

RESISTENCIA A BIOCIDAS EN CEPAS DE *SALMONELLA* SP. AISLADAS DE HUEVO

LAURA BEATRIZ ALMEIDA GONZÁLEZ, M^a LUISA FERNÁNDEZ MÁRQUEZ, M^a CARMEN LÓPEZ AGUAYO, ROSARIO LUCAS LÓPEZ, ANTONIO MARÍN GARRIDO **, ANTONIO GÁLVEZ DEL POSTIGO, Y M^a JOSÉ GRANDE BURGOS*

RESUMEN

Se ha estudiado la presencia de presuntas salmonelas en la superficie de huevos comerciales, y se ha determinado la sensibilidad a biocidas para la colección de cepas ensayadas. El porcentaje de muestras positivas osciló entre el 37% y el 43%. En algunas de las marcas comerciales analizadas no se logró aislar la bacteria en los huevos analizados, mientras que en los huevos de comercios pequeños o granjas se aisló en todas las muestras ensayadas. La mayoría de las cepas fueron inhibidas a una concentración del 0.1% de los biocidas cloruro de benzalconio, cetrimida, hexadecilpiridinio, hexaclorofeno, polihexametil biguanidío o P3 oxonia. Sin embargo, en algunos casos (cetrimida, polihexametil biguanidío o P3 oxonia) se encontró un bajo porcentaje de cepas que requerían concentraciones de biocida de hasta diez veces superiores para su inhibición. El triclosan mostró una mayor eficacia, inhibiendo al 77% de las cepas a una concentración de 0.075%. Sin embargo, el resto de las cepas fueron muy tolerantes a este biocida, siendo necesaria una concentración del 1% para su inhibición. Los resultados de este estudio sugieren la existencia de bajos porcentajes de cepas de *Salmonella* en la superficie de huevo que son tolerantes a los biocidas.

Palabras clave: huevo, *Salmonella*, biocida

ABSTRACT

We have studied the presence of presumptive salmonellae in comercial eggs, and the biocide tolerance of isolates. Presumptive salmonellae were detected in some 37 to 43% of samples tested. Some comercial brands were free of the bacterium, but all eggs from local stores and farms tested positive. Most isolates were inhibited by 0.1% of the biocides benzalkonium chloride, cetrimide,

* Universidad de Jaén. Dpto. de Ciencias de la Salud. Área de Microbiología. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas, s/n. 23071-Jaén. E-mail: mariajosegrande-burgos@yahoo.es

** Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.

hexadecylpyridinium chloride, hexachlorophene, polyhexamethylen biguanide and P3 oxonia. A small percentage of isolates required up to ten-fold higher biocide concentrations for inhibition (as in the case of cetrimide, polyhexamethylen biguanide and P3 oxonia). Triclosan was apparently more effective, inhibiting 77% of isolates at 0.075%. However, the remaining of isolates only were inhibited at 1% of the biocide. Results from this study suggest that a low percentage of the *Salmonella* population on egg surfaces can tolerate biocides.

Keywords: egg, *Salmonella*, biocides

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El huevo

El huevo es el producto de la ovulación de las gallinas y otras aves. Según el Reglamento CE 589/2008 el huevo se define como el producto con cáscara sin romper, incubar o cocer de la especie *Gallus gallus*, apto para el consumo humano directo o para la elaboración de ovoproductos (1). Entre los alimentos de origen animal, el huevo se considera como una fuente importante de proteína en la dieta de los humanos. Según la Organización Mundial de la Salud - OMS, este alimento es una referencia de proteína a nivel mundial, con la cual se comparan las demás proteínas. El huevo es una estructura biológica natural con cáscara que proporciona protección al desarrollo de embriones de pollo. Se caracteriza por tener un alto valor nutritivo y un amplio uso a nivel industrial debido a sus propiedades funcionales (2, 3).

