



**UNIVERSIDAD
DE BURGOS**

Facultad de Ciencias

**MÁSTER EN SEGURIDAD Y BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIAS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Estudio del efecto de agentes de
limpieza/desinfección sobre distintas cepas de
Listeria monocytogenes aisladas en la industria
alimentaria

Autor: Ana Jiménez García

Tutora: Ana María Díez Mate

Burgos, Julio de 2017

Curso académico 2016/2017



AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO: 2016/2017

D/Dña. ANA MARÍA DIEZ MATE Director/a del Trabajo fin de
Máster de D/Dña. ANA SIMÉNEZ GARCÍA, que
lleva por título ESTUDIO DEL EFECTO DE AGENTES DE LIMPIEZA / DESINFECCIÓN
SOBRE DISTINTAS CEPAS DE LISTERIA MONOCYTOGENES AISLADAS EN LA
INDUSTRIA ALIMENTARIA

Autoriza No autoriza

A defender públicamente el trabajo mencionado.

Burgos, a 14 de JULIO de 2017

Fdo.: Ana María Diez Mate

AUTORIZACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER AL REPOSITORIO (RIUBU)

D/Dña. ANA SIMÉNEZ GARCÍA y
D/Dña. ANA MARÍA DIEZ MATE autor y
Director/a del Trabajo fin de Máster autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio
Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido Acceso abierto Acceso abierto con periodo de embargo

Burgos, a 14 de JULIO de 2017

Fdo.: Ana Jiménez García Fdo.: Ana María Diez Mate

Índice

Resumen	1
1. Introducción	1
2. Material y métodos.....	3
2.1. Muestreo y aislamiento de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	3
2.2. Preparación del cultivo	4
2.3. Preparación del detergente	4
2.4. Preparación del desinfectante	6
2.5. Diseño experimental.....	7
3. Resultados y discusión	8
3.1. CMI para el detergente Desenfort.....	8
3.2. CMI para el desinfectante Dexacide	10
3.3. Clasificación de las cepas según su tolerancia a la acción combinada de los agentes de limpieza/desinfección.....	15
3.4. Adecuación de la dosis recomendada por el fabricante frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	15
4. Conclusiones	19
5. Bibliografía.....	19
ANEXO 1	21
ANEXO 2	24

Resumen

Listeria monocytogenes es una bacteria muy relacionada con entornos de procesamiento de alimentos y puede persistir en ellos durante largos periodos de tiempo, dando lugar a contaminación de los productos alimenticios, con especial preocupación por los alimentos listos para el consumo. Este hecho hace que sea fundamental llevar a cabo una correcta limpieza y desinfección de las superficies y ambientes en la industria alimentaria, y poder garantizar así la inocuidad de los alimentos. Para llevar a cabo esta acción se utilizan detergentes y desinfectantes, por lo que es importante conocer el efecto de estos sobre *L. monocytogenes*. Por ello, mediante el presente estudio, se ha determinado la concentración mínima inhibitoria de estos agentes de limpieza/desinfección para esta bacteria, su eficacia y su adecuación a la concentración recomendada por el fabricante mediante el estudio de curvas de crecimiento.

1. Introducción

Listeria monocytogenes es una bacteria ubicua Gram positiva, anaerobia facultativa, no formadora de esporas. Puede sobrevivir a amplio rango de pH (4,0-9,5), temperatura (<1-45°C) y actividad de agua (0,92 a >0,99). Esta bacteria puede crecer en presencia de altas concentraciones de sal (hasta 10% de NaCl) y, como se trata de una bacteria anaerobia facultativa, es capaz de tolerar varias condiciones de envasado de alimentos. Las condiciones óptimas para su crecimiento son temperaturas de 30-37°C, pH neutro (7,0) y una actividad de agua de 0,97. [1][2][3]

L. monocytogenes es un patógeno transmitido por los alimentos que puede causar listeriosis invasiva en individuos inmunodeprimidos, mujeres embarazadas, lactantes y ancianos. En personas inmunocompetentes puede causar listeriosis no invasiva manifestándose mediante enfermedades gastrointestinales [4]. En 2015, se comunicaron en la UE 2206 casos confirmados de listeriosis en humanos, similar a 2014, año el que se produjo un aumento del 30% en los casos de listeriosis en comparación con 2013. En 2015, la incidencia más alta dentro de las diferentes categorías de alimentos listos para el consumo se encontró en muestras de productos de pesca, principalmente pescado ahumado, productos lácteos y productos cárnicos tratados térmicamente recogidas durante el procesamiento [5][6].

Esta bacteria se asocia frecuentemente con entornos de procesamiento de alimentos y es especialmente problemática en alimentos listos para el consumo ya que no requieren tratamiento térmico previo a su consumo que contribuya a la eliminación de posibles bacterias patógenas. En concreto, quesos blandos y semiblandos, y productos cárnicos son los alimentos con mayor riesgo de sufrir contaminación por *L. monocytogenes*. Además, *L. monocytogenes* puede persistir mucho tiempo en diferentes lugares de una planta de procesamiento debido a su capacidad para formar biofilms, especialmente en áreas que presentan dificultades para su limpieza y desinfección debido a la presencia de grietas o ranuras presentes en las superficies de trabajo, zonas de la maquinaria utilizada que son de difícil acceso, etc. Esto hace que la limpieza y desinfección no sea efectiva y, por tanto, no se lleve a cabo la eliminación completa de esta bacteria, dando lugar a la contaminación de los alimentos durante su procesado.

Los criterios de seguridad alimentaria sobre la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos están regulados por la Unión Europea, y se recogen dentro del Reglamento (CE) 2073/2005. Este reglamento establece que para alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean destinados a lactantes ni a usos médicos especiales, el límite de este microorganismo debe ser de 100 ufc/g. Y para los alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean destinados a lactantes ni a usos médicos especiales, se establece que el límite debe ser 100 ufc/g para productos comercializados durante su vida útil, y ausencia en 25 gramos antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido [7].

Debido, por tanto, a la frecuente presencia de esta bacteria en la industria alimentaria, es necesario llevar a cabo un proceso de limpieza y desinfección eficiente para prevenir y evitar la contaminación de los productos alimenticios durante su procesado. Para que este proceso sea eficaz, debe constar de un correcto mantenimiento, limpieza y desinfección. Dicho mantenimiento debe garantizar la preservación del establecimiento y de los equipos, de manera que estos se encuentren en las mejores condiciones posibles, lo que facilitará los procedimientos de limpieza y desinfección. La finalidad de la limpieza es eliminar restos de materia orgánica y residuos incrustados de las distintas superficies. Esta acción se lleva a cabo con la aplicación de detergentes, que ayudan a liberar la suciedad y las películas bacterianas manteniéndolas en suspensión o solución, facilitando así su eliminación. Existen distintos tipos de desinfectantes, la elección de uno de ellos depende del tipo de suciedad, los materiales de las superficies, máquinas y utensilios a limpiar, etc. Los detergentes pueden clasificarse en detergentes alcalinos, detergentes ácidos y detergentes neutros. Los detergentes más poderosos son fuertemente alcalinos, y están indicados, principalmente, para la eliminación de suciedad de tipo orgánico (grasas, proteínas) y la suciedad de suelos, paredes, techos, equipos y utensilios. Una vez terminado el proceso de limpieza, las superficies deben ser desinfectadas para la eliminación de bacterias patógenas. Antes de aplicar el desinfectante es necesario un correcto enjuague del detergente para que el desinfectante sea eficaz [8]. Los desinfectantes basados en amonios cuaternarios (QAC) son los más utilizados en la industria alimentaria. El mecanismo de acción de estos compuestos es penetrar en las membranas de los microorganismos gracias a las cadenas carbonadas (hidrófobas). A través del nitrógeno catiónico (hidrófilo) interaccionan con los fosfatos de los fosfolípidos que forman parte de la membrana, causando la salida al exterior del material vital citoplasmático. Todo esto da lugar a una pérdida de la organización e integridad de la membrana citoplasmática de las bacterias, junto con otros efectos perjudiciales para la célula bacteriana. Los compuestos de amonio cuaternario inhiben también la cadena respiratoria e inactivan enzimas celulares esenciales para su crecimiento [9] [10]. Sin embargo, el proceso de desinfección no siempre se realiza de manera adecuada y, en ocasiones, los desinfectantes con QAC se utilizan en concentraciones inferiores a las recomendadas por el fabricante o, al aplicarlos en superficies mojadas, se produce la dilución de los mismos haciendo que la concentración a la que se aplica no sea la adecuada. Esto hace que las bacterias sean expuestas a concentraciones subletales y sobrevivan, lo que facilita el desarrollo de

tolerancia a los desinfectantes. Otro problema que se da en la industria alimentaria es que los desinfectantes no se enjuagan adecuadamente tras su aplicación, y algunos agentes antimicrobianos, como los QAC, pueden persistir durante largos periodos de tiempo. Bajo estas condiciones, la exposición de *L. monocytogenes* a estos desinfectantes de forma repetida y prolongada en el tiempo puede facilitar también el desarrollo de tolerancia [1].

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar el comportamiento de cepas de *Listeria monocytogenes*, procedentes de dos industrias alimentarias diferentes (industria quesera y empresa de marisco), en presencia de agentes de limpieza/desinfección utilizados en estas industrias, mediante el estudio de sus curvas de crecimiento a 37°C durante 24 horas.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) para las distintas cepas de *Listeria monocytogenes* estudiadas frente a estos productos.
- Estudiar si existen diferencias entre las cepas aisladas en una industria y en otra en cuanto a la tolerancia a los agentes de limpieza/desinfección.
- Establecer las diferencias entre el comportamiento de *L. monocytogenes* para agentes de limpieza y el comportamiento para agentes de desinfección.
- Conocer si la concentración de aplicación recomendada por el fabricante de los agentes de limpieza/desinfección es adecuada para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, y evitar así su presencia en las industrias alimentarias y en los alimentos elaborados en las mismas.

2. Material y métodos

2.1. Muestreo y aislamiento de cepas de *Listeria monocytogenes*

Para llevar a cabo el aislamiento de cepas de *L. monocytogenes*, se realizaron distintos muestreos en una industria quesera y en una empresa de marisco. Para la industria quesera, se realizaron muestreos mensuales durante el periodo comprendido entre Octubre de 2012 y Octubre de 2013, mientras que para la empresa de marisco, se realizaron muestreos mensuales durante el periodo comprendido entre Julio y Noviembre de 2012. El muestreo incluyó puntos en superficies tanto de contacto con los alimentos, como superficies que no entran en contacto con los productos alimentarios. También, en el caso de la industria quesera, se recogieron muestras en alimentos.

Tras el aislamiento de distintas cepas se realizó un estudio genético basado en la Tipificación multilocus de secuencias (Multilocus sequence typing (MLST)) en la que se estudian 7 genes altamente conservados de *L. monocytogenes* y, en función de los resultados obtenidos, se clasificaron las cepas según los distintos genotipos. Para llevar a cabo el presente estudio, se escogieron cepas representativas de cada genotipo. En total se incluyeron en el estudio diez cepas de *L. monocytogenes*, ocho de ellas pertenecientes a la industria quesera, y dos pertenecientes a una empresa de marisco, concretamente de langostinos. El origen de las cepas estudiadas se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Origen de las distintas cepas de *L. monocytogenes* incluidas en el estudio.

Tipo de Industria alimentaria	Cepas	Origen de la cepas	ST
INDUSTRIA QUESERA	E2 87	Migas de queso en suelo (F)	5
	E4 192	Queso (F)	382
	E6 325	Suelo (NFCS)	7
	E8 503	Migas queso en suelo (F)	6
	E10 642	Guantes operario (FCS)	204
	E10 652	Suelo (NFCS)	29
	E10 657	Cinta transportadora (FCS)	5
	E10 666	Queso rallado (F)	9
EMPRESA DE MARISCO	GS1 1	Agua máquina glaseadora (FCS)	321
	GS2 25	Agua suelo (NFCS)	2

F (Food): cepas aisladas de un producto alimentario; NFCS (Non-food-contact-surface): cepas aisladas en superficies de no contacto con productos alimentarios; FCS (Food-contact-surface): cepas aisladas en superficies de contacto con productos alimentarios; ST (sequence type): tipo de secuencia obtenida a través de la técnica MLST.

Los cultivos de partida de cada una de las cepas se encontraban conservados a -80°C con glicerol al 33% (glicerinado).

