

RESISTENCIA A BIOCIDAS DE DIFERENTES CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

M^a CARMEN LÓPEZ AGUAYO¹, M^a JOSÉ GRANDE BURGOS¹, ROSARIO LUCAS LÓPEZ¹,
ANTONIO GÁLVEZ^{1,*}

RESUMEN

Los biocidas son herramientas de gran importancia para controlar la transmisión de microorganismos patógenos a través de la cadena alimentaria. En el presente estudio se ha determinado la resistencia a siete biocidas en una colección de nueve cepas de *Escherichia coli*, incluyendo cepas verotoxigénicas y cepas portadoras de resistencia a beta-lactámicos. Los biocidas más eficaces fueron triclosan, hexadecilpiridinio y cetrimida, seguido del cloruro de benzalconio. No se encontraron diferencias significativas entre las cepas verotoxigénicas y/o productoras de beta lactamasas de amplio espectro en cuanto a sensibilidad a los biocidas mencionados.

Palabras clave: biocidas, *Escherichia coli*, verotoxigénicas, beta-lactamasas

ABSTRACT

Biocides have great relevance in the control of transmission of foodborne microbes through the food chain. In the present study, resistance to seven biocides was investigated among a collection of nine *Escherichia coli* strains, including

¹Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas, s/n. 23071-Jaén. *E-mail: agalvez@ujaen.es

verotoxigenic and beta-lactamase producers. The most effective biocides were triclosan, hexadecylpyridinium chloride and cetrimide, followed by benzalkonium chloride. Verotoxigenic and beta-lactamase producing strains did not show significant differences in their sensitivities to biocides compared to the other strains tested.

Keywords: biocides, *Escherichia coli*, verotoxigenic, beta-lactamase

INTRODUCCIÓN

Los biocidas

Los biocidas se definen como productos destinados a destruir, neutralizar, impedir la acción o ejercer control de otro tipo sobre cualquier microorganismo dañino por medios químicos o biológicos. Algunos ejemplos son los desinfectantes, conservantes, pesticidas, herbicidas, fungicidas e insecticidas (1). Los biocidas son también aquellas sustancias activas y preparados que contienen una o más sustancias activas, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer el control sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos. El uso de biocidas en el ámbito alimentario está muy restringido a fin de garantizar un elevado nivel de protección para la salud de los consumidores (1,2). Desde que la Directiva de 1998 sobre biocidas fue transpuesta al ordenamiento jurídico español en el año 2002, diferentes ministerios son los responsables de controlar el proceso de evaluación para registro, autorización y comercialización de biocidas, debido a la extensa gama de usos a los que estas sustancias pueden destinarse, desde simples desinfectantes para el hogar e higiene para animales hasta conservantes de productos manufacturados, no sólo del ámbito alimentario. A fin de preservar la salud pública, la de los animales y el medio ambiente, la normativa sobre biocidas dispone de obligaciones de estricto cumplimiento para quien pretende comercializar estos productos.

Son biocidas y están clasificados como biocidas los productos cuyas propiedades y usos están descritos en el Anexo V del Real Decreto 1054/2002 (1), (Tabla 1).

Tabla 1.
Clasificación de los biocidas según el Real decreto 1054/2002.

Grupo	Tipo de producto
1.-Desinfectantes y biocidas en general	<ul style="list-style-type: none"> - Biocidas para la higiene humana - Desinfectantes utilizados en los ámbitos de la vida privada y de la salud pública y otros - Biocidas para la higiene veterinaria - Desinfectantes para las superficies que están en contacto con alimentos y piensos - Desinfectantes para agua potable
2.-Conservantes	<ul style="list-style-type: none"> - Conservantes para productos envasados - Conservantes para películas - Protectores para maderas - Protectores de fibras, cuero, caucho y materiales polimerizados - Protectores de mampostería - Protectores para líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y en procesos industriales - Productos antimoho - Protectores de líquidos de metalistería
3.-Plaguicidas	<ul style="list-style-type: none"> - Rodenticidas - Avicidas - Molusquicidas - Piscicidas - Insecticidas, acaricidas y productos para controlar otros artrópodos - Protectores de líquidos de metalistería
4.-Otros biocidas	<ul style="list-style-type: none"> - Conservantes para alimentos o piensos - Productos antiincrustantes - Líquidos para embalsamamiento y taxidermia - Control de otros vertebrados

Dentro de los biocidas dirigidos a las bacterias se encuentran:

- a) Los desinfectantes utilizados en objetos inanimados o piel intacta para reducir el número de microorganismos, estos pueden ser de bajo, medio o alto nivel, en función del número de microorganismos diferentes que eliminan.