Los huevos que se incluyen dentro del grupo de alimentos proteicos, tienen una larga tradición de consumo y son apreciados en diferentes culturas por su facilidad de obtención, precio, cualidades culinarias, contenido de nutrientes y amplio aprovechamiento en la industria de alimentos (4). Existe constancia de su utilización desde épocas muy antiguas en regiones de la India y China, posteriormente en Grecia y de su propagación por Europa. En sus inicios, la avicultura fue una actividad rural con condiciones muy precarias, solo hasta principios del siglo XX se presenta una selección de razas de gallinas para mejorar la producción y a partir de 1960 surge la avicultura intensiva con una producción promedio de 600 millones de docenas (5). La producción de huevos a nivel mundial es liderada por China, mientras que España ocupa el tercer lugar en la Comunidad Europea según los índices del año 2007. Por otro lado, el consumo por persona es en promedio de 8.2 kg de huevos anuales según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (6). A nivel comercial los huevos se identifican por categorías (A: Para huevos frescos, sin tratamientos de conservación ni refrigeración, B: si no cumplen con las características para ser A) y por peso (Clase XL: ≥ 7.3 g; L: entre 63 y 73 g; M: entre 53 y 63 g; S: < 53 g) (1).

Son considerados una buena fuente de nutrientes, un alimento económico y multifuncional debido a que sus componentes tienen propiedades coagulantes, emulsionantes y espumantes. Los componentes del huevo lo hacen una excelente fuente de proteínas de alta calidad, vitaminas y minerales. Su perfil nutricional varía dependiendo de la parte analizada, y está también altamente influenciado por la composición de los piensos de la gallina y el sistema de crianza (7, 8). De forma general, el huevo contiene de 12-14% de proteínas caracterizadas por poseer un buen balance de aminoácidos esenciales. Es una fuente rica de lecitina, un fosfolípido que forma parte de la membrana celular de todas las células del organismo. La grasa del huevo se caracteriza por ser fuente de ácidos grasos esenciales (como el ácido linoleico y araquidónico). Se encuentra en una forma altamente emulsionada lo cual facilita la digestión y absorción por el organismo (9). Las Vitaminas A, D y E están presentes en la yema y son transportadas por los lípidos. La cáscara de huevo aunque se considera como no comestible, puede ser una buena fuente de calcio si es sometida a un proceso de pulverizado muy fino (8). También es una fuente importante de minerales, siendo de destacar el elevado aporte de selenio, potasio y fósforo, iodo y zinc (10). Otros elementos traza que proporciona el huevo son cobre, manganeso y flúor pero también se encuentran cantidades abundantes de vitaminas, en especial vitamina B12, biotina, ácido pantoténico, riboflavina, vitamina D, niacina, vitaminas A, E y B1. Una ventaja de este alimento es que contiene tanto vitaminas hidrosolubles como liposolubles, que pueden ayudar a cubrir una parte considerable de las necesidades diarias (11, 12, 13).

Los huevos recién puestos son generalmente estériles, sin embargo, en un periodo de tiempo relativamente corto después de la puesta, se pueden encontrar numerosos y diferentes tipos de microorganismos en su superficie, que bajo determinadas condiciones (temperatura de almacenamiento, frescura del huevo, nivel de contaminación ambiental, manipulación, entre otros) pueden entrar al huevo, multiplicarse y causar su deterioro. Además, una humedad elevada favorece en gran medida el desarrollo de microorganismos en la superficie y la consecuente penetración por las membranas internas (13). De forma natural se encuentra protegido de la contaminación exterior gracias a la barrera física que le proporciona su cáscara y membranas y a barreras químicas antibacterianas presentes en su composición. Sin embargo son alimentos perecederos debido a la alta susceptibilidad de ser atacados por microorganismos. A pesar de contar con defensas naturales, como agentes antimicrobianos en su interior, de forma habitual adquieren una contaminación microbiana en su cáscara que puede proceder del contacto con heces, de los nidales, de los sistemas colectores hasta el centro de clasificación, ó de la manipulación inadecuada, entre otros. Además, influyen otros factores en su contaminación como son la carga microbiana inicial (número y

tipo de microorganismo), las condiciones de almacenamiento (humedad, temperatura, composición atmosférica) y factores intrínsecos del huevo (pH, nutrientes, barreras físicas, e inhibidores de crecimiento) (4).

1.2. *Salmonella enterica*

Los microorganismos pueden contaminar los huevos en diferentes etapas, desde la producción hasta el consumo. La contaminación transovárica o transmisión “vertical” puede ocurrir cuando los huevos son infectados durante su formación en los ovarios de la gallina. Mientras que la transmisión horizontal se produce cuando son expuestos a un ambiente contaminado y a microorganismos que penetran la cáscara del huevo (14). Entre los tipos de microorganismos contaminantes del huevo se encuentran bacterias del género: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* y *Staphylococcus*. Entre los mohos generalmente se encuentran los géneros: *Mucor*, *Penicillium*, *Hormodendron*, *Cladosporium* y otros. Se han identificado también levaduras del tipo *Torula* en algunos casos (13).

