



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a la Universidad de Zaragoza, y a quienes conforman la carrera de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, por abrirme las puertas y poder seguir creciendo profesionalmente. También agradecer a la Dra. Lourdes Sánchez quien fue un pilar fundamental para que yo pudiera estar en tan prestigiosa Institución, y de igual modo a toda la plantilla docente.

Gracias a todos mis compañeros del máster por haberme brindado su amistad y también a todas esas personas que han ayudado a la realización de este Trabajo Fin de Máster, en especial al Dr. Rafael Pagán Tomás y al Dr. Diego García Gonzalo, y como olvidarme de Daniel Berdejo Martínez, por su dedicación, apoyo, paciencia y por todo lo que me han enseñado.

Gracias también al área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza, por brindarme la oportunidad de poder realizar el Trabajo Fin de Máster con vosotros y aprender todo lo posible, y hacer mi estancia más agradable.

DATOS PERSONALES

Apellidos: ESPARZA BONILLA

Nombre: CRISTIAN JOSÉ

DNI: Y4948801-C

Dirección: Camino de la Mosquetera 42/4

C.P.: 50010 **Provincia:** Zaragoza **Ciudad:** Zaragoza

Teléfono: 535366288

Email: 742711@unizar.es

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	4
2.1. Importancia de la inocuidad de los alimentos	4
2.2. Formación de biopelículas	5
2.3. Factores que influyen en la formación de biopelículas	6
2.4. Etapas de la formación de una biopelícula.....	7
2.5. El uso de aceites esenciales como agentes antimicrobianos	9
2.6. Superficies de contacto en la industria alimentaria: acero inoxidable	10
2.7. Problemática de los actuales sistemas de higienización y desinfección de superficies de contacto con alimentos	11
3. Objetivos.....	14
4. Material y métodos.....	15
4.1. Material y reactivos.....	15
4.2. Preparación de las biopelículas	16
4.3. Recuento del número de microorganismos presentes en las biopelículas.	17
4.4. Tratamiento de destrucción de las biopelículas con carvacrol, óxido de limoneno y aceite de naranja.....	17
4.5. Análisis estadístico de datos	18
5. Resultados y discusión	19
5.1. Carvacrol	21
5.2. Óxido de limoneno.....	23
5.3. Aceite de naranja.....	25
6. Conclusiones	27
7. Bibliografía	28

1. Resumen

Las biopelículas, más conocidas por el término inglés biofilms, son organizaciones microbianas que se adhieren a las superficies, independientemente del material, mediante la secreción de un expolímero que actúa como matriz intercelular. La estructura de estas biopelículas incrementa la resistencia frente a los desinfectantes y antimicrobianos usualmente utilizados en los sistemas de limpieza y desinfección, lo que les convierte en complejos difíciles de eliminar de los ambientes donde se establecen.

Actualmente, las biopelículas son un grave problema en la industria agroalimentaria, ya no sólo por el deterioro de la maquinaria, sino por la fuente de contaminación que suponen para los alimentos y que ponen en riesgo la seguridad alimentaria. Sin embargo, aunque cada vez existen más estudios sobre la eliminación de biopelículas, pocos se llevan a cabo en materiales comúnmente empleados en la industria alimentaria como el acero inoxidable.

En los últimos años, se ha demostrado la efectividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas y medicinales, y se ha planteado su uso como alternativa natural a la utilización de desinfectantes químicos en la industria alimentaria.

Por ello, el objetivo de este trabajo es evaluar in vitro la influencia de la superficie de contacto en la eliminación de biopelículas, plástico (poliestireno) y acero inoxidable (AISI 304 y AISI 316), formadas por *E. coli* MG1655 y *L. monocytogenes* EGD-e mediante la aplicación de aceites esenciales o sus constituyentes individuales. Además, se pretende evaluar la influencia de otros factores en la eficacia del tratamiento como el pH (4,0 y 7,0) o como el tipo y la concentración del antimicrobiano: carvacrol, óxido de limoneno y aceite de naranja, a 500 y 1000 ppm.

Para llevar a cabo la formación de la biopelícula se requirió la incubación de los cultivos en placas de 24 pocillos de acero inoxidable (AISI 304 y AISI 316) y de plástico (Poliestireno) en estufas de aire estático, durante 72 horas a 37°C.

Los tres compuestos naturales mostraron distinto grado de eficacia como agentes antimicrobianos con capacidad para reducir la presencia de células sésiles de biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655. El carvacrol ha sido el agente antimicrobiano más eficaz, permitiendo alcanzar niveles de inactivación microbiana superiores a los 5 ciclos logarítmicos sobre las biopelículas desarrolladas en superficies

de acero inoxidable. Este estudio demuestra que las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 desarrolladas sobre superficies de acero inoxidable, no solo contienen un menor número de células sésiles, sino que además muestran una mayor sensibilidad al ataque del carvacrol que las desarrolladas sobre poliestireno, lo que contribuye a corroborar la mayor adecuación del acero inoxidable como material de contacto con alimentos en la industria alimentaria.

Abstract

Biofilms are microbial organizations that adhere to the surfaces, independently of the material composition, by the secretion of an exopolymer that acts like intercellular matrix. The structure of these biofilms increases the resistance to disinfectants and antimicrobials usually used in cleaning and disinfection systems, which makes them difficult to remove from the environments where they are established.

Currently, biofilms are a serious problem in the food industry, not only because of the deterioration of the machinery, but because they could suppose a source of contamination for food, which maybe pose a risk to public health. However, despite there are more and more studies on biofilm removal, few are carried out in materials commonly used in the food industry, such as stainless steel.

In recent years, the antimicrobial efficacy of essential oils from aromatic and medicinal plants has been demonstrated and has been proposed as a natural alternative to the use of chemical disinfectants in the food industry.

Therefore, the aim of this study is to evaluate in vitro the influence of the contact surface on the removal of biofilms, plastic (polystyrene) and stainless steel (AISI 304 and AISI 316), formed by *E. coli* MG1655 and *L. monocytogenes* EGD-e by the application of essential oils or their individual constituents. In addition, it is intended to evaluate the influence of others factors on the efficacy of the treatment as pH (4.0 and 7.0) or as the type and concentration of antimicrobial compounds: carvacrol, limonene oxide and orange oil, at 500 and 1000 ppm.

To carry out biofilm formation, cultures were incubated in 24-well stainless steel plates (AISI 304 and AISI 316) and plastic (Polystyrene) in static air stoves during 72 hours at 37°C.

The three natural compounds showed different degrees of efficacy as antimicrobial agents capable of reducing the presence of sessile cells from biofilms of *L. monocytogenes* EGD-e and *E. coli* MG1655. Carvacrol was the most effective antimicrobial agent, allowing to reach levels of microbial inactivation superior to 5 logarithmic cycles on the biofilm developed in surfaces of stainless steel. This study demonstrates that biofilms of *L. monocytogenes* EGD-e and *E. coli* MG1655 developed on stainless steel surfaces, not only contain a smaller number of sessile cells, but also show a greater sensitivity to carvacrol attack than those developed on polystyrene. These results corroborate the greatest suitability of stainless steel as food contact material in the food industry.

2. Introducción

2.1. Importancia de la inocuidad de los alimentos

Inocuidad, según la Real Academia de la Lengua Española, se define como el carácter de ser inocuo, es decir, que no cause daño al consumidor. En este sentido, la salud pública se pone en riesgo cuando a lo largo de la cadena alimentaria no se siguen buenas prácticas de producción, procesamiento, conservación, transporte y/o venta de alimentos (Nguyen-Viet, Tuyet-Hanh, Unger, Dang-Xuan, & Grace, 2017).

Cuando se habla de inocuidad de los alimentos se hace referencia a todos los riesgos, sean crónicos o agudos, que pueden hacer que los alimentos sean nocivos para la salud del consumidor (Arturo Rafael, Alejandro, & John Jairo, 2012). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015), la inocuidad de los alimentos es una cuestión prioritaria para los consumidores, productores y gobiernos, y señala que invertir en salubridad de los alimentos significa invertir en la próxima generación.

Cabe indicar que para la OMS (2015), la insalubridad de los alimentos representa un problema, ya que la existencia de enfermedades de transmisión alimentaria se considera un problema de salud pública significativo, de relevancia social y económica, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo.

Se debe tener en cuenta la importancia de la inocuidad de los alimentos ya que con frecuencia se producen brotes alimentarios vehiculados por una amplia variedad de productos alimenticios (Jofré *et al.*, 2016). Estos brotes pueden estar causados por malas prácticas higiénicas a lo largo de la cadena de producción, desde las prácticas agrícolas y/o ganaderas hasta las ejercitadas por los consumidores. Además de suponer un riesgo para la salud del consumidor también tiene repercusión a nivel económico, ya que la desconfianza del consumidor sobre las medidas de seguridad alimentaria podría ocasionar una interrupción del comercio nacional e internacional, como lo demostró el grave brote con *Escherichia coli* O104:H4 en Alemania en 2011 (Asselt, Fels-Klerx, Breuer, & Helsloot, 2017).