2.2. Preparación del cultivo

A partir del glicerinado se sembraron las distintas cepas en una placa de ALOA (Scharlab S.L., Sentmenat, España) mediante siembra por agotamiento (en 4x4) y se incubaron durante 48 horas a 37°C . Pasado ese tiempo, y tras comprobar que el estado de las cepas era adecuado (observando la morfología de las colonias crecidas en ALOA), se seleccionó una colonia aislada con la que se sembró una placa de TSA (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) + extracto de levadura (Laboratorios Conda S.A., Madrid, España) al 0,6%, de nuevo por agotamiento. Tras la incubación de dicha placa a 37°C durante 24 horas, se inocularon, a partir de esta, 5 mL de BHI estéril (Oxoid Ltd), y se incubaron a 37°C durante una noche para asegurar el crecimiento óptimo, dando como resultado un cultivo puro de partida con una concentración de 10^9 ufc/mL denominado overnight.

2.3. Preparación del detergente

El detergente utilizado para el estudio del comportamiento de *L. monocytogenes* en presencia del mismo fue el Desenfort (Betelgeux, S.L, Valencia, España). Se trata de un detergente alcalino basado en hidróxido sódico e hidróxido potásico. Tiene un pH de 12 y la concentración de aplicación recomendada por el fabricante es de 1-3%.

Se realizaron estudios previos en *L. monocytogenes* con este detergente de forma orientativa para seleccionar las concentraciones a estudiar de este producto. Por lo tanto, para la realización del presente trabajo las concentraciones utilizadas del detergente Desenfort fueron 2%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% y 0,1%.

Para la preparación del detergente a estas concentraciones se partió del detergente puro, con una concentración del 100%, y se llevó a una concentración del 10% con un volumen final de 10 mL añadiendo a 9 mL de BHI (Oxoid Ltd), 1 mL del detergente Desenfort. A partir de la dilución al 10% se prepararon 5 mL de detergente en BHI (Oxoid Ltd) a una concentración del 1% añadiendo a 4,5 mL de BHI (Oxoid Ltd), 0,5 mL del detergente al 10%. La dilución al 10% fue utilizada para preparar las concentraciones al 2%, 1%, 0,75%, 0,5% y 0,25%. Para la concentración al 0,1% se utilizó la dilución del detergente al 1%.

A continuación, se prepararon los controles del detergente, que contenían BHI + detergente, las muestras, que contenían BHI + detergente + inóculo correspondiente, y los controles positivos, que contenían BHI + inóculo correspondiente. Esto se llevó a cabo mediante la adición de los volúmenes correspondientes, los cuales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Volúmenes adicionados, según las distintas concentraciones de detergente, para la preparación de las muestras, los controles del detergente y los controles positivos.

	Concentración de detergente	Volumen de BHI (µL)	Volumen de detergente (µL)	Inóculo (µL)
Muestra	2%	3950 µL	1000 µL al 10%	50 µL
	1%	4450 µL	500 µL al 10%	50 µL
	0,75%	4575 µL	375 µL al 10%	50 µL
	0,5%	4700 µL	250 µL al 10%	50 µL
	0,25%	4825 µL	125 µL al 10%	50 µL
	0,1%	4450 µL	500 µL al 1%	50 µL
Control detergente	2%	4000 µL	1000 µL al 10%	--
	1%	4500 µL	500 µL al 10%	--
	0,75%	4625 µL	375 µL al 10%	--
	0,5%	4750 µL	250 µL al 10%	--
	0,25%	4875 µL	125 µL al 10%	--
	0,1%	4500 µL	500 µL al 1%	--
Control positivo		4950 µL	--	50 µL

Para inocular tanto las muestras como los controles positivos se añadieron 50 µL del cultivo overnight a un volumen de 4950 µL de BHI (Oxoid Ltd), con el fin de obtener una concentración final de 10^7 ufc/mL en un volumen final de 5mL, sabiendo, como se ha citado anteriormente, que la concentración del cultivo overnight era de 10^9 ufc/mL.

2.4. Preparación del desinfectante

El desinfectante utilizado para el estudio del comportamiento de *L. monocytogenes* en presencia del mismo fue el Dexacide (Betelgeux, S.L). Este desinfectante está basado en amonios cuaternarios (QAC), tiene un pH de 10,4 y la concentración de aplicación recomendada por el fabricante es de 0,5-3%. Su capacidad biocida ha sido determinada en ensayos realizados según la norma UNE-EN 13697 [11] por un laboratorio acreditado, superando la norma frente a los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus hirae* [12].

Estudios previos realizados en *Listeria monocytogenes* con este desinfectante fueron utilizados de forma orientativa para seleccionar las concentraciones de este producto que se iban a emplear. Por lo tanto, para la realización del presente trabajo las concentraciones a estudiar del desinfectante Dexacide que se seleccionaron fueron 0,0125%, 0,00625% y 0,003125%.

Para la preparación del desinfectante a estas concentraciones se partió del desinfectante puro, con una concentración del 100%, y se llevó a una concentración del 1% con un volumen final de 10 mL añadiendo a 9,9 mL de BHI (Oxoid Ltd), 0,1 mL del desinfectante Dexacide.

A continuación, se prepararon los controles del desinfectante, que contenían BHI + desinfectante, las muestras, que contenían BHI + desinfectante + inóculo correspondiente, y los controles positivos, que contenían BHI + inóculo correspondiente. Tanto los controles del desinfectante como las muestras se prepararon en las tres concentraciones seleccionadas previamente. Los volúmenes adicionados para llevar a cabo dicha preparación se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Volúmenes adicionados, según las distintas concentraciones de desinfectante, para la preparación de las muestras, los controles del desinfectante y los controles positivos.

	Concentración de desinfectante	Volumen de BHI (µL)	Volumen de desinfectante (µL)	Inóculo (µL)
Muestra	0,0125%	4887,5 µL	62,5 µL	50 µL
	0,00625%	4918,75 µL	31,25 µL	50 µL
	0,003125%	4934,37 µL	15,63 µL	50 µL
Control desinfectante	0,0125%	4937,5 µL	62,5 µL	--
	0,00625%	4968,75 µL	31,25 µL	--
	0,003125%	4984,37 µL	15,63 µL	--
Control positivo		4950 µL	--	50 µL

Al igual que para el detergente, para inocular tanto las muestras como los controles positivos se añadieron 50 µL del cultivo overnight a un volumen de 4950 µL de BHI (Oxoid Ltd) con el fin de obtener una concentración final de 10^7 ufc/mL en un volumen final de 5 mL, sabiendo, como se ha citado anteriormente, que la concentración del cultivo overnight era de 10^9 ufc/mL.

2.5. Diseño experimental

Se diseñó un procedimiento experimental dividido en dos fases para evaluar el comportamiento de las distintas cepas de *L. monocytogenes* en presencia de agentes de limpieza-desinfección. Estas dos fases fueron denominadas Tiempo inicial (To) y Tiempo final (Tf).

2.5.1. Tiempo inicial

Para determinar el comportamiento de las cepas de *L. monocytogenes* en las distintas concentraciones de detergente y desinfectante y la CMI, se realizaron curvas de crecimiento con ayuda del espectrofotómetro Multiskan Go Thermo Scientific para microplacas, mediante el Software SkanIt Thermo Scientific. El espectrofotómetro utilizado se muestra en la Ilustración 1.



Ilustración 1. Espectrofotómetro Multiskan Go, Thermo Scientific

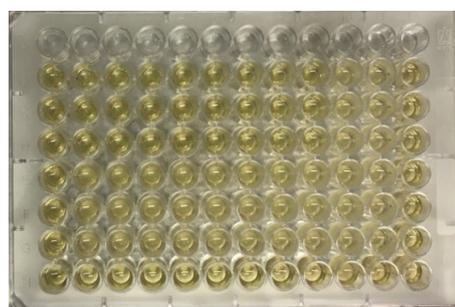


Ilustración 2. Placa multipocillo utilizada para medir la absorbancia

Para ello se utilizó una placa multipocillo de 96 pocillos (BRAND plates - pure Grade - Ref 781602, Germany) (Ilustración 2), en cada uno de los cuales se añadió 150 μ L del contenido correspondiente: BHI (Oxoid Ltd) estéril, control del desinfectante/detergente, controles positivos y muestras. Tanto el BHI (Oxoid Ltd) estéril como el control del desinfectante se utilizaron para controlar que no hubiera contaminación en los mismos y evitar así falsos positivos en cuanto a las curvas de crecimiento. Además, los resultados de la absorbancia de ambos (BHI y detergente/desinfectante) se restaron a los resultados de absorbancia obtenidos en las muestras, de tal manera que, finalmente, se pudiera representar gráficamente la absorbancia correspondiente al crecimiento de cada cepa.

La placa se incubó en el espectrofotómetro a 37°C y se realizaron, de forma automática, mediciones de la absorbancia cada 15 minutos durante 24 horas a una densidad óptica (O.D.) de 600 nm. Con los resultados obtenidos se elaboraron las gráficas de las distintas curvas de crecimiento con ayuda del programa Microsoft Office Excel.

Por otro lado, a partir de los controles positivos y de las muestras, preparados anteriormente, se llevaron a cabo diluciones decimales 1:10 en agua de peptona (Scharlab S.A), añadiendo a 900 μ L de agua de peptona, 100 μ L de muestra o de

control positivo, según correspondiese. Estas diluciones decimales se realizaron con el fin de llevar a cabo la cuantificación de *L. monocytogenes*. A continuación, se sembraron, mediante siembra en superficie, 100 µL de las diluciones correspondientes en placas de TSA (Oxoid Ltd.) + extracto de levadura (Laboratorios Conda S.A.) al 0,6%. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Tras este tiempo se realizaron los recuentos correspondientes para comprobar que la concentración bacteriana tras añadir el inóculo era de 10⁷ufc/mL.

2.5.2. Tiempo final (Tf)

Una vez transcurrido el tiempo de medición fotométrica de la placa multipocillo (24 horas), se recogió el contenido de los pocillos correspondientes a las muestras y a los controles positivos, y se llevaron a cabo diluciones decimales 1:10 de los mismos en agua de peptona (Scharlab S.A). A continuación, se sembraron, mediante siembra en superficie, las diluciones correspondientes en placas de TSA (Oxoid Ltd) + extracto de levadura (Laboratorios Conda S.A.) al 0,6%. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas, tras las cuales se realizaron los recuentos correspondientes con el fin de comprobar si se producía reducción de los mismos o incluso ausencia, lo que significarían recuentos por debajo del límite de detección del método (<1 log ufc/mL), y así comparar dichos recuentos con los obtenidos en Tiempo inicial y con las curvas de crecimiento.

Este diseño experimental se repitió 3 veces para cada una de las cepas estudiadas y para cada agente de limpieza/desinfección utilizado.

3. Resultados y discusión

3.1. CMI para el detergente Desenfort

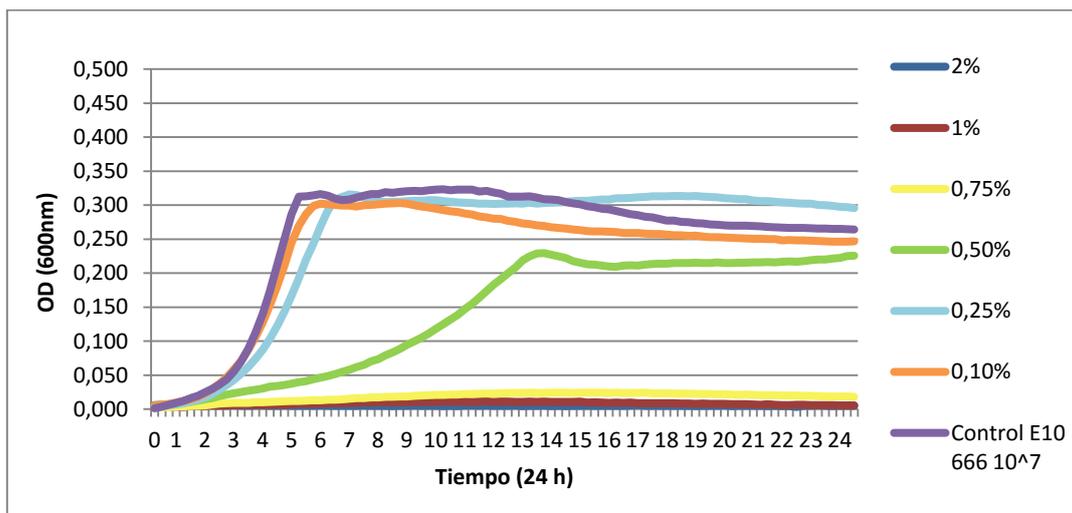
Los resultados obtenidos en los ensayos realizados con el detergente Desenfort mostraron que todas las cepas de *L. monocytogenes* estudiadas, tanto de la industria quesera como de la empresa de marisco, tenían un comportamiento similar frente a este detergente, salvo la cepa GS1 1, que mostró menor tolerancia al mismo.