De las toxiinfecciones alimentarias notificadas en España, un porcentaje considerable se relaciona con el consumo de huevos y derivados, de los cuales, la mayoría de ellos se asocian con salmonelosis. Entre los brotes relacionados con el huevo o derivados, destaca como agente causal *Salmonella*, siendo el serotipo Enteritidis el más frecuente, y como vehículo de transmisión más habitual los platos con huevo crudo o poco cocinado. Es una de las infecciones bacterianas más común, aunque la familia *Salmonella* incluye más de 2.300 serotipos *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium son los más comunes a hora de producir salmonelosis (15,16). Los síntomas de la enfermedad incluyen náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea y fiebre (17, 18). El hogar es el lugar donde ocurren la mayoría de los brotes, aunque los asociados a la restauración colectiva provocan un elevado número de afectados. El principal factor que contribuye a estas toxiinfecciones es la temperatura inadecuada de conservación del alimento, seguido del consumo de alimentos crudos y la preparación de los platos con antelación. La estacionalidad es muy marcada, siendo los meses con temperaturas más elevadas los que presentan una mayor frecuencia de brotes.

La bacteria *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae la cual está formada por bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, que crecen en medios usuales. Incluye un gran número de géneros y especies.

El género *Salmonella* incluye un amplio grupo de bacterias patógenas, la mayoría de las cuales tiene su reservorio natural en el tubo digestivo de diversos animales, como aves, mamíferos y reptiles y causan enteritis humanos; otras tienen un reservorio exclusivamente en el hombre, como las causantes de la fiebre tifoidea y paratifoidea. *Salmonella*, como todas las enterobacterias, crece bien en los medios usuales, y presenta la mayor resistencia de esta familia a las sales biliares y otros componentes químicos (19). Es una bacteria Gram- negativa en forma de bacilo, móvil, no formadora de esporas. Existen serotipos que no son móviles, tales como: *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (20).

Dentro de los alimentos que la pueden transmitir se encuentran la carne, aves de corral, leche y los huevo crudos (21, 22) principalmente aunque también pueden aparecer en zumos no pasteurizados (23, 24), el pescado (25, 26) cacao, frutas, verduras y mantequilla de cacahuetes (27, 28, 29). Dado que *Salmonella* es sensible a calor, es más frecuente en los alimentos crudos que no se cocinan a una alta temperatura o a una temperatura mínima.

Conscientes de ello, la Organización Interprofesional del Huevo y sus Productos (INPROVO), en colaboración con los Ministerios de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo, implantaron un plan de vigilancia y control de *Salmonella* en la producción de huevos con el fin de disminuir la incidencia y la prevalencia de infecciones por *Salmonella* relacionadas con el consumo de huevos, mediante actuaciones de prevención y control (10). Dentro de este Plan se pusieron en marcha importantes medidas en la producción y comercialización de huevos con la finalidad de garantizar la higiene alimentaria. Cabe destacar la aplicación en las granjas de protocolos de buenas prácticas de higiene, la vacunación obligatoria de las gallinas ponedoras y la realización de controles en piensos, agua y pollitas de reposición. En los centros de embalaje de huevos y fábricas de ovoproductos se emplea el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) para asegurar que los riesgos sanitarios del proceso están bajo control.

1.3. Biocidas

A pesar de ello y de las medidas adoptadas en las granjas de producción, en algunas ocasiones, bacterias como *Salmonella* pueden llegar al huevo, lo que si se combina con una manipulación, cocinado o conservación inadecuados puede desembocar en una toxiinfección alimentaria. La lucha contra estas enfermedades es un objetivo prioritario de la política comunitaria en salud pública y su incidencia debe reducirse progresivamente.

