XXIII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

Editores:

Alfredo Palop Gómez, Pablo S. Fernández Escámez, Arturo Esnoz Nicuesa y Silvia Guillén Morer

Cartagena 9 al 12 de septiembre de 2024

Universidad Politécnica de Cartagena

Microbiología de los Alimentos
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA

ediciones UPCT

XXIII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

Cartagena 2024

COMITÉ DE HONOR

Excmo. Sr. Presidente de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia
Sr. Rector Magnífico de la Universidad Politécnica de Cartagena
Ilma. Sra. Alcaldesa del Excmo. Ayuntamiento de Cartagena
Ilma. Sra. Delegada del Gobierno en la Región de Murcia
Sr.Director de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
Sr. Presidente de la Sociedad Española de Microbiología
Sr. Presidente del Grupo de Microbiología de Alimentos de la SEM

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente: Pablo Salvador Fernández Escámez
Vicepresidente: Alfredo Palop Gómez
Secretaria: Silvia Guillén Morer
Tesorera: Enriqueta García Gutiérrez
Vocales:
Paula M. Periago Bayonas
Alberto Garre Pérez
Arantxa Aznar Samper
Asunción Iguaz Gaínza
Mariem Somrani
Arturo Esnoz Nicuesa
Ginés Benito Martínez Hernández
Antonio Luciano
Jorge Baixaulí Pérez-Crespo
Lorena Martínez Zamora
Diego Hernández Prieto

COMITÉ CIENTÍFICO

Alfredo Palop Gómez. Universidad Politécnica de Cartagena
Pablo S. Fernández Escámez. Universidad Politécnica de Cartagena
Alberto Garre Pérez. Universidad Politécnica de Cartagena
Paula M. Periago Bayonas. Universidad Politécnica de Cartagena
Enriqueta García Gutiérrez. Universidad Politécnica de Cartagena
Mariem Somrani. Universidad Politécnica de Cartagena
Silvia Guillén Morer. Universidad de Zaragoza
Ana Allende Prieto. CEBAS-CSIC, Murcia
Pilar Truchado Gambao. CEBAS-CSIC, Murcia
Antonio Valero Garrido, Universidad de Córdoba
Gonzalo Doroteo García de Fernando Minguillón. Universidad Complutense de Madrid
Rosa María Capita González. Universidad de León
Rosa del Campo Moreno. Hospital Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria
José Manuel Guillamón Navarro. IATA-CSIC Valencia
M. Dolores Rodrigo Aliaga. IATA-CSIC Valencia
Susana Langa Marcano. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
M. Magdalena Martínez Cañamero. Universidad de Jaén
Albert Bordons de Porrata-Doria. Universitat Rovira i Virgili
Beatriz Martínez Fernández. IPLA-CSIC Asturias
Ignacio Álvarez Lanzarote. Universidad de Zaragoza
M. Consuelo Pina Pérez. Universidad de Valencia

ediciones
UPCT

© 2024, editores: Pablo. S. Fernández Escámez; Alfredo Palop Gómez,
Arturo Esnoz Nicuesa y Silvia Guillén Morer

© 2024, Imagen: Sus autores

© 2024, Universidad Politécnica de Cartagena
Ediciones UPCT
Plaza del Hospital, 1
30202, Cartagena
ediciones@upct.es

Primera edición, 2024
ISBN: 978-84-17853-94-5

Esta obra está bajo una licencia de Reconocimiento-No comercialSinObraDerivada (by-ne-nd): no se permite el uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas. http://es.creativecommons.org/blog/wp-content/uploads/2013/04/ by-nc-nd.eu_petit.png

XXIII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

Región de Murcia

f SéNeCa(+)
Agencia de Ciencia y Tecnología
Región de Murcia

Microbiología de los Alimentos
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA

Federation of European Microbiological Societies

Universidad Politécnica de Cartagena

PROQUILAB
PRODUCTOS QUÍMICOS DE LABORATORIO

microonics®
Small things that matter.

Índice

PONENCIAS

THE 12 PLEASURES OF SCIENCE 9

LA COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO DEL INIA Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS 14

BIOFILMS EN SUPERFICIES EN CONTACTO CON ALIMENTOS: LECCIONES APRENDIDAS Y ESTRATEGIAS FUTURAS PARA SU CONTROL 19

ESTRATEGIAS DIGITALES PARA LA MEJORA DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE PRODUCTOS DEL MEDITERRÁNEO 20

EL RESISTOMA DE LOS ALIMENTOS Y AMBIENTES ASOCIADOS 25

EL PAPEL DE LOS PROBIÓTICOS Y POSTBIÓTICOS EN LA MODULACIÓN DE LOS TRASTORNOS ALIMENTARIOS 29

¿ENEMIGOS O AMIGOS? LOS FAGOS COMO ALIADOS EN LA MEJORA DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA 32

MICROBIOMAS Y SOSTENIBILIDAD DE LA CADENA ALIMENTARIA: OPORTUNIDADES BASADAS EN MICROBIOMAS PARA VALORIZAR SUBPRODUCTOS AGROALIMENTARIOS 36

NEXT-GENERATION FOOD MICROBIOME RESEARCH: USE OF METAGENOMIC APPROACHES FOR CHARACTERIZING MICROBIAL COMMUNITIES IN FOODS (ESPECIALLY FERMENTED FOODS) AND ALONG THE FOOD CHAIN 39

DIVERSIDAD DE ESTRATEGIAS COMPETITIVAS EN LEVADURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DURANTE LA FERMENTACIÓN 40

KOMBUCHA: AN EXAMPLE OF SYMBIOTIC MICROBIAL CULTURE WITH MANY POTENTIAL 45

PREMIOS

ESTUDIO DE LAS RELACIONES ENTRE RESISTENCIA AL ESTRÉS, CAPACIDAD DE CRECIMIENTO Y VIRULENCIA EN EL GÉNERO *SALMONELLA* 50

CARACTERIZACIÓN Y CONTROL DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS Y DE LOS BIOFILMS EN BACTERIAS PATÓGENAS DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: HACIA EL ENFOQUE UNA SALUD 54

ORALES

EVOLUCIÓN DEL MICROBIOMA Y RESISTOMA DEL LOMO Y SOLOMILLO DE CERDO A LO LARGO DE SU CADENA DE PRODUCCIÓN Y DE SU VIDA ÚTIL 59

BACTERIÓFAGOS PARA EL CONTROL DE AISLADOS DEL *ENTEROBACTER CLOACAE COMPLEX* EN VEGETALES FRESCOS 63

UNDERSTANDING THE MICROBIOME AND RESISTOME DYNAMICS IN A POULTRY BURGER PROCESSING LINE 69

IN-DEPTH ANALYSIS OF THE AUSTRIAN CHEESE MICROBIOME REVEALS HIGH TAXONOMIC AND FUNCTIONAL INTERACTIONS WITH THE PRODUCTION FACILITY ENVIRONMENT..... 72

COMPONENTES DE LA MATRIZ DE *BIOFILMS* FORMADOS POR MICROORGANISMOS AISLADOS DE SUPERFICIES DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA COMO POTENCIALES FACTORES DE PERSISTENCIA EN LAS SUPERFICIES..... 77

DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN NUEVO MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO PARA *SALMONELLA* 82

PÉRDIDA DE EFICACIA DEL ÁCIDO LÁCTICO FRENTE A VARIANTES RESISTENTES A CIPROFLOXACINA DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM..... 85

IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA ADQUIRIDA DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM FRENTE A SULFITO SÓDICO..... 89

DEVELOPMENT OF USER-FRIENDLY BIOINFORMATIC TOOLS FOR THE ANALYSIS OF SHOTGUN SEQUENCING DATA AND THE INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE..... 93

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS “USER-FRIENDLY” PARA EL ANÁLISIS DE DATOS DE SECUENCIACIÓN MASIVA DE ADN Y LA INVESTIGACIÓN DE RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS 93

IMPACTO DE LOS TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN EN EL RESISTOMA DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA REGIÓN DE MURCIA Y SU CAPACIDAD DE TRANSMISIÓN A LOS ALIMENTOS MEDIANTE LAS AGUAS DE RIEGO..... 96

ANÁLOGOS CÁRNICOS: TENDENCIAS EN FORMULACIÓN ANTIMICROBIANA Y SU IMPACTO EN LA SEGURIDAD ALIMENTARIA 100

EFECTO DE FILMS ACTIVOS DE GELATINA Y QUITOSANO CON EXTRACTO DE SALVADO DE ARROZ EN LA CONSERVACIÓN DE CARNE FRESCA DE CERDO 103

INFLUENCIA DEL ÁCIDO OXÁLICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A DE ASPERGILLUS NIGER EN UN SISTEMA MODELO DE HIGO..... 107

ANÁLISIS DE CLONES Y PLÁSMIDOS DE *ESCHERICHIA COLI* PORTADORES DE BLA_{SHV-12} Y $BLA_{CTX-M-14}$ PROCEDENTES DE ANIMALES DE PRODUCCIÓN 112

RED DE INOCUIDAD ALIMENTARIA PARA EL DESARROLLO, ARMONIZACIÓN Y ADOPCIÓN DE METODOLOGÍAS BASADAS EN “ONE HEALTH” ENFOCADAS A LA EVALUACIÓN DE NUEVOS RIESGOS MICROBIOLÓGICOS (ONEHEALTH4FOOD) 115

PERFIL METATAXONÓMICO EN LA FERMENTACIÓN DE TRONCO DE BRÓCOLI COMO NUEVO ALIMENTO FUNCIONAL..... 118

DISEÑO DE UN CONSORCIO DE MICROORGANISMOS PARA LA FERMENTACIÓN DE VINOS BASE PARA CAVAS DE ALTA GAMA 122

MICROBIAL BIODIVERSITY OF TRADITIONAL FERMENTED PRODUCTS FROM THE LAZIO REGION IN ITALY 126

INCIDENCIA Y ALTERACIÓN DE *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS* EN ZUMOS DE FRUTAS 130

CONTROL DE *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS* EN ZUMO DE NARANJA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UV-C Y HPP COMBINADO CON TEMPERATURA Y ANTIMICROBIANOS..... 134

AGUA ACTIVADA POR PLASMA COMO ALTERNATIVA INNOVADORA EN LA ELIMINACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* 139

NANOPORE ADAPTIVE SAMPLING PARA LA DETECCIÓN MEJORADA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*: UN ENFOQUE CUASIMETAGENÓMICO 142

LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DEL MEDIO DE TRATAMIENTO, UN PARÁMETRO CRÍTICO PARA LA SUPERVIVENCIA DE *ANISAKIS* A LOS PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE 147

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE *S. CEREVISIAE* ASISTIDA POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEF): EFECTO DE LA INTENSIDAD DE TRATAMIENTO 150

PLASMA FRÍO EN COMBINACIÓN CON UNA NANOEMULSIÓN DE D-LIMONENO COMO HERRAMIENTAS PARA EL CONTROL DE *BACILLUS CEREUS* 154

ACTIVACIÓN POR PLASMA FRÍO DE AGUA DE MAR PARA EL CONTROL DE NOROVIRUS HUMANOS Y PATÓGENOS BACTERIANOS DURANTE LA PURIFICACIÓN DE MOLUSCOS BIVALVOS 160

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM SL1344 CON MAYOR RESISTENCIA A DIFERENTES AGENTES ESTRESANTES Y TECNOLOGÍAS DE PROCESADO DE ALIMENTOS 165

IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN CRUZADA DE BIOFILMS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE A JAMÓN COCIDO Y DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO* 168

VIGILANCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO RECOLECTADOS EN MERCADOS DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO - ECUADOR 171

EVALUACIÓN DEL RIESGO DE CONTAMINACIÓN POR *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN SISTEMAS DE AGRICULTURA CONTROLADA 176

EVALUACIÓN DE LAS MEDIDAS DE CONTROL IMPLEMENTADAS PARA LA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN PLANTAS DE PROCESADO DE PRODUCTOS VEGETALES FRESCOS CONTRA *LISTERIA MONOCYTOGENES* 180

AUMENTO DE RESISTENCIA DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM A AMINAS TERCIARIAS TRAS EXPOSICIÓN PROLONGADA 185

LA COMBINACIÓN DE ACEITES ESENCIALES NANOEMULSIONADOS Y CALOR REDUCE NOTABLEMENTE LA RESISTENCIA TÉRMICA DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN LECHE DE SOJA 190

¡LECHE CONTAMINADA! VALIDACIÓN DE UN MÉTODO INNOVADOR PARA DETECTAR Y EVALUAR EL POTENCIAL INFECCIOSO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A EN LECHE DE VACA 194

IMPACTO DEL TIPO DE PRODUCTO DE PANIFICACIÓN EN LA MICROBIOTA INTESTINAL 198

FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA DE SUEROS PROCEDENTES DE QUESERÍAS ASTURIANAS PARA LA BÚSQUEDA DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA 204

ESTUDIO DE INACTIVACIÓN DE NOROVIRUS HUMANO EN PURÉ DE FRESAS MEDIANTE ENTEROIDES INTESTINALES HUMANOS Y MODELIZACIÓN PREDICTIVA 207

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE ORIGEN VEGETAL Y UTILIZACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE HARINAS FERMENTADAS PREBIÓTICAS 212

PÓSTER

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y FISICOQUÍMICA DEL AGUA DE LAVADO UTILIZADA EN EL PROCESADO INDUSTRIAL DE VEGETALES FRESCOS CORTADOS 217

SENSIBILIDAD UNIFORME A ANTIBIÓTICOS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* 221

DETERMINACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PROLONGADA A DOSIS SUBINHIBITORIAS DE TERPENOS VEGETALES SOBRE LA RESISTENCIA A LA ENROFLOXACINA EN *SALMONELLA ENTERICA* 224

QUESOS MADURADOS COMO POTENCIALES PORTADORES DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS 229

STAPHYLOCOCCUS SPP. EN UNA INDUSTRIA DE EMBUTIDOS: DIVERSIDAD DE ESPECIES Y SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA 234

MUTANTES DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM INDUCIDOS POR EXPOSICIÓN A KANAMICINA MUESTRAN RESISTENCIA CRUZADA AL CARVACROL 238

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CARVACROL Y TIMOL INMOVILIZADOS EN PARTÍCULAS DE SÍLICE FRENTE A CRONOBACTER SAKAZAKII EN FÓRMULAS INFANTILES 243

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SUBPRODUCTOS VEGETALES SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 247

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS NATURALES EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y GRAM-NEGATIVAS DE ORIGEN ALIMENTARIO 194

DESARROLLO DE SUPERFICIES FUNCIONALIZADAS CON ANTIMICROBIANOS NATURALES PARA EVITAR LA ADHERENCIA DE BACTERIAS PRESENTES EN REDES DE CONDUCCIÓN DE AGUAS DE USO PÚBLICO 197

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *POLIOMINTHA LONGIFLORA* GRAY FRACCIONADO FRENTE A *LISTERIA MONOCYTOGENES* A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE MODELOS PREDICTIVOS 201

OPTIMIZATION OF MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN OREGANO AND LOVAGE ETHANOLIC EXTRACTS 206

EFFECTS OF PULSED ELECTRIC FIELDS ON THE DEVELOPMENT OF A NEW FERMENTED WHEAT-BASED BEVERAGE 210

COMPOSICIÓN BACTERIANA DE FERMENTACIONES DE SUBPRODUCTOS PARA ECONOMÍA CIRCULAR 214

EVALUATION OF THE CHEMICAL AND ORGANOLEPTIC PROFILES OF WINES INOCULATED WITH DIFFERENT *PIED DE CUVE* 216

EFFECT OF LOW-PRESSURE COLD PLASMA ON *B. CEREUS* SPORES AND VEGETATIVE CELLS INACTIVATION USING DIFFERENT MATRICES. 220

DOSIS SUB-LETALES DE PLASMA FRÍO COMO ESTRATEGIA EN LA REDUCCIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE LISTERIA MONOCYTOGENES 223

INACTIVACIÓN DE OOQUISTES DE *TOXOPLASMA GONDII* MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE: ESTUDIO EXPLORATORIO 227

EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS POR ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA (APH) EN LA CARGA MICROBIANA DE ALIMENTOS PASTEURIZADOS *SOUS-VIDE* CON REDUCIDO TRATAMIENTO TÉRMICO 230

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE UN EXTRACTO DE BONIATO NARANJA OBTENIDO POR PULSOS ELÉCTRICOS 234

INVESTIGACIÓN EN TÉCNICAS RÁPIDAS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS FRESCOS (SAFEFOOD) 238

USO DE COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES INMOVILIZADOS EN PARTÍCULAS DE SÍLICE COMO MÉTODO DE PASTEURIZACIÓN FRÍA DE ZUMO DE MANZANA 241

PERCEPCIÓN DEL CONSUMIDOR SOBRE EL USO DE NANOTECNOLOGÍA PARA ALARGAR LA VIDA ÚTIL DE LOS ALIMENTOS 245

TRATAMIENTO NO TÉRMICO DE ALIMENTOS LÍQUIDOS BASADO EN EL USO DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS NATURALES INMOVILIZADOS SOBRE SOPORTES APTOS PARA CONSUMO ALIMENTARIO 248

DESCONTAMINACIÓN DE TOMATES CHERRY INOCULADOS CON *ESCHERICHIA COLI* MEDIANTE LA ADICIÓN DE UNA NANOEMULSIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ROMERO AL AGUA DE LAVADO 252