- b) Los antisépticos utilizados para tratar la infecciones en heridas superficiales, a excepción de los antibióticos. Y los conservantes añadidos a productos como los cosméticos, los alimentos, el pienso para animales o los productos de limpieza, con el principal objetivo de inhibir el crecimiento de microorganismos.

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 de forma rápida 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. Cada biocida tiene una concentración mínima inhibitoria frente a un microorganismo específico que define la capacidad para inhibir el crecimiento microbiano. No obstante en la mayoría de las aplicaciones los biocidas se aplican no contra un microorganismo, sino frente a poblaciones bacterianas o comunidades de bacterias y algas, bacterias y hongos o bacterias, hongos y algas. Para aumentar el intervalo de inhibición, los biocidas se pueden utilizar como mezclas de dos o tres compuestos activos compatibles que juntos tienen como blanco bacterias, algas, hongos, levaduras e incluso esporas bacterianas.

Existen varios términos para definir la respuesta de un microorganismo a un biocida. Según Russell (3,4), la resistencia se puede definir como la supervivencia de una cepa bacteriana a una concentración de biocida que matará el resto de las poblaciones bacterianas. En condiciones de laboratorio, el término resistencia se utiliza generalmente para definir una cepa bacteriana que sobrevive a concentraciones de un biocida que inhibe al resto de la población. Chapman (5) definió tolerancia como la inhibición de un microorganismo sin causarle la muerte. El término no susceptible se utiliza para definir a un microorganismo que es resistente a un biocida. En la práctica, la resistencia se podría definir como la supervivencia bacteriana frente a un biocida usando las concentraciones normalmente recomendadas por el fabricante (6).

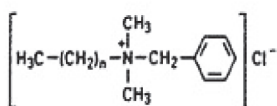
El aumento de las infecciones causadas por microorganismos resistentes a diferentes antibióticos y biocidas han motivado el estudio de la resistencia a estos compuestos (5,7) con el fin de controlar su uso.

Tipos de biocidas

Los agentes “no oxidantes” emplean diferentes mecanismos en su acción biocida. Su acción es generalmente un envenenamiento lento de las células, alterando su metabolismo de alguna forma. Algunos ejemplos son sulfato de cobre, fenoles clorados, óxido de tributil estaño, compuestos de amonio cuaternarios, organosulfuros como el metilbistiocianato, ditiocarbamatos, la propianamida de dibromo nitrilo y otros.

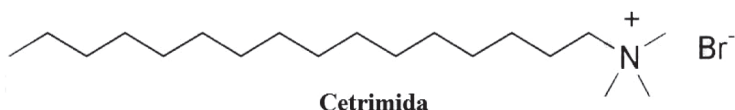
Las **sales cuaternarias de amonio** son productos químicos tensoactivos que consisten generalmente en un átomo de nitrógeno, rodeados por los grupos sustitutivos que contienen de ocho a veinticinco átomos de carbono en cuatro perspectivas del átomo de nitrógeno. Estos compuestos catiónicos son generalmente los más eficaces contra bacterias en gamas alcalinas de pH. Se cargan y enlazan positivamente a los sitios negativamente cargados en la pared bacteriana de la célula. Estos enlaces electrostáticos causarán a las bacterias tensiones en la pared de la célula. También causan daño al flujo normal de compuestos que sostienen la vida a través de la pared de la célula al paralizarlo, disminuyendo su permeabilidad. Son activos frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas aunque estas últimas en menor grado (8,9). El uso de las sales cuaternarias de amonio es limitado, debido a su interacción con el aceite cuando éste está presente y al hecho de que pueden causar espuma.

Cloruro de benzalconio (cloruro de alquilbenzildimetilamonio)

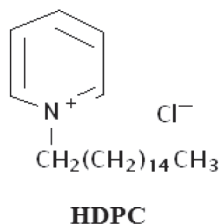


Cloruro de benzalconio

Es activo frente a bacterias, hongos y virus. Se emplea como antiséptico y desinfectante de la piel, material de industrias alimentarias y en algunos compuestos cosméticos.

