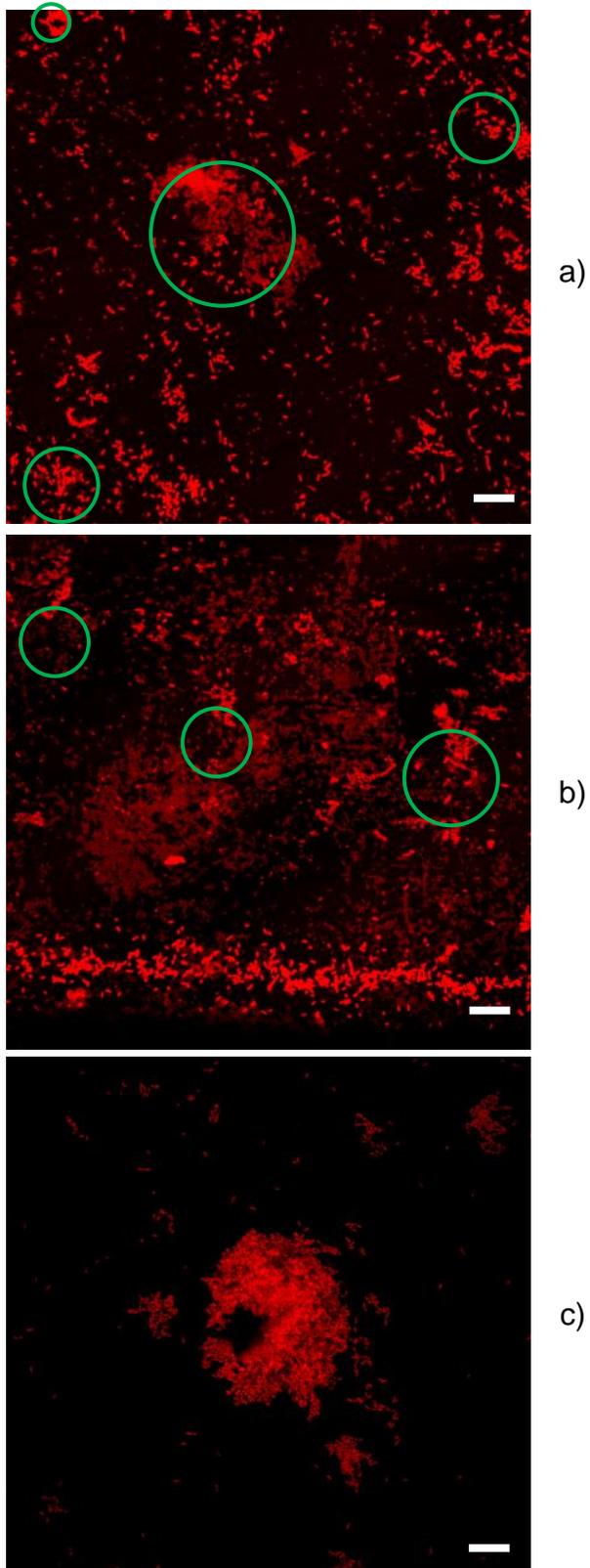


Figura 5. Conformación de biopelículas de *Salmonella* Heidelberg a las 24 h en superficies de acero inoxidable a: 304, b: 316, c: 316 pulido evaluada por microscopía confocal. (Barra de escala: 50 μm)

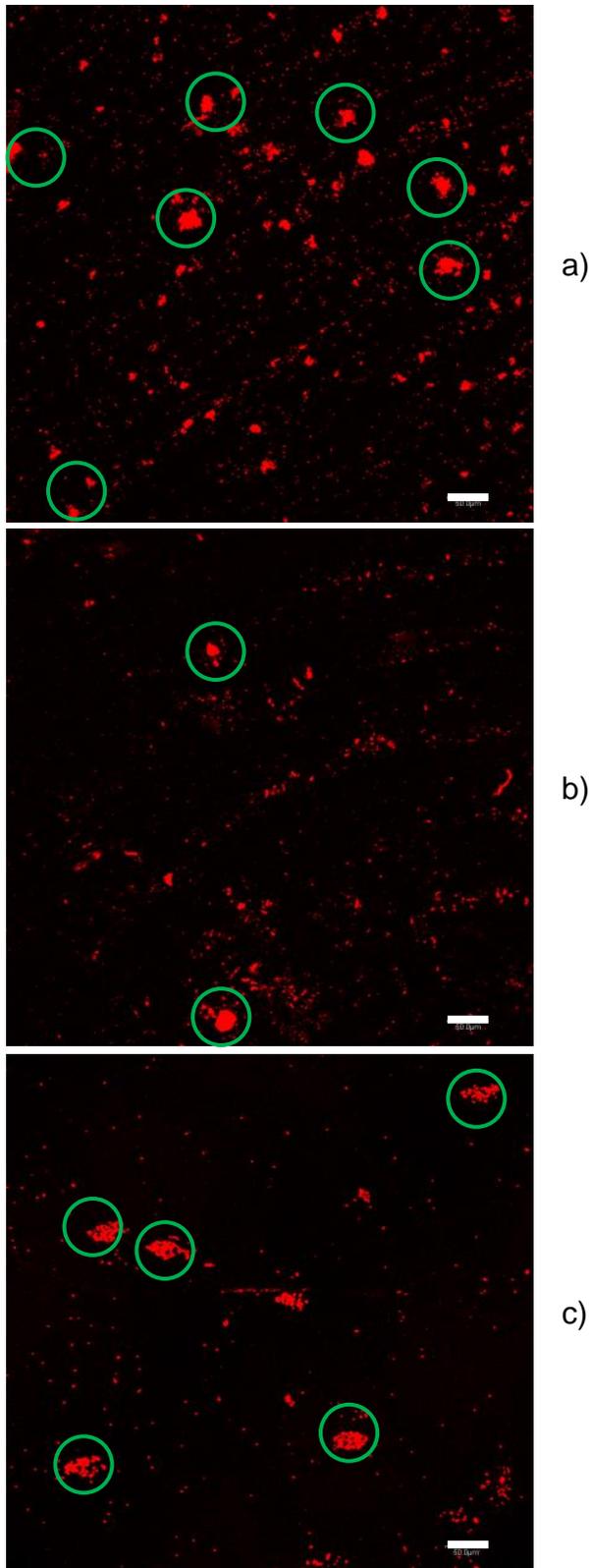


Figura 6. Conformación de biopelículas de *Salmonella* Typhimurium a las 24 h en superficies de acero inoxidable (a: 304, b: 316, c: 316 pulido) por microscopía confocal (Barra de escala: 50 µm)

En cambio en el acero inoxidable 316 pulido (Figura 5c), las biopelículas desarrolladas fueron en grupos compactos, muy superficiales y con escasas unidades celulares sueltas.