Debido a estas semejanzas, se ha elegido la cepa E10 666 como ejemplo para mostrar el comportamiento de todas las cepas estudiadas (salvo la GS1 1), en presencia del detergente Desenfort (Gráfica 1). El resto de gráficas pertenecientes a las curvas de crecimiento de las otras cepas se muestran en el Anexo 1, donde se puede observar que todas estas cepas fueron sensibles a las concentraciones de Desenfort 2%, 1% y 0,75%. En la cepa GS1 1 se observó que solo existía crecimiento en las concentraciones de detergente 0,25% y 0,1% (Gráfica 2), mientras que el resto mostraron crecimiento en las concentraciones 0,5%, 0,25% y 0,1%. Por lo tanto, la CMI para la cepa GS1 1 fue 0,5%, y para el resto de cepas se obtuvo una CMI de 0,75%.

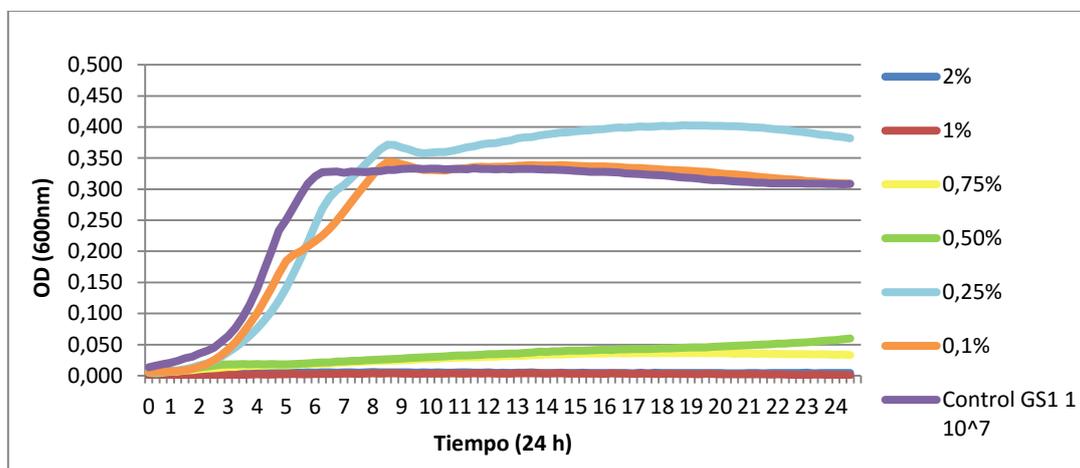
Las fases de latencia de las curvas en las que se observó crecimiento fueron, aproximadamente, de dos horas tanto para las muestras como para el control positivo. En la mayoría de las cepas se observó un crecimiento más lento para la concentración 0,5% aunque, pasadas las 24 horas de incubación, la O.D. final para esta concentración era muy similar al resto de las concentraciones y al control positivo.

(Gráfica 1). El resto de gráficas pertenecientes a las curvas de crecimiento de las otras cepas se muestran en el Anexo 1.

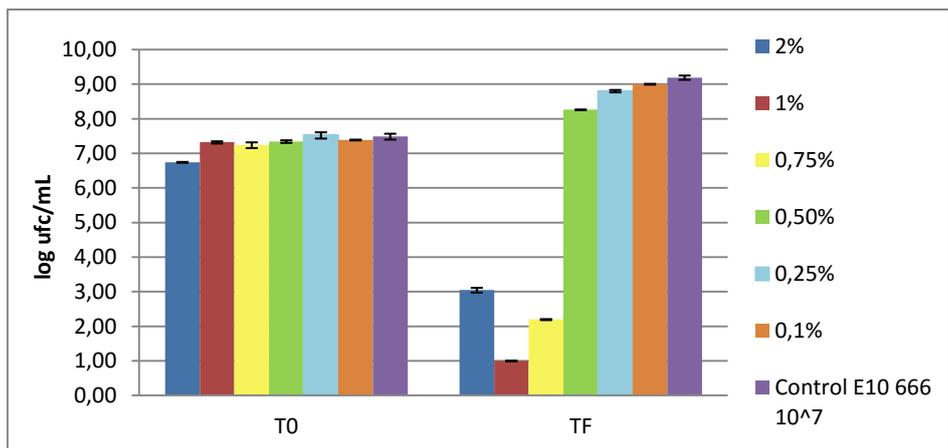
Como se muestra en la Gráfica 3 y en el Anexo 1, para las tres concentraciones que permitieron el crecimiento de *L. monocytogenes*, se observó un incremento de 2 log ufc/mL aproximadamente, mientras que para el resto de concentraciones se produjo una caída, obteniéndose incluso en alguno de los casos recuentos por debajo del límite de detección (<1 log ufc/mL). En este caso, también se ha elegido la cepa E10 666 como ejemplo para mostrar el resultado de los recuentos de todas las cepas estudiadas (salvo la GS1 1), en presencia del detergente Desenfort.



Gráfica 1. Curva de crecimiento de la cepa E10 666 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort

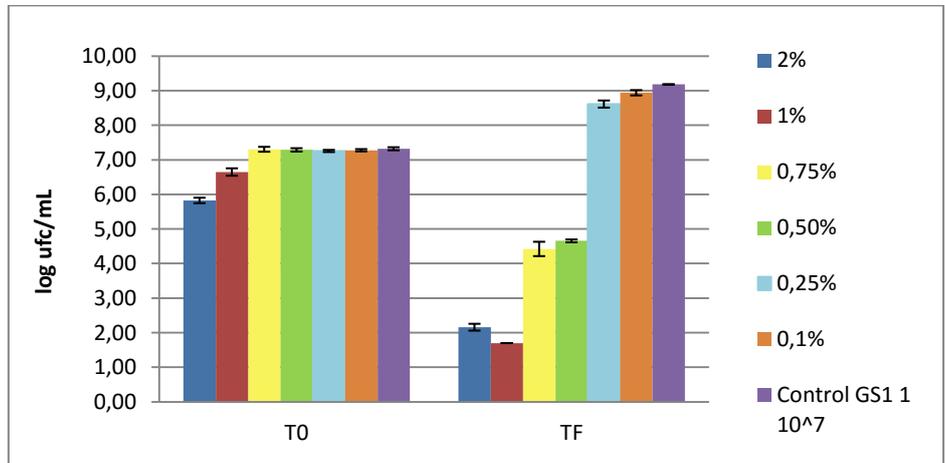


Gráfica 2. Curva de crecimiento de la cepa GS1 1 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort



Gráfica 3. Recuentos de la cepa E10 666 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort a Tiempo inicial (T0) y Tiempo final (TF)

En el caso de la cepa GS1 1, en las concentraciones de 0,25% y 0,1%, donde sí se observó crecimiento de *L. monocytogenes*, también se produjo un aumento en los recuentos de 2 log ufc/mL, aproximadamente, como se muestra en la Gráfica 4. En esta cepa también se advirtió un pequeño aumento de la densidad óptica en las concentraciones 0,5% y 0,75% pasadas las 24 horas de incubación. Sin embargo, en los recuentos se observa cómo en ambas hay una caída superior a 2 log ufc/mL a tiempo final. Para las concentraciones 2% y 1% donde tampoco hubo crecimiento, la caída en los recuentos fue más marcada, siendo esta de 5 log ufc/mL, aproximadamente.



Gráfica 4. Recuentos de la cepa GS1 1 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort a Tiempo inicial (T0) y Tiempo final (TF)

3.2. CMI para el desinfectante Dexacide

En cuanto a los resultados obtenidos en los ensayos realizados con el desinfectante Dexacide, todas las cepas aisladas en la industria quesera, salvo la cepa E4 192, fueron sensibles a las tres concentraciones estudiadas, no observándose crecimiento en ninguna de ellas. En la cepa E4 192 se observó crecimiento en la concentración 0,003125%, mostrando mayor tolerancia al desinfectante que el resto de cepas estudiadas.

En el caso de las cepas aisladas en la empresa de marisco, ambas tienen un comportamiento similar frente al desinfectante, ya que se observó crecimiento tanto en la concentración 0,003125% como en la 0,00625%. Por tanto, las cepas aisladas en la empresa de marisco presentaban mayor tolerancia al desinfectante que las cepas aisladas en la industria quesera.

Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a la concentración 0,0125%.

Respecto a los recuentos en el Tiempo final para las concentraciones donde no se produjo aumento en el crecimiento, la caída de los recuentos fue, aproximadamente, de 4 log ufc/mL, pasando de 7 log ufc/mL a 3 log ufc/mL, mientras que, como vimos en el caso del detergente, los recuentos obtenidos a Tiempo final, fueron más altos que para el desinfectante, alcanzando recuentos, en algunas ocasiones, incluso de 6 log ufc/mL en la concentración 0,75%. Esto muestra la mayor eficacia del desinfectante frente a *L. monocytogenes* en comparación con el detergente. Las tablas relativas a estos resultados se muestran en los Anexos 1 y 2.

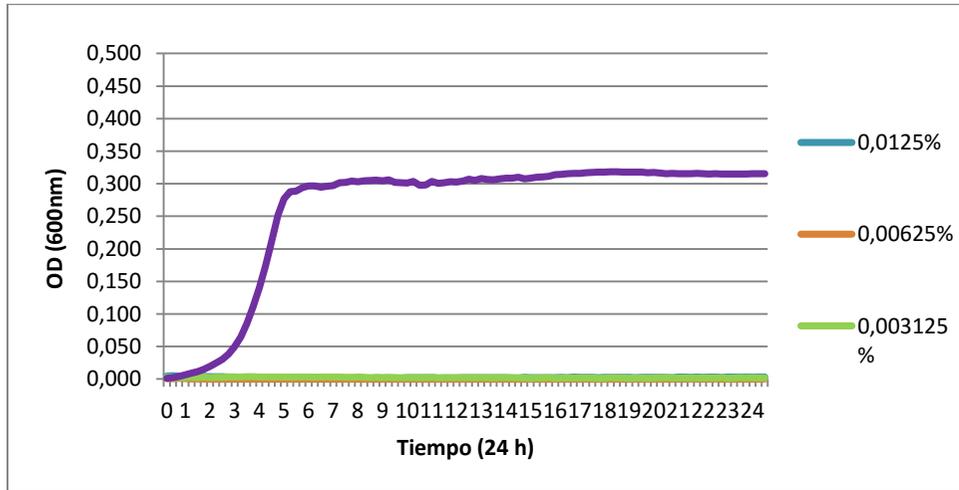
Con estos resultados podemos clasificar las cepas estudiadas (tanto las aisladas en la industria quesera como las aisladas en la empresa de marisco) en tres grupos, en función de su tolerancia al Dexacide:

Grupo 1: no hay crecimiento a ninguna concentración. Se encuentran dentro de este grupo las cepas E2 87, E3 625, E8 503, E10 642, E10 652, E10 657, E10 666. Para todas estas cepas la CMI inhibitoria fue de 0,003125%. En cuanto a los recuentos, se observó una caída de los mismos a Tiempo final, en comparación con el Tiempo inicial, de 4 log ufc/mL aproximadamente. Por el contrario, en el control positivo se observó un incremento de 2 log ufc/mL, pasando de 7 log ufc/mL a 9 log ufc/mL. Como ejemplo, para mostrar el comportamiento de este grupo de cepas, se ha elegido la cepa E2 87 (Gráfica 5) (Gráfica 6). (El resto de gráficas pertenecientes a los recuentos de cada cepa se muestran en el Anexo 2).