Entre las bacterias patógenas causantes de infecciones e intoxicaciones alimentarias destacan, debido a su elevada prevalencia en los alimentos, algunos serotipos de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica* Typhimurium y *Staphylococcus aureus* (Duvenage, Duvenage, Plessis, Volschenk, & Korsten, 2017).

Se conoce que la listeriosis es una enfermedad de gravedad elevada en poblaciones de riesgo, como embarazadas, ancianos, bebés e inmunodeprimidos, causada por el consumo de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*. Un reciente estudio ha demostrado también la implicación de otras cepas de *Listeria* presentes en alimentos procesados tales como *Listeria ivanovii* y *Listeria welshimeri* (Bouayad & Hamdi, 2012). La prevalencia de *L. monocytogenes* en carnes crudas y cocidas en España durante el año 2012 fue de aproximadamente el 18% y 35%, respectivamente. Esto se debe fundamentalmente a la contaminación de *Listeria* durante el procesamiento, resaltando como una de las principales causas la formación de biopelículas y su elevada resistencia a los actuales sistemas de higienización y desinfección.

En las últimas décadas, se ha puesto de manifiesto que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente exclusivamente de forma libre, comportándose como seres unicelulares, sino que, en muchas ocasiones, pueden encontrarse formando parte de comunidades microbianas con un sistema de organización más típico de los organismos coloniales, creciendo adheridas a superficies y embebidas en matrices extracelulares que ellas mismas sintetizan. A estas estructuras biológicas se las denomina biopelículas (Domínguez Rodríguez, Badiola Díez, Cepeda Sáez, Más Barón, & Rodríguez Ferri, 2010).

Además de los problemas sanitarios ocasionados por la formación de biopelículas a partir de microorganismos patógenos, los microorganismos alterantes también forman habitualmente biopelículas, lo que también conlleva la contaminación de los alimentos, y como consecuencia, la pérdida de calidad y de vida útil.

2.2. Formación de biopelículas

Las biopelículas se reconocen como un ecosistema microbiano unido a una superficie abiótica y embebido dentro de sustancias poliméricas extracelulares sintetizadas por las propias células. La formación de biopelículas bacterianas es una cuestión alarmante en la industria alimentaria debido a su elevada resistencia frente a antimicrobianos, calor y desinfectantes (Branda, Kolter, Chu, Kearns, & Losick, 2006).

Las biopelículas comparten una característica estructural importante; sus células constituyentes están unidas por una matriz extracelular que se compone principalmente de macromoléculas, incluyendo polisacáridos, proteínas, y ácidos nucleicos, que son producidas por las propias células. Además, se ha demostrado que la matriz extracelular

desempeña un papel esencial en el establecimiento y mantenimiento de la estructura de las biopelículas (Roux *et al.*, 2015). Existen numerosos beneficios que una comunidad bacteriana podría obtener de la formación de biopelículas; entre las principales se encuentra la protección contra protozoos y el aporte de una elevada resistencia frente a los agentes antimicrobianos. La presencia de una matriz extracelular protege a las células constituyentes de las agresiones externas y actúa como una barrera de difusión de nutrientes, vitaminas, o cofactores. Por otro lado, la biopelículas influyen en la tasa de crecimiento bacteriano viéndose limitado por el tamaño y disposición de la matriz de las biopelículas (López, Vlamakis, & Kolter, 2010).

Las bacterias más comunes en formación de biopelículas son *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* y *Cronobacter sakazakii* (Bae, Baek, & Lee, 2012). Estas bacterias, poseen la capacidad de desarrollar biopelículas y adherirse en la mayoría de las superficies ampliamente utilizadas en el procesamiento de alimentos, incluyendo acero inoxidable, juntas de goma y polímeros, y suponer una fuente de contaminación cruzada para el alimento. Además, se ha evidenciado que las biopelículas desarrolladas en el procesado de alimentos de la industria poseen una mayor resistencia debido a la elevada cantidad de nutrientes disponibles, favoreciendo su crecimiento y diseminación a lo largo de la cadena productiva (Kim & Kang, 2017).

2.3. Factores que influyen en la formación de biopelículas

Según Shi and Zhu (2009), los factores que en mayor medida influyen sobre la formación de biopelículas son:

- a) Propiedades de la superficie de contacto.
- b) Tiempo de contacto.
- c) Características de la superficie bacteriana.
- d) Disponibilidad de nutrientes.
- e) Disponibilidad de agua.
- f) Temperatura.
- g) Concentración de oxígeno.
- h) Humedad.
- i) pH del medio.
- j) Cepa microbiana.

Mediante el uso de la microscopía electrónica de barrido (Figura 1) se puede observar la influencia que pueden desempeñar las condiciones de tratamiento medioambientales en la morfología y estructura de las biopelículas de *Escherichia coli* O157: H7 sobre superficies de acero inoxidable.

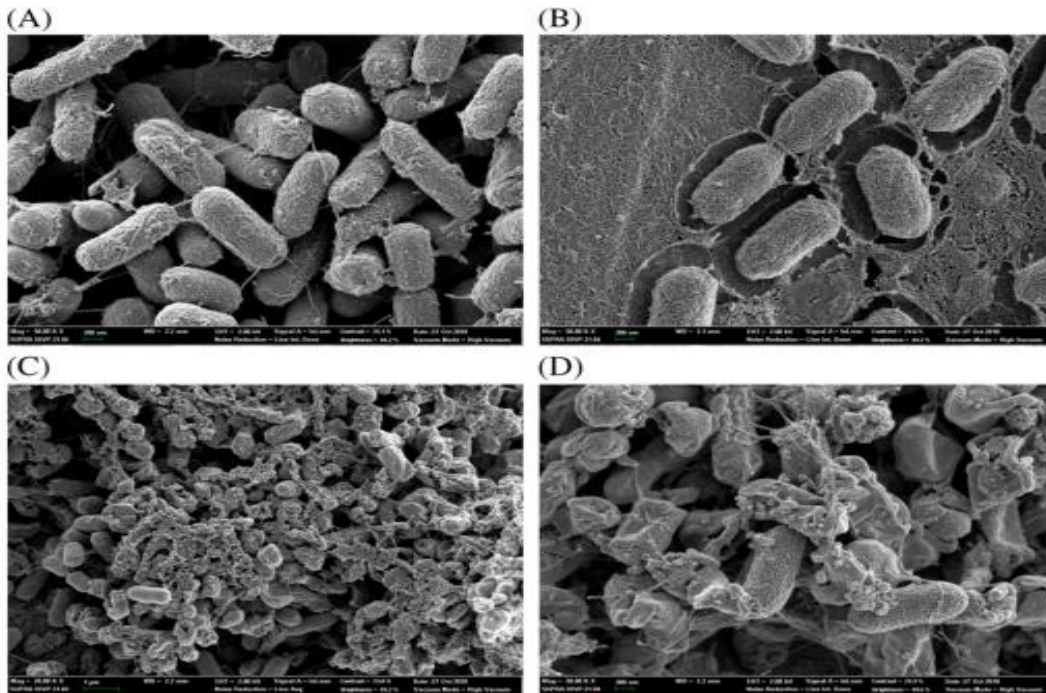


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FE-SEM) de *Escherichia coli* O157: H7 en superficies de acero inoxidable: (A) Biopelícula formada a 25 °C durante 6 días, (B) Biopelícula en TSB almacenadas a 25 °C durante 5 días, (C) Biopelícula a 68 % de humedad relativa durante 5 días a 25 °C y (D) Biopelícula en 100% de humedad relativa a 25 °C durante 5 días (Bae *et al.*, 2012).

2.4. Etapas de la formación de una biopelícula

La formación de una biopelícula siempre sigue un proceso sistemático que permite predecir y conocer más afondo su comportamiento.

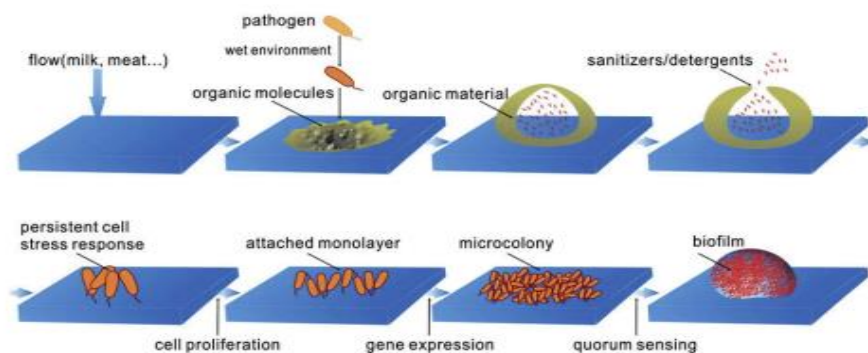


Figura 2. Etapas de formación de una biopelícula: 1) Unión inicial, 2) Unión irreversible, 3) Desarrollo de la arquitectura de la futura biopelícula, 4) Maduración, 5) Dispersión (Shi & Zhu, 2009).

A continuación, se describen las fases de formación de una biopelícula (Figura 2):

1. Unión inicial

En la unión inicial los microorganismos sufren cambios profundos durante su transición de organismos planctónicos a células sésiles, aquellas que forman parte de una comunidad microbiana adheridas a una superficie (O'Toole, Kaplan, & Kolter, 2000).