PAPEL DE SIGB EN LA ACLIMATACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* A TRATAMIENTOS TÉRMICOS DINÁMICOS 255

RESISTENCIA AL CALOR DE LARVAS L3 DE *ANISAKIS* 259

ESTIMACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE LARVAS L3 DE *ANISAKIS* A COCINADOS *SOUS-VIDE* .. 262

ANÁLISIS GENÓMICO DE CEPAS BACTERIANAS DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA 265

LA ESPORULACIÓN EN CONDICIONES DE ALTA SALINIDAD ACELERA EL ENTRECRUZAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DEL "COAT" EN *BACILLUS SUBTILIS* INCREMENTANDO LA RESISTENCIA FRENTE AL H_2O_2 Y AL CALOR HÚMEDO. 269

DISEÑO DE UNA SOLUCIÓN DE LAVADO A BASE DE D-LIMONENO NANOEMULSIONADO PARA TOMATES CHERRY COMO SUSTITUTO DE LOS DESINFECTANTES A BASE DE CLORO 273

TODO TIENE UN PRECIO – "SPANC BALANCE" EN LA APTITUD PARA EL CRECIMIENTO EN ALIMENTOS DE UNA VARIANTE DE *ESCHERICHIA COLI* ADAPTADA AL TIMOL 278

DETECCIÓN DEL AGENTE CAUSANTE DE LA "MANCHA" EN CEREZA (BOTRYTIS SP.) MEDIANTE PCR 281

LA ADICIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN EN FORMA DE NANOEMULSIÓN REDUCE DE MANERA ESPECTACULAR LA RESISTENCIA TÉRMICA DE DOS CEPAS DE *SALMONELLA* 284

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE SUBPRODUCTOS DE FRUTAS Y ACEITES ESENCIALES FRENTE A *PENICILLIUM DIGITATUM* 288

CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA TRANSFERENCIA DE BIOFILMS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* A ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO MEDIANTE RISK RANGER 2.0 . 291

INTERACCIÓN DE *SALMONELLA* CON LA MICROBIOTA INTESTINAL: INFLUENCIA EN LA CAPACIDAD DE INVASIÓN 295

SUERO QUESERO FERMENTADO POR BACTERIAS LÁCTICAS COMO INHIBIDOR DE *PSEUDOMONAS* SPP. ALTERANTES DE PRODUCTOS LÁCTEOS 298

BEBIDA DE SOJA ENRIQUECIDA EN LINO MEJORA LOS EFECTOS METABÓLICOS DE UNA DIETA ALTA EN GRASA EN UN MODELO DE RATÓN 302

BIODIVERSIDAD MICROBIANA INTESTINAL EN UN MODELO MURINO DE ICTUS SUPLEMENTADO CON HIDROXITIROSOL 306

DESARROLLO DE UN ZUMO DE PIÑA Y UVA ENRIQUECIDO EN COMPUESTOS BIOACTIVOS REVALORIZADOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA 309

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO CON *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* EN MEDIO DE CULTIVO LÁCTEO 312

ELIMINACIÓN DE ESPOROS EN LECHE COMERCIAL EN POLVO PARA PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS INACTIVADOS 317

PONENCIAS

THE 12 PLEASURES OF SCIENCE

Zwietering, M.H.

Wageningen University & Research, Wageningen, The Netherlands.
marcel.zwietering@wur.nl

Resumen / Abstract

Being a professor makes you work on three dimensions, for science, students and society. To work for these three is a pleasure. But apart from these three aspects there are also other wonderful aspects to work in science, going from amazement to altruism. These aspects can be individual pleasures (like doing a discovery, getting insight, working competently, playing) or pleasures in sharing with others (explaining, giving direction, work in a community). Working in science is more than 3-dimensional, it can even be seen as 12-dimensional.

Palabras clave / Key words

Science, society, education, serendipity, cooperation, pleasure, dedication

In a lecture by professor de Valk in 1996 (de Valk, 1996) he described 12 pleasures of science, showing the multidimensional enjoyable aspects that scientists do encounter in their work. In this paper I describe these 12 pleasures as proposed by de Valk and give great examples of great scientists on the one hand and some minor examples of our own work, as illustrations.

The source of all knowledge is "*wonder*". For example, Alexander Fleming wondered why around moulds, bacteria did not grow. This observation resulted in the invention of penicillin. This result can be seen as a serendipity resulting from his amazement. In my MSc thesis I had control experiments with no carbon and nitrogen source. But for some experiments at higher pH, I could not use phosphate buffer and I used a TRIS-buffer. These solutions did show large growth of *Pseudomonas*, that largely surprised me. But if you consider the chemical structure of TRIS (tris-hydroxymethyl-aminomethane), this is quite logical since it contains carbon and nitrogen and has almost the structure of an amino acid.

A second aspect is "*discovery*" often resulting from this wondering. When Archimedes did invent the law of hydrostatics he shouted Heureca while walking outside naked. And imagine Antoni van Leeuwenhoek discovering microorganisms under his microscope, this would have given him immense feelings. In our work we had during a long time the issue that biphasic inactivation kinetics were well described with a biphasic curve. But the fraction resistant cells was almost never found statistically

significant, although the data clearly showed this biphasic behaviour (den Besten et al. 2006).

$$\log(C) = \log C(0) + \log\left((1-f)\cdot 10^{-t/t_{sens}} + f\cdot 10^{-t/t_{res}}\right)$$

Since this fraction *f* of resistant cells is a very small value, and can easily change orders of magnitude, it is better to fit this parameter log transformed, so that it gets better statistical properties. And indeed when, instead of fitting *f*, the parameter log(*f*) was estimated, then the factor log(*f*) was significant.

$$\log\ (C) = \log C(0) + \log\left((1-10^{\log f})\cdot 10^{-t/t_{sens}} + 10^{\log f}\cdot 10^{-t/t_{res}}\right)$$

Mathematically $10^{\log(f)}$ is equal to *f*, but the parameter log(*f*) has other statistical characteristics than the parameter *f*.

The third aspect is "*insight*", we want to better understand the coherence in the reality and create order in phenomena. For example, Darwin has created insight in biological phenomena and helped to get order in the structure of all species on earth. We characterised and sequenced the before mentioned resistant variants, responsible for the non-linear inactivation after HHP, acid or heat treatment. We then found that the variants showed mutations in their ribosomal proteins and they were more resistant to multiple stresses. But they also had a lower growth rate (Koomen et al. 2021). Further experimental evolution experiments showed that these variants could also revert back to their wild type phenotype. These phenomena show a sort of biological switch that can set populations in the fast growth state, or switch to a robust phenotype and back.

"Competently performing" one's profession can also be a satisfactory activity. Another basis of science are good sets of data. We have collected large datasets to determine growth kinetics (Zwietering et al. 1994) and inactivation kinetics (Aryani et al., 2015), but also quantifying their variation, requiring large datasets. These data are very relevant to investigate and predict the variation in outcomes of growth and inactivation kinetics. Also to investigate heterogeneity of contamination of pathogens in a food product, required a huge amount of data (Jongenburger et al., 2011). But this gave insight in the level of heterogeneity of contaminated dry powders and could help to evaluate the effectiveness of various sampling plans.

Also, the pleasure of "*playing*" gives satisfaction, but can also result in relevant outcomes. To determine the integral effect of the heat treatment over a large variation of strains having variable thermal resistance (as determined by Aryani et al., 2015) can be solved by numerical integration. But the same question can also be solved by Monte Carlo simulations. Both gave the same outcome giving confirmation of both approaches. But these also gave different insights, one with a more kinetic approach and the other with a more stochastic approach (Zwietering et al. 2021). Both numeric integration and Monte-Carlo simulations and investigating their outcomes, can be for some people a nightmare, but for others

this really is playing like gaming or puzzling.

The former aspects are either performed alone or in groups, but are merely individualistic pleasures. However, many aspects also require exchanges with others. For example, it is a pleasure to *"explain insights"* to others. One level higher, *"showing people the right direction"*, is also rewarding. Also working in a team with BSc-, MSc-, PhD-students, post-docs, assistant-, associate- and full professors is a great symbiosis. We all need each other to be effective. The students need their tutors, but the professors need their students. Such community also creates the right atmosphere of creativity. We work in a "*community"*. Also working together in international cooperations gives great impulses and progress and creativity.

It is good to be satisfied with results, progress and insights. However, it is also great to "*admire"* great scientists and their work. Although we are not able to compete with these giants, we can have pleasure in respecting their work. Louis Pasteur has had great impact with the invention of pasteurisation, both for food quality, spoilage and food safety, but at the same time also answered the existentialistic question that live can only be formed from other life. Giving society great progress, but also answering basic questions in this manner is to strive for, but it is admirable to see what Pasteur did achieve in his live. I also admire how well professor de Valk could write his essay on the 12 pleasures. I will never be able to write so beautiful, but it gives me pleasure to admire this.

Apart from admiring, also being *"altruistic"* is a pleasant feeling. The best example is that the master enjoys it when a pupil is surpassing him. Furthermore, working on aspects that are *"timeless"*, and working with young people is satisfying and motivating.

Finally, it is the reSEARCH towards the "*truth"* that we strive for. The truth we will never reach, and the path towards is goes slow, and is sometimes inefficient. It is not development, it is science. While working on all these nice aspects, we help our society develop, we educate our students, to even exponentially develop our society, and we increase our understanding of all the beauty in our world.

AGRADECIMIENTOS

This article is based on a timeless article, from professor de Valk (1927-2012), that I admire since it is competently and altruistically written in wonderful language. It was amusing to read and explains insights and shows the right direction. That made me discover the insight that working in science is not a 3-dimensional pleasure but even 12-dimensional. I think this is really the truth. This all makes me very happy to form part of the scientific community.

REFERENCIAS

[1] DC Aryani, HMW den Besten, WC Hazeleger, MH Zwietering. Int. J. Food Microbiol. **2015**, 193, 130-138. 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.021

[2] HMW den Besten, M Mataragas, R Moezelaar, T Abee, MH Zwietering, Appl. Environ. Microbiol. **2006**, 72, 5884-5894. 10.1128/AEM.00780-06

[3] I. Jongenburger, M.W. Reij, E.P.J. Boer , L.G.M. Gorris, M.H. Zwietering. Int. J. Food Microbiol. **2011**, 151, 1581-1590. 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.003

[4] J Koomen, L Huijboom, X Ma, MH Tempelaars, S Boeren, MH Zwietering, HMW den Besten, T Abee. Int. J. Food Microbiol. **2021**, 351, 109269. 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109269

[5] KI Metselaar, HMW den Besten, T Abee, R Moezelaar, MH Zwietering MH. Int. J. Food Microbiol. **2013**, 166, 508–514. 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.011

[6] J.M.M. de Valk, De twaalf vreugden van de wetenschap. In: Socialisme en Democratie, 1996, 53 (2), 67-73. (in Dutch). https://dnpprepo.ub.rug.nl/10046/67/PvdA%20Socialisme%20en%20Democratie%20jrg-53%201996.pdf

[7] M.H. Zwietering, H.G.A.M. Cuppers, J.C. de Wit, K. van 't Riet. Appl. Environ. Microbiol. **1994**, 60, 195-203. 10.1128/AEM.60.1.195-203.1994

[8] MH Zwietering, A Garre, HMW den Besten. Food Res. Int. **2021**, 139, 109973. 10.1016/j.foodres.2020.109973

LA COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO DEL INIA Y SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS

Antonia Picón y Eva Rodríguez-Mínguez

Grupo de Tecnología de Productos Lácteos, Dpto. de Tecnología de Alimentos, INIA (CSIC), Carretera de La Coruña Km 7, 28040 Madrid

apicon@inia.csic.es

Resumen

El Departamento de Tecnología de Alimentos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA (CSIC)) cuenta con una colección de bacterias lácticas y bifidobacterias con propiedades probióticas y tecnológicas, aisladas a partir de heces de lactantes y leche materna. Algunas de estas cepas se han utilizado para elaborar productos lácteos y bebidas vegetales funcionales. En quesos, algunas de ellas, han mantenidos niveles de viabilidad lo suficientemente elevados (6-7 log UFC / g) para su potencial uso como probióticos, sin modificar sustancialmente las características fisicoquímicas y sensoriales del queso. Algunas son capaces de transformar los polifenoles complejos presentes en la dieta en sus correspondientes agliconas, aumentando así su biodisponibilidad, y sus efectos beneficiosos para la salud. La presencia de polifenoles complejos y de estas cepas en el mismo alimento, permite que todos los consumidores puedan beneficiarse de los efectos positivos para la salud tanto de los polifenoles como de estas cepas con propiedades funcionales.

The Department of Food Technology of the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA (CSIC)) possesses a collection of lactic acid bacteria and bifidobacteria with probiotic and technological properties, isolated from baby faeces and human breast milk. Some of these strains were used for the elaboration of functional dairy products and plant beverages. In cheese, some of them maintained high viability levels (6-7 log CFU / g) to sustain their potential use as probiotics, without substantially modifying cheese physicochemical and sensory characteristics. Some of them are able to transform complex diet polyphenol compounds in their corresponding aglycones, increasing their bioavailability and health beneficial effects. The presence of complex polyphenol compounds and these strains in the same food product ensures that all consumers would fully benefit from both polyphenol and microbial health-promoting properties.

Palabras clave / Key words

Bacterias lácticas, bifidobacterias, propiedades probióticas, propiedades tecnológicas, alimentos
Lactic acid bacteria, bifidobacteria, probiotic properties, technological properties, food products

El Departamento de Tecnología de Alimentos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA (CSIC)) posee una colección de microrganismos que contiene bacterias con potencial tecnológico y funcional, bacterias alterantes y patógenas de origen alimentario, bacterias modificadas genéticamente, y fagos inhibidores de bacterias alterantes de productos lácteos. Esta colección es el resultado de los numerosos proyectos de investigación que se han desarrollado en el Departamento, para mejorar la seguridad y calidad sensorial, nutricional y funcional de productos lácteos, cárnicos y vegetales.

A finales del 2001, la Dra. Rodríguez-Mínguez inició una nueva línea de investigación para aislar y caracterizar microorganismos con potencial probiótico, a partir de heces de lactantes, que dio lugar a la colección de bacterias lácticas y bifidobacterias con propiedades probióticas, y la Tesis Doctoral de Raquel Rodríguez Tato en 2005 [1]. Se aislaron más de 500 cepas que fueron identificadas como lactobacilli (72 %), *Bifidobacterium* (21 %) y *Enterococcus* (7 %).

Las cepas de bifidobacterias frecuentemente carecen de propiedades tecnológicas para su uso en alimentos ya que no alcanzan niveles de viabilidad en el alimento y/o durante su almacenamiento lo suficientemente elevados (6-7 log UFC / ml) para sustentar efectos terapéuticos [2]. Posteriormente, gracias a otros dos proyectos de investigación, se siguió ampliando la colección de bifidobacterias de origen humano, y estudiando sus características tecnológicas para su potencial aplicación en productos lácteos funcionales. Además, se realizó un estudio para la detección de pares madre-hijo de cepas de bifidobacterias en heces de lactantes y leche materna que permitió obtener 9 pares de bifidobacterias madre-hijo [3]. El uso de una de estas cepas está patentado: “Microorganismo aislado de leche materna y de heces de un lactante y su uso como probiótico” (2012).

Algunas cepas de bifidobacterias de la colección INIA han mostrado aptitudes para su uso como cultivos adjuntos en la elaboración de quesos de leche de oveja, manteniendo niveles de 6 log UFC/g durante más de 30 días, sin afectar la viabilidad del cultivo iniciador, el pH, el extracto seco, la actividad de agua, o la mayoría de las características sensoriales, pero aumentando significativamente la proteólisis total y la concentración de algunos aminoácidos libres [4]. También se determinó la mejor combinación de lactobacilos de la colección INIA y carbohidratos prebióticos (que favorecen el crecimiento de la microbiota intestinal) como galacto-oligosacáridos, fructo-oligosacáridos (FOS) o inulina para desarrollar un queso simbiótico (conteniendo una cepa de *L. paracasei* con propiedades probióticas y compuestos prebióticos). La presencia de FOS no afectó a la viabilidad de esta cepa en queso, pero sí estimuló su metabolismo, produciendo mayores niveles de ácidos orgánicos y compuestos volátiles. Cuando el queso simbiótico fue introducido en un modelo colónico, se observó una mejora de la viabilidad de esta cepa con respecto al queso control, por lo que la presencia de FOS en el queso podría aumentar la viabilidad de estas cepas en el huésped [5].

Los compuestos fenólicos están presentes en frutas, vegetales y bebidas como el café, el té o el vino, y su ingesta se relaciona con efectos beneficiosos para la salud relacionados con enfermedades cardiovasculares, enfermedades metabólicas y ciertos tipos de cáncer [6,7]. Sin embargo, muchos de los efectos

beneficiosos atribuidos a estos compuestos fenólicos de la dieta dependen de los metabolitos producidos por nuestra microbiota, y esta transformación varía mucho entre individuos [8]. En 2013, el Dr. José Mª Landete inició una nueva línea de investigación sobre la transformación de polifenoles complejos presentes en la dieta por bacterias lácticas y bifidobacterias de la colección INIA. Se ha demostrado que algunas cepas son capaces de transformar estos compuestos en sus correspondientes agliconas, aumentando así su biodisponibilidad. La soja y la semilla de lino son de interés como alimentos funcionales por contener compuestos como ácidos grasos omega-3, fibra, isoflavonas, flavonoides y lignanos, con efectos beneficiosos para la salud. Sin embargo, la bioactividad de los flavonoides y lignanos depende en gran medida de las transformaciones que realiza nuestra microbiota. La fermentación de estas bebidas vegetales con una selección de cepas de lactobacilos y bifidobacterias de la colección INIA mejoró las propiedades nutricionales de las bebidas de soja y enriquecidas con semillas de lino, al transformar isoflavonas, flavonoides y lignanos en compuestos más biodisponibles y de mayor actividad biológica, de interés para la salud humana [9,10]. En estas bebidas se ha podido obtener un doble beneficio, al aumentar sus compuestos bioactivos y suministrar microorganismos con propiedades probióticas.