En la búsqueda de alternativas para atacar una carga microbiana específica se han utilizado sustancias como los biocidas, compuestos inorgánicos ó moléculas orgánicas sintéticas usadas para desinfectar o esterilizar instrumentos y superficies, y para preservar materiales o procesos de la degradación microbiológica (30). El estudio sistemático del efecto de estas sustancias sobre diferentes cepas permite contribuir al diseño y desarrollo de nuevos agentes, identificar los mecanismos de resistencia de microorganismos y problemas toxicológicos que puedan presentar, para finalmente, ofrecer una guía de uso correcto de estos compuestos (31).

Según el anexo V del Real Decreto 1054/2002 los biocidas se clasifican en cuatro grupos:

Grupo 1: Desinfectantes y biocidas generales. Estos tipos de productos excluyen los productos de limpieza que no persiguen un efecto biocida, incluidos los detergentes líquidos y en polvo y productos similares. Grupo 2: Conservantes. Grupo 3: Plaguicidas y Grupo 4: Otros biocidas.

En la Tabla 1, se muestran los principales biocidas aceptados en la industria alimentaria, de aplicación en las zonas de procesado, manipuladores o en los productos mismos.

Tabla 1. Principales biocidas utilizados en la industria alimentaria

Para zonas o ambientes de procesado
- Compuestos de amonio cuaternario
- Iodóforos
- Agentes a base de cloro
Para manipuladores
- Compuestos de amonio cuaternario
- Iodóforos
- Clorhexidina
- Polihexametil biguanidido
- Paraclorometaxilenol
- Triclosan
Para la corteza de productos
- Hipocloritos
- Clorados
- Ácidos orgánicos

Los biocidas desempeñan un papel muy importante en el control de microorganismos patógenos. La industria alimentaria depende de ellos, y su uso es cada

vez mayor motivo de preocupación debido a la aparición de bacterias que muestran tolerancia a determinados biocidas, junto con la capacidad de desarrollar resistencia cruzada a diferentes compuestos antimicrobianos de importancia clínica (32).

Los agentes biocidas usados en la industria de alimentos deben cumplir con una serie de características deseables (Tabla 2). Es muy difícil encontrar un agente que cumpla con todas las características mencionadas en la tabla, pero, la diversidad de aplicaciones en la industria (superficies, paredes, uso en manos de manipuladores, etc..) hacen posible diferentes combinaciones de estos (33).

Tabla 2. Características ideales de los biocidas empleados en la industria alimentaria.

Características
- Amplio espectro de acción biocida
- Acción rápida
- Sin olor
- Compatible con una amplia variedad de materiales (sin efecto blanqueador, descolorante, propiedades corrosivas)
- Compatibles con la formulación de componentes (agentes de limpieza, buffers, geles, espumas)
- Solubles en agua y de fácil lavado
- Estables durante su almacenamiento
- Fáciles de usar (diluir, aplicar directamente)
- De uso seguro por el manipulador
- No sean productores de residuos peligrosos que puedan afectar al consumidor
- Sin efectos adversos sobre las características de los productos (sabor, apariencia, textura)
- Atractivos económicamente

Dependiendo de la zona o potencial de acción del biocida se clasifican por su actuación sobre la pared celular, la membrana citoplasmática y el citoplasma, aunque no quiere decir que tengan una acción exclusiva sobre esta zona.

El mecanismo de acción de los biocidas se basa en la acción del biocida sobre la membrana de los microorganismos donde oxidan las proteínas alterando la permeabilidad de la membrana y generando entrecruzamientos que hacen rígida a la membrana y alteran la presión intracelular con lo que el microorganismo muere. Los biocidas oxidantes tienden a oxidar todo tipo de materia orgánica y se consumen rápidamente en sistemas muy contaminados. Los biocidas no oxidantes, por otro lado, tienen un efecto más dañino, pueden penetrar en la célula y alterar el DNA, el RNA o los sistemas de defensa celulares, por lo cual son los más recomendados (34).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Aislamiento microbiano

Se utilizaron huevos obtenidos de diferentes puntos de venta y distintas granjas. Cada huevo fue identificado previamente con un número y colocado en una bolsa estéril a la que se le adicionaron 35 mL de TSB, dejándolo reposar una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se frotó la superficie del huevo durante un minuto, con movimientos de arriba, hacia abajo y de derecha a izquierda, hasta lograr frotar toda la superficie. Finalmente, el huevo fue extraído de la bolsa y el líquido remanente se incubó durante 24 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, mediante un hisopo se sembró por agotamiento en placas de Agar Bilis Verde Brillante (ABVB) que se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Finalizado el tiempo de incubación, se seleccionaron las colonias que cumplieran con las características de *Salmonella* en dicho medio, es decir, colonias pequeñas, translúcidas e incoloras u opacas de un color intermedio entre rosa pálido y fucsia. Una vez identificadas y purificadas las colonias se sembraron en tubos de semilla de TSA para el uso rutinario y se guardaron en glicerol a -20°C para trabajos posteriores.