La adhesión es el paso inicial en la formación de biopelículas, y es mediada principalmente por fuerzas van der Waals, interacciones electrostáticas y enlaces hidrofóbicos. Las propiedades de la superficie celular, la presencia de apéndices extracelulares, las interacciones involucradas en la comunicación célula-célula y la producción de exopolisacáridos, tienen gran importancia en la formación y el desarrollo de biopelículas con respecto a la superficie de contacto (Pimentel-Filho, Martins, Nogueira, Mantovani, & Vanetti, 2014).

2. Unión irreversible

En el paso de la fase reversible a la unión irreversible se produce un cambio de una interacción débil de las bacterias con la superficie a una unión permanente con la presencia de exopolisacáridos (EPS). Se ha demostrado que las bacterias adheridas producen un polisacárido extracelular que une las células y facilita la formación de microcolonias, provocando la maduración de la biopelícula (Augustin, Ali-Vehmas, & Atroshi, 2004).

3. Desarrollo de la arquitectura de la futura biopelícula

El sustrato fortalece el vínculo entre las bacterias y estabiliza las colonias frente a cualquier estrés ambiental. En los sistemas naturales se ha demostrado que la acumulación bacteriana facilita el acceso de nuevas células planctónicas del medio circundante como resultado de la comunicación de célula a célula (percepción de quórum) (Pesci *et al.*, 1999).

4. Maduración

La maduración de biopelículas es el paso en el que se desarrolla una estructura organizada con el fin de alcanzar la madurez estructural, para lo que se requieren períodos de 3 a 10 días. Las bacterias crecen bajo forma sésil, en microcolonias, y a medida que la biopelícula madura, se va adaptando a las variaciones de nutrientes, de oxígeno y a los cambios poblacionales (Puga, SanJose, & Orgaz, 2016).

5. Dispersión

La dispersión es el último paso en el ciclo de la formación de biopelículas que permite que las células vuelvan a su forma planctónica, de modo que el desprendimiento permite la colonización de nuevos nichos. La falta de nutrientes es una de las principales razones por las que se inicia la fase de dispersión, ya que permite a las bacterias buscar un ambiente rico en nutrientes y aumentar en número la población microbiana (O'Toole *et al.*, 2000).

2.5. El uso de aceites esenciales como agentes antimicrobianos

Los aceites esenciales (AEs) pertenecen al grupo de los agentes antimicrobianos naturales de origen vegetal. Son productos líquidos aromáticos que se extraen de las plantas a partir de procesos como la destilación, la expresión mecánica o la extracción con solventes volátiles, entre otros (Burt, 2004). En la naturaleza, los AEs sirven de protección a las plantas que los sintetizan debido a sus propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas e insecticidas (Bakkali, Averbek *et al.*, 2008). Las propiedades antimicrobianas de los AEs residen en la gran variedad de compuestos terpenoides que los componen, como por ejemplo el carvacrol.

El carvacrol es un compuesto monoterpenoide fenólico y un constituyente principal del orégano. Este compuesto tiene un elevado efecto antimicrobiano ya que provoca daños estructurales y funcionales a la membrana celular, y la desintegración de la membrana externa causando la liberación de liposacáridos (LPS) en bacterias Gram-negativas. Aunque el carvacrol afecta a la membrana externa, se considera que la principal causa de su efecto antimicrobiano reside en el daño producido en la membrana citoplasmática, de esta manera repercute en el transporte pasivo de iones a través de la membrana (Hyldgaard, Mygind, & Meyer, 2012). En este sentido, el carvacrol posiblemente afecte al plegamiento de las proteínas de la membrana externa. Según Burt (2004), la presencia de una concentración sub-letal de carvacrol en el medio de crecimiento de *E. coli* provocó una alteración en el plegamiento de proteínas y la inhibición de la síntesis de flagelina, que causó el crecimiento de nuevas células sin flagelos. Además, las células que poseían flagelos mostraron una disminución de la motilidad en presencia de carvacrol, lo que indica que este compuesto puede alterar el potencial de membrana, y de este modo, la fuerza motriz de protones necesaria para

impulsar el movimiento flagelar y regular el transporte de nutrientes a través de las envolturas celulares.

Por otra parte, los aceites cítricos, y concretamente el obtenido de la naranja, se utilizan ampliamente en diversas aplicaciones en las industrias de los alimentos. Los aceites cítricos son mezclas de más de cien compuestos que se pueden clasificar en tres fracciones: hidrocarburos terpénicos, compuestos oxigenados y compuestos no volátiles. El óxido de limoneno se encuentra en muchos aceites esenciales de plantas y en especial de origen cítrico, como sucede en el aceite esencial de naranja. El óxido de limoneno es un terpeno producido a partir de la combinación de varias unidades de isopreno ($C_5 H_8$) sintetizados en el citoplasma de las células vegetales de la corteza de los cítricos (Caballero & Caballero, 2003). Los estudios realizados con óxido de limoneno han mostrado que su actividad antimicrobiana es moderada frente a 25 géneros diferentes de bacterias que plantean problemas en los animales, plantas y productos alimenticios (Dorman & Deans, 2000).

Debido a su baja contaminación ambiental, los aceites esenciales y sus principales constituyentes son generalmente reconocidos como seguros (GRAS) (Fisher, Phillips, & McWatt, 2009).

2.6. Superficies de contacto en la industria alimentaria: acero inoxidable

Entre otros, los materiales más utilizados en contacto con los alimentos en la industria alimentaria son el acero inoxidable, vidrio, caucho, policarbonato, poliuretano, poliestireno, polipropileno, teflón, nitrilo, titanio, aluminio, cerámica y madera. Es habitual que las biopelículas puedan desarrollarse en cualquiera de estas superficies. La adhesión al sustrato depende de las propiedades fisicoquímicas del sustrato tales como textura, hidrofobicidad y carga superficial (Pagán & García-Gonzalo, 2016). El principal factor que promueve el proceso de formación de biopelículas es el envejecimiento de los materiales de contacto, lo que habitualmente se produce por la temperatura, la utilización, los agentes de limpieza, etc. (Storgards, Simola, Sjöberg, & Wirtanen, 1999).

Debido a los problemas ocasionados por el desgaste que sufren los materiales de contacto con los alimentos, la industria ha tratado de sustituir los materiales tradicionales por otros más seguros y resistentes frente al deterioro, como es el acero inoxidable (American Iron and Steel Institute (AISI)).

El acero inoxidable posee una alta resistencia a la corrosión debido a sus altos contenidos de cromo y níquel, sin embargo, en función de su composición, pueden presentar diferentes propiedades mecánicas y tribológicas (Biehler, Hoche, & Oechsner, 2017). AISI 304 y AISI 316 son los aceros inoxidables más utilizados en la fabricación de equipos para la industria alimentaria. AISI 304 es un acero con un mínimo de 18% de cromo, 8% de níquel y hasta 0,08% de carbono, mientras que AISI 316, es un acero que tiene hasta 3% de molibdeno y más alto contenido de níquel (10-14%) que AISI 304. La principal diferencia entre los dos aceros, AISI 304 y AISI 316, es su contenido de molibdeno, añadido para aumentar la resistencia a la corrosión en diversos ambientes (salmueras, blanqueo, biofluidos, etc.); concretamente el molibdeno reduce e inhibe la corrosión por picadura inducida por cloruros. A pesar de que el acero inoxidable AISI 316 posee mayor resistencia química, el acero inoxidable AISI tipo 304 ha sido el más ampliamente utilizado por los fabricantes de equipos para la industria alimenticia debido a su menor coste (Casarin, Casarin, Brandelli, *et al.*, 2016).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos siguen siendo un serio problema de salud en todo el mundo. Se ha señalado como una de las principales causas la contaminación microbiana durante la elaboración del producto alimenticio, a partir de superficies de equipos utilizados para el procesamiento o el almacenamiento de alimentos (Trentin *et al.*, 2014). La prevención de la contaminación microbiana así como el saneamiento adecuado de los materiales en contacto con los alimentos son fundamentales para evitar las enfermedades transmitidas por los alimentos. (Casarin, Casarin, Soares, *et al.*, 2016). Se sabe que la industria alimentaria se enfrenta a un gran problema en muchas etapas del procesado debido a la formación de biopelículas, ya que, además de suponer un riesgo alimentario, los biofilms pueden causar pérdidas y bloqueos en el equipo de procesamiento, acelerar la corrosión y el deterioro del material en el equipo (Wirtanen, Husmark, & Mattila-Sandholm, 1996).