La suplementación de productos lácteos fermentados con extractos ricos en polifenoles se ha propuesto como una opción efectiva para mejorar los beneficios para la salud de estos productos [11]. En 2014 el Dr. Manuel Nuñez inició una nueva línea de investigación, y siguiendo este criterio, desarrollamos quesos con algas [12] y leches fermentadas con extractos de algas y probióticos comerciales [13]. Recientemente hemos desarrollado quesos simbióticos con cepas de bifidobacterias y un extracto acuoso de alcachofa, rico en polifenoles. No observamos un efecto de este extracto sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas o de color del queso, pero sí sobre los niveles de proteólisis total, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante, que fueron más elevados en los quesos simbióticos que en el queso control [14]. También hemos estudiado los efectos de extractos de mangostán, una fruta tropical muy sabrosa y delicada, sobre cepas de lactobacilos y bifidobacterias de la colección INIA, y observamos que los extractos de mangostán aumentaban la capacidad antioxidante de las cepas y la inhibición frente a patógenos Gram-positivos, y reducían la formación de biopelículas [15]. Como aplicación, desarrollamos leches fermentadas con extractos de mangostán y estas cepas, observando que las cepas sobrevivían bien a la elaboración, el almacenamiento en refrigeración y las principales condiciones presentes en el tracto gastrointestinal. Los productos con mangostán tenían niveles más elevados de polifenoles totales y mayor capacidad antioxidante que las leches fermentadas control [15].

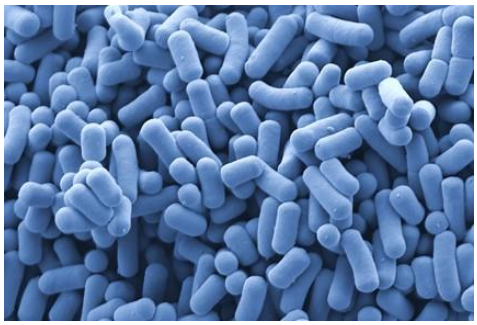


Figura 1. Imagen de *L. reuteri* INIA P572.

Desde marzo de 2021, la EFSA ha establecido que los microorganismos añadidos intencionadamente a la cadena alimentaria deben ser analizados genómicamente para asegurar su seguridad

[16]. Algunas de estas cepas de lactobacilos y bifidobacterias con potencial probiótico y tecnológico de la colección INIA ya han sido secuenciadas, y publicadas sus secuencias: *Limosilactobacillus reuteri* INIA P572 [17], *Bifidobacterium breve* INIA P734 (CECT 8178) [18], *Lacticaseibacillus paracasei* INIA P272 (CECT 8315) y *Lacticaseibacillus rhamnosus* INIA P344 (CECT 8316) [19]. Recientemente hemos realizado el análisis genómico de *Lacticaseibacillus paracasei* INIA P495 e INIA P708, y *Bifidobacterium breve* INIA P366, junto con otras cepas de origen lácteo (Poster 29). Los análisis genómicos han revelado la ausencia de genes de resistencia a antibióticos o de genes relacionados con patogenicidad, y la presencia de características probióticas en estas cepas de origen humano.

Varias empresas biotecnológicas están evaluando actualmente las aptitudes industriales de algunas de estas cepas.

AGRADECIMIENTOS

Proyectos AGL2000-0727-C03-03, RM2004-00013, RM2010-00008-00-00, RM2012-00004-00-00, RTA2010-00116-00-00, RTA2013-00029-00-00, AGL2013-42911-R, AT2016-002, RTA2017-00002-00, RTI2018-099271-R-I00, PID2020-11960RB-I00.

REFERENCIAS

[1] R. Rodríguez Tato (2005). Microorganismos probióticos: caracterización y aplicación en productos lácteos. Universidad Complutense de Madrid.https://www.educacion.gob.es/teseo/mostrarRef.do?ref=391662

[2] C.S. Ranadheera, N. Naumovski, S. Ajlouni. Curr. Opin. Food Sci., **2018**, 22, 109-114. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.010

[3] A. Peirotén, J.L. Arqués, M. Medina, E. Rodríguez-Mínguez. Benef. Microbes, **2018**, 9, 231-238. https://doi.org/10.3920/BM2017.0133

[4] S. Langa, A. Peirotén, P. Gaya, S. Garde, J.L. Arques, M. Nuñez, M. Medina, E. Rodríguez-Mínguez. J. Dairy Sci., **2020**, 103, 7695-7706. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18203

[5] S. Langa, E. van den Bulck, A. Peirotén, P. Gaya, H.A. Schols, J.L. Arqués. LWT, **2019**, 114, 108361.https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108361

[6] N.P. Bondonno, F. Dalgaard, C. Kyrø, K. Murray, C.P. Bondonno, J.R. Lewis, K.D. Croft, G. Gislason, A. Scalbert, A. Cassidy, A. Tjønneland, K. Overvad, J.M. Hodgson. Nat. Commun., **2019**, 10, 3651. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11622-x

[7] A. Tresserra-Rimbau, E.B. Rimm, A. Medina-Remón, M.A. Martínez-González, R. de la Torre, D. Corella, J. Salas-Salvadó, E. Gómez-Gracia, J. Lapetra, F. Arós, M. Fiol, E. Ros, L. Serra-Majem, X. Pintó, G.T. Saez, J. Basora, J.V. Sorlí, J.A. Martínez, E. Vinyoles, V. Ruiz-Gutiérrez, R. Estruch, R.M. Lamuela-Raventós. Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis., **2014**, 24, 639-647. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2013.12.014

[8] P. Gaya, A. Peirotén, J.M. Landete. J. Funct. Foods, **2017**, 39, 198-205. https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.029

[9] A. Peirotén, P. Gaya, I. Álvarez, J.M. Landete. Food Chem., **2020**, 318, 126521. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126521

[10] A. Ruiz de la Bastida, A. Peirotén, S. Langa, I. Álvarez, J.L. Arqués, J.M. Landete. Food Res. Int., **2021**, 147, 110488. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110488

[11] M. Dueñas, I. Muñoz-González, C. Cueva, A. Jiménez-Girón, F. Sánchez-Patán, F., C. Santos-Buelga, M.V. Moreno-Arribas, B. Bartolomé. BioMed Res. Int., **2015**, 850902. http://dx.doi.org/10.1155/2015/850902

[12] A. del Olmo, A. Picon, M. Nuñez. Int. Dairy J., **2018**, 84, 36-45. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.04.004

[13] A. del Olmo, A. Picon, M. Nuñez. LWT, **2019**, 107, 249-255. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.006

[14] E. Rodríguez-Mínguez, J. Calzada, C. Sánchez, M. Vázquez, M. Ávila, S. Garde, A. Picon. LWT, **2024**, 201, 116169. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116169

[15] E. Rodríguez-Mínguez, M.G. Ríos, C. Sánchez, A. Picon. Food Res. Int., **2024**, 191, 114720. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114720

[16] European Food Safety Authority (EFSA), https://n9.cl/efsa_2021

[17] E. Rodríguez-Mínguez, P. Huedo, S. Langa, A. Peirotén, J.M. Landete, M. Medina, J.L. Arqués. Microbiol. Resour. Announc., **2021**, 10, e00988-21. https://doi.org/10.1128/MRA.00988-21

[18] L. Rodrigo-Torres, E. Rodríguez, A. Peirotén, S. Langa, M. Medina, D.R. Arahal, R. Aznar, J.L. Arqués. Microbiol. Resour. Announc., **2021**, 10, e00871-20. https://doi.org/10.1128/MRA.00871-20

[19] L. Rodrigo-Torres, J.M. Landete, P. Huedo, A. Peirotén, S. Langa, E. Rodríguez-Minguez, M. Medina, D.R. Arahal, R. Aznar, J.L. Arqués. Gene, **2022**, 840, 146743. https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.1467

BIOFILMS EN SUPERFICIES EN CONTACTO CON ALIMENTOS: LECCIONES APRENDIDAS Y ESTRATEGIAS FUTURAS PARA SU CONTROL

Orgaz B [1,2]

1 Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria. Avda. Complutense s/n. 20840-Madrid (España)
2 Instituto Universitario Pluridisciplinar. Universidad Complutense de Madrid. Paseo Juan XXIII, nº 1. 20840-Madrid (España)

belen@ucm.es

Resumen / Abstract

Las biopelículas microbianas o biofilms son comunidades microbianas complejas asociadas a superficies. Muchas son las características diferenciales que se les han atribuido a los microorganismes presentes en los biofilms. Entre estas, su mayor tolerancia a los agentes antimicrobianos. Esto, junto a otros factores, les permite persistir en ambientes reales por largos periodos de tiempo, incluyendo en las superficies en contacto con alimentos. En esta ponencia, se revisaran los avances realizados hasta el momento en materia de control y eliminación de biofilms en la industria alimentaria y se propondrán varias estrategias futuras basadas en un enfoque multidisciplinar de los mismos.

Biofilms are complex microbial communities associated to surfaces. Some characteristics of biofilm microorganisms have been claimed to be unique to this lifestyle. Among these, a hallmark of biofilms is their profound tolerance against antimicrobial agents. This fact is partly responsable for their capacity to persist in real environaments, including food contact surfaces. This talk will attemppt to provide a comprehensive overview of the strategies we currently known about biofilm control and removal in the food indutry. Future strategies based on a multidisciplinary approach of biofilms will be proposed.

Palabras clave / Key words

Biopelículas microbianas, industria alimentaria, eliminación / Biofilms, food industry, removal

ESTRATEGIAS DIGITALES PARA LA MEJORA DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE PRODUCTOS DEL MEDITERRÁNEO

Possas, A.M.M.[1], Bonilla-Luque, O.[1], Rabasco-Vílchez, L.[1], Jiménez-Jiménez, F.[1], Pérez-Rodríguez, F.[1], Valero, A.[1]

1 Universidad de Córdoba. Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes (ENZOEM), CeiA3, Campus Rabanales, 14014.

avalero@uco.es

Resumen

La implementación de tecnologías digitales en la cadena de producción alimentaria ha permitido una mejora considerable en la detección y cuantificación de patógenos de transmisión alimentaria gracias a sistemas de monitorización a tiempo real, trazabilidad y respuesta rápida ante incidentes de seguridad alimentaria. La producción de alimentos artesanales constituye una de las señas de identidad de la gastronomía mediterránea, siendo necesario el impulso de estrategias que conduzcan a una mayor diferenciación y reconocimiento de estas industrias. En la presente ponencia se presentarán las principales herramientas digitales basadas en modelos de riesgo microbiológico y gráficos de control para la mejora de la calidad y seguridad de alimentos del Mediterráneo, que han sido desarrolladas en el marco de proyectos de investigación internacionales de la convocatoria PRIMA (ArtisaneFood y BioFreshcloud) y que sirven de apoyo a industrias del sector, así como a la Administración sanitaria y consumidores.

Palabras clave:

Modelos predictivos, bio-intervención, criterios de proceso, evaluación de riesgos, alimentos artesanales

Actualmente, la industria alimentaria debe afrontar el reto de poder abastecer la ingente demanda de alimentos a nivel mundial, la cual prevé incrementarse en los próximos años en torno a un 50%, considerando el aumento de la población y los cambios en los hábitos alimenticios (Gautam et al., 2021). Además, los desafíos a nivel medioambiental, relacionados con el cambio climático, y disponibilidad de recursos hídricos, entre otros, hace que deban desarrollarse nuevos modelos de producción en un futuro próximo.

El uso de herramientas de digitalización ha permitido una mayor automatización de los procesos y una conectividad entre el mundo físico y virtual, que hace ganar eficiencia y capacidad de monitorización en tiempo real de toda la cadena de producción alimentaria (Demartini et al., 2018).

En relación con los patógenos de transmisión alimentaria, los modelos de

microbiología predictiva, inicialmente basados en datos empíricos, han evolucionado para incorporar factores complejos que influyen en el comportamiento microbiano, incluyendo condiciones ambientales, composición de los alimentos e interacciones microbianas (Possas et al., 2022). Las innovaciones recientes en técnicas de modelado predictivo, como los modelos mecanicistas y los algoritmos de inteligencia artificial, han permitido predicciones más precisas, lo que empodera a los actores de la industria alimentaria para tomar decisiones informadas sobre la seguridad alimentaria y la extensión de la vida útil. Los logros más recientes en modelos predictivos no solo han mejorado la comprensión del comportamiento microbiano en los alimentos, sino que también han abierto puertas a aplicaciones interdisciplinarias (Allende et al., 2022). La monitorización en tiempo real de las poblaciones microbianas a lo largo de la cadena de suministro de alimentos, junto con la implementación de modelos predictivos, facilita la evaluación proactiva de riesgos y las estrategias de intervención, ayudando a mitigar la incidencia de enfermedades de transmisión alimentaria.

A continuación se presentan algunas de las herramientas de digitalización desarrolladas en dos proyectos internacionales financiados por la convocatoria PRIMA; ArtisaneFood y Biofreshcloud que permiten la integración de modelos predictivos para la mejora de la calidad y seguridad microbiológica asociadas a la producción de alimentos del Mediterráneo.

En el marco del proyecto ArtisaneFood, coordinado por el Instituto Politécnico de Braganza (Portugal), se han desarrollado estrategias eficientes de bio-intervención, así como mejoras en los criterios de proceso y programas de muestreo orientados a la implementación de herramientas informática de toma de decisiones sobre la calidad e inocuidad alimentaria en industrias de elaboración artesanal de alimentos fermentados de origen cárnico (embutidos crudo-curados) y lácteo (quesos).

La herramienta desarrollada, ArtisaneR, presenta módulos específicos de simulación de procesos de elaboración de quesos y productos cárnicos curados, así como modelos de gráficos de control de parámetros de proceso.

La aplicación está desarrollada en Shiny, y permite la modificación de variables de proceso relacionadas con la elaboración de productos cárnicos curados y quesos.

Los modelos relacionados con productos cárnicos curados permiten estimar la prevalencia y concentración de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* considerando diferentes fases del proceso, tales como mezcla y amasado, embutido, fermentación, secado-maduración, y envasado. Además, el usuario puede evaluar el efecto de operaciones de contaminación cruzada así como de estrategias de intervención basadas en la aplicación de cultivos iniciadores y extractos de aceites esenciales.

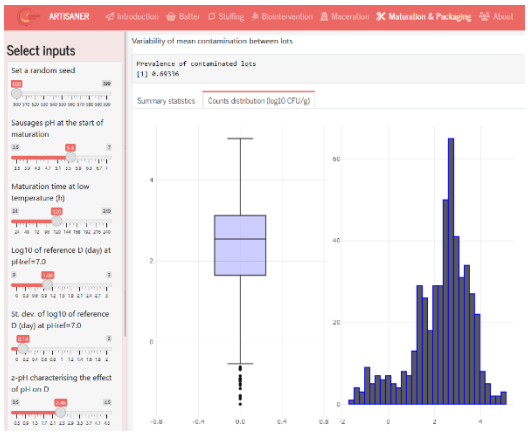


Figura 1: Variabilidad de la concentración microbiana de los lotes de producción asociados a la elaboración de productos cárnicos curados en la herramienta ArtisaneR.

Un ejemplo de los resultados obtenidos del modelo se representa en la Figura 1, donde se refleja la variabilidad de la contaminación media entre lotes de producción.

La herramienta ArtisaneR cuenta también con modelos predictivos que permiten estimar el comportamiento de *L. monocytogenes* en quesos artesanales, incluyendo etapas como coagulación, moldeado, y maduración. Además, al igual que el en caso de los productos cárnicos, se pueden evaluar estrategias de bio-intervención para mitigar el riesgo asociado a *L. monocytogenes* en el producto final, pudiendo cuantificar el efecto inhibitorio de bacterias ácido-lácticas (Østergaard et al., 2014) en función de la temperatura, pH, actividad de agua y niveles de ácido láctico. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la Figura 2.

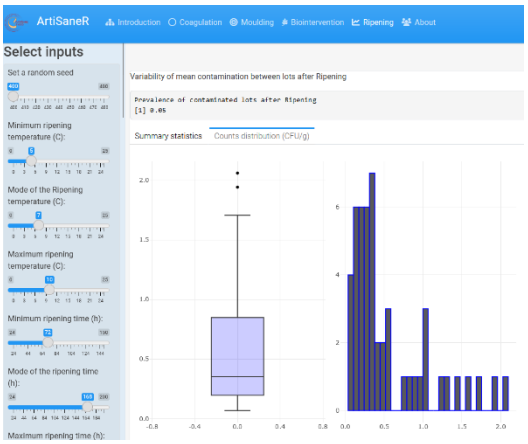


Figura 2: Variabilidad de la concentración microbiana de los lotes de producción asociados a la elaboración de quesos artesanales en la herramienta ArtisaneR.