2.2. Determinación de la sensibilidad a biocidas.

Los biocidas empleados se muestran en la Tabla 3. Para la obtención de las diferentes concentraciones de biocida se preparó una solución madre al 10% en agua destilada estéril de todos los biocidas a ensayar excepto el triclosan que se preparó en etanol.

Tabla 3. Biocidas empleados en el ensayo

AGENTES NO OXIDANTES
BIS-FENOLES
Hexachlorofeno
Triclosan
DERIVADOS DE AMONIO CUATERNARIO
Cloruro de benzalconio
Cetrimida
Hexadecilpiridinio
BIGUANINAS
Polihexametil biguanidio (PHMG)
AGENTES OXIDANTES
P3-oxonia active

Los ensayos de sensibilidad a biocidas se realizaron en placas de microtitulación inoculadas con un cultivo de 18 h de la cepa bacteriana diluido 1:10. En los diferentes pocillos se adicionaron concentraciones crecientes de los biocidas a ensayar. Tras 24 h de incubación, se determinó la densidad óptica a 505 nm de cada pocillo mediante un lector de microplacas y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada biocida y cepa. La CMI se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación durante 24h. (31).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aumento de las infecciones causadas por microorganismos resistentes a diferentes antimicrobianos y biocidas han motivado el estudio de la resistencia a estos compuestos.

Los objetivos perseguidos en este estudio han sido detectar y aislar *Salmonella* spp. de la superficie de diferentes huevos de gallina, tamaño S, M y L, y de codorniz, de distintos puntos de venta y granjas y de diferente color. Una vez obtenida la colección, evaluar la susceptibilidad de dichas cepas de *Salmonella* sp., frente a diversos biocidas que tienen un potencial tecnológico importante para ser usados como desinfectantes y antisépticos.

Se recolectaron 118 muestras, de las cuales 111 fueron huevos de gallina y 7 de huevos de codorniz. De todos los huevos analizados se ha observado que el porcentaje de aislamiento de presuntas *Salmonella* es ligeramente mayor en los huevos de codorniz (42.86%) con respecto a los huevos de gallina donde se aisló en el 37.84% de las muestras.

El color de la cáscara, que puede ser blanco o marrón según la raza de la gallina, depende de la concentración de pigmentos, denominados porfirinas, depositados en la matriz cálcica y no afecta a la calidad, ni a las propiedades nutritivas del huevo. Los diferentes niveles de coloración dependen del estado individual de la gallina. La alimentación o el sistema de cría no influyen en el color de la cáscara (blanco o moreno) y tampoco en su intensidad (si se trata de un huevo de color) (35,36). Para éste trabajo se analizaron 83 huevos blancos y 28 de color marrón, los resultados obtenidos mostraron que el aislamiento de *Salmonella* era ligeramente superior en los huevos de color marrón en los cuales se aisló la bacteria en 12 muestras de las 28 analizadas. Sin embargo, en los pequeños comercios o granjas, el aislamiento de *Salmonella* fue mayor en huevos blancos (45.16%), mientras que en los grandes comercios se aisló *Salmonella* en el 50% de los huevos marrones.

Del total de muestras analizadas, 74 fueron procedentes de grandes almacenes y 44 de comercios pequeños o granjas en los cuales se detectó al patógeno en 30 y 15 muestras respectivamente. No obstante en las marcas comerciales analizadas, no se logró aislar la bacteria en los huevos de algunas marcas, mientras que en los huevos de comercios pequeños o granjas se aisló en todas las muestras ensayadas.