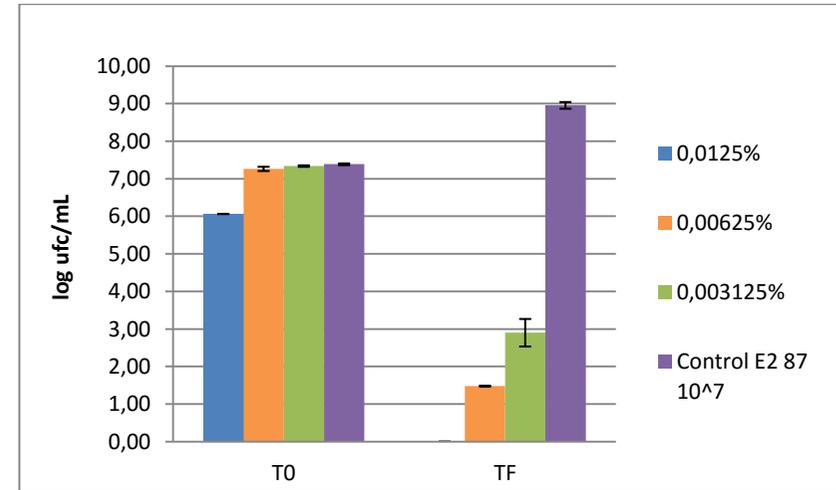
Grupo 2: hay crecimiento en la concentración 0,003125%. Se encuentra dentro de este grupo la cepa E4 192. Para esta cepa, la CMI fue de 0,00625%. La fase de latencia para la concentración de desinfectante 0,003125% fue, aproximadamente, de 16 horas. Sin embargo, para el control positivo se observó una fase de latencia de 1-2 horas. A pesar de ello, esta cepa consiguió crecer y alcanza una O.D. similar a la del control positivo. Tanto para esta concentración como para el control positivo hubo un incremento en los recuentos en 2 log ufc/mL, pasando de 7 log ufc/mL en Tiempo inicial a 9 log ufc/mL en Tiempo final. En el resto de concentraciones se produjo una caída de los recuentos (Gráfica 7) (Gráfica 8).

Grupo 3: hay crecimiento en la concentración 0,003125% y 0,00625%. Se encuentran dentro de este grupo las cepas de la industria de marisco GS1 1 y GS2 25. Para estas cepas, la CMI fue de 0,0125%. En el caso de la cepa GS1 1, la fase de latencia para la concentración 0,003125% fue, aproximadamente, de 1-2 horas, al igual que la del control positivo, mientras que en la concentración 0,00625% se observó una fase de latencia aproximadamente de 8 horas, lo que muestra mayor dificultad para el crecimiento de esta cepa. Sin embargo, al cabo de ese tiempo consiguió crecer alcanzando finalmente una O.D. final de 0,240, muy semejante a la que se alcanza con la concentración 0,003125% (0,254) (Gráfica 9). Para las dos concentraciones en

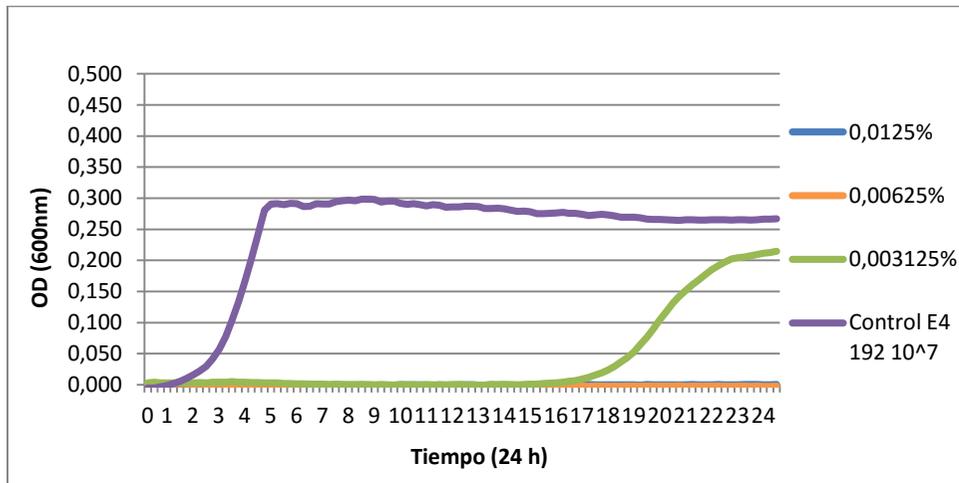
las que se observó crecimiento se produjo un aumento de los recuentos en torno a 1,5 log ufc/mL, cayendo estos para la concentración 0,0125%, donde no hubo crecimiento (Gráfica 10). Por otro lado, para la cepa GS2 25, la fase de latencia para las concentraciones 0,003125% y 0,00625% fue aproximadamente de 1-2 horas, muy semejante a la del control positivo (Gráfica 11). En los recuentos también se observó un incremento de 2 log ufc/mL tanto en estas concentraciones como en el control positivo, cayendo estos para la concentración 0,0125%, donde hubo una reducción de casi 5 log ufc/mL (Gráfica 12).



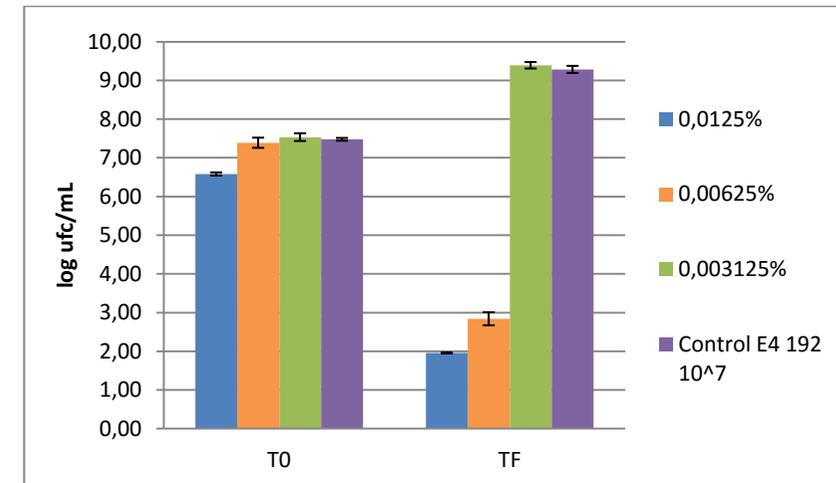
Gráfica 5. Curva de crecimiento de la cepa E2 87 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide



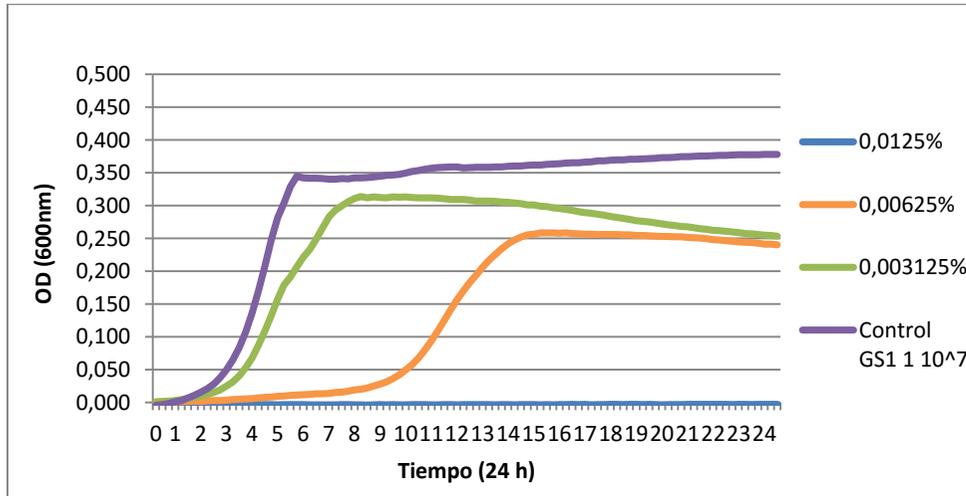
Gráfica 6. Recuentos de la cepa E2 87 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide Tiempo inicial (TO) y Tiempo final (TF)



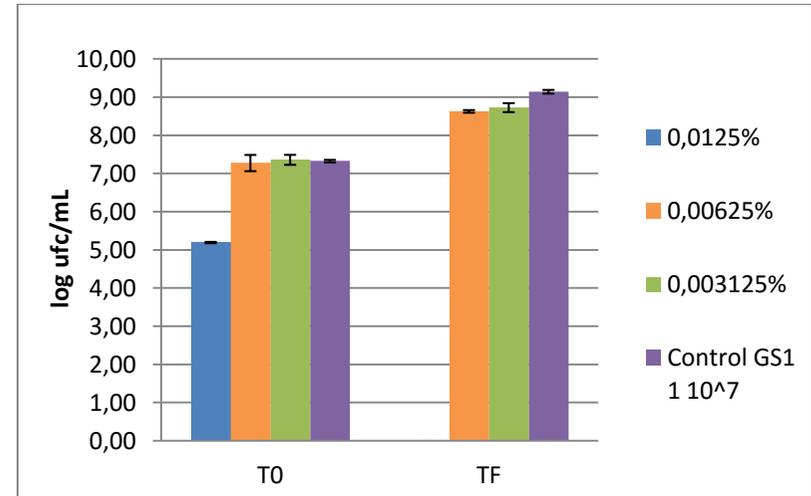
Gráfica 7. Curva de crecimiento de la cepa E4 192 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide



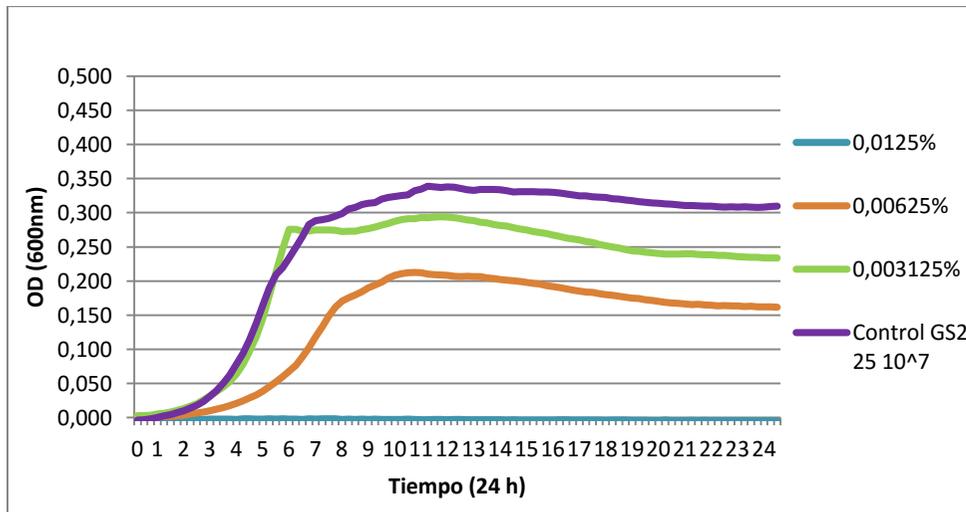
Gráfica 8. Recuentos de la cepa E4 192 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide Tiempo inicial (TO) y Tiempo final (TF)



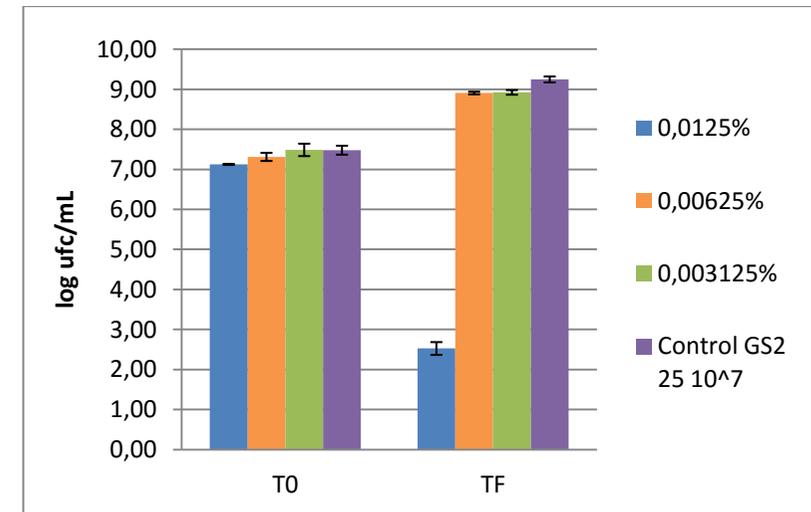
Gráfica 9. Curva de crecimiento de la cepa GS1 1 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide



Gráfica 10. Recuentos de la cepa GS1 1 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide Tiempo inicial (TO) y Tiempo final



Gráfica 11. Curva de crecimiento de la cepa GS2 25 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide



Gráfica 12. Recuentos de la cepa GS2 25 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide Tiempo inicial (TO) y Tiempo final

3.3. Clasificación de las cepas según su tolerancia a la acción combinada de los agentes de limpieza/desinfección

En la gráfica 4, se pueden observar los distintos valores de CMI obtenidos para cada una de las cepas de *L. monocytogenes*, tanto para el detergente Desenfort como para el desinfectante Dexacide.