2.7. Problemática de los actuales sistemas de higienización y desinfección de superficies de contacto con alimentos

Para eliminar eficazmente los residuos de alimentos y otros residuos que puedan contener microorganismos es fundamental la utilización de un método de limpieza eficaz. Entre los métodos de limpieza empleados, cabe destacar la aplicación de fuerzas físicas y/o productos químicos tales como agentes tensoactivos o productos alcalinos, utilizados

para suspender y disolver residuos alimentarios por disminución de la tensión superficial. Entre los principales agentes antimicrobianos convencionales empleados en los sistemas de limpieza se encuentran el yodo, hipoclorito, ácido aniónico, ácido peroxiacético y amonio cuaternario. Así, los procesos de limpieza normalmente pueden llegar a eliminar el 90% o más de los microorganismos asociados a las superficies de contacto, pero no siempre resulta posible lograr su total eliminación. Si bien uno de los principales inconvenientes de una buena limpieza o desinfección es a menudo el coste que implica el tiempo de inactividad de los equipos, la razón fundamental que nos obliga a revisar los sistemas de limpieza actuales es el alto grado de contaminación y residuos que se genera por parte de los productos de limpieza empleados, lo que supone en ocasiones un grave riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Simões, Simões, & Vieira, 2010). En este sentido, el uso de calor hasta alcanzar temperaturas moderadas es un factor relevante que permite reducir la aplicación de altas concentraciones de antimicrobianos, contribuyendo a disminuir los niveles de contaminación.

En la actualidad, como alternativa al uso de desinfectantes químicos tradicionales, se está estudiando la eficacia de antimicrobianos de origen natural. Esto responde a la demanda de los consumidores por productos alimenticios más seguros, naturales y saludables, y al reciente crecimiento negativo y percepción de los consumidores contra los productos químicos sintéticos, lo que se está desplazando el esfuerzo de investigación hacia alternativas naturales (Raffaella *et al.*, 2017). En este sentido, la investigación de nuevas sustancias en la desinfección capaces de evitar la formación de biopelículas o causar su destrucción es un área de creciente interés.

Según Botta and Scaffaro (2010), se está estudiando el uso de antimicrobianos naturales con el fin de reemplazar a los agentes de limpieza tradicionales, entre los que se destacan los aceites esenciales (AEs) de especias y hierbas aromáticas. Numerosos estudios han demostrado la eficacia de los componentes de los AEs en la eliminación de las biopelículas, pero hay que tener en cuenta que muy pocas veces se ha estudiado en profundidad en materiales comúnmente utilizados en la industria, como son los aceros (Dorman & Deans, 2000).

Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias, cuando se encuentran formando parte de biopelículas, son más resistentes frente a los agentes antimicrobianos que cuando se encuentran como células planctónicas. Por ello, en este Trabajo Fin de Master se propone la utilización de nuevos antimicrobianos de origen natural, que sean

eficaces y seguros, y además económicos y respetuosos con el alimento y el medio ambiente, actuando individualmente o en combinación, como alternativa a las estrategias convencionales de limpieza y desinfección para la eliminación de las biopelículas microbianas en la industria alimentaria. Además, este Trabajo Fin de Máster pretende abordar por primera vez en nuestro grupo de investigación el estudio de la resistencia de microorganismos formadores de biopelículas en función del tipo de superficie, incluyendo dos tipos de aceros inoxidables (AISI 304 y AISI 316) comúnmente empleados en la industria alimentaria, lo que contribuirá al diseño y optimización de sistemas de limpieza y desinfección más adecuados.

3. Objetivos

Este Trabajo Fin de Máster pretende abordar el estudio in vitro de la influencia de la superficie de contacto en la eliminación biopelículas sintetizadas por *E. coli* MG1655 y *L. monocytogenes* EGD-e mediante la aplicación de aceites esenciales o sus constituyentes individuales. Para la consecución de este objetivo general se proponen los siguientes objetivos parciales:

-Estudio de la influencia del tipo de acero inoxidable (AISI 304 y AISI 316) en comparación con material plástico de laboratorio (Poliestireno).

-Estudio de la influencia del tipo y la concentración de antimicrobiano: carvacrol, óxido de limoneno y aceite de naranja, a concentraciones de 500 y 1000 ppm.

-Estudio de la influencia del pH del medio de tratamiento (pH 7,0 y 4,0).

4. Material y métodos

4.1. Material y reactivos

Materiales

- Agitador vórtex. (IKA-Werke GmbH & Co. KG)
- Centrífuga (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).
- Contador automático de colonias (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, Reino Unido).
- Estufa de aire estático (J.P. Selecta, Bilbao, España).
- Estufa de aire forzado (J.P. Selecta).
- Ultrasonidos (Allendale-ultrasonics.co.uk, cavitek professional series, Hertfordsire, Reino Unido).
- GraphPad Software (Inc, San Diego, Estados Unidos).
- Micropipetas de 20, 100 y 1000 μ L. (Nichiryo Nichipet EX-Plus.,France)
- pH metro (modelo BASIC 20+, Crison, Barcelona, España).
- Placas de microtitulación de 24 pocillos (NunclonTM Delta, ICT S.L., Lardero, La Rioja, España).
- Placas de acero inoxidable AISI 304 y AISI 316 (fabricadas por el Servicio de Mecánica de Precisión del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza).
- Placas Petri. (VWR International, 90 x 14,2 mm., France)
- Tubos de 1,5 mL.
- Frascos de vidrio de 50, 100 y 250 mL.
- Pipetas graduadas estériles de 10 y 50 mL.
- Eppendorf 1,5 mL.
- Asas de siembra.

- Tubos de ensayo.
- Tubos falcon.

Reactivos

- Ácido cítrico 1-hidratado PA-ACS-ISO (C₆H₈O₇ H₂O) (Panreac, Barcelona, España).
- Agar tripticasa de soja (TSA) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).
- Agua de peptona tamponada (AES Laboratoire, Combourg, Reino Unido).
- Caldo tripticasa de soja (TSB) (Oxoid).
- Carvacrol \geq 98%, FCC, FG (SigmaAldrich, San Luis, Estados Unidos).
- Óxido de limonene 95% (SigmaAldrich).
- Aceite de naranja 95% (Indulleida, Lleida, España).
- Extracto de levadura (YE) (Oxoid).
- Fosfato disódico (Reag.Ph.Eur) PA-ACS (Na₂HPO₄)(Panreac).
- Tween 80 (SigmaAldrich).

4.2. Preparación de las biopelículas

Para llevar a cabo la formación de las biopelículas se emplearon dos cepas bacterianas diferentes: *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655. A partir de los crioviales, conservados a -80°C con glicerol, se realizaron siembras en estría en placas con TSA de forma semanal, para la obtención de colonias aisladas a partir de las cuales se realizarían los experimentos a largo del estudio. En primer lugar se prepararon los precultivos microbianos; para ello, se inoculó una colonia, previamente aislada, en un tubo de ensayo con caldo de cultivo tripticasa de soja (TSB). Este tubo con TSB se incubó en agitación a 37°C durante 12 horas. A continuación se inoculó, en una proporción 1:100, el precultivo en caldo de cultivo TSB estéril, previamente preparado. A continuación, se añadió 2 mL de la dilución en placas de microtitulación de 24 pocillos de plástico (Poliestireno) (control), y de acero inoxidable (AISI 304 y AISI 316). Estas placas se incubaron a 37°C durante 72 horas en una estufa de aire estático.

4.3. Recuento del número de microorganismos presentes en las biopelículas.

Tras las 72 horas se eliminó el sobrenadante de los pocillos y se procedió al lavado de la placa cuidadosamente con agua destilada, para eliminar los restos medio de cultivo. Una vez realizado el lavado, en cada pocillo de la placa se añadieron 1,5 ml de agua de peptona (0,1%) con Tween 80 (dilución 1:100), a los cuales se les aplicó ultrasonidos durante diez minutos para lograr la disgregación de la biopelícula formada en la placa. Posteriormente, se llevaron a cabo diluciones seriadas en agua de peptona (0,1%) y se procedió a la siembra de 100 µL en placas Petri por homogeneización en masa en medio de cultivo tripticasa de soja (TSA). Las placas inoculadas con *L. monocytogenes* EGD-e se incubaron durante 48 horas a 35°C, mientras que las de *E. coli* MG1655 se incubaron durante 24 horas a 35°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento de colonias mediante un contador automático de colonias.

4.4. Tratamiento de destrucción de las biopelículas con carvacrol, óxido de limoneno y aceite de naranja.

Tras el lavado, y de forma paralela al recuento de células en la biopelícula, se realizó el tratamiento de eliminación de las biopelículas con los diferentes compuestos individuales (CIs; carvacrol y óxido de limoneno) y el AE de naranja. Para ello, se añadió a cada uno de los pocillos, donde se encontraban las biopelículas, 2 mL de tampón McIlvaine a pH 4,0 y pH 7,0 con los CIs disueltos. Los CIs se aplicaron a una concentración de 500 ppm y 1000 ppm para evaluar su acción individual. La concentración aplicada en el tratamiento fue seleccionada en base a estudios previos (Fernández, 2015; Alfonso, 2016). Se dejó actuar al antimicrobiano, en contacto con la biopelícula, durante 60 minutos a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizó el lavado de los pocillos como se describe en el apartado 4.3 para realizar el posterior recuento en placa con el fin de determinar la cantidad de microorganismos eliminados de la biopelícula.