El segundo objetivo de este trabajo una vez aisladas las cepas fue la evaluación de la susceptibilidad de las cepas de *Salmonella* spp. frente a los distintos biocidas. Los resultados obtenidos (Fig. 1) muestran que en el caso de los biocidas Cloruro de benzalconio, Hexadecilpiridinio y Hexaclorofeno, no se observó crecimiento de las cepas a las concentraciones de 0.25, 0.5 y 1%, mientras que con el P3-oxonia se observó un crecimiento en torno al 13% de las cepas en las concentraciones de 0.25 y 0.5%. A concentraciones inferiores, de 0.00025, 0.0025, 0.025, 0.05 y 0.075% eran capaces de crecer casi el 100% de las cepas. Al utilizarse una concentraciones de 0.1% en el caso de Cloruro de benzalconio y Hexadecilpiridinio se observó un crecimiento en torno al 10% de las cepas y del 30% a esa misma concentración de Hexaclorofeno y P3-oxonia.

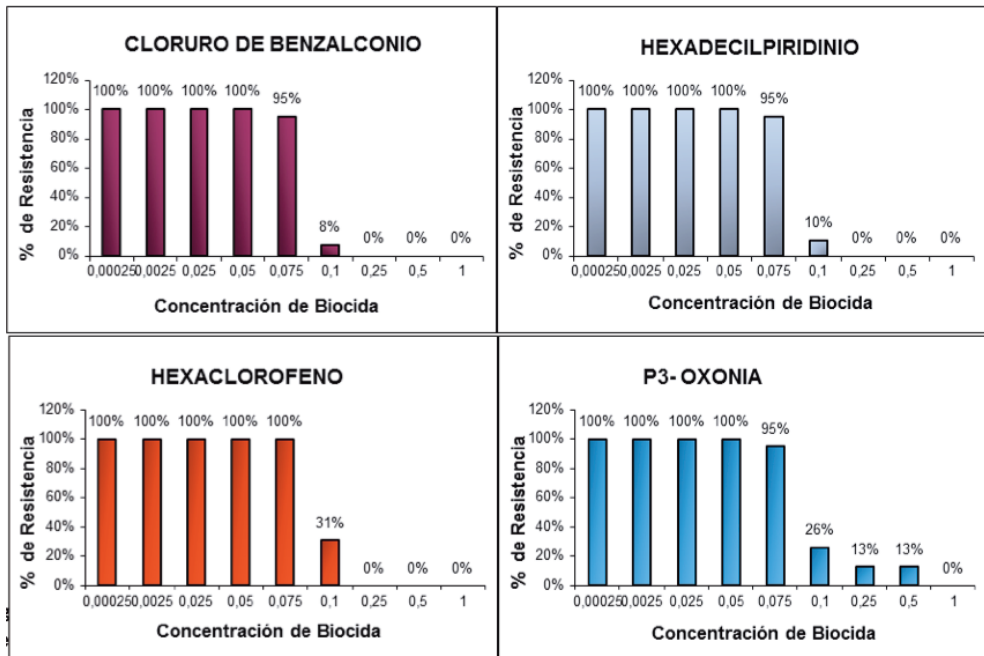


Fig. 1.- Resistencia a los biocidas Cloruro de benzalconio, Hexadecilpiridinio, Hexaclorofeno y P3-Oxonia de las cepas de *Salmonella*. Las gráficas muestran el porcentaje de cepas que fueron capaces de crecer a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

En el caso de los biocidas Cetrimida y PHMG (Fig. 2), no se detectó inhibición alguna a concentraciones inferiores al 0.075%. A esta concentración se obtuvo una inhibición del crecimiento de alrededor del 20% de las cepas. Las concentraciones superiores de ambos biocidas fueron más efectivas con solo un 3% de resistencia a las concentraciones de 0.25 y 0.50% y una inhibición total a la concentración del 1%

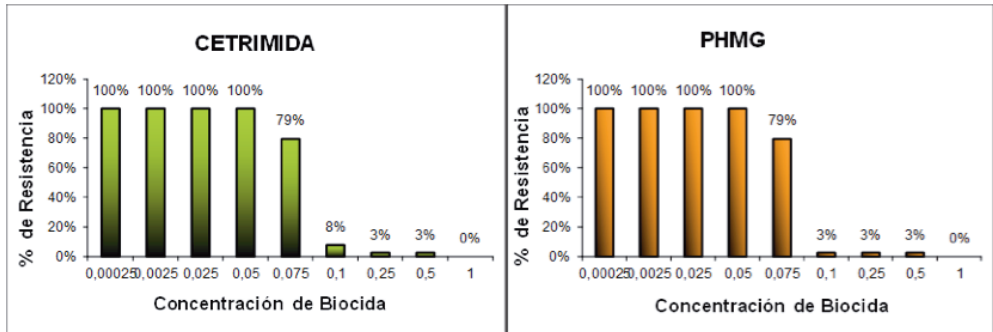


Fig. 2 .- Resistencia a los biocidas Cetrimida y PHMG de las cepas de *Salmonella*. Las gráficas muestran el porcentaje de cepas que fueron capaces de crecer a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