Por último, cabe destacar la funcionalidad relacionada con los gráficos de control, mediante la cual el usuario puede importar datos físico-químicos, microbiológicos y nutricionales relativos a los lotes de producción con el objeto de comprobar la existencia de valores que estén situados fuera de los márgenes de seguridad del proceso (Figura 3).

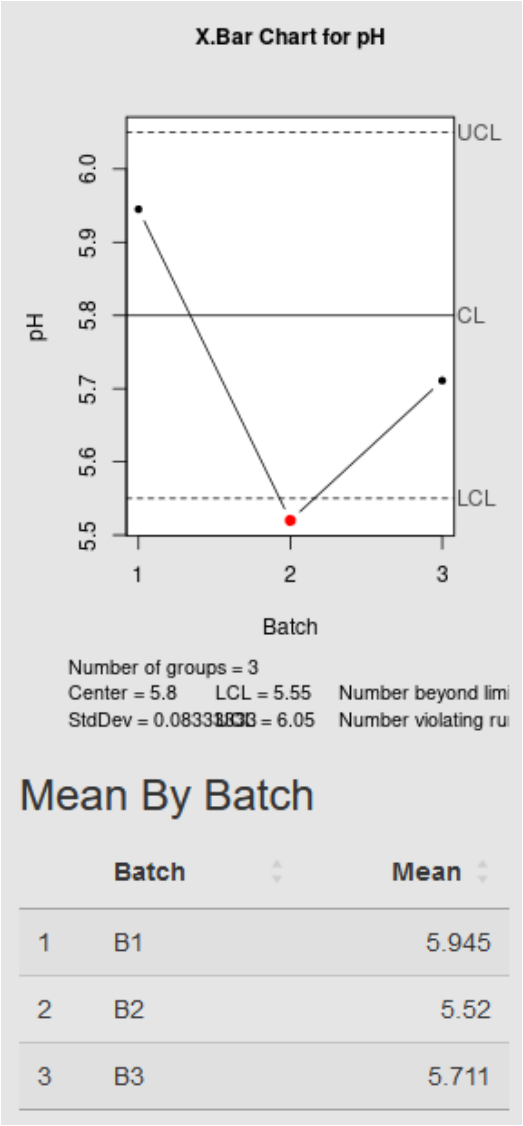


Figura 3: Ejemplo de gráfico de control de mediciones de pH a lo largo de la elaboración de un producto cárnico curado en la herramienta ArtisaneR.

Por otro lado, el proyecto BioFreshcloud, coordinado por la Universidad de Córdoba, tuvo por objetivo desarrollar un enfoque integrado, innovador y ecológico para evaluar la vida útil óptima y minimizar las pérdidas de alimentos de fresas y tomates producidos en la región mediterránea, combinando tecnologías de bio-preservación de alimentos, modelado de alimentos y herramientas de Food Cloud.

La estructura de la base de datos ha sido desarrollada considerando un enfoque de lenguaje unificado de modelado (UML). A través del uso de métodos de análisis no destructivos los modelos integrados permiten la estimación de la vida útil dinámica a tiempo real, mediante la utilización de sistemas de captura de datos de temperatura y humedad a lo largo de la cadena de distribución de estos alimentos de origen vegetal (Figura 4).

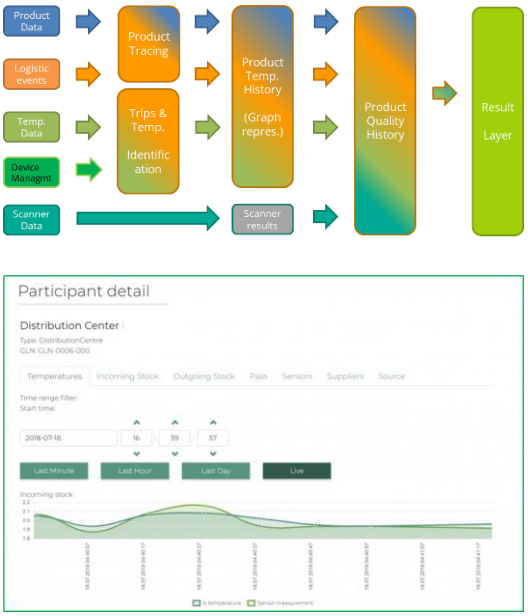


Figura 4: Diagrama de flujo de información y ventana de datos de trazabilidad de alimentos de origen vegetal generados en BioFreshcloud.

A nivel logístico, la plataforma permite recoger información sobre la trazabilidad de los lotes de producción para la estimación de la calidad sensorial y microbiológica.

El éxito de la integración de tecnologías digitales en el entorno alimentario a nivel global (IA, IoT, blockchain etc.) exige superar barreras tales como el coste económico, problemas de accesibilidad, ciberseguridad e infraestructuras disponibles. Sin embargo el mayor acceso a la información y fuentes de datos, junto con el desarrollo de nuevos métodos computacionales y analíticos, permitirán en

un futuro próximo adaptar la producción de alimentos a nuevos patrones de consumo de la población ligados a cambios de tipo social, económico y ambiental que mejoren la calidad, seguridad alimentaria y sostenibilidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de los proyectos de la convocatoria PRIMA (S2) ArtisaneFood (PRIMA-2019-103453) y BioFreshcloud (PRIMA-2020-112015) por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyectos de I+D+i "Programación Conjunta Internacional").

REFERENCIAS

[1] Gautam, M., Laborde, D., Mamun, A., Martin, W., Piñeiro, V. and Vos, R. Repurposing Agricultural Policies and Support: Options to Promote Sustainable Agricultural Development. Technical Report. Washington D.C.: World Bank and IFPRI (forthcoming). **2021**.

[2] Demartini, M., Pinna, C., Tonelli, F., Terzi, S., Sansone, C., Testa, C. *IFAC-PapersOnLine*, **2018**, *51*, 1371-1378.

[3] Possas, A., Valero, A., Pérez-Rodríguez, F. *Cur. Op. Food Sci*., **2022**, *44*, 100814.

[4] Allende, A., Bover-Cid, S., Fernández, P.S. A., Pérez-Rodríguez, F. *Cur. Op. Food Sci*., **2022**, *45*, 100839.

[5] Østergaard, N.B., Eklöw, A., Dalgaard, P. *Int. J. Food Microbiol.,* **2014**, *188*, 15-25.

EL RESISTOMA DE LOS ALIMENTOS Y AMBIENTES ASOCIADOS

Quijada N.M.[1], Cobo-Diaz, J.F.[2], Alvarez-Ordóñez A.[2],

1 Departamento de Microbiología y Genética. Instituto de Investigación en Agrobiotecnología. Universidad de Salamanca
2 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León

aalvo@unileon.es

Resumen

Aunque los sistemas de producción de alimentos pueden actuar como una ruta de transmisión de bacterias resistentes a los antimicrobianos y genes de resistencia a los antimicrobianos (GRA), el resistoma de los alimentos y los ambientes asociados sigue estando poco caracterizado. En el marco del proyecto europeo MASTER (https://www.master-h2020.eu/) se ha llevado a cabo la caracterización del resistoma de 1.780 muestras de materias primas, productos finales y superficies de 113 industrias alimentarias productores de queso, carne y productos cárnicos, vegetales y productos pesqueros. El análisis demostró que más del 70% de todos los GRA que se conocen, incluidos muchos de los que confieran resistencia a antibióticos de importancia crítica, circulan a lo largo de las cadenas de producción de alimentos, siendo los que confieren resistencia a las tetraciclinas, β-lactámicos, aminoglucósidos y macrólidos los más abundantes en general. Los resultados también sugirieron que existe una mayor diversidad y abundancia de GRA en industrias relacionadas con la producción de alimentos de origen animal terrestre, especialmente carne y productos cárnicos. Las bacterias del grupo ESKAPEE, junto con Staphylococcus equorum y Acinetobacter johnsonii, fueron los principales portadores de GRA. Aproximadamente el 45 % de los GRA (y un porcentaje aún mayor para los genes vinculados a la resistencia a los aminoglucósidos y las tetraciclinas) estaban asociados con elementos genéticos móviles, principalmente plásmidos. El trabajo realizado demuestra que la implementación en industrias alimentarias de métodos de mapeo de microbiomas basados en tecnologías independientes de cultivo es un medio eficaz para la identificación y caracterización de peligros biológicos que suponen un riesgo para la seguridad alimentaria.

Palabras clave

Resistoma, antimicrobianos, resistencia, seguridad alimentaria, microbioma, genes de resistencia

La rápida aparición y propagación de resistencias a los antimicrobianos (RAM) se encuentra entre las amenazas más urgentes para la salud pública, ya que muchas infecciones se están volviendo resistentes al tratamiento antimicrobiano [1]. Se ha estimado que 4,95 millones de muertes fueron causadas en 2019 por microorganismos resistentes a los antimicrobianos [2], lo que coloca a la RAM como la tercera causa de muerte más importante a nivel mundial [3], y se estima que el número de muertes aumentará si no

se implementa un plan de acción global y coordinado [4].

A pesar del alto impacto que el contenido microbiano de los alimentos tiene en la salud humana a través de su influencia en el microbioma intestinal [8], el papel de los sistemas de producción de alimentos como reservorio y ruta de transmisión a los humanos de bacterias resistentes y genes de resistencia a antimicrobianos (GRA) sigue estando poco estudiado. Además, los estudios disponibles se centran exclusivamente en ciertas combinaciones de patógenos y antimicrobianos y, por lo tanto, la diversidad de GRA que circula a lo largo de la cadena alimentaria aún está por desentrañar.

En el Consorcio europeo MASTER (https://www.master-h2020.eu/) se analizaron mediante secuenciación metagenómica un total de 1.780 muestras de materia prima, producto final y superficies de 113 industrias alimentarias, realizando una caracterización en profundidad de la abundancia y diversidad de GRA, para identificar posibles puntos críticos de transferencia de los mismos, obteniendo también información sobre sus taxones portadores y asociación con elementos genéticos móviles (EGM). El trabajo representa el estudio más ambicioso del resistoma de los alimentos y ambientes asociados realizado hasta la fecha sobre la base de la gran cantidad de muestras analizadas (~3x de metagenomas alimentarios disponibles públicamente), la amplia diversidad de tipos de alimentos y superficies industriales secuenciadas, el enfoque de secuenciación seguido (~2x de profundidad de secuenciación normalmente empleada, lo que permitió reconstruir ~4x número de genomas desde estos metagenomas) y los análisis bioinformáticos diseñados específicamente para el presente estudio.

Una evaluación cuantitativa de lecturas sin ensamblar demostró que la mayoría de todos los GRA conocidos (más del 70%), incluidos muchos que confieren resistencia a antibióticos de importancia crítica, circulan a lo largo de las cadenas de producción de alimentos, en la mayoría de los casos con baja prevalencia. Identificamos GRA asociados con resistencia a casi todas las clases de antimicrobianos conocidas, con una mayor representación de aquellos vinculados a las más ampliamente consumidas en la UE, es decir, tetraciclinas, β-lactámicos, aminoglucósidos y macrólidos [5]. También se apreció una mayor diversidad y abundancia de GRA en sistemas relacionados con la producción de alimentos de origen animal terrestre, especialmente de carne y productos cárnicos. Sin embargo, nuestro estudio no fue equilibrado, es decir, incluyó una mayor proporción de industrias queseras y, en menor medida, de productos cárnicos, y se limitó a unos pocos países europeos. Estudios adicionales que incluyan más instalaciones de una gama más amplia de sectores de producción de alimentos y países serían muy beneficiosos, ya que los países tienen diferentes políticas con respecto al uso de antimicrobianos en agricultura y ganadería, lo que probablemente se reflejará en diferencias en la composición del resistoma [6].
Identificamos varias especies bacterianas pertenecientes al grupo ESKAPEE entre los principales portadores de GRA, principalmente en fábricas de queso y productos cárnicos, casi ubicuamente en todas las categorías de muestras. Entre

ellos, *Staphylococcus aureus* fue el portador de GRA más frecuente en general. Otros miembros del género *Staphylococcus* (*S. equorum* y *S. saprophyticus*), que se encuentran con frecuencia en entornos de producción de alimentos [7], también se identificaron como principales portadores de determinados GRA, con baja presencia en materias primas y una mayor representación en superficies de diferentes salas industriales y en producto final. *Acinetobacter johnsonii*, una bacteria asociada con el deterioro de los alimentos y descrita solo ocasionalmente como un patógeno oportunista [8], también se distribuyó ampliamente en alimentos y entornos de procesamiento de todos los sectores de producción (incluida la producción de pescado y vegetales) como portadora principalmente de GRA cromosómicos tipo bla_{OXA}.

Aproximadamente el 45 % de todos los GRA encontrados se asociaron con EGM, principalmente plásmidos (70 % de todos los EGM que portaban GRA). Algunos de los GRA más abundantes, como *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *str*, *aadA1*, *aadA2* (resistencia a aminoglucósidos); *tet(K)*, *tet(39)*, *tet(L)* (resistencia a tetraciclinas); *sul2*, *sul1* (resistencia a antagonistas de la vía del folato) y *msr(A)* (resistencia a macrólidos y estreptogramina B), se vincularon casi exclusivamente con EGM. Para ciertas especies de ESKAPEE, como *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*, la gran mayoría de los GRA se identificaron como vinculados con EGM.

Los análisis realizados demostraron el impacto que tienen algunos procesos de fabricación y entornos de procesamiento de alimentos en el resistoma de los productos finales, que en general tenían una mayor cantidad de GRA que las materias primas, incluidos genes que no estaban presentes en absoluto en estas últimas y que eran posiblemente introducidos más tarde en la cadena de producción. Se observaron diferencias importantes en la composición del resistoma de los alimentos entre las etapas de producción previas y posteriores a la maduración, y los productos finales mostraron perfiles de GRA muy similares a los de las superficies de las últimas etapas de fabricación (salas de maduración y envasado). Además, la evaluación de posibles eventos de propagación de GRA también mostró vínculos entre el resistoma de los productos finales y las superficies de distintas salas de procesamiento, lo que sugiere que éstas tienen un efecto marcado en la dispersión de GRA a los alimentos.

Notablemente, nuestro trabajo muestra que la implementación en industrias alimentarias de métodos de mapeo de microbiomas basados en tecnologías independientes de cultivo es un medio eficaz para la identificación y caracterización de peligros biológicos que suponen un riesgo para la seguridad alimentaria. La aplicación de enfoques de secuenciación metagenómica en industrias alimentarias enfrenta desafíos importantes, siendo el más relevante la recuperación de una cantidad suficiente de ADN microbiano de muestras que en ocasiones albergan baja biomasa microbiana. El Consorcio MASTER ha validado protocolos mejorados de muestreo y extracción de ADN para análisis de microbiomas adaptados a entornos de procesamiento de alimentos [9]. Es nuestro deseo que su aplicación, en combinación con las herramientas y recursos de análisis bioinformáticos desarrollados y disponibles en repositorios públicos

(https://github.com/SegataLab/cFMD; https://github.com/SegataLab/MASTER-WP5-pipelines), acelere la adopción de estos enfoques de mapeo de microbiomas por parte de la comunidad investigadora y de laboratorios y operadores de la industria alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Comisión Europea en el marco del programa de investigación e innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea, en virtud del acuerdo de subvención n.º 818368 (MASTER). N.M.Q. está actualmente financiado por el programa de investigación e innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea en virtud del acuerdo de subvención Marie Skłodowska-Curie n.º 101034371.

REFERENCIAS

[1] Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D. & Gurr, S. J. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. Science 360, 739–742 (2018).

[2] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet 399, 629–655 (2022).

[3] GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Lancet 396, 1204–1222 (2020).

[4] O'Neill, J. I. M. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. Rev. Antimicrob. Resist. (2014).

[5] ECDC. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA - A One Health response. (2022).

[6] Zhao, C., Wang, Y., Mulchandani, R. & Van Boeckel, T. P. Global surveillance of antimicrobial resistance in food animals using priority drugs maps. Nat. Commun. 15, 763 (2024).

[7] Marino, M., Frigo, F., Bartolomeoli, I. & Maifreni, M. Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments. J. Appl. Microbiol. 110, 550–561 (2011).

[8] Kämpfer, P. Acinetobacter. in Encyclopedia of food microbiology 11–17 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00002-1.

[9] Barcenilla, C. et al. Improved sampling and DNA extraction procedures for microbiome analysis in food-processing environments. Nat. Protoc. (2024) doi:10.1038/s41596-023-00949-x.

EL PAPEL DE LOS PROBIÓTICOS Y POSTBIÓTICOS EN LA MODULACIÓN DE LOS TRASTORNOS ALIMENTARIOS

Alejandra Flor-Duro, Ana Agustí, Marta Olivares, Yolanda Sanz

Microbiome, Nutrition and Health Research Unit, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Spanish Research Council (IATA-CSIC), Valencia, Spain

yolsanz@iata.csic.es

Resumen / Abstract

La obesidad representa uno de los principales retos sanitarios mundiales debido a su elevada prevalencia por lo que ha aumentado el interés por comprender los mecanismos neurobiológicos que contribuyen a la ingesta de alimentos en ausencia de demanda energética. Esta conducta se caracteriza por cambios neuroquímicos relacionados con pérdida de control de la ingesta de alimentos. La microbiota intestinal puede influir en el apetito y el control de la ingesta a través de vías endocrinas y neuronales. En este estudio demostramos que la administración de la bacteria intestinal Bacteroides uniformis CECT 7771 (B. uniformis) en un modelo animal de ingesta por atracón y adicción a la comida influye en la respuesta de recompensa del cerebro, reduciendo la ingesta calórica en la fase del atracón y disminuyendo la ansiedad por la comida mediante cambios en los niveles de dopamina, serotonina y noradrenalina en el núcleo accumbens. Además, B. uniformis produce cambios en la microbiota y aumenta la abundancia de especies relacionadas con la salud metabólica. Por tanto, las aproximaciones basadas en la regulación de la microbiota podrían ayudar a controlar la ingesta compulsiva modulando la respuesta de recompensa.