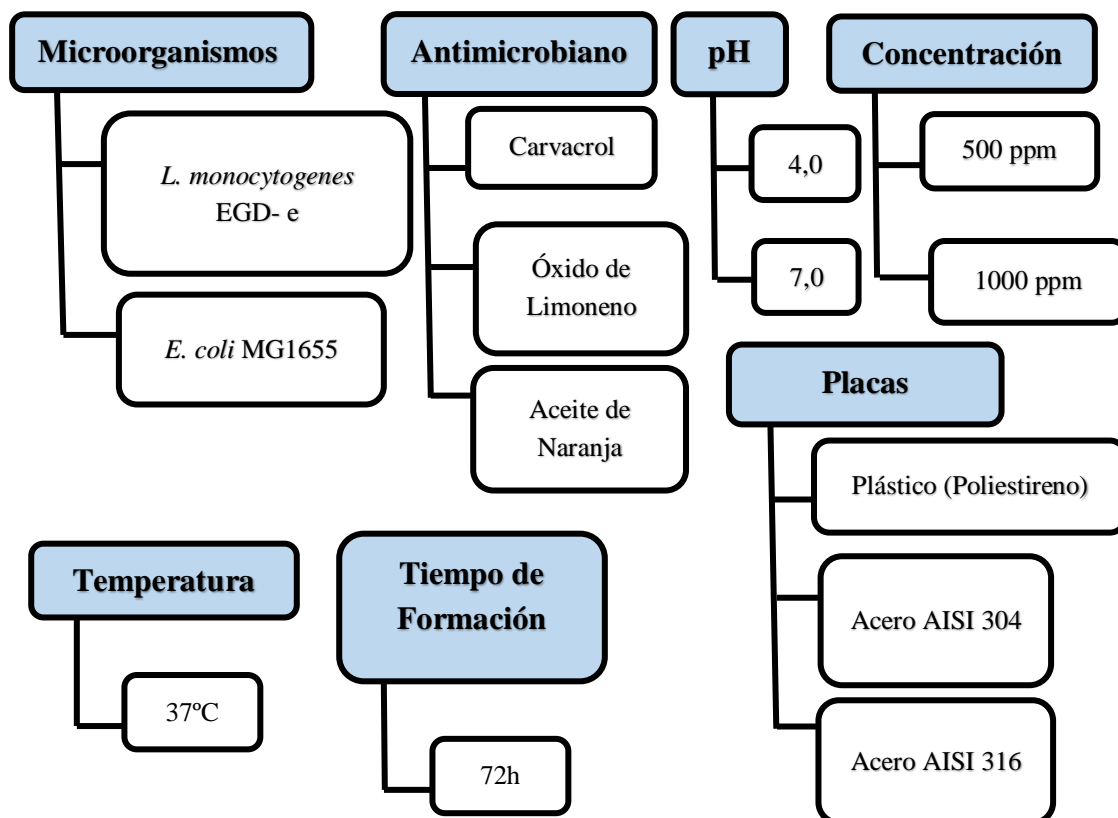


Figura 3. Esquema de las condiciones del tratamiento de destrucción de biopelículas ensayadas.

4.5. Análisis estadístico de datos

Los datos para la cuantificación de las biopelículas se obtuvieron por triplicado en cada experimento, y en base a tres experimentos independientes. En las gráficas se muestran las medias y la desviación estándar (sd) de todas las réplicas.

Por otro lado, se empleó el t-test o análisis ANOVA para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados. Complementariamente se realizó un post test Tukey, mediante la herramienta GraphPadPRISM®. La significancia estadística de cada uno de ellos se consideró a $p < 0,05$.

5. Resultados y discusión

Antes de iniciar los estudios de eliminación de biopelículas formadas por *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655, se realizó una revisión bibliográfica con el objetivo de seleccionar, de forma aproximada, las concentraciones de los antimicrobianos naturales para aplicar en los tratamientos de destrucción de las biopelículas, para así poder comparar con estudios previos los resultados obtenidos. Las concentraciones seleccionadas para este estudio fueron de 500 y 1000 ppm para los tres compuestos naturales: carvacrol, óxido de limoneno y aceite de naranja, en base previos estudios (Fernandez, 2015; Alfonso, 2016).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de tres antimicrobianos (carvacrol, óxido de limoneno y aceite esencial de naranja) sobre biopelículas de una bacteria gram-positiva (*L. monocytogenes* EGD-e) y una gram-negativa (*E. coli* MG1655), formadas en placas microtiter de tres materiales diferentes: poliestireno, AISI 304 y AISI 316. Por otro lado, debido a la importancia del pH en la efectividad de los tratamientos de aceites esenciales para la eliminación de biopelículas (Oussalah, Caillet, Saucier, & Lacroix, 2007) todos los experimentos se llevaron a cabo tanto a pH neutro (pH 7,0) como a pH ácido (pH 4,0).

Como se muestra en la figura 4, en primer lugar, se determinó la concentración inicial de células sésiles de las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 tras 72 horas de incubación en una estufa de aire estático a 37°C en función del material de contacto. Como se observa en la figura 4A, el recuento inicial de las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e crecidas en poliestireno fue aproximadamente 1 ciclo logarítmico mayor ($>10^7$ UFC/mL) que el obtenido en cualquiera de los dos aceros empleados ($>10^6$ UFC/mL) ($p < 0,05$). Si bien las diferencias fueron mucho más reducidas, también las biopelículas de *E. coli* MG1655 (Figura 4B) alcanzaron mayores recuentos en poliestireno que en acero inoxidable ($p < 0,05$). Por otra parte, a modo de control, se verificó que el tratamiento durante 60 minutos en ausencia de antimicrobianos, únicamente en presencia del tampón, y un posterior lavado, eliminaba menos de 2 ciclos logarítmicos de la población microbiana inicial, no existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tampón de pH 4,0 y el de pH 7,0 en ninguno de los materiales empleados. No obstante, a pesar de eliminar gran parte de la biopelícula inicial, esta seguía estando constituida por células viables, que podrían constituir una posible fuente de contaminación desde un punto de vista práctico, por lo que seguía siendo igualmente

importante lograr un método efectivo que permitiera lograr el mayor grado de destrucción posible. Los resultados que se muestran en esta figura se han incluido como control en las figuras 5, 6 y 7 con objeto de ilustrar la reducción del número de células sésiles de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 tras la aplicación de carvacrol (Figura 5), óxido de limoneno (Figura 6) y aceite de naranja (Figura 7).

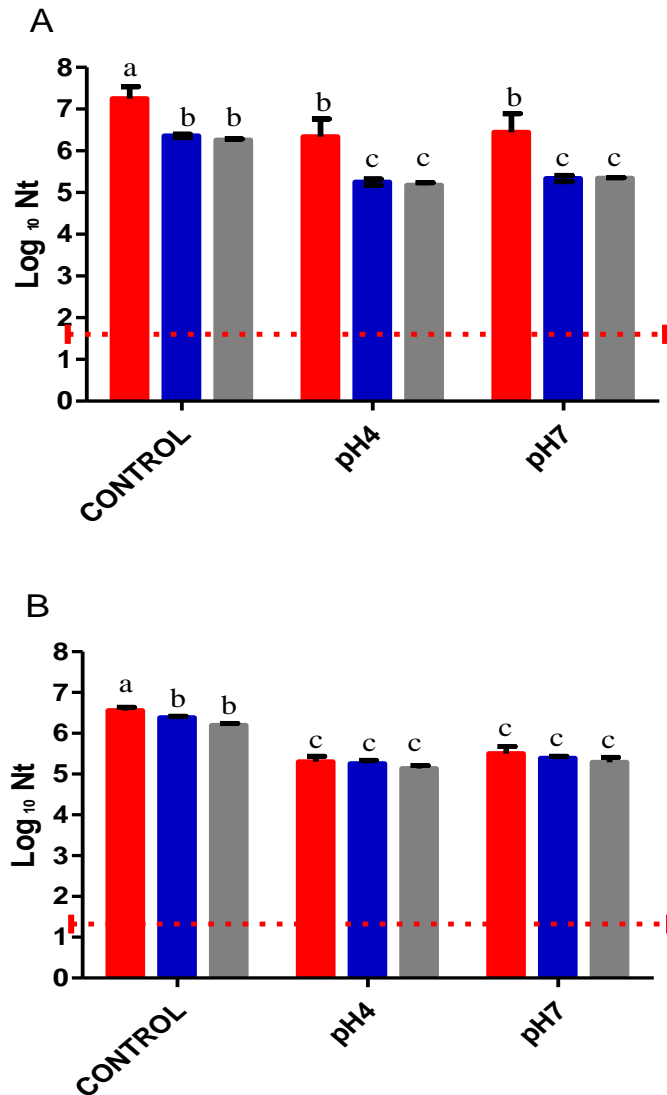


Figura 4. Recuentos microbianos (UFC/mL) de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e (A) y *Escherichia coli* MG1655 (B) desarrolladas en placas microtiter de poliestireno (■), AISI 304 (■) y AISI 316 (■) tras incubación durante 72 h a 37°C (control), y tras posterior incubación a 37°C durante 60 min en presencia de tampón de pH 4,0 (pH 4) o pH 7,0 (pH 7). Se muestra la media y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes. La línea de puntos indica el límite de detección de la técnica de recuento utilizada, las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre materiales y sus respectivos pHs.