El comportamiento mostrado por *S. Typhimurium* (Figura 6) fue distinto a lo observado en *S. Heidelberg*. Esto puede observarse en todos los materiales, con biopelículas más superficiales, pero más claramente en el cupon 304 (Figura 6a), donde las biopelículas formadas, si bien están extendidas por toda la superficie del metal, éstas son más pequeñas y compactas que las desarrolladas por el otro serovar, y con un menor número de unidades celulares sueltas. El cupón 316 pulido presenta una conformación similar al observado en el acero 316, no obstante contiene un menor número de biopelículas, más compactas y con un menor número de células sueltas.

Cabe resaltar que no se encontraron reportes en la literatura sobre el uso de esta técnica microscopía para determinar diferencias conformacionales de biopelículas entre diferentes serovares de *Salmonella*. Los reportes existentes utilizan esta herramienta solo para determinar su presencia de manera visual (Schlisselberg & Yaron, 2013; Sinde & Carballo, 2000; Wang, Zhang, Zhang, Ye, Xu, & Zhou, 2015).

Por lo tanto se puede mencionar que el presente estudio es uno de los primeros en evidenciar las diferencias conformacionales de biopelículas de diferentes serovares de un mismo microorganismo. Sin embargo, se requiere realizar estudios más extensivo con serovares adicionales para poder establecer con certeza las diferencias en los patrones conformacionales entre serovares.

Transferencia de *Salmonella Heidelberg* y *Salmonella Typhimurium* hacia carne de Pollo

Para la determinación de la transferencia de células de *S. Heidelberg* y *S. Typhimurium* se utilizaron cupones con biopelículas de 24 h de crecimiento,

lo que corresponde a una cuenta celular promedio de 5.63 ± 0.041 Log UFC/mL, para ambos serovares evaluados en los tres tipos de acero inoxidable. Cabe aclarar que esta cuenta celular corresponde a la población microbiana que se encuentra distribuida en la superficie de ambas caras del cupón. Por lo tanto, es posible estimar que la cuenta celular presente en una de las caras es la mitad de este valor (aproximadamente 2.387 Log UFC/mL). En el cuadro 2, se presenta el número de células de *S. Heidelberg* y *S. Typhimurium* que se transfirieron desde la superficie de la cara expuesta de cada uno de los cupones de acero inoxidable que fueron evaluados hacia pechuga de pollo, después de aplicar una presión de contacto de 10 o 50 g/cm² por 15 s. La transferencia microbiana de la cara expuesta de la superficie hacia la muestra de pollo, osciló entre un 65 y >99%, en función del serovar analizado y la magnitud de la presión de contacto aplicada. Sin embargo el tipo de superficie de acero inoxidable no causó una variación ($P > 0.05$) en la cantidad de células transferidas. Esto puede indicar, que las diferencias de composición y rugosidad que existe entre estos materiales de acero no es un factor que facilite o impida la transferencia de las biopelículas de *Salmonella* a un alimento cárnico.

La transferencia fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en *S. Typhimurium* que en *Salmonella Heidelberg* para todos los tipos de superficies de acero cuando la presión ejercida era mayor (50g/cm²). Este comportamiento podría explicarse en función de las diferencias en conformación de las biopelículas que estos microorganismos desarrollan, las cuales quedaron evidenciadas en la Figuras 5 y 6. El hecho de que *S. Typhimurium* forme biopelículas más pequeñas y superficiales (Figura 6) posiblemente facilita su migración, ya que no están tan fuertemente ancladas a la superficie del metal, en comparación con las biopelículas grandes y ampliamente diseminadas que forma *S. Heidelberg* (Figura 5).

Cuadro 2. Transferencia celular de biopelículas de *Salmonella* Heidelberg (S.He) y *Salmonella* Typhimurium (S.Ty) hacia pechuga de pollo.

Log UFC/mL (\pm EE)				
Cepa	Presión de Contacto ₂ (gr/cm ²)	304	316	316 Pulido
S.He	10	2.214 \pm 0.16 ^{aAB}	2.431 \pm 0.22 ^{aA}	2.092 \pm 0.15 ^{aA}
S.He	50	1.901 \pm 0.19 ^{aB}	2.045 \pm 0.16 ^{aB}	2.356 \pm 0.16 ^{aA}
S.Ty	10	2.265 \pm 0.15 ^{aA}	2.700 \pm 0.15 ^{bA}	2.359 \pm 0.15 ^{aA}
S.Ty	50	2.702 \pm 0.17 ^{aC}	2.720 \pm 0.17 ^{aA}	2.932 \pm 0.19 ^{aB}

^{abc} Literales diferentes en la misma fila, indican que existieron diferencias (P<0.05) entre superficies analizadas.

^{ABC} Literales distintas en la misma columna, indican que existieron diferencias (P<0.05) entre cepas o presión de contacto.

Wang y colaboradores (2015), encontraron una transferencia entre 16-73% de biopelículas con 5 días de formación por un coctel de distintas cepas de *Salmonella*, que incluían a *S. Heidelberg* y *S. Typhimurium*, desde la superficie de acero inoxidable 304, y con una cuenta microbiana de ~ 5.5 Log UFC/cm² hacia distintos productos cárnicos, como jamón, salchichas y tocino. Este resultado concuerda con lo encontrado en la presente investigación.

Efecto del Proceso de Sanitización en la Eliminación de Biopelículas de *Salmonella Heidelberg* y *Salmonella Typhimurium*

En los Cuadros 3 y 4 se muestra el efecto que tuvo cada paso del tratamiento de sanitización (agua caliente y detergente) en las biopelículas de *S. Heidelberg* y *S. Typhimurium* formadas después de 24 h. La utilización del agua caliente no tuvo un efecto significativo ($P > 0.05$) en la cuenta celular viable de las biopelículas de *S. Heidelberg* adheridas en cualquiera de las superficies del acero inoxidable (304, 316 y 316 pulido) al compararse con el número inicial de células bacterianas (Cuadro 3). Tampoco se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los distintos cupones tratados. Lo anterior puede deberse a que la temperatura utilizada (50°C), no fue lo suficientemente alta para tener un efecto en la células de *Salmonella* en el acero inoxidable o el tiempo de exposición (2 min) no fue suficiente. Este mismo comportamiento fue experimentado por las biopelículas de *S. Typhimurium*, las cuales tampoco sufrieron una reducción significativa al momento de ser tratados con agua caliente.