En el caso del Triclosan (Fig. 3), se observó un comportamiento diferente, produciéndose una inhibición del 75% de las cepas con una concentración del 0.05% concentración con la que con el resto de los biocidas se observaba un crecimiento total de las cepas. No obstante, se observó que un porcentaje de entre el 18 y el 23% de las cepas eran capaces de crecer a concentraciones de hasta el 0.5%, siendo necesaria una concentración del 1% para inhibir a todas las cepas.

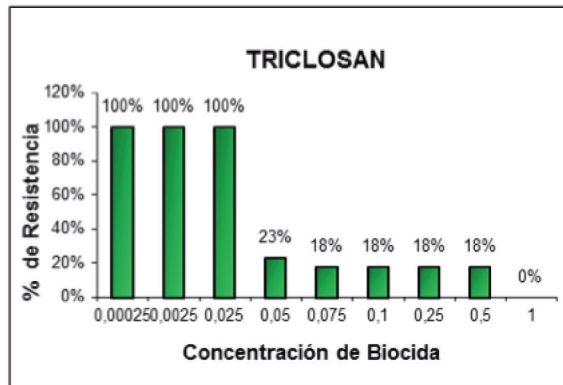


Fig. 3 .- Resistencia al Triclosan de las cepas de *Salmonella*. La gráfica muestra el porcentaje de cepas que fueron capaces de crecer a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

Como conclusión del presente estudio podemos decir que fue posible detectar la presencia de *Salmonella* sp. en la superficie de huevos procedentes de grandes almacenes, pequeños comercios o granjas sin importar si eran de gallina o de codorniz y del color de la cáscara. Los biocidas Triclosan, PHMG y Cetrimida son los que muestran mayor efecto a una concentración menor frente a las cepas de *Salmonella*. Por consiguiente, estos biocidas serían eficaces para el control de las cepas de *Salmonella* a lo largo de la cadena alimentaria. Estos resultados indican también la importancia de elegir el tipo de biocida adecuado así como la concentración mínima para la eliminación de *Salmonella* en ambientes alimentarios. La existencia de bajos porcentajes de cepas que son capaces de crecer a concentraciones de biocidas hasta diez veces superiores a la mayoría de las cepas sugiere la existencia de sub-poblaciones de cepas tolerantes a biocidas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto P08-AGR-4295 (Proyectos de Excelencia, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa. Junta de Andalucía). Laura Beatriz Almeida ha sido becada por la Fundación Carolina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reglamento (CE). (2008). Reglamento (CE) N^o.589. Diario Oficial de la Unión Europea.
2. Mudambi, S.R. (2007). Eggs. Food Science, 2, 115-120.
3. Vaclavik, V., Christian, E.W. (2007). Essentials of Food Science, 3rd ed. Springer Science NY,NY.
4. Hernández, A.G., López, M.D.R. (2010). Tratado de Nutrición. 2^a ed. Tomo II: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos., Editorial Medica Panamericana.
5. Rodríguez, R.V.M., Magro, E.S. (2008). Bases de la Alimentación Humana. Oleiros (La Coruña), España, Editorial Netbiblo.
6. M.A.A.M. (2011). El Consumo Alimentario en España. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente, Gobierno de España.
7. USDA. (2008). National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. Nutrient Data Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
8. Watson, R.R. (2008). Eggs and Health Promotion, John Wiley & Sons. 1-185.
9. Srilakshmi, B. (2003). Food Science, New Age International, 1-380.
10. Ortega, R.M. (2003). El huevo en la alimentación. Importancia nutricional y sanitaria. Facultad de Farmacia, Departamento de Nutrición. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
11. Vollmer, G., Josst, G., Schenker, D., Sturm, N., Vreden, N. (1999). Huevos, leche y quesos. Elementos de Bromatología descriptiva. Zaragoza: Acribia, S.A.
12. Sparks, N. (2000). Microbiology of Fresh Eggs. Encyclopedia of Food Microbiology - Process Hygiene, Academic.

13. Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005). Modern food microbiology, 7th edition. Springer Science + Business Media. New York, NY.
14. De Reu, K., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J., et al. (2006). Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. International Journal of Food Microbiology, 112, 253-260.
15. Tauxe, R.T. (1991). *Salmonella*: A postmodern pathogen. Journal of Food Protection, 54, 563-568.
16. Todd, E.C.D. (1996). Worldwide surveillance of foodborne disease: The need to improve. Journal of Food Protection, 59, 82-92.
17. Giannella, R.A. (2006). Infectious enteritis and proctocolitis and bacterial food poisoning. In M. Feldman, L.S. Friedman, M.H. Sleisenger (Eds.), Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease (8th ed.). Philadelphia: Saunders Elsevier.
18. Peques, D.A., Miller, S.I. (2009). *Salmonella* species, including *Salmonella typhi*. In G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin (Eds.), Principles and Practice of Infectious Diseases (7th ed). Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone
19. Prats, G., Coll, P. (1998). Géneros *Shigella*, *Salmonella* y *Yersinia*. In J.A. García Rodríguez, J.J. Picazo, Microbiología Médica, pp. 246- 249. Madrid: Harcourt Brace.
20. Porrero, M., García, M., Cubillo, I., Rivero, E., Herrera, L., Mariano, E., et al. (2006). Salmonellosis. Salmonelosis y Huevos, pp. 28-32. Madrid.
21. Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D.R. A., Bolton, F.J, et al. (2002). Prevalence and number of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chicken in relation to sampling methods. International Journal of Food Microbiology, 76, 151-164.
22. Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., et al. (1999). Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5, 607-625.
23. Buxton, J., Fyfe, M., King, A., Paccagnella, A., Campbell, K., Ellis, A., et al. (1999). Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infection in the United States and Canada associated with unpasteurized orange juice-the British Columbia Experience. Canada Communicable Disease Report, 25, 161-164.
24. Parish, M.E., Narcisco, J.A., Friedrich, L.M. (1997). Survival of *Salmonella* in orange juice. Journal of Food Safety, 61, 280-284.
25. Da Silva, M.V., Gibbs, P.A., Kirby, R.M. (1998). Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (*Trachurus trachurus*). Journal of Applied Microbiology, 84, 802-810.
26. Heintz, M.L., Ruble, R.D., Wagner, D.E., Tatini, S.R. (2000). Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. Journal of Food Protection, 63, 579-592.
27. Grasso, E.M., Somerville, J.A., Balasubramaniam, V.M., Lee, K. (2010). Minimal effects of high-pressure treatment on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium inoculated into peanut butter and peanut products. Journal of Food Science, 75, E522-E526.
28. Park, E.J., Oh, S.W., Kang, D.H. (2008). Fate of *Salmonella tennessee* in peanut butter at 4 and 22°C. Journal of Food Protection, 73, M82-M86.
29. Lampel, K.A., Al-Khaldi, S., Cahill, S.M. (2012). *Salmonella* species. In T. Hammack, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins (pp. 12- 16). U.S. Food and Drug Administration.
30. Chapman, J.S. (2003). Biocide resistance mechanisms. International Biodeterioration and Biodegradation, 51, 133-138.
31. Denyer, S.P. (1995). Mechanisms of action of antibacterial biocides. International Biodeterioration and Biodegradation, 36, 227-245.
32. Condella, O., Iversena, C., Cooneya, S., Powera, K.A., Walsh, C., Burgessa, C., et al. (2012). Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links bet-

- ween biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 3087-3097.
33. Willians, J., Worley, S. (2000). Types of biocides. *Encyclopedia of Food Microbiology - Process Hygiene*, Academic.
 34. López Aguayo, M.C., Grande Burgos, M.J., Lucas López, R., Gálvez, A. (2010). Resistencia a biocidas de diferentes cepas de *Escherichia coli*. *Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 23, 121-136.
 35. FAO (2006). Seguridad alimentaria. Informe de Políticas número 2. Junio de 2006.
 36. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. (2000). El Huevo. Contenidos Actualizados de Nutrición y Alimentación. Panamá.