5.1. Carvacrol

Como se observa en la figura 5, en el caso de *L. monocytogenes* EGD-e (Figura 5A) la aplicación de 500 ppm de carvacrol permitió reducir en aproximadamente 2 ciclos logarítmicos la población de células sésiles crecidas en los pocillos de poliestireno, y en aproximadamente 3 ciclos logarítmicos en los de AISI 304 y 316. Con lo que respecta a *E. coli* MG1655, tras la aplicación de 500 ppm de carvacrol se obtuvieron unos resultados similares en cuanto al nivel de inactivación en comparación con las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e, y si bien se alcanzó una destrucción de la biopelícula obtenida en AISI 316 sensiblemente mayor, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los dos tipos de acero inoxidable ensayados. Estos resultados corroboran los obtenidos en un estudio previo sobre *E. coli*, en el que se lograban también reducciones cercanas a los 3 ciclos logarítmicos tras 72 horas de incubación en poliestireno (Bazargani & Rohloff, 2016). Al realizar el análisis estadístico entre los materiales se observó que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el plástico y los dos aceros, pero no entre los propios aceros.

Como se observa en la Figura 5, el tratamiento de 1000 ppm de carvacrol frente a las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y de *E. coli* MG1655 formados en pocillos de AISI 304 y 316, causaron una reducción microbiana de 5 ciclos logarítmicos, sin embargo los valores de inactivación en poliestireno fueron inferiores: 3 ciclos logarítmicos. En relación a los resultados obtenidos en poliestireno, estudios realizados también en este material obtuvieron resultados similares cuando trataron de destruir biopelículas de *E. coli* MG1655 mediante la adición de carvacrol a concentraciones de 700 ppm (Pérez-Conesa, Cao, Chen, McLandsborough & Weiss, 2011; Rigotti *et al.*, 2017). Por otra parte, estos resultados demuestran la importancia del material dónde se adhiere y desarrolla la biopelícula, en la efectividad de los tratamientos desinfectantes mediante carvacrol. Si bien los resultados obtenidos en poliestireno confirman resultados previos de nuestro grupo de investigación (Fernández, 2015), los obtenidos en acero muestran por primera vez que este material no solo dificulta la formación de biopelículas sino que además, facilita el ataque de este compuesto antimicrobiano. En este sentido, el estudio demuestra que las diferencias químicas entre los dos AISI empleados no interferirían en la resistencia de las biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 al carvacrol.

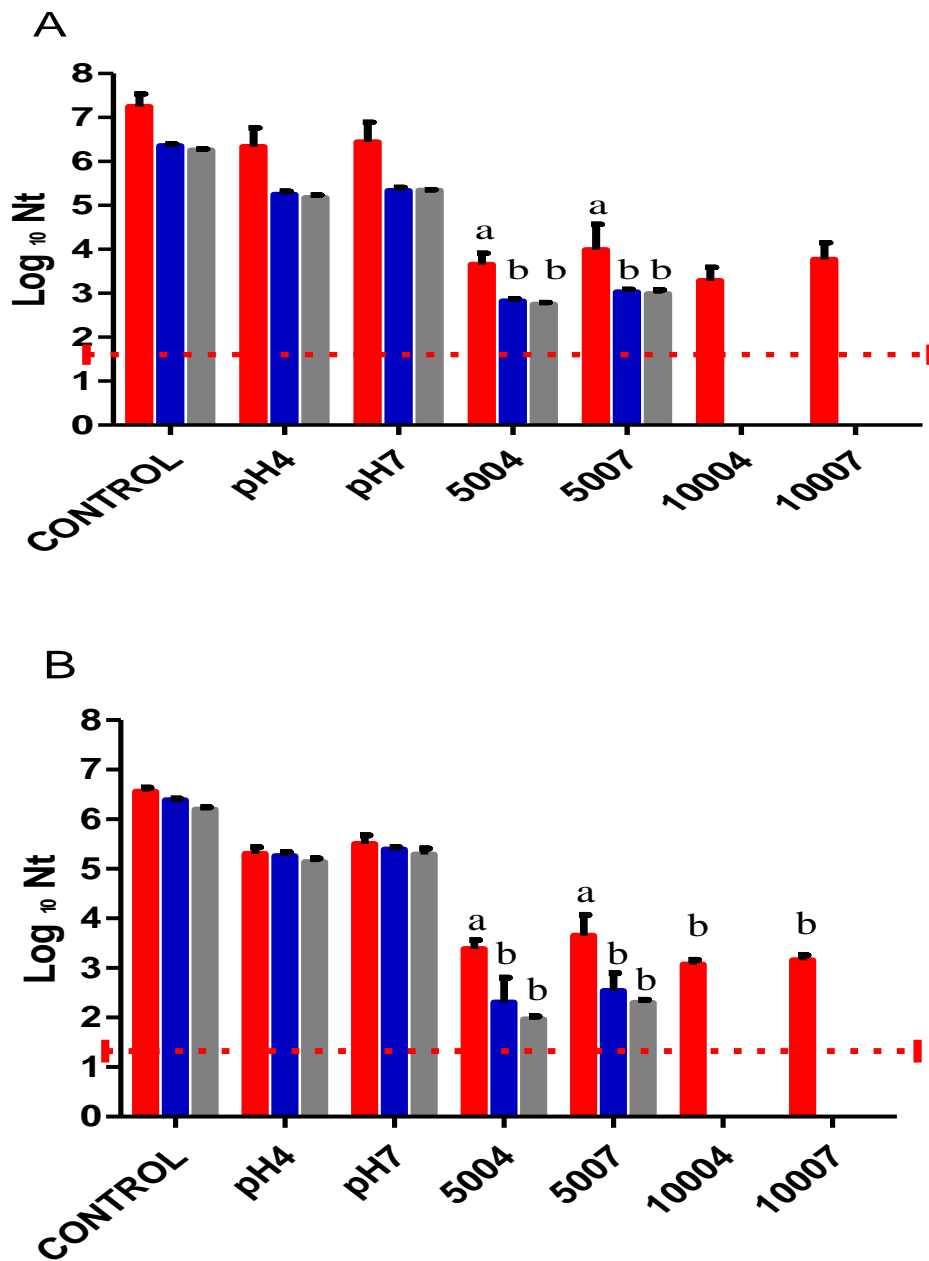


Figura 5. Recuentos microbianos (UFC/mL) de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e (A) y *Escherichia coli* MG1655 (B) en placas microtiter de poliestireno (■), AISI 304 (■) y AISI 316 (■), tras incubación a 37°C durante 60 min en presencia de 500 ppm de carvacrol a pH 4 (5004) o pH7 (5007) o 1000 ppm de carvacrol a pH 4 (10004) o pH 7 (10007). Como control se incluyen los resultados recogidos en la Figura 4. Se muestra la media y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes. La línea de puntos indica el límite de detección de la técnica de recuento utilizada, las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre materiales y sus respectivos pHs.

5.2. Óxido de limoneno

El tratamiento de óxido de limoneno frente a la biopelícula formada por *L. monocytogenes* EGD-e, a una concentración de 500 y 1000 ppm del compuesto, permitió reducir hasta 2 ciclos logarítmicos de la carga de células sésiles de las biopelículas, independientemente del tipo de material de contacto empleado y también del pH del medio de tratamiento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en ningún caso. Los resultados obtenidos en poliestireno confirman resultados previos del grupo de investigación (Espina, Somolinos, Pagán, & García-Gonzalo, 2010).

En lo que respecta a *E. coli* MG1655, el tratamiento de óxido de limoneno tan solo logró una reducción microbiana de 1 ciclo logarítmico en ambos pHs, independientemente de la concentración utilizada, 500 o 1000 ppm, o del material de los pocillos, plástico o acero inoxidable ($p < 0,05$) (Figura 6). Si bien los resultados obtenidos en poliestireno confirman resultados previos de nuestro grupo de investigación (Fernández, 2015), los obtenidos en acero muestran por primera vez que este material se comportaría de modo similar al poliestireno, y que las diferencias químicas entre los dos AISI empleados no interferirían en la resistencia de las biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 al óxido de limoneno, en contraposición a lo observado en el apartado 5.1 cuando el ataque se realiza con carvacrol, y en el que las biopelículas formadas sobre acero son más sensibles que las crecidas sobre superficie de poliestireno.