No se encontraron estudios publicados donde se utilice agua a temperaturas cercanas a las usadas en esta investigación para la eliminación de *Salmonella spp.*, por lo que se utilizó estudios donde se evaluó la eliminación de este patógeno por calentamiento (50°C), como método comparativo: Phungamngoen y colaboradores (2011) estudiaron el efecto

Cuadro 3. Efecto de cada paso del proceso de sanitización en el cuenta viable celular de la biopelícula de *Salmonella* Heidelberg

		Log UFC/mL (\pm EE)		
ETAPA		304	316	316 P
Inicial		5.624 \pm 0.147 ^a	5.7156 \pm 0.146 ^a	5.533 \pm 0.147 ^a
Prelavado (50°C)		5.280 \pm 0.131 ^a	5.5045 \pm 0.119 ^a	5.187 \pm 0.147 ^a
Lavado	Sterilex	<10 ^b	<10 ^b	<10 ^b
	Foam Chlor	<10 ^b	<10 ^b	<10 ^b

^{abc} Literales diferentes indican que existieron diferencias significativas en la cuenta celular

Cuadro 4. Efecto de cada paso del proceso de sanitización en el cuenta viable celular de la biopelícula de *Salmonella* Typhimurium

		Log UFC/mL (\pm EE)		
ETAPA		304	316	316 P
Inicial		5.659 \pm 0.067 ^a	5.592 \pm 0.067 ^a	5.707 \pm 0.067 ^a
Prelavado (50°C)		5.578 \pm 0.087 ^a	5.505 \pm 0.087 ^a	5.706 \pm 0.147 ^a
Lavado	Sterilex	<10 ^b	<10 ^b	<10 ^b
	Foam Chlor	<10 ^b	<10 ^b	<10 ^b

^{abc} Literales diferentes indican que existieron diferencias significativas en la cuenta celular.

de la temperatura en la eliminación de células libres de *Salmonella* en la superficie de repollo y encontraron que cuando la temperatura utilizada era de 50°C, era necesario aproximadamente 1 h para lograr reducir en un logaritmo la cuenta microbiana, tiempo que era reducido a la mitad cuando la temperatura se elevaba a 70°C. De manera similar, Hawaree y colaboradores (2009) observaron que para lograr una reducción de 3 Log UFC/mL de *Salmonella* Anatum, se requería de un tiempo superior a 19 h a una temperatura de 50°C. Los resultados mencionados anteriormente, en conjunto con los obtenidos en el presente indican que 50°C no es suficiente para lograr una reducción en el número de microorganismos en un tiempo de contacto relativamente corto, no mayor a 10 min. Por lo anterior, es necesario utilizar temperaturas cercanas a ebullición (>70°C) si se desea lograr un impacto significativo en la eliminación de biopelículas de *Salmonella*, en base a lo reportado (Phungamngoen, Chiewchan, & Devahastin, 2011).

Después del tratamiento con agua caliente, se analizó la susceptibilidad de los serovares al detergente (Foam Chlor o Sterilex) en las distintas superficies de acero inoxidable. Como se aprecia en los cuadros 3 y 4, después de un tiempo de exposición de 10 min, ambos detergentes consiguieron una eliminación completa de las biopelículas en todas las superficies. Estos resultados concuerdan con Nguyen y Yuk (2013), quienes encontraron una reducción de 7.86 Log UFC/cm en biopelículas de *S. Typhimurium* al utilizar una solución de 50 ppm de cloro (ingrediente activo de Foam Chlor), por 5 min en superficies de acero inoxidable. Ramesh y colaboradores (2002), analizaron 13 sanitizantes comerciales, cuatro de ellos contenían cloro como ingrediente activo, y reportaron una reducción de 92.58-99.99% de un coctel de *Salmonella enterica*, las cuales se encontraban en acero galvanizado. Estos resultados concuerdan con lo reportado por esta investigación. La efectividad del detergente Sterilex ha sido evaluada en un par de reportes científicos aplicado en superficies metálicas y en alimentos. Buhr y colaboradores (2013) estudiaron la eliminación de *S. Typhimurium* de la superficie de cáscara de huevo, con una cuenta celular inicial de 3-5 Log UFC/cáscara de huevo, y encontraron que con

este sanitizante se obtenía una reducción del 90% en el número de cáscaras de huevo positivas a esta bacteria. Por otro lado, Schel y colaboradores (2006) realizaron un estudio para evaluar la efectividad de distintos sanitizantes, entre ellos Sterilex, en la reducción de *Pseudomonas aeruginosa* de plomerías utilizadas en la industria dental. Ellos reportan una reducción de 78% de las plomerías analizadas, que contenían menos de 200 UFC/mL, sin afectar la integridad del material utilizado para plomería. Estos resultados concuerdan a los reportados en la presente investigación.

En las Figuras 7 y 8 se muestran las imágenes de la superficie de los distintos cupones de acero inoxidable obtenidas por microscopía confocal para cada etapa del proceso de sanitización. Como ya se mencionó anteriormente, el agente de tinción utilizado por microscopía confocal se adhiere al ADN de la bacteria, independientemente de si ésta está viva o muerta, por lo que esta herramienta sirve para complementar los resultados obtenidos por cuenta microbiana, así como para constatar si existen residuos celulares (células no viables), los cuales podrían facilitar una recontaminación por parte de *Salmonella* u otro microorganismo formador de biopelículas. Es posible confirmar en las filas prelavado (PL) de ambas Figuras la inefectividad que tuvo el uso de agua caliente para remover y disminuir la cuenta celular en las biopelículas de ambos serovares, independientemente del tipo de acero inoxidable. Sin embargo, es importante hacer notar que a pesar de que ambos detergentes pudieron prácticamente eliminar o disminuir la cuenta celular viable de ambos serovares a cero, independientemente de la rugosidad de la superficie de acero, la habilidad de estos detergentes para eliminar las células bacterianas (no viables) adheridas a la superficie estuvo en función de la rugosidad y del tipo de cepa.