Cetrimida (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)

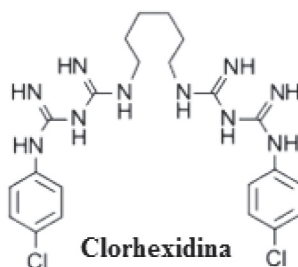
Es un antiséptico de amplio espectro, que actúa de forma mayoritaria frente a bacterias Gram-positivas que frente a Gram-negativas. Su uso está indicado para el tratamiento de quemaduras, heridas, desinfección de la piel y desinfección y limpieza de utensilios.

Hexadecilpiridinio (Cloruro de hexadecilpiridinio, HDPC)

Agente antibacteriano con aplicaciones como conservante y desinfectante. Un estudio realizado recientemente (10) pone de manifiesto el efecto bactericida frente a las especies *Bacillus cereus* y *Bacillus weihenstephanensis* en verduras crudas, especialmente en condiciones de abuso de temperatura en el almacenamiento.

Biguaninas

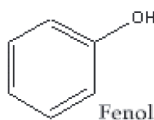
Este tipo de compuestos ejercen sus efectos letales sobre los microorganismos al reaccionar con los grupos cargados negativamente de las membranas biológicas, alterando su permeabilidad (11,12). Son de amplio espectro, si bien carecen de actividad frente a virus, esporas, micobacterias y hongos. Las biguaninas solo funcionan en un rango limitado de pH (11,12), y se inactivan fácilmente en contacto con jabones y detergentes.

Clorhexidina (1,1'-Hexametilenebis[5-(4-clorofenil)biguanida])

La clorhexidina posee un amplio espectro de acción. Se ha utilizado desde hace años como desinfectante en productos farmacéuticos y cosméticos (13). Es activa frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, modifica la permeabilidad de la membrana plasmática provocando la precipitación de las proteínas y ácidos nucleicos (14,15).

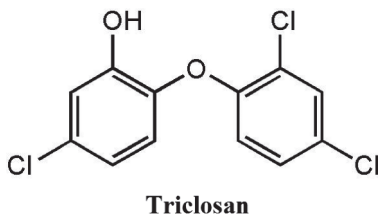
Bis-fenoles

Los fenoles son desinfectantes de amplio espectro que actúan desnaturalizando proteínas e inactivando enzimas de membrana, alterando la permeabilidad. Generalmente se emplean como soluciones jabonosas para aumentar su poder de penetración. Tienen actividad bactericida, tuberculocida, fungicida y virucida frente a virus envueltos (12). Sin embargo, son ineficaces frente a los virus no envueltos y las endosporas bacterianas.

Hexachlorofeno (2,2'-dihidroxi-3,5,6,3',5',6'-hexaclorodifenilmetano)**Hexachlorofeno**

A bajas concentraciones inhibe diversos enzimas de la membrana, y a concentraciones superiores produce la destrucción celular. Es activo principalmente frente a bacterias Gram-positivas y esporas.

Triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hidroxidifenil eter, $C_{12}H_7O_2Cl_3$)



El triclosan es un biocida de amplio espectro utilizado tanto en cuidados médicos como en gran cantidad productos comerciales (16,17). Ataca la membrana plasmática bloqueando la síntesis de lípidos (18). Actúa también sobre la síntesis de ARN, ácidos nucleicos y proteínas.

Agentes oxidantes

La acción biocida de los agentes oxidantes interfiere con la síntesis proteica en las células, provocando la muerte de los microorganismos. En este grupo están el cloro, bromo, yodo, dióxido de cloro, ozono, peróxido de hidrógeno, juntamente con algunas sales halógenas y de peróxido.

Debido a que los agentes oxidantes operan por contacto, su aplicación preferencial es en sistemas limpios, bajo condiciones de tratamiento que aseguren mantenerse limpios para que la acción biocida se mantenga efectiva. La acción de los oxidantes sobre la biopelícula es únicamente en la superficie, manteniendo el interior de esta masa microbiológicamente activa. El uso de oxidantes conjuntamente con tensoactivos incrementa su efectividad sustancialmente a un costo relativamente bajo.

P3-oxonia active

Este preparado comercial contiene peróxido de hidrógeno (25-35%) junto con ácido acético (5-15%) y peracético (2-5%). Ataca los componentes esenciales

de los microorganismos. Debe controlarse bien su uso, almacenaje y manejo, ya que a altos niveles de concentración puede quemar la piel, y existe la posibilidad de explosiones si entra en contacto con ciertos compuestos orgánicos o si se descompone generando calor y suficiente oxígeno.