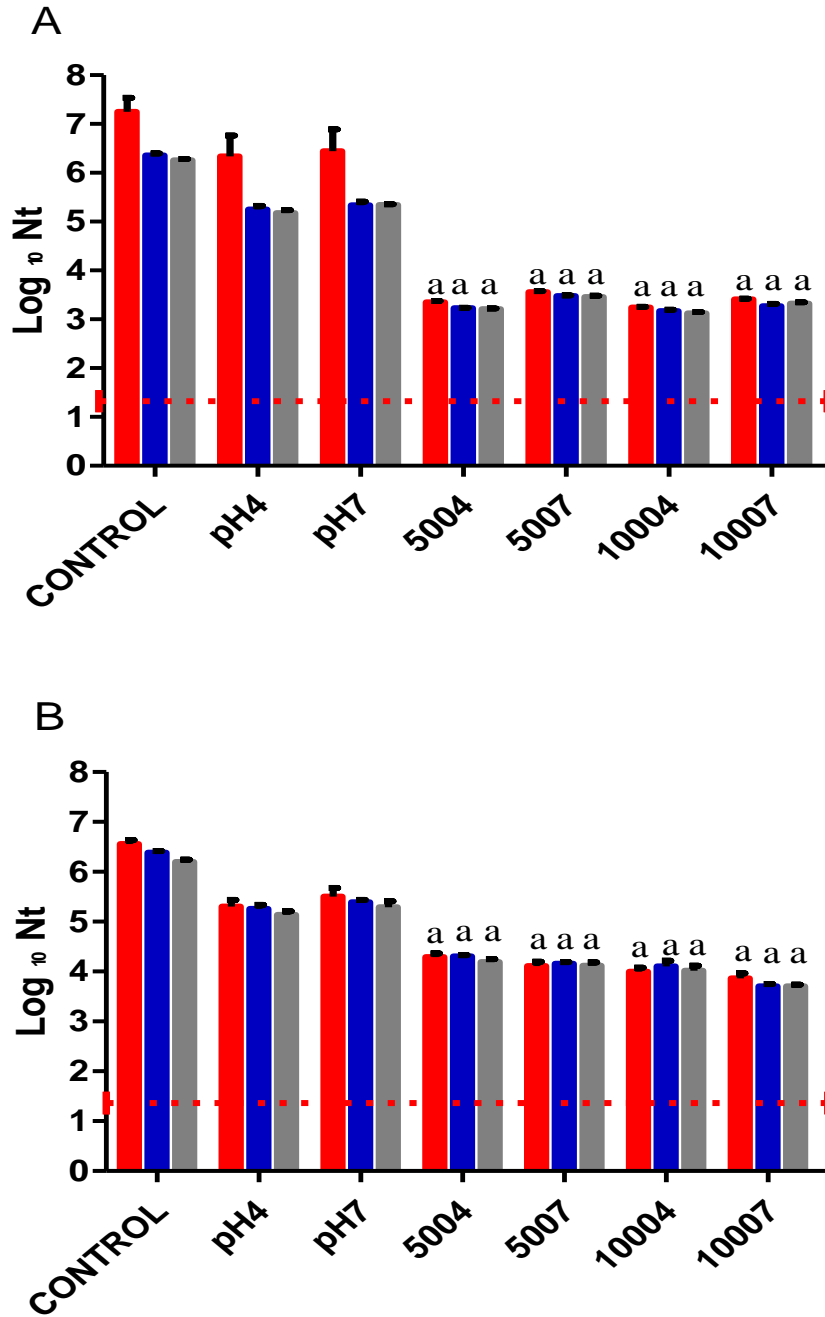


Figura 6. Recuentos microbianos (UFC/mL) de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e (A) y *Escherichia coli* MG1655 (B) en placas microtiter de poliestireno (■), AISI 304 (■) y AISI 316 (■), tras incubación a 37°C durante 60 min en presencia de 500 ppm de óxido de limoneno a pH 4 (5004) o pH7 (5007) o 1000 ppm de carvacrol a pH 4 (10004) o pH 7 (10007). Como control se incluyen los resultados recogidos en la Figura 4. Se muestra la media y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes. La línea de puntos indica el límite de detección de la técnica de recuento utilizada, las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre materiales y sus respectivos pHs.

5.3. Aceite de naranja

Como muestra la figura 7, los resultados obtenidos con aceite de naranja son muy similares a los obtenidos con óxido de limoneno (Figura 6), es decir, se lograron alcanzar niveles moderados de destrucción de las biopelículas (no se alcanzan los 5 ciclos de inactivación deseados), independientemente del material empleado, la concentración de antimicrobiano y el pH del medio de tratamiento ($p < 0,05$). Los resultados obtenidos sobre biopelículas crecidas en poliestireno confirman la escasa actividad antimicrobiana sobre biopelículas del aceite de naranja descrita previamente (Sandasi, Leonard, & Viljoen, 2008).

Así, se puede concluir que tanto el aceite de naranja como uno de sus principales constituyentes, el óxido de limoneno, logran niveles similares de inactivación microbiana, aunque insuficientes a las concentraciones ensayadas, si lo que se pretende es alcanzar una destrucción superior a los 5 ciclos logarítmicos de las células sésiles. Para lograr ese nivel óptimo de destrucción, se hace preciso emplear carvacrol a la mayor concentración testada (1000 ppm), aunque solo sobre superficies de acero, que probablemente por su mayor porosidad, disminuyen la resistencia de las biopelículas frente a este agente antimicrobiano. Estos resultados confirmarían la idoneidad del acero inoxidable como material de contacto con alimentos de referencia para la industria alimentaria. Para la destrucción de biopelículas crecidas en poliestireno se requeriría o bien una mayor concentración de carvacrol, o el incremento de la temperatura de tratamiento hasta temperaturas moderadas de 45°C (Alfonso, 2016).

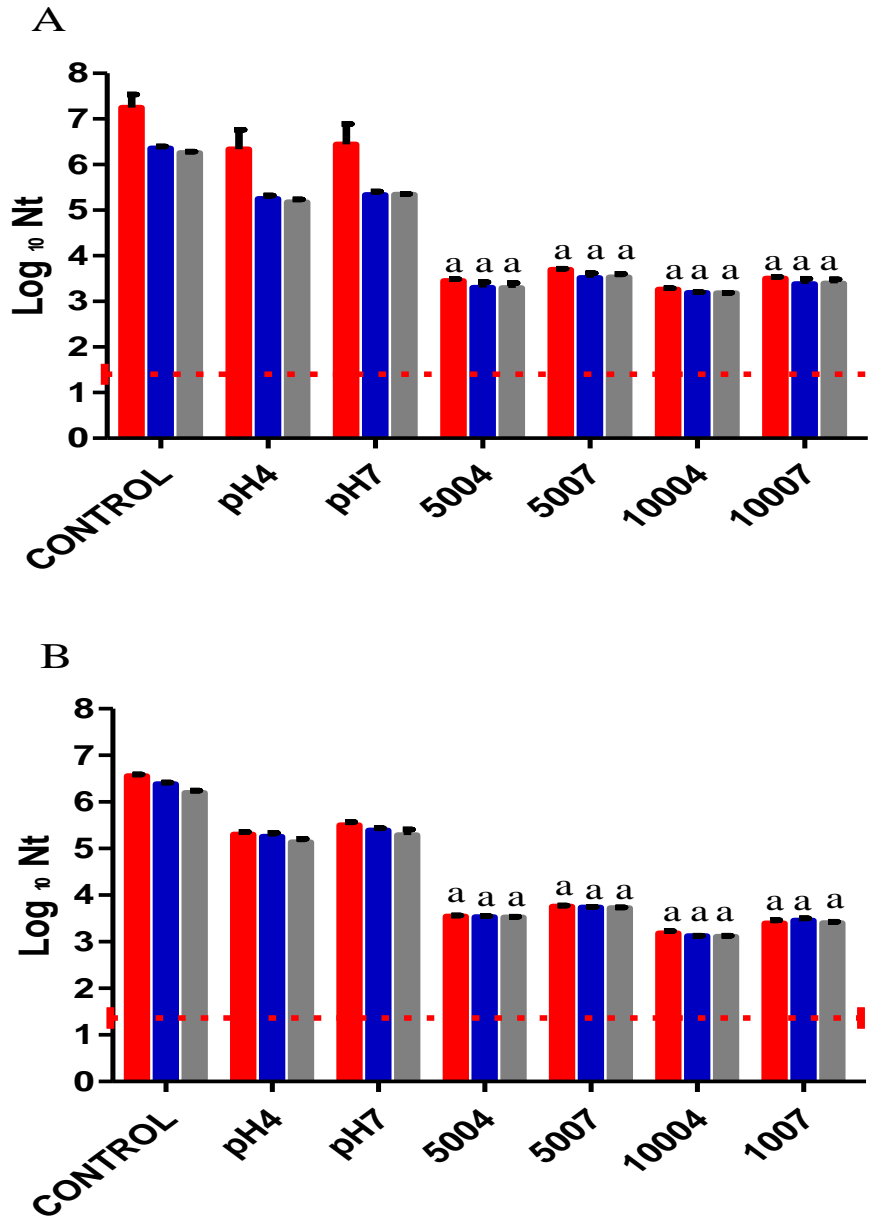


Figura 7. Recuentos microbianos (UFC/mL) de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e (A) y *Escherichia coli* MG1655 (B) en placas microtiter de poliestireno (■), AISI 304 (■) y AISI 316 (■), tras incubación a 37°C durante 60 min en presencia de 500 ppm de aceite de naranja a pH 4 (5004) o pH7 (5007) o 1000 ppm de carvacrol a pH 4 (10004) o pH 7 (10007). Como control se incluyen los resultados recogidos en la Figura 4. Se muestra la media y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes. La línea de puntos indica el límite de detección de la técnica de recuento utilizada, las letras indican las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre materiales y sus respectivos pHs.