Comparando dichos resultados, observamos que el valor de CMI inhibitoria fue mayor para el detergente, lo que era de esperar, ya que la función de este producto no es inhibir el crecimiento de bacterias ni eliminarlas. Otra diferencia que se observa es que, para el desinfectante, las cepas aisladas en la empresa de marisco (GS1 1 y GS2 25) mostraron mayor tolerancia al mismo, sin embargo, en el caso del detergente no fue así, ya que se observó mayor sensibilidad a este en la cepa GS1 1, también perteneciente a la industria de marisco, es decir, fue la cepa en la que menor valor de CMI se obtuvo.

Tabla 4. Clasificación de las cepas de *Listeria monocytogenes* en función de su comportamiento frente a la acción combinada de agentes de limpieza/desinfección

	CMI para el Desenfort	CMI para el Dexacide
E2 87, E3 625, E8 503, E10 642, E10 652, E10 657, E10 666	0,75%	0,003125%
E4 192	0,75%	0,00625%
GS1 1	0,5%	0,0125%
GS2 25	0,75%	0,0125%

Puesto que el producto que tiene como objetivo principal la eliminación o inhibición bacteriana es el desinfectante, es interesante identificar las cepas que más tolerancia presentan a este producto y relacionarlas con su origen, de tal manera que se conozcan los puntos críticos del entorno de procesamiento de alimentos donde se debe prestar especial atención y, con ello, se pueda tener un mayor control que evite la propagación de las mismas y, por tanto, la contaminación de los productos alimentarios. En nuestro caso, las cepas que presentaron, en general, mayor tolerancia al desinfectante fueron las cepas GS1 1 y GS2 25, aisladas en la empresa de marisco. Ambas cepas fueron aisladas en agua, una de ellas (la cepa GS1 1) en agua procedente de una maquina y la otra (la cepa GS2 25) en agua procedente del suelo, por lo que, en este caso, se debería prestar especial atención a todos los equipamientos relacionados con el agua e instalaciones como arquetas y suelos, para evitar generar aguas estancadas. En la industria quesera, la cepa E4 192 presentó mayor tolerancia al desinfectante en comparación con el resto. Esta cepa fue aislada directamente del producto, lo que es importante tener en cuenta, ya que a partir de un producto contaminado se puede producir contaminación cruzada de otros. Por tanto, en este caso, se tendrá que poner especial cuidado en la maquinaria del proceso de elaboración y en las materias primas.

3.4. Adecuación de la dosis recomendada por el fabricante frente a *Listeria monocytogenes*

En el caso del detergente, la CMI de todas las cepas está por debajo de la concentración mínima de aplicación recomendada por el fabricante (1%), por lo que dicha concentración, en principio, sería suficiente para reducir notablemente los recuentos de *Listeria monocytogenes*, mostrando efecto bactericida, aunque no para eliminarla por completo, ni siquiera a la concentración recomendada por el fabricante del 1%, en el caso de que estos sean tan elevados como los recuentos de partida inoculados en este estudio, de 7 log ufc/mL.

Para el desinfectante Dexacide, como ya se ha dicho anteriormente, la CMI fue de 0,003125% para todas las cepas aisladas en la industria láctea, salvo para la cepa E4 192, cuya CMI fue de 0,00625%. Las cepas aisladas de la empresa de marisco mostraron una CMI de 0,0125%. Por lo tanto, la CMI de todas las cepas estaba muy por debajo de la concentración mínima de aplicación recomendada por el fabricante (0,5%). Al igual que ocurrió con el detergente, los recuentos de *L. monocytogenes* en Tiempo final disminuyeron con respecto al Tiempo inicial para las CMI establecidas en nuestro estudio, mostrando efecto bactericida, pero no serían suficientes para eliminarla por completo en el caso de recuentos tan elevados como los recuentos de partida inoculados en este estudio, de 7 log ufc/mL. Sin embargo, hay que resaltar que la concentración de 0,0125% era capaz de eliminar por completo a la mayoría de las cepas estudiadas excepto a la E4 192, E10 666 y la GS2 25, por lo que seguramente la concentración necesaria para una inhibición completa en recuentos tan altos seguiría estando muy por debajo de la concentración recomendada por el fabricante de 0,5%.

Se debe tener en cuenta que la concentración inoculada de *L. monocytogenes* en Tiempo inicial de 7 log ufc/mL, se establece para poder ver la capacidad de reducción en este microorganismo, de tal forma que, está por encima de los niveles presentes en la industria alimentaria. Por lo tanto, con la combinación de ambos productos, aplicándose a las concentraciones recomendadas y siguiendo las instrucciones de empleo del fabricante, se debería conseguir la eliminación total de esta bacteria.

En un estudio sobre la presencia de *L. monocytogenes* en la industria quesera, se observó que todos los desinfectantes y productos de limpieza utilizados fueron eficaces contra *L. monocytogenes*, aplicados según las recomendaciones de los fabricantes. El limpiador alcalino utilizado obtuvo una CMI de 1,57%, mientras que para los dos desinfectantes basados en amonios cuaternarios se obtuvieron CMI de 0,00078%-0,00313% y 0,00313-0,0188%, todas ellas por debajo de la recomendación del fabricante [13].

Otros autores obtuvieron, para cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas en la industria láctea, una CMI de 0,2% para un detergente basado principalmente en hidróxido sódico, y 0,625% para un detergente alcalino basado principalmente en hidróxido potásico, siendo también CMI menores a la recomendada por el fabricante. Además, estudiaron la eficacia de estos limpiadores alcalinos en superficies, donde también fueron eficaces [14].

Comparando los resultados obtenidos por otros autores y los resultados obtenidos en el presente estudio en cuanto a los detergentes alcalinos, podemos observar que existen diferencias en las CMI obtenidas, aunque en todos los casos, los detergentes

fueron eficaces a concentraciones menores al mínimo recomendado por los fabricantes. Estas diferencias en cuanto a las CMI pueden ser debidas a la distinta composición entre los agentes de limpieza, ya que, aunque todos sean detergentes alcalinos y estén basados en hidróxido sódico e hidróxido potásico, las proporciones de estos componentes y otros componentes secundarios pueden variar entre unos y otros.

Aarnisalo K et. al (2007) [14] estudiaron el efecto de distintos desinfectantes en *L. monocytogenes*. Para el desinfectante basado en QAC la CMI fue de 0,00125% y 0,00031% para cepas de *L. monocytogenes* aisladas en una industria quesera. Pero estos autores también estudiaron el efecto de desinfectantes y detergentes en superficie. Los resultados obtenidos mostraron que el desinfectante basado en QAC fue ineficaz en superficie, aunque si fue eficaz en suspensión. Esto puede ser debido a que la unión de las células bacterianas a las superficies reduce la eficacia de los QAC [14]. Los limpiadores alcalinos fueron eficaces tanto en suspensión como en las superficies, lo que resulta interesante, ya que estos están diseñados para eliminar materia orgánica, pero también actúan contra *L. monocytogenes*. Esto puede resultar provechoso en cuanto a la limpieza y desinfección de las industrias alimentarias ya que, según el Codex Alimentarius en relación con la higiene de los alimentos [15], primero se debe aplicar el detergente para eliminar los restos de materia orgánica y después el desinfectante para eliminar bacterias patógenas. Como se ha visto en los resultados, los detergentes también pueden ayudar a eliminar *L. monocytogenes*, por lo que la combinación de ambos productos será más eficaz siempre y cuando estos se apliquen de manera correcta, ya que un aclarado insuficiente del detergente dejaría restos de este en las superficies, lo que puede hacer que el desinfectante no sea eficaz [8]. Además, como ya se ha mencionado anteriormente, si se aplica el desinfectante en superficies con restos de agua, esto va a dar lugar a la dilución del mismo, haciendo que la concentración de aplicación pueda no ser adecuada y se convierta en subletal, lo que contribuiría al desarrollo de tolerancia de estos desinfectantes. Otro problema con respecto a los QAC es que la exposición repetida a dosis subletales de estos compuestos, participa también en el desarrollo de tolerancia. Esta situación puede darse si el enjuague del desinfectante no se realiza de forma correcta y no se elimina por completo. Algunos autores han comprobado la presencia de restos de cloruro de benzalconio (un QAC muy utilizado en la industria alimentaria como desinfectante) en residuos de agua después del saneamiento, en una planta de procesamiento de carne [16].

En otros ensayos se ha comprobado que la formación de biofilms y la resistencia a los desinfectantes se ven afectadas por el material de superficie, siendo el acero inoxidable el material que más aumenta la fijación microbiana en comparación con el polietileno y el vidrio [17].

Kastbjerg V y Gram L (2012) [18] comprobaron el aumento de la CMI para distintos desinfectantes basados en hipoclorito, ácido peracético y peróxido de hidrógeno, y QAC, y vieron que no se produjo aumento en las CMI salvo para el desinfectante basado en QAC. Sin embargo, concentraciones de 0,0125%, menores a las concentraciones recomendadas por el fabricante (1-5%) causaron la muerte de las cepas de *L. monocytogenes*. Por lo tanto, estos desinfectantes si eran eficaces para combatir *L. monocytogenes*.

Esta resistencia a los desinfectantes, principalmente basados en QAC viene dada, como ya se ha mencionado, por la presencia de genes de resistencia, como son *qacH* y *bcrABC*. Møretrø T et al. (2017) [16] estudiaron la CMI de distintas cepas de *L. monocytogenes* en relación con la presencia o ausencia de genes que conferían resistencia a QAC. Los resultados obtenidos fueron que las cepas que no contenían estos genes tuvieron una CMI de $\leq 0,0005\%$, las cepas con el gen *qacH* tuvieron una CMI de 0,0005-0,0012% y las cepas con el gen *bcrABC* tuvieron una CMI de 0,001-0,0013%, por tanto, la CMI aumentó en función de la presencia de estos genes. Esto nos hace pensar que algunas de las cepas incluidas en el estudio, como las cepas aisladas de la empresa de marisco (GS1 1 y GS2 25), podrían tener dichos genes, ya que presentaron mayor tolerancia al desinfectante Dexacide que el resto de cepas. Teniendo en cuenta que estas cepas provenían del mismo entorno de procesamiento, ambas podrían tener dichos genes, ya que se puede producir intercambio de material genético mediante la transferencia horizontal de genes entre una cepa y otra [1].

Existen otros desinfectantes utilizados en la industria alimentaria como son los basados en etanol, en hipoclorito de sodio o en isopropanol, con los que se han observado diferencias interesantes en cuanto a su eficacia. Se ha visto que los desinfectantes basados en etanol, tenían un CMI mucho mayor al resto. Con los desinfectantes basados en hipoclorito de sodio y en isopropanol también se obtuvieron CMI mas altas y, en general, el desinfectante basado en QAC fue el que mostró la CMI menor [14]. Belessi C et al. (2011) [17] también observaron que el desinfectante más eficaz fue el QAC, seguido del ácido peroxiacético y del desinfectante basado en cloro.

Como hemos visto, los detergentes y desinfectantes tienen CMI para *L. monocytogenes* menores a las concentraciones que recomienda el fabricante, por lo que aplicadas correctamente sí son eficaces frente a esta bacteria. El problema se produce cuando no se llevan a cabo correctamente los programas de limpieza y desinfección, llegando a situaciones en las que disminuye la concentración a la que se están aplicando estos productos, y dando lugar a la formación de biofilms por parte de las células bacterianas que no se han eliminado y que crean microambientes donde es difícil alcanzar las concentraciones adecuadas de desinfectantes. Estas situaciones también dan lugar a la adquisición de mecanismos de resistencia, incluyendo aquellos que conducen a una reducción de la concentración intracelular del desinfectante [19].