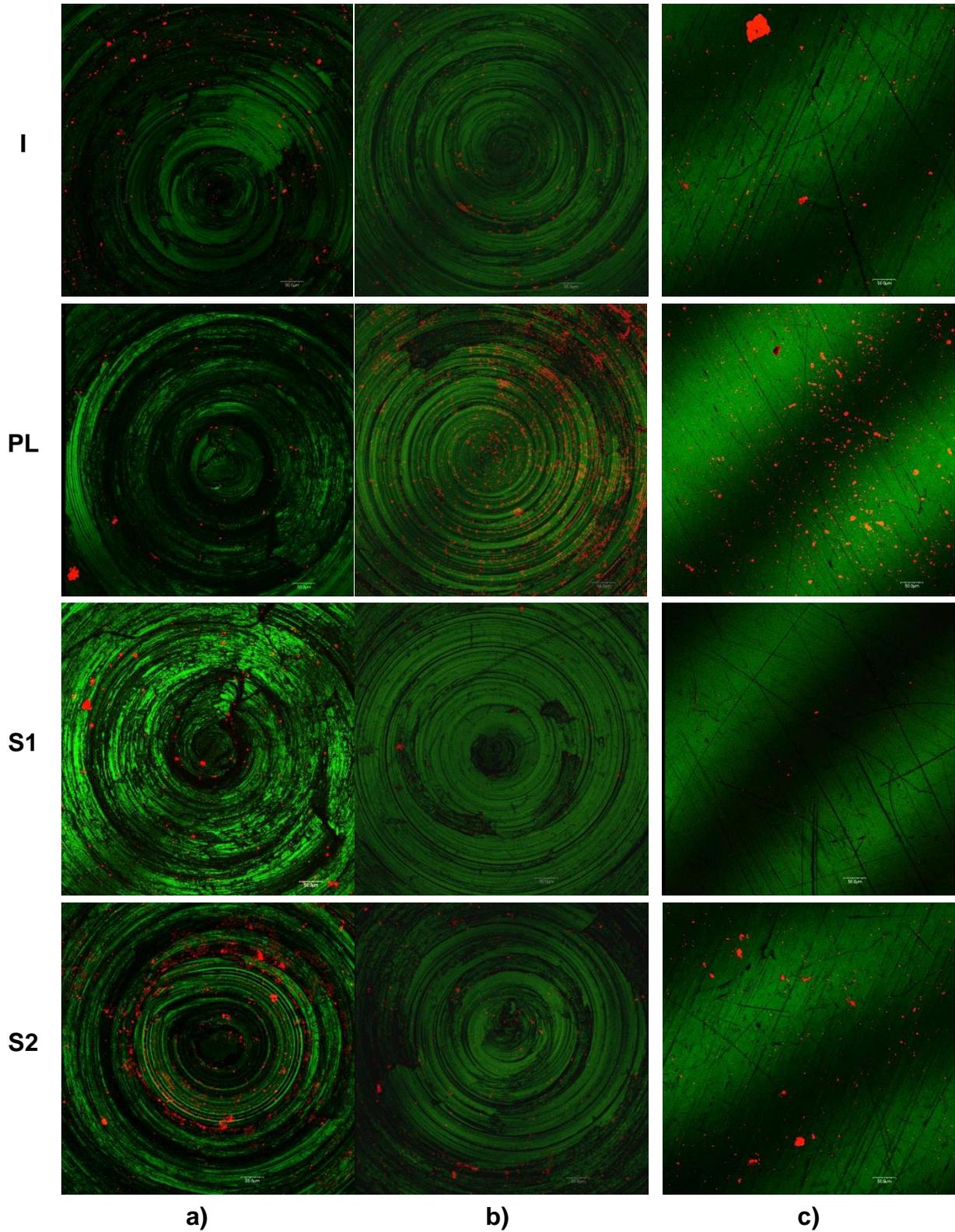


Figura 7. Superficie del acero inoxidable (a) 304, (b) 316 y(c) 316 Pulido (en cada uno de los pasos de sanitización: inicial (I), prelavado (PL), lavado: Foam Chlor 535 (S1) y Sterilex (S2), para *Salmonella* Heidelberg (escala de las imágenes: 10 µm).