***Escherichia coli* enteropatógenas**

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa, no esporulada, móvil por flagelos peritricos, anaerobia facultativa y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Se encuentra normalmente en el intestino de humanos y animales de sangre caliente, y su presencia en las aguas es indicativa de contaminación fecal. En individuos sanos forma parte de la flora intestinal ayudando a la absorción de nutrientes además de producir las vitaminas B y K.

Dentro de las cepas patógenas cabe destacar la cepa de *E. coli* O157:H7, cepa capaz de producir una potente toxina que puede ocasionar enfermedades graves como el síndrome urémico hemolítico o la colitis hemorrágica con alta mortalidad (19,20,21). Estas enfermedades pueden ser transmitidas por los alimentos, la mayoría de las infecciones se asocian a los productos cárnicos contaminados poco cocinados, aunque muchos brotes también han sido asociados al consumo de zumo de manzana, leche cruda, agua potable, o vegetales como rábanos, brotes de alfalfa, lechuga y espinacas (22,23,24).

El ganado vacuno sigue siendo el principal portador de *E. coli* O157:H7 (25). También la contaminación de las superficies de trabajo puede ser una causa indirecta de infecciones (26). *E. coli* O157:H7 es capaz de sobrevivir largos períodos en las superficies de los equipos y en las mesas de acero inoxidable de trabajo (27,28,29), debido a su capacidad de formación de biofilms y la alta resistencia en de estos a las condiciones ambientales desfavorables (30).

La fruta y verdura se exponen a diferentes contaminantes naturales (suelo, insectos, animales y / o seres humanos) durante el crecimiento en las cosechas como en las plantas de procesado. Las enfermedades provocadas por el consumo de estos alimentos contaminados se han asociado a bacterias como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes* o *Shigella* entre otros (31,32).

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos utilizados

Para los ensayos de la actividad antimicrobiana con los diferentes biocidas se emplearon nueve cepas de *Escherichia coli* incluyendo *E.coli* 0157:H7 y cepas productoras de beta-lactamasas (Tabla 2), procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y de la Colección de Cultivos Tipo de la Universidad de Göteborg, Suecia (CCUG).

Para el uso rutinario, las diferentes cepas se conservaron a 4°C en agar inclinado, mediante resiembras periódicas. Para su conservación a largo plazo se almacenaron a -20°C y -80°C utilizando como crioconservante glicerol.

Tabla 2
Relación de cepas de *Escherichia coli* utilizadas.

<i>E.coli</i> CECT 4783	<i>E.coli</i> CCUG 58078
<i>E. coli</i> CECT 5947	<i>E.coli</i> CCUG 58537
<i>E.coli</i> CCUG 47553	<i>E.coli</i> CCUG 58544
<i>E.coli</i> CCUG 47557	<i>E.coli</i> CCUG 58567
<i>E.coli</i> CCUG 47566	

Biocidas empleados

Se emplearon biocidas representativos de diferentes grupos químicos (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 este trabajo.

DERIVADOS DE AMONIO CUATERNARIO
<i>Cloruro de benzalconio</i>
<i>Cetrimida</i>
<i>Hexadecilpiridinio</i>
BIGUANINAS
<i>Clorhexidina</i>
BIS-FENOLES
<i>Hexachlorofeno</i>

<i>Triclosan</i>
AGENTES OXIDANTES
<i>P3-oxonia active</i>

Determinación de la concentración mínima inhibitoria: técnica de microtitulación

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación durante 24 h.

Para el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias, los biocidas objeto de estudio se han distribuido en placas de microtitulación a diferente concentración junto con inóculos procedentes de cultivos estacionarios de las diferentes cepas de *E. coli* diluidos 1:100.

En todos los casos se dispuso un pocillo adicional con la cepa a ensayar en medio de cultivo sin biocida alguno, como control positivo de crecimiento. Tras incubar a 37°C durante 24 horas, se determinó la densidad óptica alcanzada mediante lectura de absorbancia a 655 nm con un lector de microplacas, con el fin de determinar la CMI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La resistencia de los microorganismos a los biocidas así como la capacidad de las bacterias patógenas de mantenerse en las superficies de los equipos de procesado de los alimentos, constituyen un problema de salud importante en el ámbito de la industria alimentaria.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la evaluación de la susceptibilidad de los microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, en este caso *Escherichia coli*, frente a varios biocidas que tienen un potencial tecnológico importante para ser usados como desinfectantes y antisépticos.