Por todo ello, es necesario considerar la importancia que tiene desarrollar una correcta limpieza y desinfección de los entornos de procesamiento de alimentos ya que, aunque la fuente original de contaminación pueda venir de las materias primas utilizadas, se ha visto que las cepas de *L. monocytogenes* presentes en los productos finales son, generalmente, diferentes a las cepas encontradas en las materias primas, lo que sugiere que se produce contaminación cruzada durante el procesamiento de los alimentos, y que por tanto, el proceso de limpieza y desinfección no se realiza correctamente. Además, se han aislado cepas de *L. monocytogenes* en entornos de procesamiento de alimentos después de la limpieza y desinfección [19]. El no llevar a cabo un correcto protocolo de limpieza y desinfección hace que sea muy difícil eliminar esta bacteria de las industrias y que perduren en ellas durante largos periodos de tiempo, dando lugar a contaminación de los productos alimentarios, con especial problemática en los alimentos listos para el consumo. Esto hace que sea necesario enseñar a los trabajadores buenas prácticas de higiene y enseñar la importancia de

una correcta manipulación, tanto de las materias primas como de los alimentos ya procesados, establecer protocolos adecuados de limpieza y desinfección, y revisar con cierta periodicidad si estas prácticas se están llevando a cabo de forma correcta.

4. Conclusiones

Como conclusiones podemos establecer que:

1. Existen diferencias a nivel de cepa a la hora de establecer la CMI de los agentes de limpieza/desinfección estudiados.
2. El desinfectante fue más eficaz que el detergente frente a *L. monocytogenes* siendo la CMI con efecto bactericida para todas las cepas estudiadas de 0,75% para el detergente Desenfort y de 0,0125% para el desinfectante Dexacide.
3. Las cepas aisladas en la empresa de marisco fueron más tolerantes al desinfectante que las cepas aisladas en la industria quesera.
4. El origen de las cepas con mayor tolerancia es diferente en función del tipo de industria, en este caso la planta de marisco debería prestar especial atención a todos los equipamientos e instalaciones relacionados con el agua, para no generar aguas estancadas, mientras que la planta quesera, tendría que poner especial cuidado en la maquinaria del proceso de elaboración y en las materias primas.
5. La CMI fue, para todas las cepas, menor que la concentración de aplicación recomendada por el fabricante.
6. Los agentes de limpieza/desinfección inhibieron el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y fueron eficaces contra esta bacteria en las concentraciones de aplicación recomendadas por el fabricante.

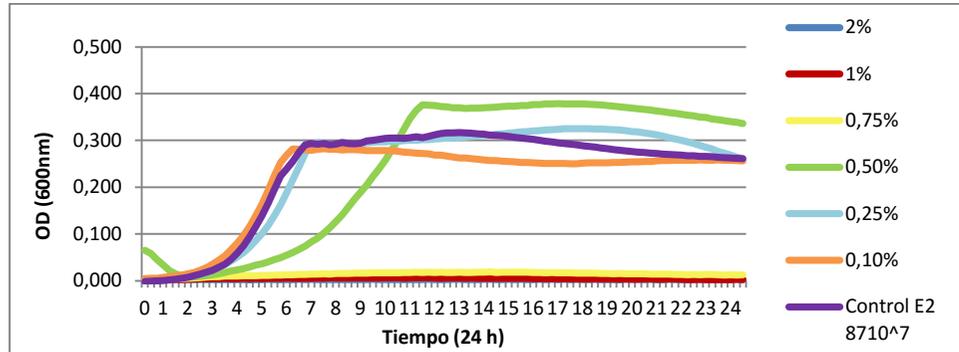
5. Bibliografía

1. Allen KJ, Walecka-Zacharska E, Chen JC, Katarzyna K, Devlieghere F, Van Meervenne E, Osek J, Wieczorek K, Bania J (2016). *Listeria monocytogenes* - An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. *Food Microbiol* 54:178–189.
2. Melo J, Andrew PW, Faleiro ML (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Res Int* 67:75–90.
3. Bover S, Garriga M (2014). Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo.
4. Allerberger F, Wagner M (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect* 16:16–23.
5. Food E, Authority S (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA J.
6. Food E, Authority S (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA J.
7. EUROPEAS LCDLC (2005). Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los

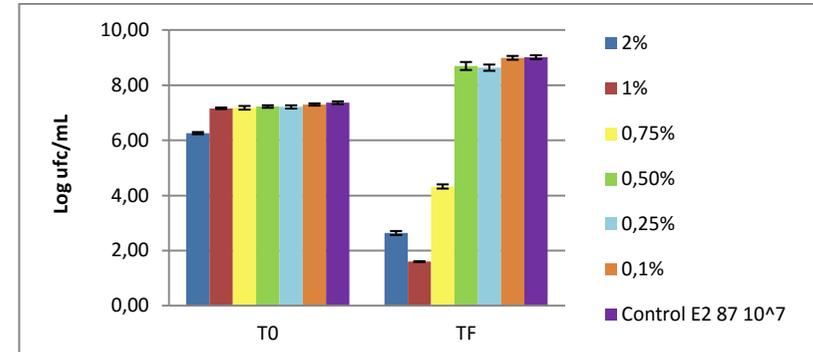
productos alimenticios. D Of Unión Eur 338:1–26.

8. OPS OMS. Establecimiento: mantenimiento, limpieza y desinfección. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10822:2015-establecimiento-mantenimiento-limpieza-desinfeccion&Itemid=42210&lang=es. Accessed 22 Jun 2017
9. Donnell GMC (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. 12:147–179.
10. Fernández García P (2009). Desinfectantes utilizados en la Industria Alimentaria. Características, modo de actuación y aspectos que inciden en su eficacia. Betelgeux 1–10.
11. Norma UNE-EN 13697 (2015). Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de superficie no porosa para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad. Método de ensayo sin acción mecánica y requisitos (fase 2/etapa 2)
12. DEXACIDE® B10. <http://www.sumilaber.com/limpieza-y-desinfeccion/156-dexacide-b10.html>. Accessed 12 Jun 2017
13. Ruckerl I, Muhterem-Uyar M, Muri-Klinger S, Wagner K, Wagner M, Stessl B (2014). *L. monocytogenes* in a cheese processing facility: Learning from contamination scenarios over three years of sampling. Int J Food Microbiol 189:98–105.
14. Aarnisalo K, Lundén J, Korkeala H, Wirtanen G (2007). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. LWT - Food Sci Technol 40:1041–1048.
15. FAO, OMS (2009). Higiene De Los Alimentos-Codex Alimentarius.
16. Møretrø T, Schirmer BCT, Heir E, Fagerlund A, Hjemli P, Langsrud S (2017). Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. Int J Food Microbiol 241:215–224.
17. Belessi C-EA, Gounadaki AS, Psomas AN, Skandamis PN (2011). Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. Int J Food Microbiol 145:S46–S52.
18. Kastbjerg VG, Gram L (2012). Industrial disinfectants do not select for resistance in *Listeria monocytogenes* following long term exposure. Int J Food Microbiol 160:11–15.
19. Martínez-Suárez J V., Ortiz S, López-Alonso V (2016). Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. Front Microbiol.

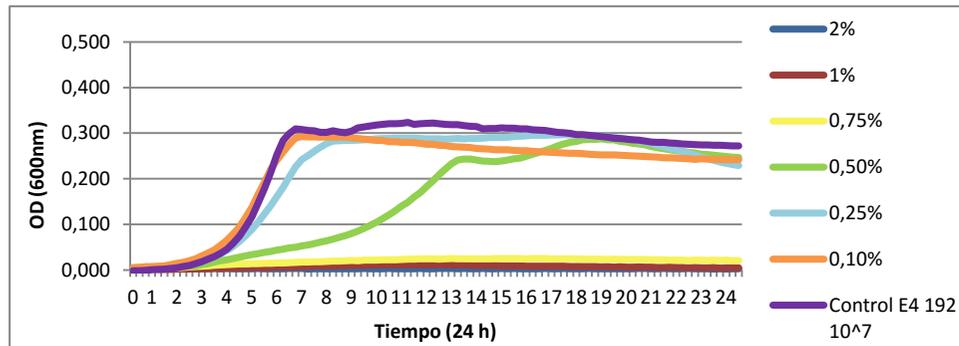
ANEXO 1



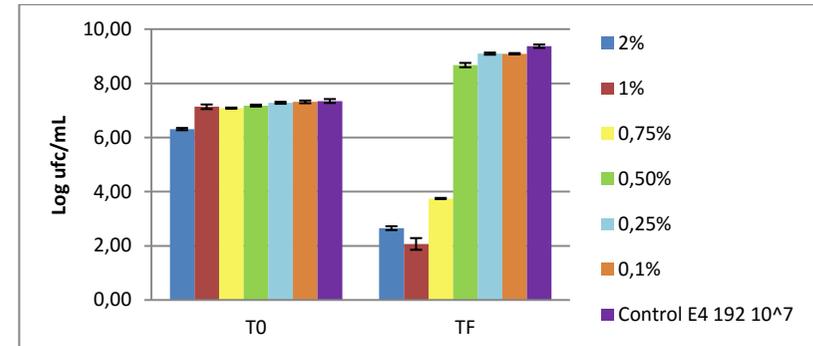
Gráfica 13. Curva de crecimiento de la cepa E2 87 en presencia del detergente Desenfort



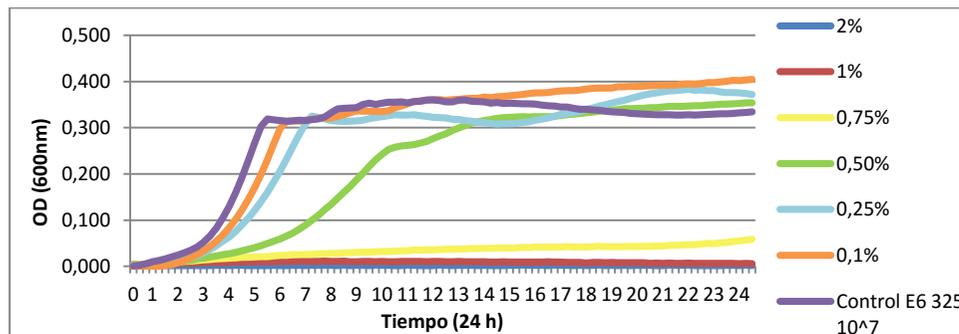
Gráfica 14. Recuentos de la cepa E2 87 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort a Tiempo inicial (TO) y Tiempo final (TF)



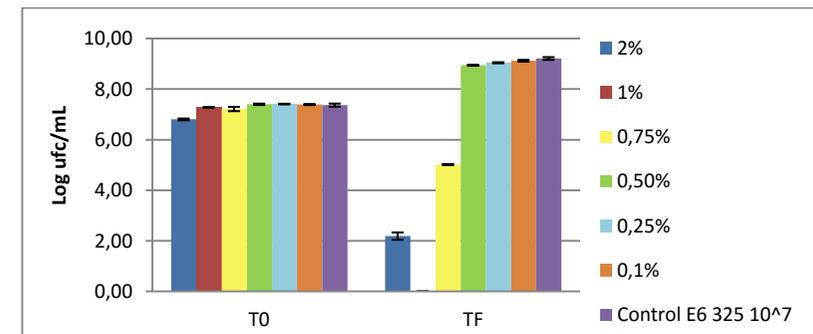
Gráfica 15. Curva de crecimiento de la cepa E4 192 en presencia del detergente Desenfort



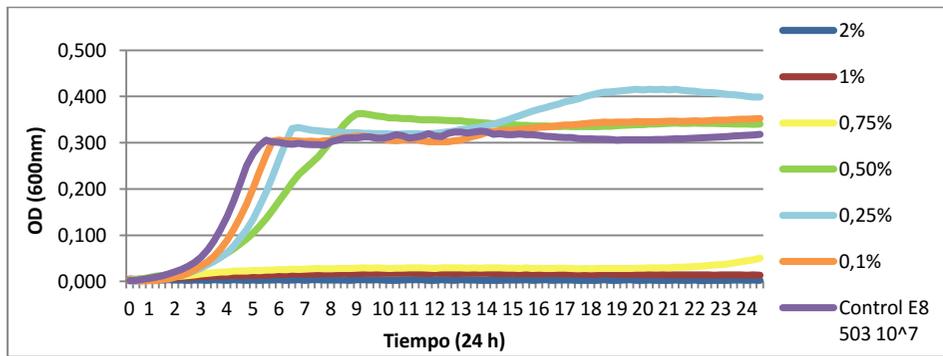
Gráfica 16. Recuentos de la cepa E4 192 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort a Tiempo inicial (TO) y Tiempo final (TF)