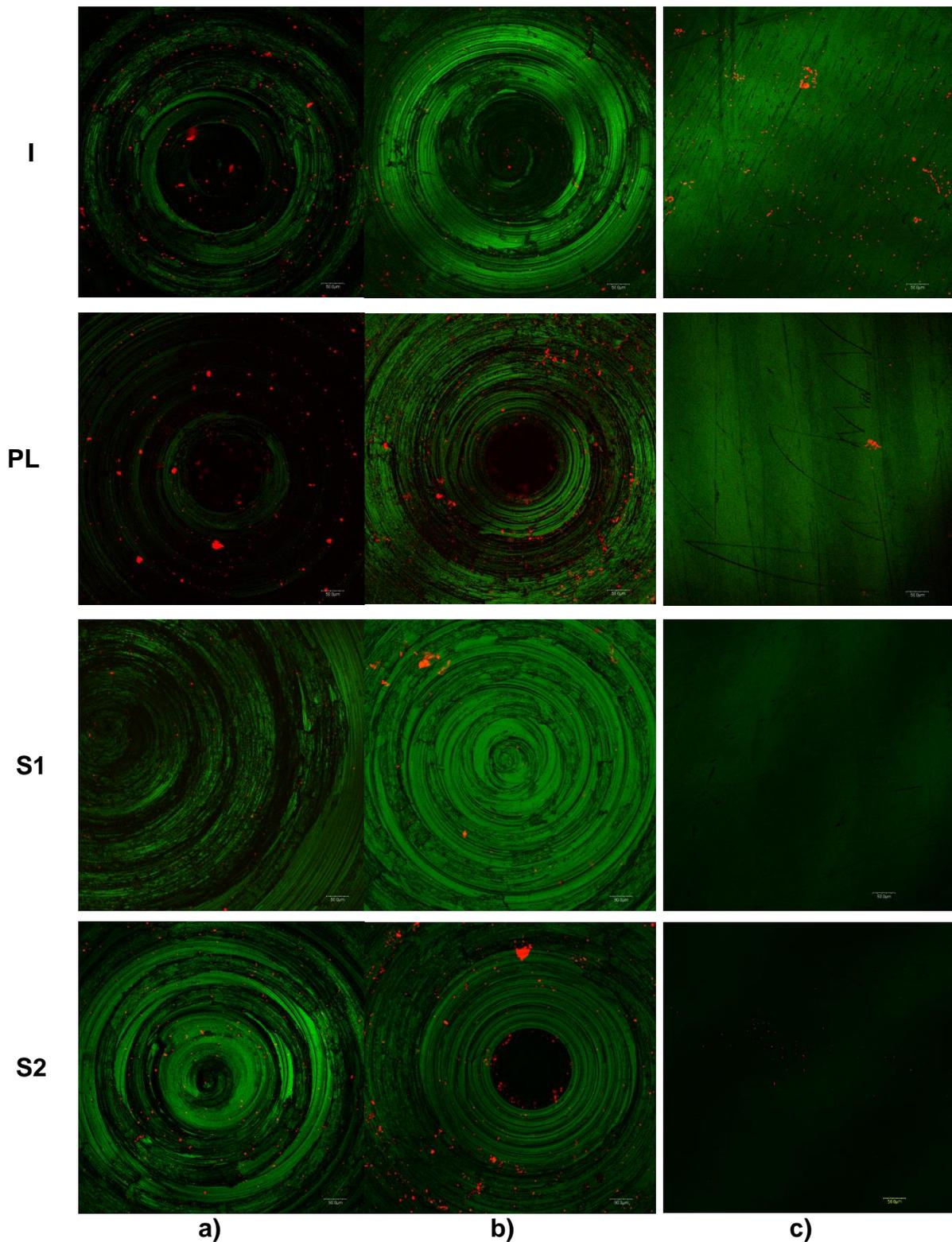


Figura 8. Superficie del acero inoxidable (a) 304, (b) 316 y(c) 316 Pulido (en cada uno de los pasos de sanitización: inicial (I), prelavado (PL), lavado: Foam Chlor 535 (S1) y Sterilex (S2), para *Salmonella Typhimurium* (escala de las imágenes: 10 µm).

Foam Chlor fue capaz de eliminar todas las células de ambos serovares de las superficies de acero inoxidable 316 pulido (Figura 7(c), fila S1 y 8(c), fila S1, respectivamente). En cambio en superficies más rugosas (Figuras 7 (a)(b) y 8(a)(b)) su habilidad fue más limitada, principalmente para eliminar células de *S. Heidelberg* (Figura 7(a)(b)).

Por otro lado Sterilex prácticamente no pudo remover las células de ambos serovares de las superficies de acero más rugosas (Figuras 7(a)(b) fila S2 y 8(a)(b) fila S2, respectivamente) y tuvo un efecto limitado para remover las células de *S. Heidelberg* de la superficie de acero inoxidable 316 pulido (Figura 7(c) fila S2). En cambio, si fue capaz de eliminar completamente las células de *S. Typhimurium* de la superficie 316 pulido (Figura 8(c) fila S2). Una posible razón para explicar porque Sterilex resultó menos efectivo para eliminar los restos celulares en la mayoría de las superficies, en comparación con Foam Chlor, es que Sterilex fue aplicado a temperatura ambiente, mientras que Foam Chlor fue utilizado a 50°C. Es posible que la aplicación del sanitizante en combinación a una temperatura alta haya facilitado la eliminación de las células no viables adheridas a la superficie.

El hecho de haber confirmado de que a pesar de que los detergentes comerciales tienen la habilidad de eliminar las células viables, pero que no necesariamente puedan eliminar los residuos celulares y sustancias poliméricas extracelulares de la superficie de metal, es muy relevante. Esto debido a que, como ya se mencionó, los restos celulares pueden facilitar la unión y crecimiento de futuras células bacterianas, ya que uno de los primeros pasos para la formación y crecimiento de una biopelícula es la erosión y unión con la superficie. Este comportamiento puede ser apreciado en otras investigaciones, como la de Ban y colaboradores (2012) y Shen y colaboradores (2012), quienes utilizaron la técnica de microscopía confocal posterior a un proceso de sanitización y evaluar la eliminación de biopelículas de *Salmonella* spp. mediante una técnica de tinción llamada “vivo o muerto” (Dead or alive, en inglés) donde las células viables se diferencian de las muertas por color (verde: vivas, rojo: muertas). Ellos reportaron un efecto importante en la reducción de

células viables de dicho microorganismo, sin embargo, las estructuras celulares permanecieron en la superficie, sin señalar los posibles efectos que estos pueden tener en una recontaminación.

CONCLUSIONES

El estudio de la cinética de formación de biopelículas de *Salmonella* Heidelberg y *Salmonella* Typhimurium demostró que 2 h son suficientes para que se de la unión de más de 3 Log₁₀ UFC/mL. Además, mostró que *S. Typhimurium* tiene un crecimiento inicial superior, en comparación con *S. Heidelberg*. Sin embargo a las 24 h, la cuenta microbiana adherida a la superficie fue similar, independientemente del serovar tipo y rugosidad de acero inoxidable. No obstante, las imágenes observadas al microscopio SEM y confocal demostraron diferencias importantes en cuanto estructura y conformación de las biopelículas en función del serovar y el tipo de acero inoxidable. La formación de sustancias poliméricas extracelulares solo fue evidente en las biopelículas formadas sobre la superficie de acero inoxidable 304. Además, se observó que las biopelículas de *S. Heidelberg* fueron más compactas en 316 P en comparación con los otro tipos de acero y que las biopelículas de *S. Typhimurium* mostraron una conformación más pequeña y escasas, en todos los cupones, en comparación con *S. Heidelberg*

La transferencia de células de las biopelículas de *Salmonella* sp. desde la superficie de acero a la pieza de pollo no se vio afectada por el tipo o rugosidad del acero inoxidable. Sin embargo, se encontró que la tasa de transferencia celular varió en función del serovar y el efecto de aplicar una mayor presión de contacto. Un incremento de la presión de contacto ocasionó un incremento significativo de la transferencia de *S. Typhimurium* al material cárnico. Además, fue posible establecer que este serovar se transfiere más fácilmente hacia el alimento que *S. Heidelberg*.

El prelavado con agua caliente no tuvo un efecto en la reducción de cuenta microbiana de salmonella, para ningún serovar, en ninguna de las superficies de acero inoxidable. Por otro lado, ambos sanitizantes fueron efectivos para eliminar las células viables de las biopelículas de *Salmonella sp.* presentes en las superficies de acero inoxidable evaluadas. Sin embargo, las imágenes de microscopia confocal permitieron observar que la efectividad de los detergentes comerciales evaluados para eliminar los restos celulares, fue dependiente de la rugosidad de las superficies de acero inoxidable; de tal forma que la efectividad de los detergentes comerciales incrementa en función inversa a la rugosidad del acero.