Los resultados obtenidos para las diferentes cepas *E. coli* mostraron que determinados biocidas tales como cloruro de benzalconio, cetrimida, hexadecilpiridinio y triclosan inhibían a la mayoría de las cepas a una concentración del 0.0025% (Figura 1). Tan solo se observó ligero crecimiento en las cepas *E. coli* CCUG 58544

y *E. coli* CCUG 47566 con cloruro de benzalconio al 0.0025%. Hay que destacar la mayor sensibilidad mostrada por algunas cepas, como *E. coli* CCUG 58567 la cual se inhibió a una concentración del 0.00025% de cetrimida y hexadecilpiridinio, y las cepas *E. coli* CCUG 47553 y *E. coli* CECT 5947 con 0.00025% de triclosan.

En otros casos, por el contrario, se detectaron niveles de resistencia superiores. Por ejemplo, frente a los biocidas hexaclorofeno y clorhexidina, son necesarias concentraciones de 0.025% de biocida para inhibir el crecimiento de las cepas, llegando incluso a observarse crecimiento con alguna de las cepas a concentraciones de 0.25% de clorhexidina (Figura 2).

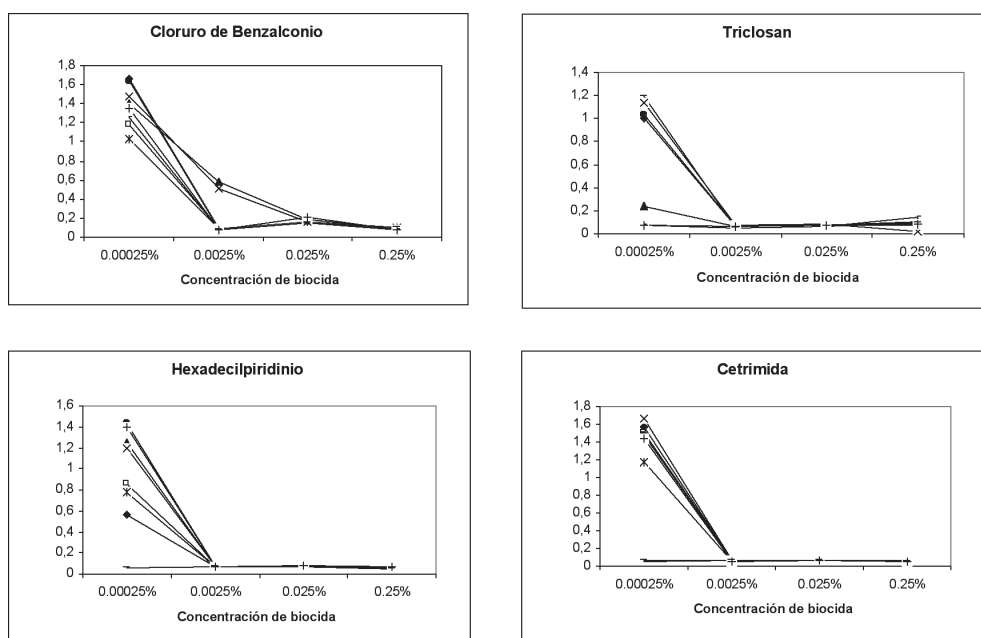


Figura 1

Resistencia a los biocidas Cloruro de benzalconio, Cetrimida, Hexadecilpiridinio y Triclosan de las cepas: (◆) *E. coli* CECT 4783, (□) *E. coli* CECT 5947, (▲) *E. coli* CCUG 58544, (x) *E. coli* CCUG 47556, (*) *E. coli* CCUG 58537, (◆) *E. coli* CCUG 47557, (I) *E. coli* CCUG 58078, (∟) *E. coli* CCUG 47553, (∩) *E. coli* CCUG 58567.

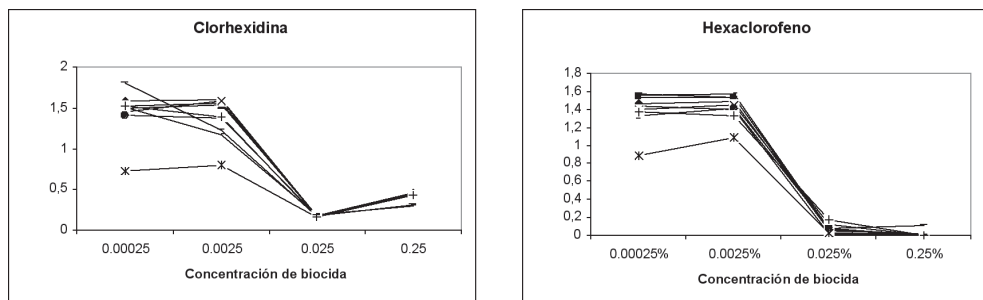


Figura 2.