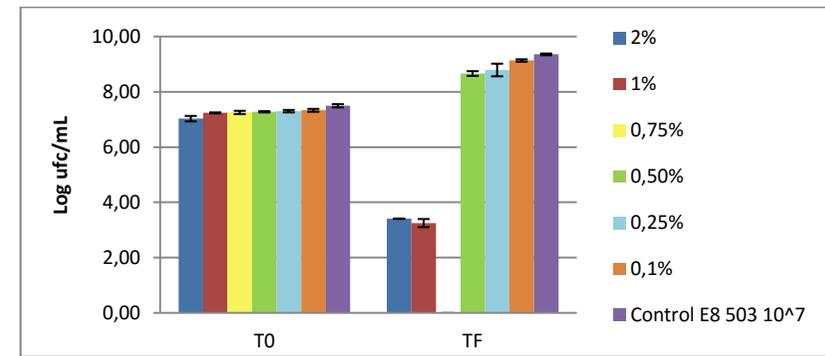
Gráfica 17. Curva de crecimiento de la cepa E6 325 en presencia del detergente Desenfort



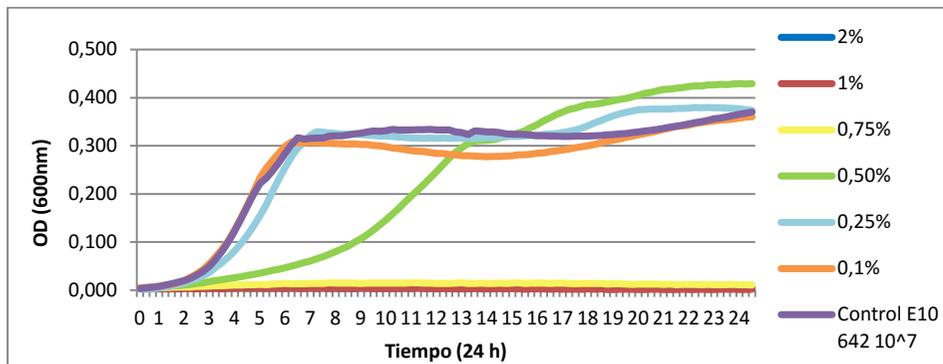
Gráfica 18. Recuentos de la cepa E6 325 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort a Tiempo inicial (TO) y Tiempo final (TF)



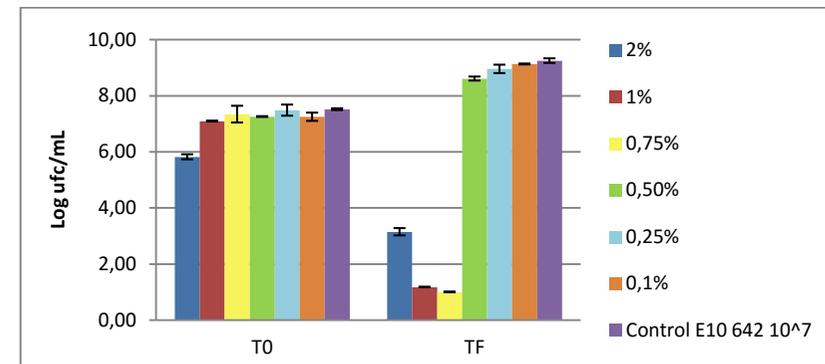
Gráfica 19. Curva de crecimiento de la cepa E8 503 en presencia del detergente Desenfort



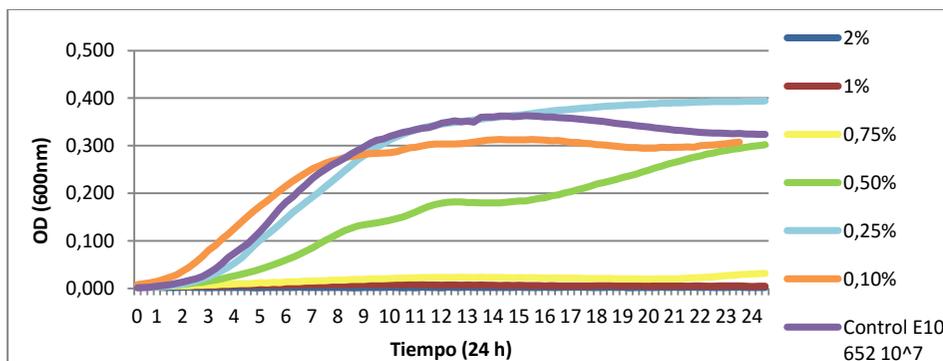
Gráfica 20. Recuentos de la cepa E8 503 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort a Tiempo inicial (TO) y Tiempo final (TF)



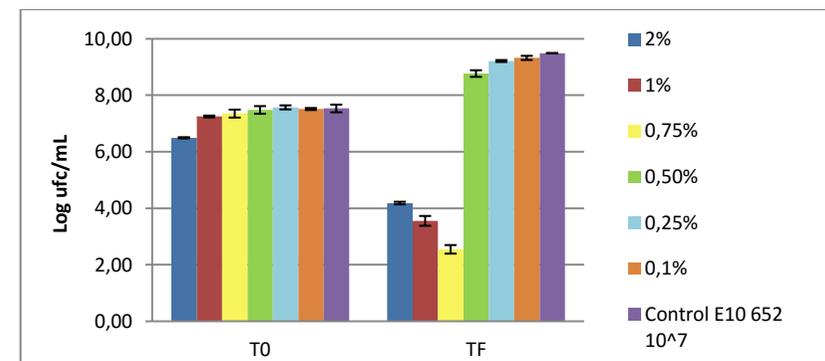
Gráfica 21. Curva de crecimiento de la cepa E10 642 en presencia del detergente Desenfort



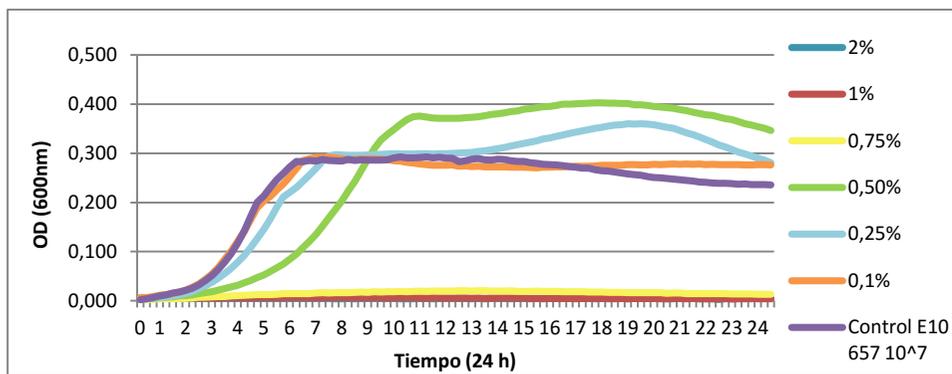
Gráfica 22. Recuentos de la cepa E10 642 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort a Tiempo inicial (TO) y Tiempo final (TF)



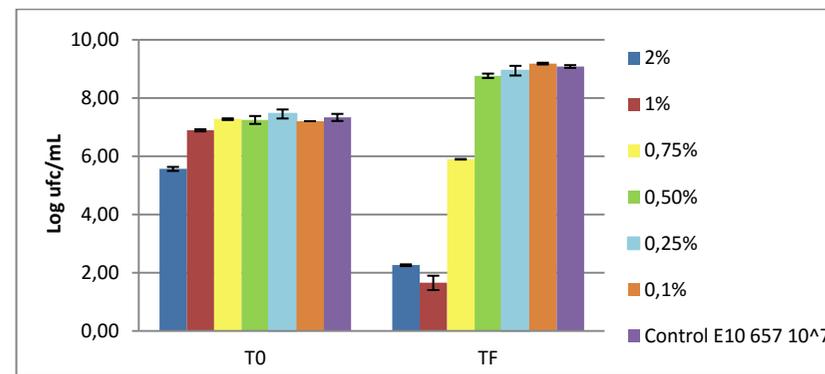
Gráfica 23. Curva de crecimiento de la cepa E10 652 en presencia del detergente Desenfort



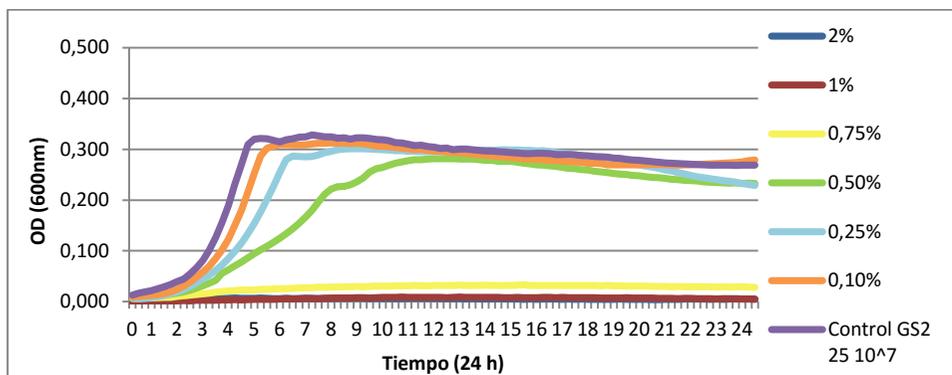
Gráfica 24. Recuentos de la cepa E10 652 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort a Tiempo inicial (TO) y Tiempo final (TF)



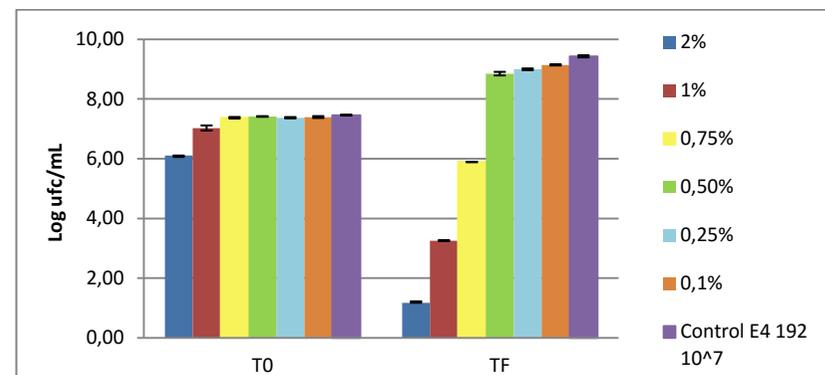
Gráfica 25. Curva de crecimiento de la cepa E10 657 en presencia del detergente Desenfort



Gráfica 26. Recuentos de la cepa E10 657 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort a Tiempo inicial (T0) y Tiempo final (TF)

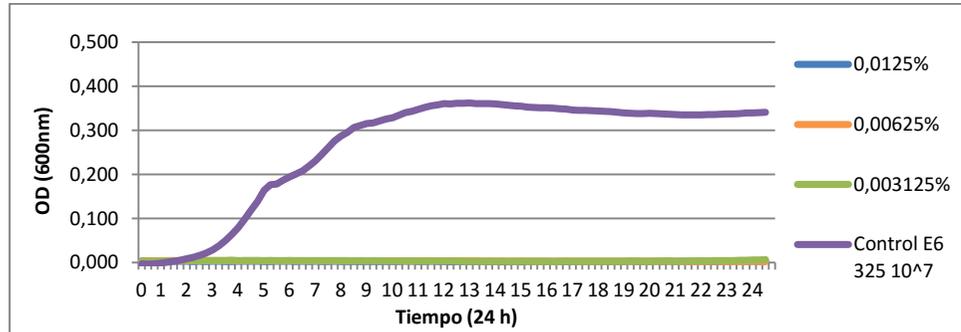


Gráfica 27. Curva de crecimiento de la cepa GS2 25 en presencia del detergente Desenfort