Palabras clave / Key words

Bacteroides uniformis CECT 7771, adicción a la comida, atracón, mecanismo de recompensa, dopamina, microbiota, eje intestino-cerebro, modelo preclínico

La adicción a la comida (AF) se caracteriza por alteraciones conductuales y cerebrales que conducen a la pérdida del control de la ingesta de alimentos [1]. Las personas con obesidad suelen tener dificultades para controlar la ingesta, por lo que se asocia con trastornos del comportamiento alimentario como los atracones y la adicción a la comida [2-3].

El control de la ingesta depende tanto de aspectos homeostáticos, cuyo objetivo es satisfacer la necesidad energética, como del componente hedónico, que proporciona placer. Este componente hedónico está regulado por mecanismos de recompensa que pueden anular el homeostático y derivar a un estado de ansiedad compulsiva independiente del hambre inducido para cubrir las necesidades energéticas. El principal neurotransmisor asociado a la respuesta de recompensa es la dopamina, que es fundamental para el consumo de alimentos y que se libera en el núcleo accumbens, donde se regulan funciones

como la secreción hormonal y el comportamiento emocional.

El eje intestino-cerebro permite la comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro, mediada por señales hormonales, inmunológicas y neuronales, y la microbiota intestinal actúa como reguladora de este eje. Sin embargo, sigue sin esclarecerse como las bacterias intestinales y la modulación de la microbiota intestinal pueden regular el sistema de recompensa cerebral y el control de la ingesta.

En este estudio evaluamos el papel y el modo de acción de la microbiota intestinal con un modelo de adicción a la comida en roedores, en el que la pérdida de control se induce mediante periodos intermitentes de ayuno y posterior exposición a comida y bebida. En este caso utilizamos la cepa *B. uniformis* CECT 7771 (*B. uniformis*), un anaerobio aislado de heces de lactante amamantado con leche materna. Dicha bacteria ha sido seleccionada por su capacidad para reducir el aumento de peso corporal y las alteraciones metabólicas en un modelo animal murino de obesidad inducida por dieta [4].

En la primera fase del proyecto se ha procedido a la optimización de la producción de la bacteria, tanto a escala de laboratorio, como a escala semiindustrial. Tras testar varias fuentes de carbohidratos y nitrógeno se ha aumentado el rendimiento del crecimiento de forma escalada. Además de la bacteria viable, posteriormente testamos el potencial postbiótico de dicha cepa en su forma no viable, para así evaluar si tiene la misma capacidad funcional. Se ha demostrado que algunas bacterias probióticas tienen el mismo efecto tras administrarlas tanto en estado viable como no viable.

A continuación, se hizo un primer experimento en un modelo animal de adicción a la comida dividiendo los animales en tres grupos: (1) grupo control al cual se proporciona una dieta estándar y agua, administrando únicamente el vehículo (PBS/cisteína/glicerol), (2) un grupo de ayuno intermitente durante 12h y durante las 12h restantes con acceso a una dieta estándar y sacarosa (10%) en el agua de bebida y (3) un grupo que sigue el mismo patrón que el anterior pero recibiendo una dosis diaria de *B. uniformis*.

Tras el experimento observamos que la administración oral de dicha bacteria reduce la ingesta calórica durante los episodios de atracón y restaura el comportamiento ansioso alterado por el ayuno intermitente. Los resultados también revelan una alteración del sistema dopaminérgico en las ratas sometidas a ayuno intermitente, lo que se traduce en niveles más bajos de dopamina extracelular en el núcleo accumbens. La administración de *B. uniformis* revirtió esta situación a través de la restauración de la expresión de los receptores de la dopamina D1 y D2 tanto en el cerebro como en el intestino. También se ha demostrado que la bacteria tiene la capacidad de modular otros neurotransmisores implicados en la respuesta de recompensa como la serotonina y noradrenalina. En cuanto a los niveles de corticosterona, se observa que están ligeramente reducidos en las ratas sometidas a ayuno intermitente, lo que podría indicar una menor capacidad de respuesta al estrés, estando aumentado en las ratas a las que se administra *B. Uniformis.*

Además, se confirma que *B. uniformis* es capaz de reducir la ansiedad por la privación de alimentos, disminuyendo también el comportamiento exploratorio en ratas en ayudas, es decir la urgencia de obtención de comida y por tanto el comportamiento ansioso por ella.

Por último, la cepa *B. uniformis* CECT 7771 restaura parcialmente las alteraciones de la microbiota intestinal inducidas por el ayuno y aumenta la abundancia de especies asociadas a un estado saludable.

Estos resultados destacan el papel que tiene la microbiota intestinal en el control de la ingesta de alimentos, actuando no sólo sobre la homeostasis energética, sino también sobre los mecanismos de recompensa.

Tras los resultados obtenidos se ha repetido el experimento administrando la bacteria como postbiótico, para comprobar si la bacteria inactiva es capaz de producir los mismos efectos que la bacteria viable. Actualmente se están analizando los datos de este segundo experimento que, de confirmarse su efectividad, supondría una ventaja para la comercialización de la bacteria ya que su efecto no se vería afectado por factores de estrés, como el oxígeno, que pueden comprometer su viabilidad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha contado con el apoyo de la subvención proporcionada por el Instituto Valenciano de Competitividad e Innovación (Ivace+i) Ref. INNVA1/2023/24. Agradecemos el apoyo técnico de L. Ortí-Pérez y E. Terrado-Blanco.

REFERENCIAS

[1] D'Addario C, Micioni Di Bonaventura MV, Pucci M, Romano A, Gaetani S, Ciccocioppo R, Cifani C, Maccarrone M (2014). Endocannabinoid signaling and food addiction. Neurosci Biobehav Rev 47:203–224.

[2] de Zwaan M (2001) Binge eating disorder and obesity. Int J Obes Relat Metab Disord 25(1):S51-5

[3] Schag K, Schönleber J, Teufel M, Zipfel S, Giel KE (2013) Food-related impulsivity in obesity and binge eating disorder - a systematic review. Obes Rev 14(6):477–95

[4] Gauffin-Cano P, Santacruz A, Moya A, Sanz Y (2012) Bacteroides uniformis CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity. PLoS One 7:e41079

¿ENEMIGOS O AMIGOS? LOS FAGOS COMO ALIADOS EN LA MEJORA DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

Lavilla M.[1]

1 AZTI-BRTA, Investigación Alimentaria. Astondo Bidea, edificio 609, 48160-Derio (Bizkaia).

mlavilla@azti.es

Resumen / Abstract

El consumo de alimentos o agua contaminados con bacterias patógenas puede provocar enfermedades graves. Para ayudar a garantizar la seguridad alimentaria global, surge el enfoque One Health, que puede anticipar, prevenir, detectar y controlar enfermedades que se propagan entre los animales, los humanos y el medio ambiente. En este contexto, el desarrollo de alternativas innovadoras, versátiles y efectivas para controlar las infecciones bacterianas con el fin de garantizar la seguridad microbiana integral de los alimentos se está convirtiendo en un tema urgente, especialmente contra las cada vez más frecuentes bacterias multirresistentes.
Los bacteriófagos (fagos) han ganado importancia en los últimos años debido a la demanda de nuevos antimicrobianos eficaces para el tratamiento de enfermedades bacterianas. Sin embargo, estos microorganismos también tienen otras muchas aplicaciones, incluida la seguridad alimentaria. En este artículo revisaremos las ventajas de la aplicación de fagos para prevenir enfermedades transmitidas por los alimentos y el agua, así como los principales retos que deberán abordarse en futuros estudios para favorecer su aplicabilidad real.

Palabras clave / Key words

Bacteriófagos, Seguridad alimentaria, Biotecnologia, Listeria, Campylobacter, Vibrio, One-Health, Salud Animal, Resistencia antimicrobiana (AMR)

.

Los alimentos y el agua son las principales vías de transmisión de más de 200 enfermedades infecciosas humanas conocidas, muchas de las cuales se atribuyen a bacterias. Además de los potenciales síntomas clínicos graves, las enfermedades transmitidas por los alimentos y el agua representan una enorme carga económica para los sistemas sanitarios (tratamiento, posible hospitalización, pérdida de jornadas laborales, etc.) y algunas de ellas, como *Listeria monocytogenes*, pueden ser mortales. Debido a la importancia de estos patógenos en la cadena alimentaria, hay instauradas, ya desde la misma producción, rigurosas medidas de control, bioseguridad, mitigación, protocolos de limpieza y desinfección y de buenas prácticas. Sin embargo, a pesar de estas medidas, cada año surgen nuevos brotes que impactan económicamente en la industria y en la salud y confianza de las personas consumidoras.

Además, el cambio climático y el calentamiento global favorece el crecimiento, distribución y prevalencia de estos patógenos, y la aparición de otros emergentes, lo que cada vez se hace más necesario el desarrollo de nuevas medidas para su control, que complementen las ya existentes.

Los **bacteriófagos** (fagos), virus que infectan específica y únicamente a las bacterias, se postulan como una de las principales alternativas y opciones más seguras para la prevención, tratamiento y erradicación de patógenos bacterianos (incluidos biofilms)

[1], habiendo un creciente interés en la terapia con bacteriófagos como estrategia de control biológico en humanos, animales y plantas [2,3]. Este biocontrol dirigido a bacterias patógenas específicas, también se acepta cada vez más como una estrategia de seguridad para prevenir la presencia y proliferación de estas bacterias en alimentos y piensos de forma natural, eficaz y económica [4]. Los fagos, además de ser útiles para luchar contra las enfermedades bacterianas, evitan al mismo tiempo el aumento de la resistencia a los antibióticos, siendo efectivos contra bacterias multirresistentes pero también respetuosos con el medio ambiente, e integrables en estrategias *One Health* (**Figura 1**) [5].

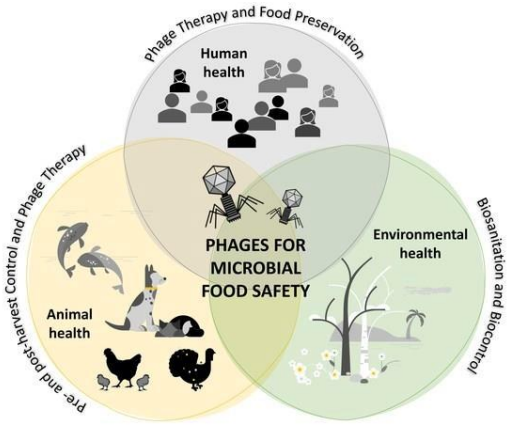


Figura 1: Aplicabilidad de los fagos para incrementar la Seguridad alimentaria desde una estrategia One Health [5].

Así, con el objetivo de reducir las enfermedades transmitidas por los alimentos, los fagos se pueden utilizar en muchas aplicaciones, como la terapia en producción animal, la limpieza del ganado, la desinfección y saneamiento de instalaciones, equipos y superficies de contacto en granjas e industrias, biocontrol en canales, carnes y otros productos frescos, y también como conservantes naturales para prolongar la vida útil de los productos [6,7].

Los fagos poseen algunas características únicas, como una naturaleza altamente específica de especie, manejo relativamente fácil, autorreplicación y autolimitación [8], que los convierten en una alternativa prometedora para inhibir eficazmente la colonización de bacterias patógenas desde el origen del alimento y reducir la contaminación en los animales y, en consecuencia, las enfermedades zoonóticas [9]. Debido a su alta especificidad, los fagos eliminan las bacterias diana sin afectar la microbiota normal y beneficiosa del huésped, los alimentos (incluidos cultivos iniciadores) o el medio ambiente. Además, como ya están ampliamente presentes en el medio ambiente (siendo las entidades biológicas más abundantes del planeta), se asume que los fagos añadidos no tienen ninguna consecuencia negativa sobre la calidad de los alimentos o la salud animal y humana [10].

Sin embargo, antes de cualquier aplicación, existen muchos factores a tener en cuenta, como la bacteria diana, la caracterización completa de cada fago aislado y selección de fagos estrictamente líticos (**Figura 2**) [5,11], la ruta de aplicación, el momento de administración de los fagos (profiláctica *vs* terapéutica), la cantidad de fagos utilizados (única *vs* cóctel), la composición de los alimentos o la temperatura de almacenamiento, por ejemplo, ya que pueden implicar grandes diferencias en los resultados sobre los efectos de los fagos en

el biocontrol de patógenos en alimentos y animales [11,12].

La seguridad y eficacia de los biocontroladores basados en fagos se refleja en el hecho de que ya existen varias preparaciones para su uso en alimentos [9,11]. Además, se pueden usar solos o en combinación con otros fagos (cócteles de fagos) para lograr un rango de huéspedes más amplio, o con antibióticos o desinfectantes para controlar las infecciones bacterianas de manera más efectiva [14].

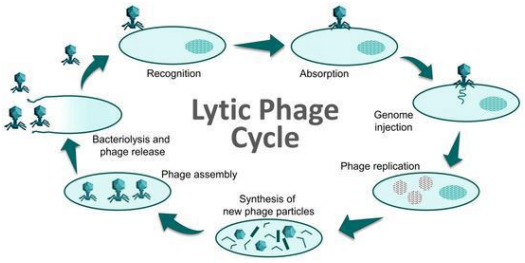


Figura 2: Ciclo de un fago lítico, que desencadena la muerte bacteriana (bacteriólisis). Adaptado de [13].

Aunque las posibles aplicaciones y ventajas de los fagos ya se han resumido en párrafos anteriores y los resultados de los estudios publicados se muestran prometedores, todavía existen algunas limitaciones y retos que deben abordarse antes de generalizar su uso. Por ejemplo, la alta especificidad de los fagos puede ser tanto una fortaleza (por su seguridad), como una desventaja, afectando a su efectividad. El biocontrol con fagos se puede lograr eficazmente como un tratamiento personalizado, que requiere conocimiento previo del huésped bacteriano y la búsqueda y selección de uno o varios fagos eficientes para controlar dicha bacteria objetivo. Los fagos también se pueden utilizar como productos de amplio espectro mediante el diseño de cócteles de varios fagos complementarios y/o sinérgicos entre sí [15].

La posible resistencia bacteriana a los fagos es otra de las dificultades de esta posible solución, ya que las bacterias también pueden desarrollar mecanismos de resistencia. Para solventar este problema, se pueden utilizar cócteles de fagos con diferentes características, rotar su composición o combinarlos con otros métodos de control [16].

En cuanto al marco legislativo, cualquier aplicación de fagos debe cumplir con la normativa vigente. La gran variabilidad de la morfología y diversidad de los fagos, su evolución intrínseca y su naturaleza autorreplicante en presencia del huésped bacteriano crean un desafío para las agencias reguladoras, y resaltan el problema de someter a todos productos derivados de fagos a la misma regulación. En países como Chile o EE. UU. los bacteriófagos se usan ya de forma rutinaria y hay productos comerciales en varios campos (ganadería y acuicultura, seguridad alimentaria…). En Europa, a pesar de su gran potencial, hasta la fecha su aplicabilidad ha estado limitada. Sin embargo, debido al potencial de los fagos, organizaciones internacionales como la Agencia Europea del Medicamento, han publicado guías científicas sobre la calidad, seguridad y eficacia de los bacteriófagos para su uso en medicina veterinaria [17]. La Agencia Española del Medicamento incluyó a los bacteriófagos como medicamentos de segunda prioridad frente a *E. coli* y *Salmonella* [18]. El informe *Top 10 Emerging Technologies 2023* del Foro Económico Mundial también destacó los bacteriófagos dentro de las tecnologías que tendrán un impacto positivo en la sociedad en los próximos 3-5 años [19]. Todos estos documentos, así como la necesidad de abordar de forma urgente el incremento de bacterias multirresistentes, evidencian que el uso de fagos también se aceptará en los próximos años en Europa para ciertas aplicaciones. Sin embargo, aún se requiere

más investigación sobre su aplicación comercial y formulación para usos más generalistas, como la seguridad alimentaria, para ser aplicados de forma segura y eficaz en la lucha contra los patógenos objetivos, con el fin de dar el último paso que aún queda entre la investigación y el usuario final.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece a la organización del XXIII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos por su confianza. Este trabajo ha sido financiado dentro del proyecto **BIOTEGANIA** (Ref. PLEC2023-010275 financiado por MCIU/AEI/10.13039/50110 0011033, TransMisiones 2023).

REFERENCIAS

[1] D Wang, X Zhao, H Wang. Food Biosci, 2023, 54, 102819. DOI: 10.1016/j.fbio.2023.102819.

[2] M Jamal, SM Bukhari, S Andleeb, et al. J. Basic Microbiol. 2019, 59, 960. DOI: 10.1002/jobm.201800412.

[3] TE Nagal, BK Chan, D De Vos, A. El-Shibiny, et al. Front. Microbiol. 2016, 7, 882. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00882.

[4] ZD Moye, J Woolston, A Sulakvelidze. Viruses, 2018, 10, 205. DOI: 10.3390/v10040205.