BIBLIOGRAFÍA

- Anetzberger, C., & Jung, K. (2009). Intercellular Communication. En R. Krämer, & K. Jung, *Bacterial Signaling* (págs. 3-95). Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell.
- Austin, J. W., Sanders, G., Kay, W. W., & Collinson, S. K. (1998). Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 295-301.
- Bassler, B. L., & Losick, R. (2006). Bacterially speaking. *Cell*, 125, 237-246.
- Baumann, A., Martin, S., & Feng, H. (2009). Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *Journal of Food Protection*, 72, 1306-1309.
- Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T., & Bover-Cid, S. (2013). High pressure inactivation of a virulent *Enterococcus faecalis* on dry-cured ham: Modeling the effect of processing parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.
- Berrang, M. E., Frank, J. F., & Meinsermann, R. J. (2010). *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation on Silver Ion Impregnated Cutting Boards. *Food Protection Trends*, 30(3), 168-171.
- Bray, D. (2000). Critical Point Drying of Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy. En J. R. Williams, & A. A. Clifford, *Supercritical Fluid: Methods and Protocols* (págs. 235-243). Totowa, New Jersey, USA: Humana Press.
- Bremer, P.J., Monk, I., Butler, R. (2002). Inactivation of *Listeria monocytogenes/Flavobacterium spp.* Biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. *Letters of applied microbiology*, 35(4), 321–325
- Bssa. (2001). *Stainless steels for the food-processing industries*. Bssa.
- Buchanan, R., Lindqvist, R., Ross, T., Smith, M., Todd, E., & Whiting, R. (2004). *Risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods*. *Microbiological Risk Assessment Series*, 4. Rome, Italy.
- Buhr, R. J., Splicker, J. L., Ritter, A. R., Bourassa, D. V., Cox, N. A., Richardson, L. J., y otros. (2013). Efficacy of combination chemicals as sanitizers of

- Salmonella-inoculated broiler hatching eggshells. *Journal of Applied Poultry Research*, 27-35.
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 1-8.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2011). *No Progress in Salmonella During Past 15 Years - Food safety annual report card targets hard-to-prevent infection*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2014). The EFSA Journal Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 9(3), 328-332.
- Chase-Topping, M., Gally, D., Low, C., Matthews, L., & Woolhouse, M. (2008). Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 904-912.
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., & Hebraud, M. (2004). Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS microbiology Letters*, 241-248.
- Chen, Y., Jackson, M., Chen, F., & Schaffer, D. (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection*, 72-80.
- Chen, Y., Jackson, M., Chen, F., & Schaffner, D. (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection*, 72-80.
- Chittick, P., Sulka, A., Tauxe, R. V., & Fry, A. M. (2006). A Summary of National Reports of Foodborne Outbreaks of *Salmonella* Heidelberg Infections in the United States: Clues for Disease Prevention. *Journal of Food Protection*, 1150-1153.
- Chorianopoulos, N. G., Giaouris, E. D., Kourkoutas, Y., & Nychas, G.-J. E. (2010). Inhibition of the Early Stage of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Biofilm Development on Stainless Steel by Cell-Free Supernatant of a *Hafnia alvei* Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018-2022.
- Chung, H.-J., & Yousef, A. E. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* in Broth and Sausage by Combined High Pressure and *Lactobacillus casei* Cell Extract. *Food Science and Technology International*, 16(5), 381-388.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78, 90-103.
- Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P., y

- otros. (2013). Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilm from food contact surface materials. *American Society for Microbiology*.
- Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P., y otros. (2014). Commonly Used Disinfectants Fail To Eradicate *Salmonella enterica* Biofilms from Food Contact Surface Materials. *Applied Environmental Microbiology*, 1507-1514.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., & Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 261-289.
- Davies, A. R., & Board, R. G. (1998). *Microbiology of Meat and Poultry*. Philadelphia: Blackie Academic & Professional.
- Dawson, P., Han, I., Cox, E., Black, C., & Simmons, L. (2003). Food contact time effects on pick-up of *Salmonella* Typhimurium from tile, wood and carpet: testing the five-second rule. *Proceedings of the 2nd Global Congress Dedicated to Hygeinic Coatings Surfaces* , (págs. 1-10). Orlando, FL.
- Dawson, P., Han, I., Cox, M., Black, C., & Simmons, L. (2007). Residence time and food contact time effects on transfer of *Salmonella* Typhimurium from tile, wood and carpet: testing the five-second rule. *Journal of Applied Microbiology*, 945–953.
- de la Fuente-Núñez, C., Korolik, V., Bains, M., Nguyen, U., Breidenstein, E. B., Horsman, S., y otros. (2012). Inhibition of Bacterial Biofilm Formation and Swarming Motility by a Small Synthetic Cationic Peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), 2696-2704.
- De Wit, J. C., Broekhuizen, G., & Kampelmacher, E. H. (1979). Cross-contamination during the preparation of frozen chickens in the kitchen. *Journal of Hygiene*, 27-32.
- 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*, 173–180.
- Dong, B. Y., Manolache, S., Somers, E. B., Wong, A. C., & Denes, F. S. (2005). Generation of antifouling layers on stainless steel surfaces by plasma-enhanced crosslinking of polyethylene glycol. *Journal of Applied Polymer Science*, 97(2), 485–497.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.
- DU PONT. (1 de 1 de 2012). *DuPont Products and Services*. Recuperado el 2 de 10 de 2012, de DuPont web page: <http://www2.dupont.com/>
- Dykes, G. A., & Dworaczek, M. (2002). Influence of interactions between temperature, ferric ammonium citrate and glycine betaine on the growth

- of *Listeria monocytogenes* in a defined medium. *Letters in Applied Microbiology*, 35(6), 538-542.
- Epstein, A. K., Pokroy, B., Seminara, A., & Aizenberg, J. (2011). Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(3), 995-1000.
- Falguera, V., Aliguer, N., & Falguera, M. (2012). An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products? *Food Control*, 26, 274-281.
- Fatemi, P., Frank, J. (1999). Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *Journal of Food Protection*. 62 (7), 761-765.
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55(3), 476-511.
- Farkas, J. (2006). Irradiation for better foods. *Food Science and Technology*, 17, 148-152.
- Field, C. E., Pivarnick, L. F., Barnet, S. M., & Rand, A. (1987). Utilization of glucose oxidase for extending the shelf-life of fish. *Journal of Food Sciences*, 51, 66-70.
- Flores, R. A., Tamlin, M. L., Marmer, B. S., Phillips, J. G., & Cooke, P. H. (2006). Transfer Coefficient Model for *Escherichia coli* O157:H7 on contacts between Beef Tissue and High-Density Polyethylene Surfaces. *Journal of Food Protection*, 69, 1248-1255.
- Florjanic, M., & Kristl, J. (2011). The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. *International Journal of Pharmacology*, 405(1-2), 16-22.
- Food Safety Inspection Service. (1999). *Sanitation Performance Standards: Compliance Guide*. United States Department of Agriculture .
- Garny, K., Horn, H., & Neu, T. (2008). Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors. *Journal of Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(6), 619-629.
- Garriga, M., Aymerich, T., Costa, S., Monfort, J. M., & Hugas, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage . *Food Microbiology*, 19(5), 509–518.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Skandamis, P., & Nychas, G.-J. (2012). Attachment and Biofilm Formation by *Salmonella* in Food Processing Environments. In B. S. Mahmoud, *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen* (págs. 157-180). Rijeka: InTech.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Skandamis, P., & Nychas, G.-J. (2012). Attachment and Biofilm Formation by *Salmonella* in Food Processing Environments. In B. S. Mahmoud, *Salmonella - A Dangerous Foodborne*