6. Conclusiones

A continuación se describen las principales conclusiones obtenidas tras la realización de este Trabajo de Fin de Máster:

- Este estudio demuestra que las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 desarrolladas sobre superficies de acero inoxidable no solo contienen un menor número de células sésiles sino que además muestran una mayor sensibilidad al ataque de alguno de los antimicrobianos testados.
- Los tres compuestos naturales mostraron distinto grado de eficacia como agentes antimicrobianos con capacidad para reducir la presencia de células sésiles de biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655.
- A las concentraciones ensayadas (500 y 1000 ppm), los tratamientos con óxido de limoneno y aceite de naranja causaron una reducción insuficiente (≤ 5 ciclos logarítmicos) de las biopelículas, independiente del pH del medio de tratamiento y el material empleado como superficie de contacto.
- El carvacrol ha sido el agente antimicrobiano más eficaz frente a las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655, permitiendo alcanzar niveles de inactivación microbiana superiores a los 5 ciclos logarítmicos sobre biopelículas desarrolladas en superficies de acero inoxidable.
- Los materiales de las superficies de contacto empleados en el estudio (poliestireno, acero AISI 304 y AISI 316) mostraron un comportamiento similar cuando el ataque de la biopelícula se realizó con óxido de limoneno o aceite de naranja. Sin embargo, la mayor eficacia antimicrobiana del carvacrol sobre biopelículas desarrolladas en superficies de acero inoxidable corroboran la mayor adecuación del acero inoxidable como material de contacto con alimentos en la industria alimentaria.
- Los tratamientos aplicados en medios ácidos y neutros revelaron que el pH del medio no ejerció efecto alguno sobre la eficacia de los antimicrobianos ensayados, en ninguna de las condiciones estudiadas (microorganismo diana, superficie de contacto, concentración o tipo de antimicrobiano).

7. Bibliografía

- Alfonso, P. (2016). Efectos combinados del carvacrol y citral en la eliminación de biopelículas; Trabajo fin de master, Máster en Calidad Seguridad y Tecnología de los alimentos.
- Arturo Rafael, C. H., Alejandro, V. G., & John Jairo, d. T. M. (2012). La etiqueta nutricional, política de seguridad alimentaria / Nutritional Labels, Food Security policy. *Elsevier Science BV*. 20(1), 168.
- Asselt, E. D. v., Fels-Klerx, H. J. v. d., Breuer, O., & Helsloot, I. (2017). Food Safety Crisis Management—A Comparison between Germany and the Netherlands. *Journal of Food Science*, 82(2), 477-483. doi: 10.1111/1750-3841.13585
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T., & Atroshi, F. (2004). Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 7 (1): 55-64.
- Bae, Y.-M., Baek, S.-Y., & Lee, S.-Y. (2012). Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 465-473. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.017
- Bazargani, M. M., & Rohloff, J. (2016). Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*, 61, 156-164. doi:10.1016/j.foodcont.2015.09.036
- Biehler, J., Hoche, H., & Oechsner, M. (2017). Corrosion properties of polished and shot-peened austenitic stainless steel 304L and 316L with and without plasma nitriding. *Surface and Coatings Technology*, 313, 40-46. doi:10.1016/j.surfcoat.2017.01.050
- Botta, L., & Scaffaro, R. (2010). Control of biofilm formation by poly-ethylene-co-vinyl acetate films incorporating nisin. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 729-737.
- Bouayad, L., & Hamdi, T.-M. (2012). Prevalence of *Listeria* spp. in ready to eat foods (RTE) from Algiers (Algeria). *Food Control*, 23(2), 397-399. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.08.006
- Branda, S. S., Kolter, R., Chu, F., Kearns, D. B., & Losick, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1229-1238. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05020.

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Caballero, B., & Caballero, B. (2003). Encyclopedia of food sciences and nutrition: Volumes 1-10 (No. Ed. 2). *Elsevier Science BV*.
- Casarin, L. S., Casarin, F. d. O., Brandelli, A., Novello, J., Ferreira, S. O., & Tondo, E. C. (2016). Influence of free energy on the attachment of *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on stainless steels AISI 304 and AISI 316. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 131-138. doi: 10.1016/j.lwt.2016.01.035
- Casarin, L. S., Casarin, F. d. O., Soares, T. P., Aguzzoli, C., Figueroa, C. A., Soares, G. V., Tondo, E. C. (2016). Effect of Plasma Nitriding Surface Modification on the Adhesion of Food Pathogens to Stainless Steel AISI 316 and AISI 304. *Journal of Food Safety*, 36(3), 341-347. doi: 10.1111/jfs.12249
- Domínguez Rodríguez, L., Badiola Díez, J. J., Cepeda Sáez, A., Más Barón, A., & Rodríguez Ferri, E. F. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. Spain, Europe: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- Duvenage, F. J., Duvenage, S., Plessis, E. M. D., Volschenk, Q., & Korsten, L. (2017). Viable bacterial population and persistence of foodborne pathogens on the pear carpoplane. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4), 1185-1192. doi: 10.1002/jsfa.7847
- Espina, L., Somolinos, M., Pagán, R., & García-Gonzalo, D. (2010). Effect of citral on the thermal inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in citrate phosphate buffer and apple juice. *Journal of food protection*, 73(12), 2189-2196.
- Fernández, A. (2015). Eliminación de biopelículas microbianas mediante el uso de compuestos antimicrobianos de origen natural; Trabajo fin de master, .Master en Calidad Seguridad y Tecnología de los alimentos.
- Fisher, K., Phillips, C., & McWatt, L. (2009) The use of an antimicrobial citrus vapour to reduce *Enterococcus* sp. on salad products. *International Journal of Food science & technology*, 44(9), 1748-1754.

- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012
- Jofré, A., Garriga, M., Aymerich, T., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., & Bover-Cid, S. (2016). Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 1, an extensive literature search and study selection with data extraction on *L. monocytogenes* in a wide range of RTE food. *EFSA Supporting Publications*, 13(12), 1141E-n/a. doi: 10.2903/sp.efsa.2016.EN-1141
- Kim, S.-S., & Kang, D.-H. (2017). Combination treatment of ohmic heating with various essential oil components for inactivation of food-borne pathogens in buffered peptone water and salsa. *Food Control*, 80, 29-36. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.04.001
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 2(7), a000398. doi:10.1101/cshperspect.a000398
- Nguyen-Viet, H., Tuyet-Hanh, T. T., Unger, F., Dang-Xuan, S., & Grace, D. (2017). Food safety in Vietnam: where we are at and what we can learn from international experiences. *Infectious Diseases of Poverty*, 6(1), 39. doi: 10.1186/s40249-017-0249-7
- OMS. (2015). World health day 2015. Food Safety.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 414-420. doi:10.1016/j.foodcont.2005.11.009
- Pagán, R., & García-Gonzalo, D. (2016). Influence of environmental factors on bacterial biofilm formation in the food industry: a review. *Journal of Postdoctoral Research* (No. ART-2015-95845).
- Pérez-Conesa, D., Cao, J., Chen, L., McLandsborough, L., & Weiss, J. (2011). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. *Journal of Food Protection*®, 74(1), 55-62

- Pesci, E. C., Milbank, J. B. J., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(20), 11229-11234.
- Pimentel-Filho, N. d. J., Martins, M. C. d. F., Nogueira, G. B., Mantovani, H. C., & Vanetti, M. C. D. (2014). Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. *International Journal of Food Microbiology*, *190*, 1-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.004
- Puga, C. H., SanJose, C., & Orgaz, B. (2016). Biofilm development at low temperatures enhances *Listeria monocytogenes* resistance to chitosan. *Food Control*, *65*, 143-151. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.01.012
- Raffaella, C., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., & Baffone, W. (2017). Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 132-140. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.021
- Real Academia Española. (2014). *Diccionario de la Lengua Española* (23.^a ed.). Madrid, España
- Rigotti, R. T., Corrêa, J. A. F., Maia, N. J. L., Cesaro, G., Rosa, E. A. R., Macedo, R. E. F. d., & Luciano, F. B. (2017). Combination of natural antimicrobials and sodium dodecyl sulfate for disruption of biofilms formed by contaminant bacteria isolated from sugarcane mills. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *41*, 26-33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.01.007>
- Roux, D., Cywes-Bentley, C., Zhang, Y. F., Pons, S., Konkol, M., Kearns, D. B., Pier, G. B. (2015). Identification of poly-N-acetylglucosamine as a major polysaccharide component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix *Journal of Biological Chemistry*, *290*(31), 19261-19272
- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(9), 407-413. doi: 10.1016/j.tifs.2009.01.054
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(4), 573-583. doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.008

- Storgards, E., Simola, H., Sjöberg, A. M., & Wirtanen, G. (1999). Hygiene of Gasket Materials Used in Food Processing Equipment Part 1. *Food and Bioprocess Processing*, 77(2), 137-145. doi: 10.1205/096030899532286
- Trentin, D. S., Bonatto, F., Zimmer, K. R., Ribeiro, V. B., Antunes, A. L. S., Barth, A. L., Macedo, A. J. (2014). N₂/H₂ plasma surface modifications of polystyrene inhibit the adhesion of multidrug resistant bacteria. *Surface and Coatings Technology*, 245, 84-91. doi: 10.1016/j.surfcoat.2014.02.046
- Wirtanen, G., Husmark, U., & Mattila-Sandholm, T. (1996). Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *Journal of Food Protection*®, 59(7), 727-733.