Resistencia a los biocidas Hexaclorofeno y Clorhexidina de las diferentes cepas: (◆) *E. coli* CECT 4783, (□) *E. coli* CECT 5947, (▲) *E. coli* CCUG 58544, (x) *E. coli* CCUG 47556, (*) *E. coli* CCUG 58537, (♣) *E. coli* CCUG 47557, (I) *E. coli* CCUG 58078, (∟) *E. coli* CCUG 47553, (∪) *E. coli* CCUG 58567.

También se detectó una mayor resistencia frente al preparado biocida comercial P3-oxonia, siendo necesarias concentraciones del 0.25% para inhibir a la mayoría de las cepas (Figura 3).

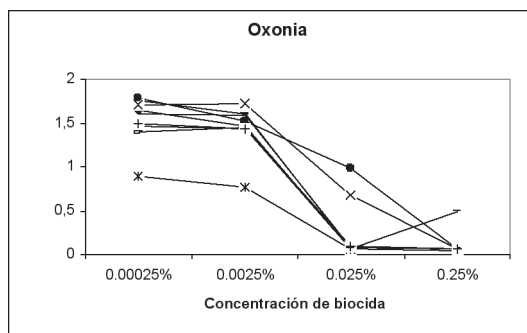


Figura 3.- Resistencia frente a P3-Oxonia de las diferentes cepas: (◆) *E. coli* CECT 4783, (□) *E. coli* CECT 5947, (▲) *E. coli* CCUG 58544, (x) *E. coli* CCUG 47556, (*) *E. coli* CCUG 58537, (♣) *E. coli* CCUG 47557, (I) *E. coli* CCUG 58078, (∟) *E. coli* CCUG 47553, (∪) *E. coli* CCUG 58567.

Como conclusión del presente estudio podemos decir que los biocidas triclosan, hexadecilpiridinio y cetrimida (seguido del cloruro de benzalconio) son los que muestran mayor efecto frente a las células planctónicas de *E. coli*, coincidiendo con resultados obtenidos en estudios anteriores para esta y otras bacterias (10,16,17,18). Todos ellos han sido muy eficaces frente a las diferentes

cepas ensayadas, no encontrándose diferencias significativas ni frente a las cepas productoras de verotoxina ni frente a las portadoras de genes para resistencia a antibióticos beta-lactámicos, que son las que constituyen un mayor problema en la industria alimentaria y en el entorno hospitalario. Por consiguiente, los mencionados biocidas son eficaces frente a la diseminación a través de la cadena alimentaria de las cepas de *E. coli* que constituyen un mayor riesgo para la salud humana. Estos resultados indican también la importancia de elegir el tipo de biocida adecuado para la eliminación de *E. coli* en ambientes alimentarios. No obstante, es necesario realizar estudios adicionales a fin de comprobar la eficacia de estos biocidas frente a las células de *E. coli* acantonadas en biofilms, donde cabría esperar una mayor resistencia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de investigación P08-AGR-4295 (Junta de Andalucía, Proyectos de Excelencia) y por el Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén.

BIBLIOGRAFÍA

1. Real decreto 1054/2002, de 11 de octubre, que regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas. (BOE número 247/2002, de 15 octubre 2002).
2. Hidalgo Moya, J. 2005. Biocidas y sector alimentario. *Consumer Eroski*. <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/normativa-legal/2005/05/02/17923.php>
3. Russell, AD. 2004. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J. Hosp. Infect.* 57:97-104.
4. Russell, AD. 2003. Biocide usage and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet. Infect. Dis.* 3:794- 803.
5. Chapman, JS. 2003. Biocide resistance mechanisms. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 51:133-138.
6. Maillard, JY. 2007. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *J. Hosp. Infect.* 65:60-72.
7. Inoue, A., KA. Horikoshi. 1989. *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* 338:264-266.
8. Farrell, AP., CJ. Kennedy, A. Wood, BD. Johnston, WR. Bennett. 1998. Acute toxicity of a didecyl-dimethylammonium chloride-based wood preservative, Bardac 2280, to aquatic species. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:1552-1557.
9. Subík, J., G. Takacsova, M. Psenak, F. Devinsky. 1997. Antimicrobial activity of amine oxides: mode of action and structure-activity correlation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12:139-164.
10. Cobo Molinos, A., H. Abriouel, R. Lucas López, N. Ben Omar, E. Valdivia, A. Galvez. 2008. Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of