[5] M Lavilla, P Domingo-Calap, S Sevilla- Navarro, A Lasagabaster. Foods. 2023, 12, 552. DOI: 10.3390/foods12030552.

[6] L Endersen, J O'Mahony, C Hill, RP Ross, et al. Ann. Rev. Food Sci. Technol. 2014, 5, 327–349. DOI: 10.1146/annurev-food-030713-092415.

[7] SM Sillankorva, H Oliveira, J Azeredo. Inter. J. Microbiol 2012, 12, 863945. DOI: 10.1155/2012/863945.

[8] JR Clark, JB March. Trends Biotechnol. 2006, 24, 212. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.03.003.

[9] M Alomari, M Dec, R Urban. *Viruses*, **2021**, *13*, 2348. DOI: 10.3390/v13122348.

[10] JP Pirnay, M Merabishvili, et al. "Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice" (Humana Press: New York, NY, USA, 2017). DOI: 10.1007/978-1-4939-7395-8_18

[11] A Vikram, J Woolston, A Sulakvelidze. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2021**, 40, 267–302. DOI: 10.21775/cimb.040.267.

[12] S Mosimann, K Desiree, P Ebner. *Poult. Sci*. **2021**, 100, 101472. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101472.

[13] J Doss, K Culbertson, D Hahn, J Camacho, N Barekzi. *Viruses* **2017**, 9, 50. DOI: 10.3390/v9030050.

[14] M Kutateladze, R Adamia. *Trends Biotechnol*. **2010**, 28, 591–595. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.08.001 .

[15] L Mateus, L Costa, YJ Silva, C Pereira, et al. *Aquaculture* **2014**, 424–425, 167–173. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.01.001.

[16] ST Abedon, KM Danis-Wlodarczyk, DJ Wozniak. *Pharmaceuticals*, **2021**, 14, 1019. DOI: 10.3390/ph14101019.

[17] EMA, EMA/CVMP/NTWP/32862/2022. https://www.ema.europa.eu/en/quality-safety- and-efficacy-bacteriophages-veterinary-

medicines-scientific-guideline#current-version-section, Última actualización: **13/10/2023**.

[18] AEPM. https://www.aemps.gob.es/laAEMPS/comites/codivet/docs/informe-codivet-vacios-terapeuticos-v9.pdf/. Última actualización: **5/12/2023.**

[19] World Economic Forum. Top 10 Emerging Technologies of 2023. Publicado: **26/06/2023**. https://www.weforum.org/publications/top-

10-emerging-technologies-of-2023/

MICROBIOMAS Y SOSTENIBILIDAD DE LA CADENA ALIMENTARIA: OPORTUNIDADES BASADAS EN MICROBIOMAS PARA VALORIZAR SUBPRODUCTOS AGROALIMENTARIOS

Ruiz L*[1]

1 Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300, Villaviciosa, Asturias, España

*lorena.ruiz@ipla.csic.es

Resumen / Abstract

El sistema alimentario requiere una transformación integral que mejore su eficiencia y permita satisfacer las necesidades nutricionales de una población global en crecimiento, de forma igualitaria y respetuosa con los recursos y con el medio ambiente, favoreciendo la transición hacia dietas saludables y sostenibles. Reducir el desperdicio alimentario a lo largo de la cadena de producción y distribución de alimentos es una paso importante para lograr este objetivo. El mayor volumen de desperdicio alimentario se da en las industrias que procesan frutas, vegetales y cereales, si bien los subproductos derivados de los mismos son ricos en ingredientes bioactivos incluyendo fibras, polifenoles, vitaminas o minerales, entre otros, por lo que son materiales interesantes para el desarrollo de nuevos alimentos y suplementos. La fermentación microbiana, debido a su capacidad para mejorar las propiedades nutricionales y bioaccesiblidad de los alimentos, y alargar su vida útil, es una forma de procesado sostenible que se ha utilizado en alimentación desde hace siglos. La aplicación de aproximaciones basadas en secuenciación y modelado metabólico al estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados y en sus entornos de producción, ha abierto oportunidades al diseño avanzado de microbiotas sintéticas, adaptadas a la fermentación de precisión de matrices determinadas y la mejora dirigida de las propiedades del producto final. Su aplicación a la fermentación controlada de subproductos agroalimentarios puede representar una oportunidad para valorizarlos, generando alimentos o ingredientes saludables y contribuyendo a una mayor eficiencia del sistema de producción de alimentos.

Palabras clave / Key words

Microbiomas, alimentos fermentados, subproductos, sostenibilidad, prebióticos

Las industrias de procesado de frutas, vegetales y cereales generan un volumen importante de subproductos agroalimentarios. A modo de ejemplo, las industrias sidrera y cervezera generan anualmente grandes toneladas de bagazo, constituidas por los restos de pieles, tallos, salvado, semilla y pulpa. Sólo en el caso de la sidra, se utilizan 1,000,000 de toneladas anuales de manzana, de las cuáles entre un

20-30% constituyen el residuo; mientras que en el caso de la cerveza, se generan 40 millones de toneladas de bagazo anuales [1,2]. Una fracción de estos residuos se emplea como suplementos en alimentación animal mientras que la mayor parte se desecha directamente, con la consiguiente contribución a la generación de gases efecto invernadero debido a su rápida descomposición. Aunque se han explorado algunas alternativas para valorizar estos residuos via extracción de ingredientes bioactivos o generación de biocombustibles a partir de este tipo de residuos, el coste y la dificultad en la implementación de algunos de estos procesos, unidos a la generación adicional de residuos en los procesos, han limitado su aplicación. Por ello la mayor parte de este tipo de residuos siguen sin utilizarse para ningún proceso de valorización. No obstante, subproductos como los derivados de la industria sidrera y cervecera, entre otros, son ricos en componentes bioactivos, fibras y minerales, entre otros compuestos, que pueden ser de interés en la elaboración de nuevos alimentos saludables [2, 3]. Por ello, la valorización de estos residuos via transformación en nuevos alimentos puede ser una opción para reducir la generación de subproductos agroalimentarios a la par que contribuir a la producción de alimentos e ingredientes saludables y contribuir a un sistema alimentario más eficiente.

La fermentación se ha utilizado como estrategia sostenible en la elaboración de alimentos durante siglos. Además, la utilización de aproximaciones basadas en secuenciación y modelado metabólico al estudio de microbiomas en alimentos fermentados y en sus entornos de producción, ha abierto oportunidades al diseño avanzado de comunidades microbianas, adaptadas a la fermentación de matrices determinades y a la mejora dirigida de las propiedades del producto final. Su aplicación a la fermentación controlada de subproductos agroalimentarios puede representar una oportunidad para valorizarlos, generando alimentos o ingredientes saludables y contribuyendo a una mayor eficiencia del sistema de producción de alimentos [3-4]

A modo de ejemplo, subproductos como el bagazo de sidra y de cerveza son materiales ricos en pectinas y hemicelulosas, respectivamente, polisacáridos de interés tanto por sus propiedades tecnológicas como emulsificantes, como por ser precursores de oligosacáridos con propiedades prebióticas [5-6]. Prebióticos convencionales como fructooligosacaridos y galactooligosacaridos se obtienen a partir de residuos vegetales mediante procesos físico-quimicos y enzimáticos, si bien estos procesos tienen un bajo rendimiento. Alternativamente, la fermentación controlada mediante consorcios de microorganismos seleccionados en base a sus capacidades metabólicas ofrece oportunidades para controlar el grado de descomposición de los polisacáridos y la transformación de otros componentes presentes en el material de partida, lo que ofrece oportunidades para desarrollar nuevos alimentos fermentados, enriquecidos en ingredientes prebióticos, a partir de subproductos de origen vegetal [3-6]. Garantizar la seguridad y las propiedades nutricionales y funcionales de los productos fermentados, priorizando procesados energética, tecnológica y ambientalmente sostenibles, son clave para lograr implementar estos procesos para valorizar subproductos de origen vegetal, contribuyendo a la mejora de la

sostenibilidad y eficiencia de la producción de alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Esta línea de investigación desarrollada en el Grupo MicroHealth está financiada por los proyectos PID2022-141737OB-I00 y TED2021-131514B-I00, financiados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033, por FEDER, UE; y por la Unión Europea NextGenerationEU/ PRTR; y por el proyecto DOMINO financiado por el Programa Horizonte Europa (Grant agreement 101060218).

REFERENCIAS

[1] AICV & Global Data, European Cider Trends, **2020**, 1–13 (https://aicv.org/files/attachments/.407/AICV_Cider_Trends_2020.pdf)

[2] G Petit, E Korbel, V Jury, M Aider, S Rousselière, L Audebrand, S Turgeon, S Mikhaylin. ACS Sust Chem Engineer, **2020**, 8, 17335-17344.

[3] C Sabater, I Calvete-Torre, M Villamiel, F J Moreno, A Margolles, L Ruiz. Trends Food Sci Technol, **2021**, 118, 399-471.

[4] C Sabater, L Ruiz, S Delgado, P Ruas-Madiedo, A Margolles. Front Microbiol, **2020**, 20:11, 581997.

[5] I Calvete-Torre, C Sabater, A Montilla, F J Moreno, S Riestra, A Margolles, L Ruiz. LWT-Food Sci Technol, **2023**, 185, 115107.

[6] I Calvete-Torre, C Sabater, M J Antón, F J Moreno, S Riestra, A Margolles, L Ruiz. Food Hydrocol, **2022,** 133, 107958.

NEXT-GENERATION FOOD MICROBIOME RESEARCH: USE OF METAGENOMIC APPROACHES FOR CHARACTERIZING MICROBIAL COMMUNITIES IN FOODS (ESPECIALLY FERMENTED FOODS) AND ALONG THE FOOD CHAIN

Cotter, PD [1,2,3]

[1] Teagasc Food Research Centre, Moorepark, Fermoy, P61 C996, Co. Cork, Ireland.
[2] APC Microbiome Ireland, University College Cork, T12 YN60, Co. Cork, Ireland.
[3] VistaMilk SFI Research Centre, Moorepark, Fermoy, P61 C996, Co. Cork, Ireland

paul.cotter@teagasc.ie

Abstract

Microorganisms exist along the food chain and impact the quality and safety of foods in both positive and negative ways. Identifying and understanding the behaviour of these microbial communities enable the implementation of preventative or corrective measures in public health and food industry settings. Traditional culture-dependent microbial analyses are time-consuming and target only specific subsets of microbes. However, the greater use of culture-independent metagenomic approaches has the potential to facilitate a thorough characterization of the microbial communities along the food chain. Indeed, these methods have shown potential in contributing to outbreak investigation, ensuring food authenticity, assessing the spread of antimicrobial resistance, tracking microbial dynamics during fermentation and processing, and uncovering the factors along the food chain that impact food quality and safety. During the seminar, I will provide an overview of our research in these areas, while providing specific examples relating to specific foods and relevant food chain-related environments.

DIVERSIDAD DE ESTRATEGIAS COMPETITIVAS EN LEVADURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DURANTE LA FERMENTACIÓN

Alba Contreras-Ruiz A[1], Alonso-del-Real J[1], Torrat-Noves JC[1], Barrio E[1,2], Querol A[1]*

[1]Yeastomics Laboratory (SBYBI group), Food Biotechnology Department, IATA- CSIC, València, Spain
[2] Departament de Genètica, Universitat de València, València, Spain

*Corresponding author. Phone number: +34963900022 (ext 435324); Fax number: +34963636301; email: aquerol@iata.csic.es

Resumen / Abstract

España es uno de los mayores productores de vino en el mundo, a pesar de esta posición de liderazgo, el sector se enfrenta a nuevos retos, relacionados con la competencia internacional, los efectos del cambio climático y las nuevas demandas de los consumidores. De este modo, la utilización de especies no convencionales, incluidas especies del género Saccharomyces, está resolviendo parte de estas demandas. En este proyecto hemos avanzado en comprender como se comportan cepas vínicas de S. cerevisiae en co-cultivos con cepas de otras especies del género Saccharomyces, especies de interés en el sector por su capacidad de reducir el grado alcohólico y aumentar la acidez de los vinos.
Nuestros resultados demuestran que a pesar de que las cepas vinícas de S. cerevisiae presentan una mayor capacidad competitiva, presentan una amplia gama de comportamientos, así como dinámicas de absorción de nutrientes, lo que apunta a una naturaleza heterogénea de los procesos de domesticación. Cabe destacar que las cepas de S. cerevisiae altamente competitivas, en competencia aceleran la capacidad de consumir las fuentes de nitrógeno y la fermentación de azúcar se ralentizó a pesar de que la fermentación terminó al mismo tiempo. También hemos profundizado en conocer la respuesta molecular de S. cerevisiae en competencias mediante un estudio de expresión global. En las cepas buenas competidoras hemos observado una respuesta rápida a su competidor (a las 12h), incluida la activación de la vía glucolítica, el metabolismo ribosomal y la síntesis de nucleótidos. Además, el estudio destaca la necesidad de investigar cepas de levaduras individuales en lugar de una visión holística de la especie, ya que se observan variaciones significativas en las respuestas entre cepas del mismo clado.

Palabras clave / Key words

S. cerevisiae, S. kudriavzevii, vinificación, cocultivos, competencia, captación de nitrógeno, transcriptómica.

Las levaduras *Saccharomyces* alternativas, como *S. kudriavzevii* o *S. uvarum*, pueden ayudar a resolver algunos de los nuevos retos de la industria del vino. A pesar de las interesantes propiedades que presentan estas especies, uno de los problemas en su implantación durante las fermentaciones del vino es que tienen que competir con la microbiota de levaduras presente

de forma natural en los mostos, en particular con las cepas de *S. cerevisiae*, que son predominantes en la mayoría de las fermentaciones del vino. *S. uvarum* aparece de forma natural en las fermentaciones del vino realizadas a bajas temperaturas en regiones de clima frío (1), y solo en estas condiciones puede ser dominante e incluso sustituir a *S. cerevisiae* (2). Analizando el mejor enfoque para mejorar la dominancia de estas especies en la fermentación del vino, realizamos un análisis transcriptómico en la fermentación del vino con co-inoculaciones de *S. cerevisiae* y las otras dos especies (3). Nuestros resultados demuestran que las cepas vínicas de *S. cerevisiae* aceleran la captación de nutrientes para competir con la levadura co-inoculada y que es necesario el contacto célula a célula (3). También pudimos confirmar que la capacidad de ser buenas competidoras se observaba en la cepa vínicas de *S. cerevisiae*, ya que en el estudio se incluyó una cepa silvestre que mostró una respuesta notablemente baja a la competencia durante la fermentación del vino (2).

Para poder confirmar si esta respuesta era general para todas las cepas vínicas de *S. cerevisiae* estudiamos esta característica en 60 cepas de *S. cerevisiae* de diferentes orígenes, co-inoculadas con una cepa de *S. kudriavzevii* a 12°C. Se observó que las cepas de origen vínico eran las cepas mejores competidoras, pero una gran variabilidad en su comportamiento (4). En la Figura 1 se muestra un gráfico de barras con las proporciones de cada una de las cepas tras 96 horas de fermentación, coloreadas en función del grupo de origen al que pertenecen.

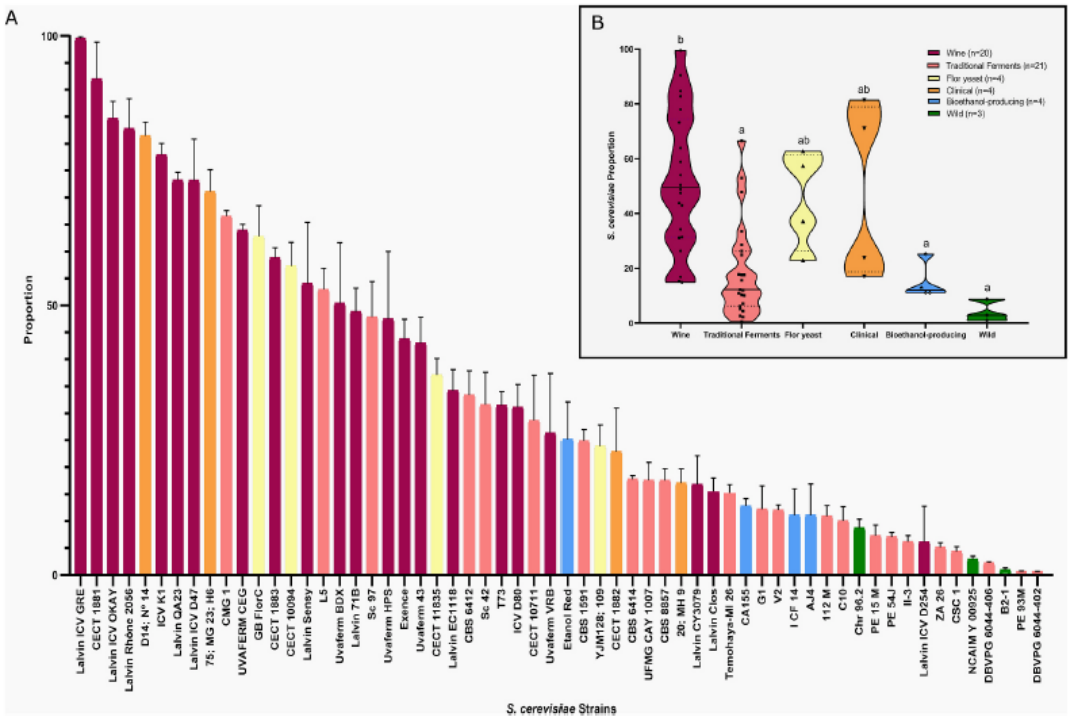


Figura 1. A) Proporción de cada cepa de *S. cerevisiae* a las 96 h de fermentación en competición. Los seis grupos relacionados con el origen ambiental de la cepa están representados por diferentes colores: vino (granate), clínica (naranja), bebidas fermentadas (rosa), levadura flor (amarillo), productora de bioetanol (azul) y silvestre (verde). B) Gráfica de violín que incluye los valores de la proporción de cepas de *S. cerevisiae* agrupadas según su origen ambiental. Los grupos marcados con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) según la prueba HSD de Tukey (prueba ANOVA). (Datos obtenidos de la referencia 4).