- Pathogen* (pp. 157-180). Rijeka: InTech.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Skandamis, P., & Nychas, G.-J. (2012). Attachment and Biofilm Formation by *Salmonella* in Food Processing Environments. En B. S. Mahmoud, *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen* (págs. 157-180). Rijeka: InTech.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2000). Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research International*, 33, 83-90.
- Gottenbos, B., van der Mei, H. C., Klatter, F., Nieuwenhuis, P., & Busscher, H. J. (2001). *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. *Biomaterials*, 23, 1417–1423.
- Greig, J. D., Todd, E. C., Bartleson, C., & Michaels, B. (2010). Infective Doses and Pathen Carriage. *USDA 2010 Food Safety Education Conference* (págs. 19-20). Atlanta: USDA.
- Hall, G. M. (2011). *Fish Processing: Sustainability and new opportunities*. Ames: Wiley-Blackwell.
- Hammou, F. B., Skali, S. N., Idaomar, M., & Abrini, J. (2010). Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C. *African Journal of Biotechnology*, 9(8), 1190-1195.
- Harbron, R. S., & Kent, C. A. (1988). *Aspects of cell adhesion* (Vol. 145). NATO ASI series.
- Hawaree, N., Chiewchan, N., & Devahastin, S. (2009). Effects of Drying Temperature and Surface Characteristics of Vegetable on the Survival of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, E16–E22.
- hood, S. K., & Zottola, E. A. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 145-153.
- Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1997). Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. *Journal of Food Protection*, 60(9), 1034-1037.
- Hugas, M., Garriga, M., & Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 6, 359–371.
- Hurme, E., Sipiläinen-Malm, T., & Ahvenainen, R. (2002). Active and intelligent packaging. En T. Ohlsson, & N. Bengtsson, *Minimal Processing Technologies in the Food Industry* (págs. 88-111). Boca Raton: CRC Press.
- Jeyasekaran, G., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2000). Effect of sanitizers

- on *Listeria* biofilm on contact surfaces. *Asian Fisheries Society*, 209-213.
- Joseph, B., Otta, S., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 367-372.
- Kerry, J. P., Kerry, J. F., & Ledward, D. (2002). *Meat processing: improving quality*. Boca Raton, FL, USA: Woodhead Publishing.
- Kerry, J. P., O'Grady, M. N., & Hogan, S. A. (2006). 93, 191–196. Kerry, J. P., O'Grady, M. N., & Hogan, S. A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 11, 113-130.
- Klueh, U., Wagner, V., Kelly, S., Johnson, A., & Bryers, J. D. (2000). Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 621-631.
- Korber, D. R., Choi, A., Wolfaardt, G. M., Ingham, S. C., & Caldwell, D. E. (1997). Substratum topography influences susceptibility of *Salmonella enteritidis* biofilms to trisodium phosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3352-3358.
- Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2009). Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiology*, 592-597.
- Lapidot, A., Romling, U., Yaron, S. (2006). Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *International Journal of Food Microbiology*. 109(3):229-233
- Lemon, K. P., Higgins, D. E., & Kolter, R. (2007). Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Journal of bacteriology*, 189(12), 4418-4424.
- MacDougall, L., Fyfe, M., McIntyre, L., Paccagnella, A., Cordner, K., Kerr, A., y otros. (2004). Frozen chicken nuggets and strips - a newly identified risk factor for *Salmonella* Heidelberg infection in British Columbia, Canada. *Journal of Food Protection*, 1111-1115.
- Mah, T. F., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9, 34-39.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., & Herman, L. (2012). Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 133-147.
- Marin, C., Hernandez, A., & Lainez, M. (2009). Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science*, 88, 424-431.

- Mayer, B. (2001). *Approaches to prevention, removal and killing of biofilms*. Wageningen, Netherlands: Elsevier Sci Ltd.
- Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W., & Lacroix, M. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, 18, 878-884.
- Ming, X., Weber, G., Ayres, J., & Sandine, W. (1997). Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *Journal of Food Science*, 62, 413-415.
- Mittelman, M. W. (1998). Structure and functional characteristics of biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2760-2764.
- Moltz, A. G., & Martin, S. E. (2005). Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*, 68, 92-97.
- Montville, R., Chen, Y., & Shaffner, D. W. (2001). Glove barriers to bacteria cross-contamination between hands and food. *Journal of Food Protection*, 845-849.
- Moore, C. M., Sheldon, B. W., & Jaykus, L. A. (2003). Transfer of *Salmonella* and *Campylobacter* from stainless steel to Romaine lettuce. *Journal of Food Protection*, 2231-2236.
- Møretrø, T., Vestby, L. K., Nesse, L. L., Storheim, S. E., Kotlarz, K., & Langsrud, S. (2009). Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, 1005-1012.
- Morgenroth, E. (2003). Detachment: an often overlooked phenomenon in biofilm research and modeling. En B. Bishop, S. Weurtz, & P. Wilderer, *Biofilms in wastewater treatment, an interdisciplinary approach* (págs. 264-293). London, UK: IWA Publishing House.
- Murano, E. A., Murano, P. S., Brennan, R. E., Shenoy, K., & Moreira, R. G. (1999). Application of high hydrostatic pressure to eliminate *Listeria monocytogenes* from fresh pork sausage. *Journal of Food Protection*, 62, 480-483.
- Nadarajah, A., Han, J. H., & Holley, R. A. (2005). Use of mustard flour to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef under nitrogen flushed packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 257-267.
- Neal, J. A., Marquez-Gonzalez, M., Cabrera-Díaz, E., Lucía, L. M., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., y otros. (2012). Comparison of multiple chemical sanitizers for reducing *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Food Research International*, 1123-1128.
- Nguyen, H. D., & Yuk, H.-G. (2013). Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. *Food Control*, 29, 236-240.