- washing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. *Food Microbiol.* 25:762-770.
11. Quinn, PJ., BK. Markey. 2001. Disinfection and disease prevention in veterinary medicine. In: Block SS, editor. Disinfection, sterilization and preservation. 5th edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 1069-1103.
 12. Jeffrey, DJ. 1995. Chemicals used as disinfectants: Active ingredients and enhancing additives. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 14:57-74.
 13. Hugo, WB., AD. Russell. 1982. Types of antimicrobial agents. In (Eds.) Russell, AD., Hugo, WB., Ayliffe, GAJ. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation. Oxford: Blackwell, pp. 8-106.
 14. Harold, FM., JR. Baarda, A. Abrams. 1969. Dio 9 and chlorhexidine: inhibitors of membrane bound ATPase and of cation transport in *Streptococcus faecalis*. *Biochim. Biophys.* 183:129-136.
 15. Chawner, JA. P. Gilbert. 1989b. Interaction of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine with phospholipid vesicles: evidence for separate modes of action. *J. Appl. Bacteriol.* 66:253-258.
 16. Kopecka-Leitmanova, A., F. Devinsky, D. Mlynarcik, I. Lacko. 1987. Interaction of ADMAOs and quaternary ammonium salts with membrane and membrane-associated processes in *E. coli* cells: mode of action. *Drug. Metabol. Drug Interact.* 7:29-51.
 17. Schweizer, HP. 2001. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 202:1-7.
 18. McMurry, LM., M. Oethinger, SB. Levy. 1998. Overexpression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 166:305-309.
 19. Nataro, JP., JB, Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinic. Microbiol. Rev.* 11:142-201.
 20. Jay, JM., MJ. Loessner, DA. Golden. 2005. Modern Food Microbiology. 7th edition. New York: Springer.
 21. Tarr, PI. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.* 20:1-10.
 22. Vernozy-Rozand, C., S. Roze. 2003. Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC). French Food Safety Agency, Maisons-Alfort (France). pp-220.
 23. Jay, M.T., M. Cooley, D. Carychao, GW. Wiscomb, RA. Sweitzer, L. Crawford- Miksza, JA. Farrar, DK. Lau, J. O'Connell, A. Millington, RV. Asmundson, ER. Atwill, RE. Mandrell. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg. Inf. Dis.* 13:1908-1911.
 24. Lopez-Velasco, G., D. Marjorie, RB. Renee, RC. Williams, MA. Ponder. 2010. Alterations of the phylloepiphytic bacterial community associated with interactions of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of packaged spinach at refrigeration temperatures. *Food Microbiol.* 27:476-486.
 25. Wang, G., T. Zhao, M. Doyle. 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2567-2570.
 26. Arthur, TM., JM. Bosilevac, DM. Brichta-Harhay, N. Kalchayanand, DA. King, SD. Shackelford, TL. Wheeler, M. Koohmaraie. 2008. Source tracking of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* contamination in the lairage environment at commercial U.S. beef processing plants and identification of an effective intervention. *J. Food Prot.* 71:1752-1760.
 27. Maule, A. 2000. Survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. *Symposium Series: Soc. Appl. Microbiol.* 71S-78S.
 28. Wilks, S.A., H. Michels, CW. Keevil. 2005. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *Int. J. Food Microbiol.* 105:445-454.
 29. Rivera-Betancourt, M., SD. Shackelford, TM. Arthur, KE. Westmoreland, G. Bellinger, M. Rossman, JO. Reagan, M. Koohmaraie. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocy-*

- togenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *J. Food Prot.* 67:295-302.
30. Whitehead, KA., P. Benson, LA. Smith, J. Verran. 2009. The use of physicochemical methods to detect organic food soils on stainless steel surfaces. *Biofouling* 25:749-756.
 31. Beuchat, LR. 1996. Pathogenic microorganism associated with fresh produce. *J. Food Prot.* 59:204-216.
 32. FDA. 2001. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. <http://www.cfsan.fda.gov/wcomm/ift3-toc.html>.