Para obtener un conocimiento más profundo sobre las características de las cepas con alta capacidad competitiva frente al resto, se realizaron microfermentaciones utilizando cepas representativas de cada grupo y se analizó la absorción de fuentes de carbono y nitrógeno, así como la respuesta transcripcional. En la Figura 2 se muestra el consumo de azúcares en co-cultivo y en cultivo puro y en la Figura 3 las diferencias en el consumo de diferentes fuentes de nitrógeno.

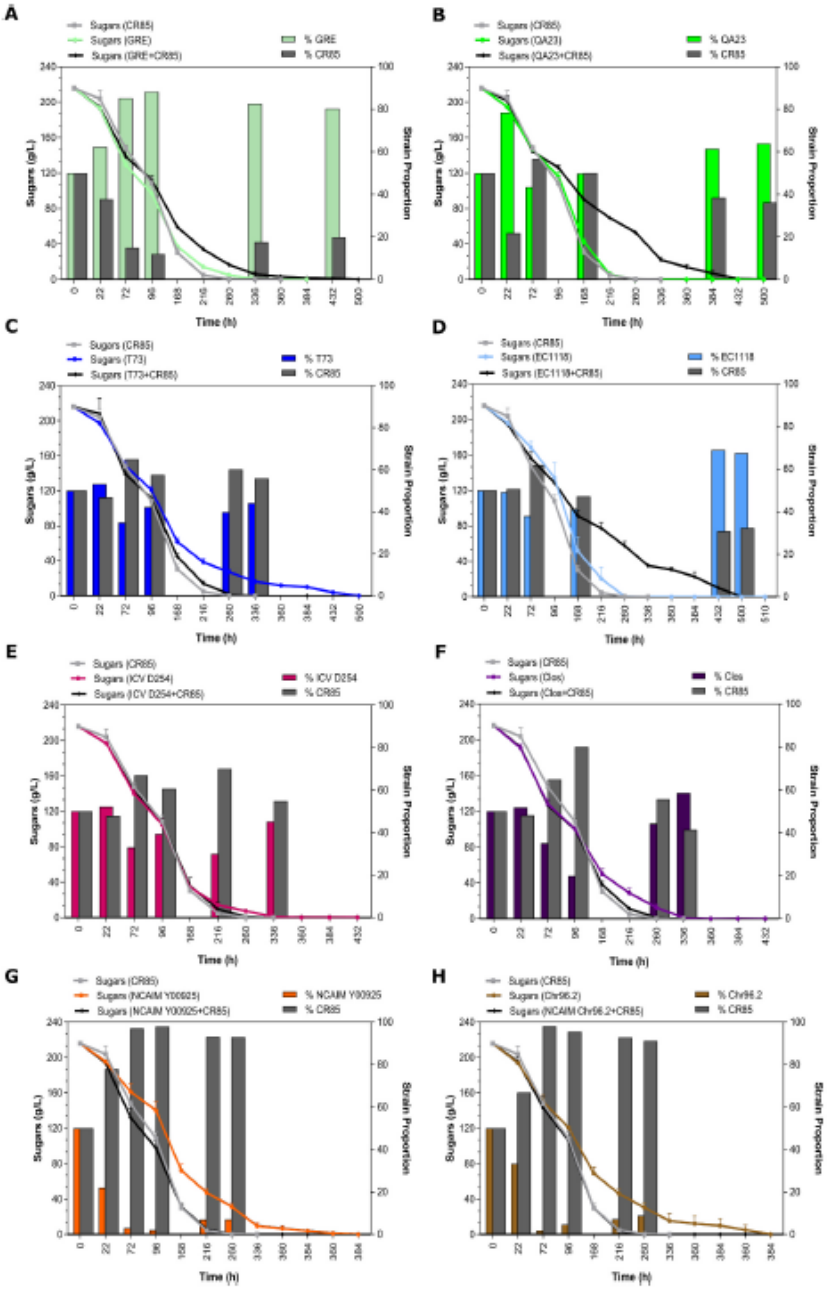


Figura 2. Perfiles de consumo de azúcares durante la fermentación con cultivos individuales de S. cerevisiae, S. kudriavzevii (CR85) y co-cultivos competitivos (representados por puntos unidos por líneas). Los valores son los valores medios de HPLC para las tres réplicas y las barras de error representan la desviación estándar. Las líneas grises representan CR85 en monocultivo, las líneas negras representan cocultivos competitivos y las líneas de otros colores (verde, azul, violeta y marrón) representan cepas de S. cerevisiae. A (GRE) y B (QA23) son cepas de vino con alta capacidad competitiva. C (T73) y D (EC1118) son cepas de vino con capacidad competitiva media. E (D254) y F (Clos) son cepas de vino con baja capacidad competitiva. G (NCAIM) y H (Chr96.2) son cepas silvestres con baja capacidad

competitiva. Las barras representan la media de la proporción alcanzada por cada cepa en las tres réplicas en 6 puntos de la fermentación competitiva realizada por co-cultivos CR85 + S. cerevisiae. La proporción en el momento 0 no se mide mediante qPCR. Se supone que es del 50%–50% porque se inocula la misma cantidad de células de cada especie. (Datos obtenidos de la referencia 4).

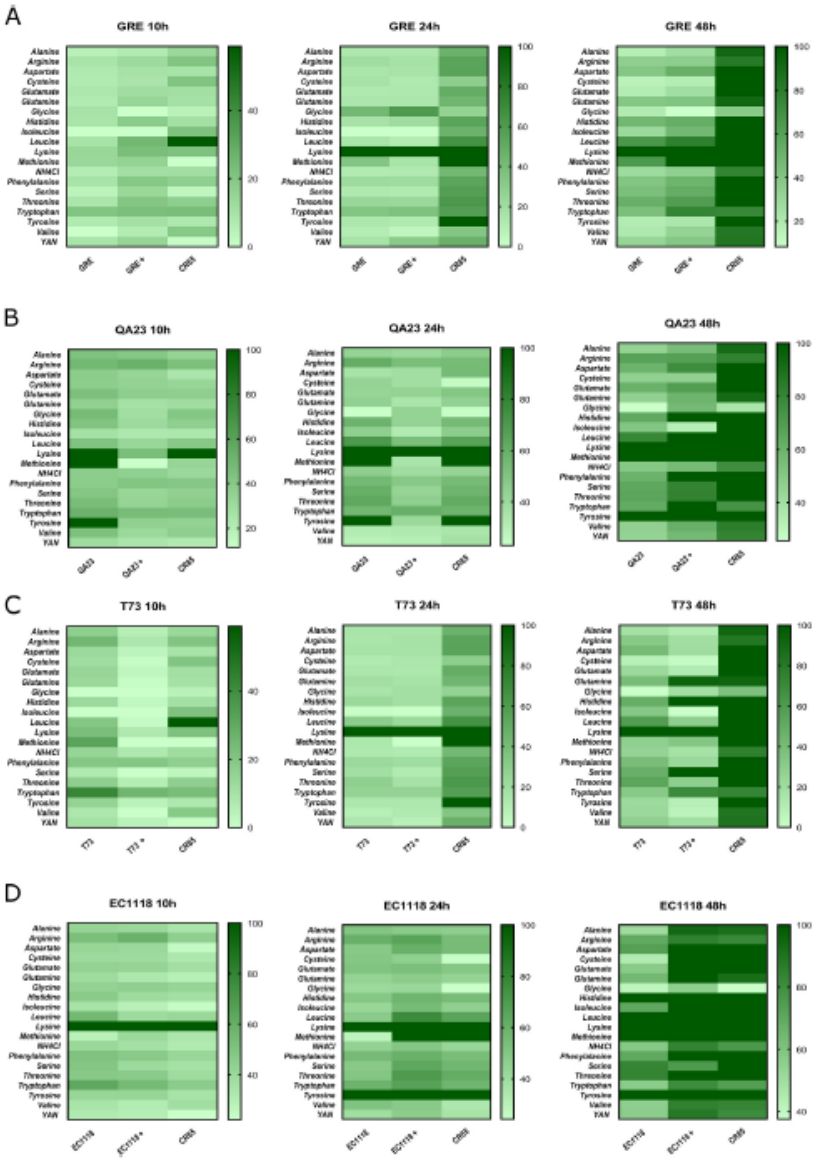


Figura 3. Mapa de calor del orden de consumo de las diferentes fuentes de nitrógeno incluyendo el consumo total de YAN. Se representan los tres puntos analizados, 10 h, 24 h, y 48 h para cada cepa de estudio. La gama de colores representa en verde claro un consumo mínimo y aumenta gradualmente la tonalidad de color hasta el verde oscuro a medida que aumenta el consumo, siendo el tono más oscuro el consumo total. Cada mapa de calor incluye el consumo de aminoácidos para las cepas de *S. cerevisiae* en monocultivo, el co-cultivo *S. cerevisiae* - *S. kudriavzevii*, representado con el nombre de la cepa de *S. cerevisiae* junto a un signo + y CR85 en monocultivo. Analizado en los 3 puntos de muestreo 10 h, 24 h y 48 h. (Datos obtenidos de la referencia 4).

Por último, hemos realizado un análisis transcriptómico durante las primeras etapas de la fermentación, cuando las cepas competidoras interactúan por primera vez. Este análisis se llevó a cabo en seis cepas vínicas de *S. cerevisiae* con diferentes capacidades competitivas, y dos cepas de *S. cerevisiae* silvestres frente a una cepa de *S. kudriavzevii* (5). En esta parte del trabajo hemos

podido demostrar que la respuesta no es generalizada para todas las cepas vínicas y que la respuesta a los estreses bióticos debidos a la competencia, deben estudiarse en el contexto específico de combinaciones particulares de cepas y condiciones de cultivo, en lugar de considerar *S. cerevisiae*, o incluso a un clado definido de *S. cerevisiae*, como uniforme. A pesar de su estrecha relación genética, las cepas vinícolas de *S. cerevisiae* muestran una alta variabilidad en la expresión génica. Esta variabilidad influye en sus respuestas competitivas en el entorno del mosto de uva. La activación temprana de la expresión génica de las vías glucolíticas y ribosomales, entre otras, en las mejores cepas competitivas sugiere que priorizan la replicación celular rápida.

AGRADECIMIENTOS

AC agradece al contrato FPU del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España (ref. FPU18/02933). El Proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España y EU ERDF-FEDER (PID2021-126380OB-C31 y PID2021-126380OB-C33) a AQ y EB, respectivamente. El IATA-CSIC recibe financiación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades del Gobierno de España ref. MCIN/AEI/10.13039/501100011033 como centro de Excelencia 'Severo Ochoa' (CEX2021-001189-S).

REFERENCIAS

[1] Querol A, Pérez-Torrado R, Alonso-Del-Real J, Minebois R, Stribny J, Oliveira BM, Barrio E. New Trends in the Uses of Yeasts in Oenology. Adv Food Nutr Res. 2018;85:177-210. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.03.002.

[2] Alonso-Del-Real J, Lairón-Peris M, Barrio E, Querol A. Effect of Temperature on the Prevalence of *Saccharomyces* non-*cerevisiae* Species against a *S. cerevisiae* Wine Strain in Wine Fermentation: Competition, Physiological Fitness, and Influence in Final Wine Composition. Front Microbiol. 2017 Feb 7;8:150. doi: 10.3389/fmicb.2017.00150. eCollection 2017.

[3] Alonso-Del-Real J, Pérez-Torrado R, Querol A, Barrio E. Dominance of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains over *S. kudriavzevii* in industrial fermentation competitions is related to an acceleration of nutrient uptake and utilization. Environ Microbiol. 2019 May;21(5):1627-1644. doi: 10.1111/1462-2920.14536. Epub 2019 Mar 10.

[4] Contreras-Ruiz A, Alonso-Del-Real J, Barrio E, Querol A. *Saccharomyces cerevisiae* wine strains show a wide range of competitive abilities and differential nutrient uptake behavior in co-culture with *S. kudriavzevii*. Food Microbiol. 2023 Sep;114:104276. doi: 10.1016/j.fm.2023.104276. Epub 2023 Apr 6.

[5] Contreras-Ruiz A, Alonso-Del-Real J, Torrat-Noves JC, Barrio E, Querol A. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* during competition with *S. kudriavzevii*: genetic expression variability and accelerated activation. Enviado LWT - Food Science & Technology.

KOMBUCHA: AN EXAMPLE OF SYMBIOTIC MICROBIAL CULTURE WITH MANY POTENTIAL

Villarreal-Sotto S., Beaufort S., I. Caceres, Barakat N., Bouajila J., Taillandier P.

Laboratoire de Génie Chimique, UMR 5503, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, 4 allée Emile Monso, CS84234, 31432 Toulouse Cedex 4, France

patricia.taillandier@toulouse-inp.fr

Resumen / Abstract

Kombucha is an increasingly consumed product sometimes considered as a nutraceutical. This product originated in Asia is a non-or-low-alcoholic functional beverage, slightly acidic and carbonated. It is obtained by the fermentation of sweetened tea by a symbiotic culture of bacteria and yeast, called SCOBY. These microorganisms as well as the chemical composiition is varying. However the main genus always present in komucha are for yeasts Brettanomyces and Zygosaccharomyces and for acetic acid bacteria Komagateibacter. In some studies lactic acid bacteria have also been reported. Some of these microrganisms have probiotic properties and can survive in the beverage once in bottle.

The chemical composiiton depends of course on the fermentation conditions and on the substrate. The main microbial metabolites are organic acids (acetic and glucuronic), ethanol, B and C vitamins. Many phenolic coumponds originated from tea but modified by the fermentation are always present at low concentration. All these coumpounds contributes to the numerous biological activities associated with Kombucha such as anti-oxydant, anti-inflammatory, anti-cholesterol,.... . Some of them have been demonstrated in vivo.

Non-typical substrates (fruits, vegetables, plants, herbs, dairy, and by-products) are being inoculated with the kombucha consortium in an attempt to develop new products with attractive properties.We will specifically present the resuls obtained wih grape pomace as substrate leading to extracts with anti-oxydant, antidiabetic and anti-inflammatory activites demonstrated in vitro.

Palabras clave / Key words

Symbiotic culture, acetic acid bacteria, yeasts, biological activities

What is kombucha?

Kombucha, an acidic beverage containing low concentration of ethanol, is made by fermentation of sweetened green or black tea with mixed consortia of bacteria and yeast known as a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY) [1]. During the fermentation, which lasts between 1 and 3 weeks, a solid-phase cellulosic pellicle is progressively formed (figure 1) due to the presence of at least ne cellulose-producing acetic acid bacterium (AAB).

Figure 1:
Kombucha et the end of fermentation (liquid and solid phases. View of the cellulose layer and AAB with MEB

Many studies have explored the microbial diversity in kombuchas. Despite the fact that many strains are found and change all along of the fermentation progress the main genus always present in kombucha are, for yeasts, *Brettanomyces* and *Zygosaccharomyces* and, for acetic acid bacteria, *Komagateibacter* (formerly *Gluconacetobacter*) which is responsible ofr cellulose prodcution [2]. The other genus very often encountered are *Schizosaccharomyces, Torulaspora, Saccharomyces , Acetobacter*. In some studies lactic acid bacteria have also been reported.

As an example the figure 2 is showing the microbial composiiton in the both phases of kombuchas prepared with balck tea ater 2 weeks of fermentation by different SCOBY [3].

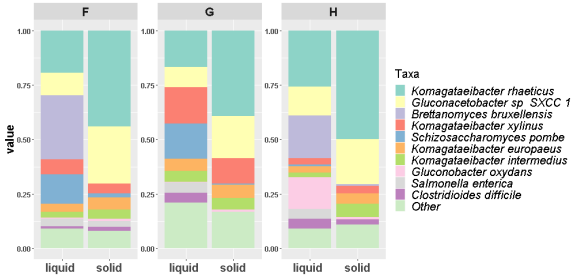


Figure 2: Taxonomic classification of microbial population in the solid and liquid phases of three different consortia after 15 days of fermentation.

A microbial symbiotic culture

There are a number of obstacles in understanding microbial ecosystems in Kombucha, the first one is the enormous diversity and complexity of the microbial community considered as a symbiosis. Most microbial species excrete metabolic products that can either stimulate or inhibit the specific growth rate of the other species, establishing commensalistic or amensalistic interactions which have to be extensively analyzed to achieve the comprehension of this phenomenon of coexistence. A synthetic overiew of these metabolic activites have been proposed (Figure 3) [4]. At the beginning of the fermentation yeasts hydrolyze sucrose into glucose and fructose, formerly the ethanol is produced by yeasts and finally acetic acid bacteria transform ethanol into acetic acid, nonetheless the production of gluconic and glucuronic acids is also remarkable. The AAB are also producinfg acetic acid from fructose in the aerobic conditions provided by the interfce solidpellicule/air.