- Nguyen, H. D., & Yuk, H.-G. (2013). Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. *Food Control*, 236–240.
- Niemira, B. A., & Solomon, E. B. (2005). Sensitivity of Planktonic and Biofilm-Associated *Salmonella* spp. to Ionizing Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2732-2736.
- Niemira, B. A., & Solomon, E. B. (2005). Sensitivity of planktonic and biofilm-associated *Salmonella* spp. to ionizing radiation. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 2732–2736.
- Nollet, M. L. (2012). *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality* (segunda ed.). Ames: John Wiley & Sons.
- Ohlsson, T., & Bengtsson, N. (2002). *Minimal processing technologies in the food industry*. Boca Raton: CRC Press.
- Omer, M. K., Alvseike, O., Holck, A., Axelsson, L., Prieto, M., Skjerve, E., y otros. (2010). Application of high pressure processing to reduce verotoxigenic *E. coli* in two types of dry-fermented sausage. *Meat Science*, 86(4), 1005–1009.
- Pan, Y., Breidt jr., F., Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7711-7717.
- Pascual Anderson, M., & Calderón, V. (2000). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Madrid, España: Díaz de Santos.
- Patrick, D. R., Findon, G., & Miller, T. E. (1997). Residual moisture determines the level of touch-associated bacterial transfer following hand washing. *Epidemiology and Infection*, 319-325.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R. M., & Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 131–144.
- Phungamngoen, C., Chiewchan, N., & Devahastin, S. (2011). Thermal resistance of *Salmonella enterica* serovar Anatum on cabbage surfaces during drying: Effects of drying methods and conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 127–133.
- Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Lee, H. Y., Tang, J. H., Noorlis, A., y otros. (2011). Biofilm formation by *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium on plastic cutting board and its transfer to dragon fruit. *International Food Research Journal*, 31-38.
- Ramesh, N., Joseph, S. W., Carr, L. E., Douglass, L. W., & Wheaton, F. W. (2002). Evaluation of Chemical Disinfectants for the Elimination of *Salmonella* Biofilms from Poultry Transport Containers. *Poultry Science*,

904-910.

- Robbins, J.B., Fisher, C.W., Moltz, A.G., Martin, S.E. (2005). Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. *Journal of Food Protection*, 68(3), 494-498.
- Robertson, G. L. (2013). *Food Packaging: Principles and Practice* (tercera ed.). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Robinson, S. (19 de Agosto de 2013). *The Big Five: Most Common Salmonella Strains in Foodborne Illness Outbreaks*. Recuperado el 10 de Octubre de 2014, de Food Safety News: http://www.foodsafetynews.com/2013/08/the-five-most-common-salmonella-strains/#.VLgK3SuG8_Z
- Rodriguez, A., McLandsborough, L.A. (2007). Transfer of *Listeria monocytogenes* from processing surfaces to foods. *Journal of Food Protection* 70(3), 600-606.
- Samelis, J., Bedie, G. K., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., & Smith, G. C. (2005). Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum package. *Food Science and Technology*, 38(1), 21-28.
- Sauer, K., & Camper, A. K. (2001). Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *Journal of Bacteriology*, 183, 6579–6589.
- Sauer, K., Rickard, A. H., & Davies, D. G. (2007). Biofilms and biocomplexity. *Microbe*, 2(7), 347-355.
- Schel, A. J., Marsh, P. D., Bradshaw, D. J., Finney, M., Fulford, M. R., Frandsen, E., y otros. (2006). Comparison of the Efficacies of Disinfectants To Control Microbial Contamination in Dental Unit Water Systems in General Dental Practices across the European Union. *Applied Environmental Microbiology*, 1380-1387.
- Schlisselberg, D. B., & Yaron, S. (2013). The effects of stainless steel finish on *Salmonella* Typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food Microbiology*, 35(1), 65–72.
- Schlisselberg, D. B., & Yaron, S. (2013). The effects of stainless steel finish on *Salmonella* Typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food Microbiology*, 65-72.
- Scott, E., & Bloomfield, S. (1990). The survival and transfer of microbial contamination via cloth, hands, and utensils. *Journal of Applied Bacteriology*, 271-278.
- Sebti, I., Cernet-Ripoche, A., Blanc, D., Saurel, R., & Coma, V. (2003). Controlled diffusion of an antimicrobial peptide from a biopolymer film. *Journal of Chemical Engineering*, 81, 1099-1104.
- Silagyi, K., Kim, S.-H., Lo, Y. M., & Wei, C.-i. (2009). Production of biofilm and

- quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. *Food microbiology*, 26, 514-519.
- Simoës, M., Simoës, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology*, 43, 573–583.
- Sinde, E., & Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17, 439-447.
- Smith, P. G. (2011). *Introduction to food process engineering*. New York: Springer.
- Somers, E. B., & Wong, A. C. (2004). Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. *Journal of Food Protection*, 67, 2218–2229.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. (2012). *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 502-531.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Mijac, V., & Svabic-Vlahovic, M. (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, 20, 339-343.
- Stepanović, S., Cirković, I., Ranin, L., & Svabić-Vlahović, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied microbiology*, 38(5), 428-432.
- Taormina, P., & Beauchat, L. (2002). Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food-processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 71-80.
- Tapp III, W. N., Gragg, S. E., Brooks, J. C., Miller, M. F., & Brashears, M. M. (2013). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* after Application of Various Sanitizing Treatments to Harvesting Knives. *Journal of Food Protection*, 190-369.
- Todhanakasem, T., Young, G. (2008). Loss of Flagellum-Based Motility by *Listeria monocytogenes* Results in Formation of Hyperbiofilms. *Journal of bacteriology*, 190, 6030–6034.
- Tuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A., & Hirata, A. (2003). Extracellular Polymeric Substances Responsible For Bacterial Adhesion Onto Solid Surface. *FEMS Microbiology Letters*, 223, 287-292.
- Ukuku, D. O., & Fett, W. F. (2002). Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe rind.

Journal of Food Protection, 65, 1093-1099.

- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1117–1131.
- Wang, H., Zhang, X., Zhang, Q., Ye, K., Xu, X., & Zhou, G. (2015). Comparison of microbial transfer rates from *Salmonella* spp. biofilm growth on stainless steel to selected processed and raw meat. *Food Control*, 50, 574–580.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, t., Ragas, P. C., & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295, 1487.
- Zhao, P., Zhao, T., Doyle, M., Rubino, J., & Meng, J. (1998). Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. *Journal of Food Protection*, 960-963.
- Zhou, G. H., Xu, X. L., & Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*, 86(1), 119–128.
- Zottola, E. A., & Sasahara, K. C. (1994). Microbial biofilms in the food processing industry – should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, 23, 125–148.