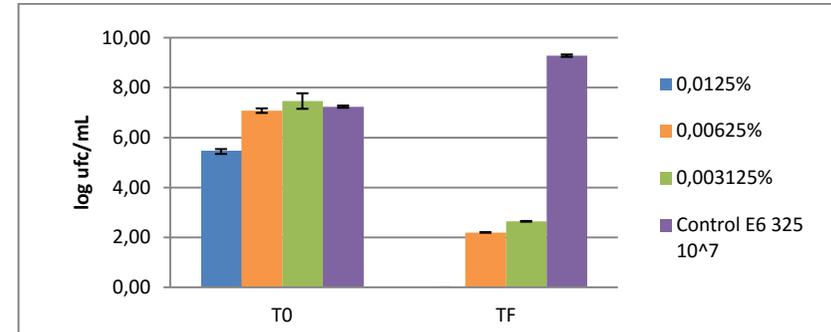


Gráfica 28. Recuentos de la cepa GS2 25 en presencia de distintas concentraciones del detergente Desenfort a Tiempo inicial (T0) y Tiempo final (TF)

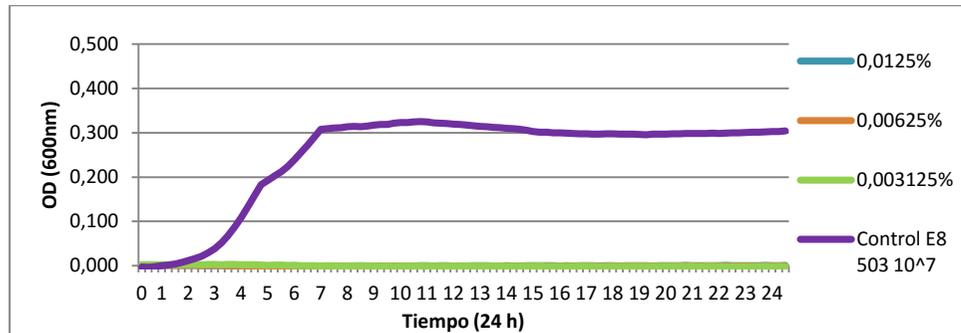
ANEXO 2



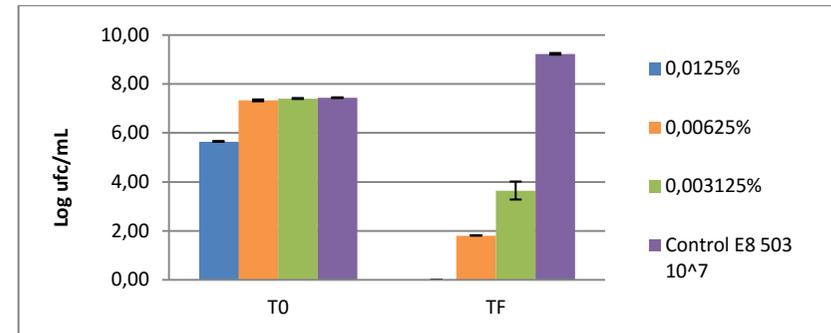
Gráfica 29. Curva de crecimiento de la cepa E6 325 en presencia del desinfectante Dexacide



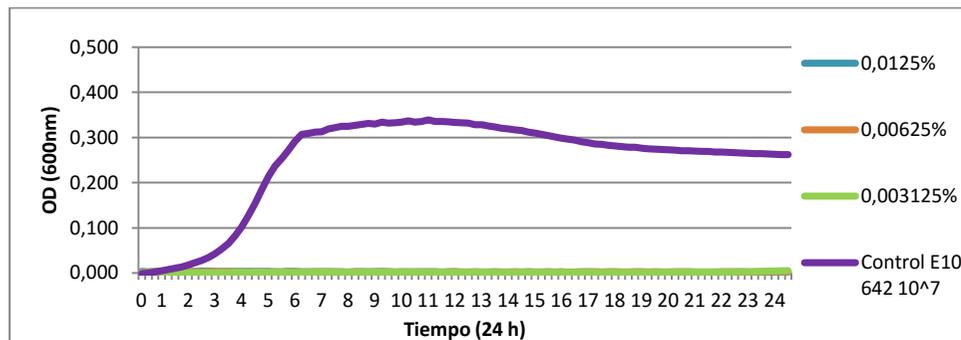
Gráfica 30. Recuentos de la cepa E6 325 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide a Tiempo inicial (T0) y Tiempo final (TF)



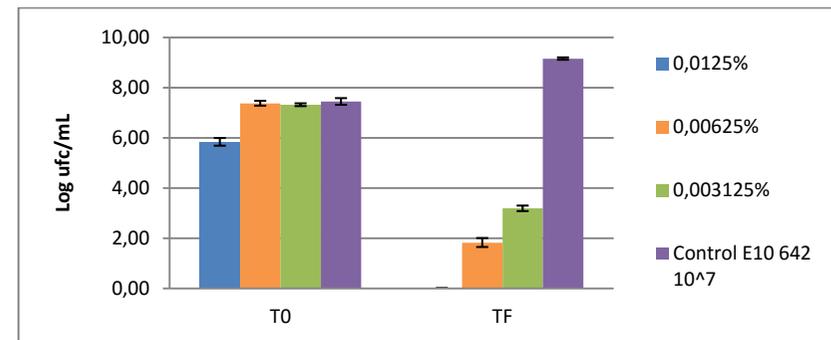
Gráfica 31. Curva de crecimiento de la cepa E8 503 en presencia del desinfectante Dexacide



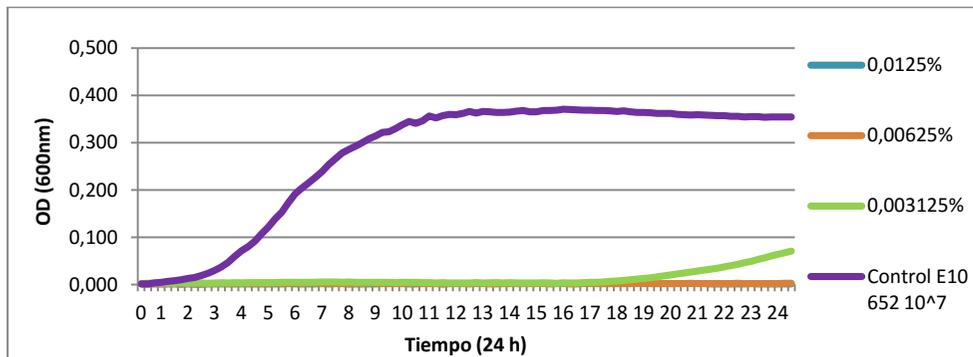
Gráfica 32. Recuentos de la cepa E8 503 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide a Tiempo inicial (T0) y Tiempo final (TF)



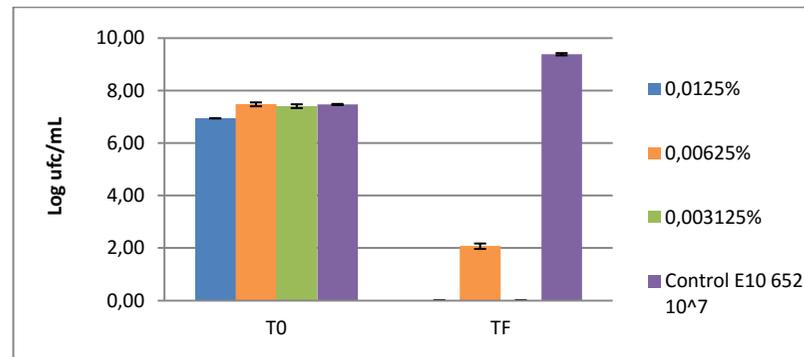
Gráfica 33. Curva de crecimiento de la cepa E10 642 en presencia del desinfectante Dexacide



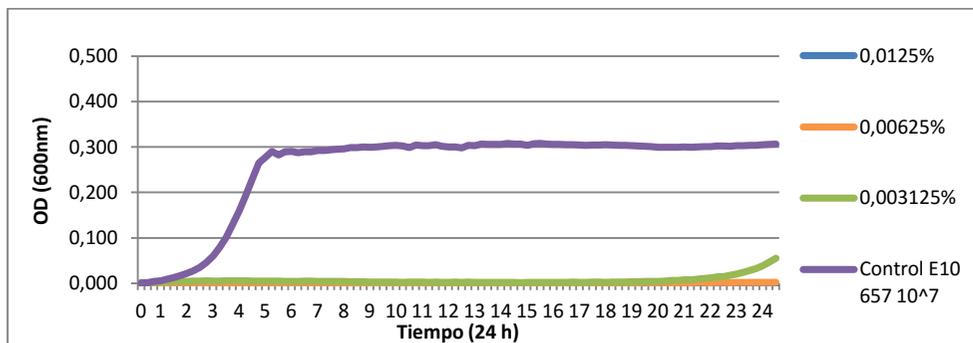
Gráfica 34. Recuentos de la cepa E10 642 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide a Tiempo inicial (T0) y Tiempo final (TF)



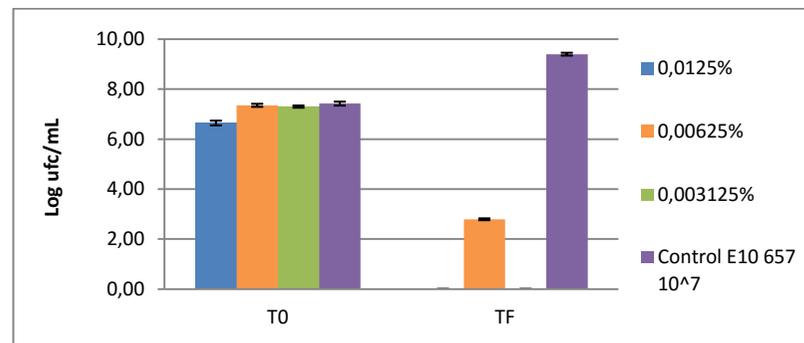
Gráfica 35. Curva de crecimiento de la cepa E10 652 en presencia del desinfectante Dexacide



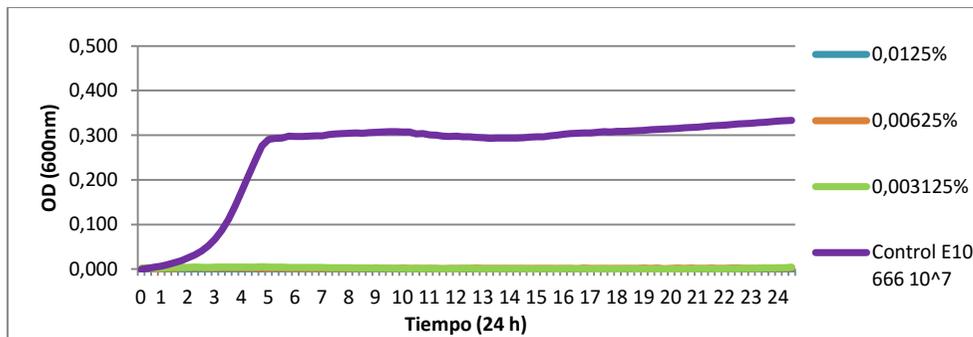
Gráfica 36. Recuentos de la cepa E10 652 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide a Tiempo inicial (T0) y Tiempo final (TF)



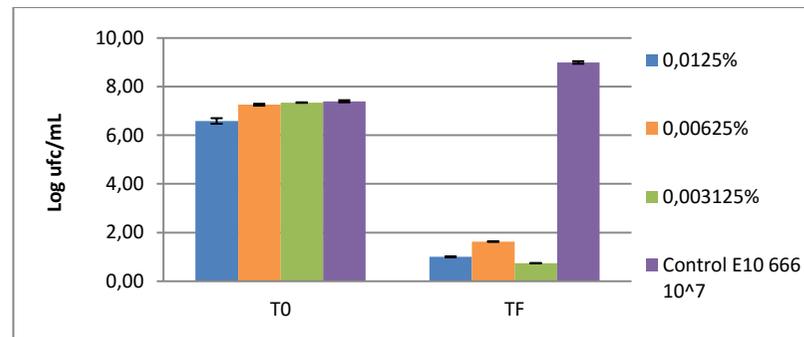
Gráfica 37. Curva de crecimiento de la cepa E10 657 en presencia del desinfectante Dexacide



Gráfica 38. Recuentos de la cepa E10 657 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide a Tiempo inicial (T0) y Tiempo final (TF)



Gráfica 39. Curva de crecimiento de la cepa E10 666 en presencia del desinfectante Dexacide



Gráfica 40. Recuentos de la cepa E10 666 en presencia de distintas concentraciones del desinfectante Dexacide a Tiempo inicial (T0) y Tiempo final (TF)