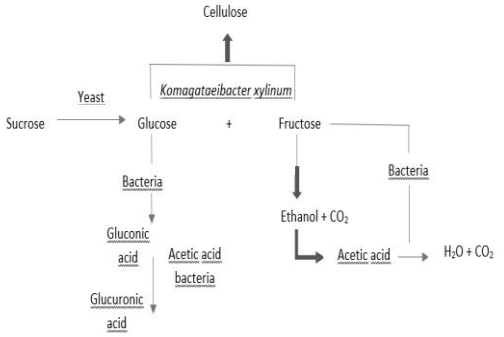


Figure 3: Main metabolic activities of the microorganisms in kombucha

Rather than a mutualistic relationship where both partners benefit, the *B. bruxellensis/Komagataeibacter* pairings studied appear to be closer to commensal interactions where bacteria benefit, while the yeast is largely unaffected [1]. Amensalism relationships have also been suggested between *Zygosaccharomyces* and *Komagateibacter.*

Chemical composiiton

The complex interactions among the different combination of yeast/bacteria, tea base, manufacturing process, create the potential for a wide diversity of bacterial and fungal compositions but also tea polyphenol levels, and metabolite contents of kombucha products. Variation in tea bases, bacteria/yeast starter cultures, and duration of fermentation may all contribute to the observed large differences in the microbial and chemical profiles of final kombucha products. Several chemical compounds with bioactive properties have been identified in kombuchas, such as organic acids (acetic, gluconic, citric and lactic), B and C vitamins, amino acids, minerals, phenols and polyphenols and DLS (D-saccharic-1,4-lactone) [5]. The phenolics compounds are always the main bioactive products and undergo many chemical transformation durning fermetnation [6].

Biological activities

The biological activities and potential health benefits of kombucha consumption have been widely studied. The most often reported are the following: anti-inflammatory, antioxidant, anti-bacterial, anti-diabetic, anticarcinogenic, reducing the concentration of cholesterol; and improving the liver metabolism, the immune system, and gastrointestinal functions [7]. Some of these effects could be due to the presence of probiotics in kombucha. Others properties such as detoxification, helps normal central nervous system function, immune stimulation, inhibiting cardiovascular disease and neurogenerative diseases and impact on liver and gastrointestinal function have also been suggested [8]. However, these effects have most of the time been studied *in vitro*, sometimes in animal models and very few tests in human have been carried out leading to controversial claims [9] and a need for legislation on this product [7]. Recently, some clinical trials were reviewed [10]; results on microbiota are contradictory and debatable, necessitating further investigation, but results on impact on diabetes are encouraging.

Kombucha from grape pomace

In the challenge of transforming waste into useful products that can be re-used in a circular economy perspective, winery by-products can be considered as a source of potentially bioactive molecules such as polyphenols. The wine industry generates each year 20 million tons of by-products. Then we focused on grape pomaces originated from red winemaking to propose a process to produce kombucha with this by-product [11]. Several parameters were varied during the fermentation process: temperature, pomace concentration, sugar concentration, temperature and duration.

The fermentation kinetics and final composition of grape Kombucha were monitored. Several biological activities were assessed *in vitro* at the beginning and at the end of fermentation: antioxydant, antidiabetic and anti-inflammatory. Depending on their physico-chemical and biological characteristics, some of the pomace Kombucha beverages were submitted to a sensory evaluation.

For all fermentation conditions the biological activities were increased, at least by a factor 2, at the end of fermentation compared to the non-fermented grape pomaces infusions. However according to their concentrations in sugar and total acidity, the grape pomace Kombuchas were not equally appreciated by the panellists. A majority of them preferred the Kombucha flavoured with natural fruity aroma.

This work confirmed the feasibility of making a grape pomace Kombucha beverage. Even if the kombucha fermentation improved the biological activities of this new beverage, results showed that there is no significant impact of the tested processing parameters on the biological activities *in vitro*. This new functional beverage consists into a new way of winemaking by-products valorisation. As for future perspectives, the organoleptic aspect must be improved. Another option would be the prodcutin of extracts form grape pomace mombucha to be used as ffod supplements or cosmetic ingredients.

ACKNOWLEDGMENT

A part of the work was supported by the French Région Occitane in the famework of the pre-maturation project Nutrigrape.

REFERENCES

[1] EA Landis, E Fogarty, JC Edwards, O Popa, AM Eren, Msystems, **2022,** 7, 3.

[2] K Harrison, C Curtin, Microorganisms, **2021**, 9, 1060.

[3] SA Villarreal-Soto, J Bouajila, M Pace, J Leech, PD Cotter, JP Souchard, P Taillandier, Int. J.Food Microbiol., **2020**, 333, 108778.

[4] S Markov, V Jerinic, D Cvetkovic, E Loncar, R Malbasa, Hemijska Industrija, **2003**,57(10) 456.

[5] B Milena Bortolomedi, CS Paglarin, F Cristiano Angonesi, Brod, Food Chemistry, **2022**, 382, 132719.

[6] J Yang, V Lagishetty, P Kurnia, SM Henning, AI Ahdoot, JP Jacobs, Nutrients, **2022**,14, 670.

[7] P Batista, MR Penas, M Pintado, P Oliveira-Silva, Foods **2022**, 11, 1977.

[8] J Kim, K Adhikari, Beverages **2020**, 6, 15.

9] CJ Greenwalt, KH Steinkraus, RA Ledford**,** J. Food Protection, **2000**, 63, 7, 976.

[10] C Aulesa, C Góngora, J CAM, Res Progress, **2024**, 2,(1): 115.

[11] N Barakat, J Bouajila,S Beaufort, Z Rizk, P Taillandier, Y El Rayess, Beverages, **2024**, 10, 29.

PREMIOS

ESTUDIO DE LAS RELACIONES ENTRE RESISTENCIA AL ESTRÉS, CAPACIDAD DE CRECIMIENTO Y VIRULENCIA EN EL GÉNERO *SALMONELLA*

Guillén S.[1], Cebrián G.[1]

1 Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 - (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, España.

silvia.guillen@unizar.es

Resumen

A pesar de la relevancia del género Salmonella*, a día de hoy existen aspectos de su fisiología que se desconocen, como la relación entre la resistencia al estrés, su patogenicidad y su capacidad de crecimiento. Estos aspectos son fundamentales para mejorar los procesos de inactivación y los planes de actuación en la cadena alimentaria. El objetivo de esta Tesis Doctoral fue estudiar la variabilidad en estos aspectos dentro del género* Salmonella*, así como las relaciones entre ellos. Se encontró que la variabilidad en resistencia al estrés y capacidad de crecimiento entre las 23 cepas de* Salmonella *estudiadas fue baja, y que la resistencia a un agente estresante no siempre se traduce en resistencia a otro. Además, no se observó una relación directa entre la resistencia al estrés y la virulencia de las cepas. En cuanto a los mecanismos de resistencia, se identificó una mutación en el gen* hnr *en 3 de las 5 variantes aisladas, que podría jugar un papel en la adquisición de resistencia. Al estudiar la capacidad de crecimiento de* Salmonella *en huevos y ovoproductos, se observó un fenómeno no descrito con anterioridad relacionado con la biodisponibilidad del hierro. Estos hallazgos contribuyen a una mejor comprensión de la fisiología de* Salmonella *y permiten desarrollar herramientas más efectivas para el control de este patógeno en la industria agroalimentaria.*

Palabras clave

Salmonella, variabilidad, estrés, tecnologías no térmicas, virulencia, biodisponibilidad hierro

Los microorganismos del género *Salmonella* constituyen a día de hoy la segunda zoonosis por consumo de alimentos con mayor número de casos confirmados en países occidentales. A pesar de ello, algunos aspectos de su fisiología todavía no están bien definidos. Entre estos aspectos deficientemente estudiados se encuentra la relación existente entre sus mecanismos de resistencia al estrés, su patogenicidad y su capacidad de crecimiento/competición [1], lo que resulta especialmente alarmante pues conocer estos fenómenos es imprescindible para poder diseñar mejores procesos de inactivación y/o planes de actuación a nivel de toda la cadena alimentaria.

Por ello se definió como objetivo general de esta Tesis Doctoral el siguiente: “estudiar y cuantificar la variabilidad intra-específica en

resistencia al estrés, capacidad de crecimiento y virulencia dentro del género *Salmonella* y determinar las relaciones existentes entre estas tres características fenotípicas con objeto de profundizar en el conocimiento de la fisiología de este microorganismo y de contribuir al desarrollo de modelos cuantitativos de análisis del riesgo más precisos". Para alcanzar dicho objetivo y verificar estas hipótesis se plantearon los siguientes objetivos parciales: 1) Caracterizar la resistencia frente a diferentes estreses (incluyendo nuevas tecnologías de conservación de los alimentos y estreses ambientales) de diferentes cepas y serovariedades de *Salmonella enterica*; 2) Caracterizar la capacidad de crecimiento y la virulencia (capacidad de adhesión e invasión de cultivos celulares) de diferentes cepas y serovariedades de *Salmonella enterica*; 3) Estudiar la relación existente entre la resistencia al estrés, la capacidad de crecimiento, la virulencia y otros aspectos fenotípicos de las diferentes cepas y serovariedades de *Salmonella enterica*; 4) Validar en condiciones/matrices reales (huevos y ovoproductos) los resultados más relevantes; 5) Explorar los mecanismos moleculares responsables de las diferencias fenotípicas observadas y 6) Sentar las bases para la optimización de la evaluación cuantitativa del riesgo que representa el consumo de un grupo de productos en el que *Salmonella* es el patógeno de referencia: huevos y ovoproductos.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que la variabilidad en resistencia al estrés y capacidad de crecimiento existente entre las 23 cepas de *Salmonella* estudiadas fue baja, con una diferencia de menos de 3,3 veces en el valor $2D/\mu max$ para todos los agentes y condiciones estudiadas (si se excluye del análisis la resistencia de *S*. Senftenberg 775W frente al calor) y que la variabilidad intra-serovar fue similar o mayor que la variabilidad inter-serovar, a pesar de la mayor proximidad genética existente entre las cepas pertenecientes a una misma serovariedad [2]. Además, se observó que, salvo en el caso de la resistencia a los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) y al medio osmótico, las cepas de *Salmonella* que mostraron una mayor resistencia frente a un agente/estrés no lo fueron frente a otros agentes/estreses y que la mayor resistencia al estrés no supuso un coste en términos de capacidad de crecimiento para las cepas de *Salmonella* estudiadas. Por otra parte, tampoco se observó ninguna relación entre la resistencia al estrés de las cepas y su virulencia. En relación a este punto, además, se comprobó que las cepas con una mayor capacidad de adhesión no fueron siempre las más invasivas [3].

Del estudio de los mecanismos responsables de las diferencias en resistencia entre las cepas de *Salmonella* se desprende que RpoS parece desempeñar un papel esencial en la resistencia de *Salmonella* al estrés osmótico, los PEAV y los UV-C [4]. Sin embargo, las diferencias en actividad RpoS existentes entre cepas no explicarían, al menos por sí solas, las diferencias en resistencia (frente a ningún agente) observadas entre las cepas de *Salmonella* aquí estudiadas. Un hecho especialmente relevante que se observó es que en tres de las cinco variantes resistentes aisladas/investigadas (obtenidas mediante la aplicación de ciclos sucesivos de un agente estresante y crecimiento) mostraron mutaciones en el gen *hnr*, un represor de RpoS, lo que sugiere que esto podría constituir una estrategia evolutiva

conservada (entre el género *Salmonella*) de adquisición de resistencia [5].

Por último, al estudiar la capacidad de crecimiento de *Salmonella* en huevo y ovoproductos se observó un fenómeno nunca antes descrito: que la dosis inicial y la historia térmica del huevo líquido entero y la clara determinan la velocidad de crecimiento de *S*. Enteritidis en estos ovoproductos, no ocurriendo esto en yema de huevo [6]. Y siendo un fenómeno que estaría relacionado con la biodisponibiidad del hierro que sería mayor en productos pasteurizados y cuanto mayor fuera el número inicial de células [7]. Estos resultados condujeron a que se hiciera una re-evaluación/determinación de la temperatura mínima de crecimiento de *S*. Enteritidis en estos productos, mediante la que se demostró que dicha temperatura mínima también dependería de la dosis inicial y la historia térmica del huevo entero líquido y la clara, pero no en yema de huevo [8]. Por otra parte, se verificó que, para la mayoría de los agentes/tecnologías de conservación estudiadas se observó una correlación significativa entre la resistencia determinada en medios de laboratorio y en matrices reales (alimentos y gallinaza) [9]. Finalmente, en un intento de demostrar la utilidad de los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral para la mejora de las evaluaciones del riesgo y la toma de decisiones en la industria agro-alimentaria se simularon distintos escenarios con objeto de determinar el riesgo relativo asociado a cuatro serovariedades emergentes en ganado aviar, en comparación con *S*. Enteritidis, observándose que las primeras no supondrían un riesgo para la salud humana superior a *S*. Enteritidis, al menos en los escenarios estudiados/simulados en esta Tesis Doctoral.

En resumen, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral contribuyen a una mejor compresión de la fisiología de *Salmonella* y permiten estimar la variabilidad en resistencia, capacidad de crecimiento y virulencia, así como las relaciones existentes entre estas características fenotípicas, que existe a diferentes niveles dentro de este género. Todo ello permitirá, como ya se ha demostrado en esta misma Tesis, desarrollar herramientas más eficaces tanto para la toma de decisiones como para el control de este patógeno en la cadena agro-alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación del MINECO-CICYT, proyecto AGL2017-84084-R, y del Instituto de Estudios del Huevo, proyecto "Caracterización de la resistencia al estrés y a los tratamientos tecnológicos, de la capacidad de crecimiento y del potencial patógeno de Salmonella Heidelberg, Salmonella Kentucky, Salmonella Livingstone y Salmonella Mbandaka" que recibió el premio a la investigación de este instituto en 2018.

REFERENCIAS

[1] S. Guillén, L. Nadal, I. Álvarez, P. Mañas, G. Cebrián, *Foods.*, **2023**, *10*, 1617.

[2] S. Guillén, M. Marcén, P. Mañas, G. Cebrián, *Food Res. Int*., **2020**, *132*, 109042.

[3] S. Guillén, M. Marcén, E. Fau, P. Mañas, G. Cebrián, *Int. J. Food Microbiol*., **2022**, *361*, 109462.

[4] S. Guillén, L. Nadal, N. Halaihel, P. Mañas, G. Cebrián, *Food Microbiol.*, **2023**, *113*, 104285.

[5] S. Guillén, L. Nadal, N. Halaihel, P. Mañas, G. Cebrián, *Pendiente de publicación.*

[6] S. Guillén, M. Marcén, I. Álvarez, P. Mañas, G. Cebrián, *Foods.*, **2023**, *10*, 1621.

[7] S. Guillén, G. Cebrián, *Food Microbiol.*, **2022**, *113*, 104008.

[8] S. Guillén, L. Domínguez, P. Mañas, I. Álvarez, E. Carrasco, G. Cebrián, *Int. J. Food Microbiol*., **2024**, *361*, 109462.

[9] S. Guillén, M. Marcén, I. Álvarez, P. Mañas, G. Cebrián, *Int. J. Food Microbiol*., **2020**, *361*, 108884.

CARACTERIZACIÓN Y CONTROL DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS Y DE LOS BIOFILMS EN BACTERIAS PATÓGENAS DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: HACIA EL ENFOQUE UNA SALUD

Autor: Rodríguez Melcón, Cristina[1,2]

Directores: Capita González, Rosa[1,2], Alonso Calleja, Carlos[1,2]

1 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071-León, España.
2 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León, Calle La Serna, nº 58, 24007-León, España.

crodm@unileon.es; rosa.capita@unileon.es; carlos.alonso.calleja@unileon.es

Resumen / Abstract

La resistencia a los antibióticos es un problema mundial de primera magnitud e importancia creciente, que afecta a la salud humana, a la sanidad animal y al medioambiente. En investigaciones previas se ha observado que la exposición a dosis bajas de algunos compuestos ampliamente usados en la Industria Alimentaria como aditivos, descontaminantes o desinfectantes, puede reducir la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos. Es esencial determinar qué biocidas pueden contribuir a la emergencia de resistencia a los antibióticos, así como conocer las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y las concentraciones mínimas bactericidas (MBCs) de dichos compuestos. La inmensa mayoría de las células microbianas se encuentran formando parte de biopelículas o biofilms. Estas estructuras, que se pueden formar en diversas superficies de las industrias alimentarias, son una fuente importante de contaminación de los alimentos con microorganismos patógenos y alterantes y, dada su elevada resistencia a los desinfectantes, favorecen la persistencia microbiana en los entornos de procesado de alimentos. Por ello, es necesario mejorar el conocimiento sobre la arquitectura y viabilidad de los biofilms en diferentes condiciones, así como identificar nuevos compuestos o materiales que permitan el control de estas estructuras.

Palabras clave / Key words:

One Health, biofilms, resistencia a antibióticos, biocidas

Esta Tesis Doctoral se encuadra en el enfoque "Una Salud" (Figura 1) y ha tenido como objetivo general contribuir a la caracterización y el control de la resistencia a antimicrobianos y de los biofilms en bacterias zoonósicas transmitidas por alimentos. Los 10 objetivos principales y las conclusiones de la Tesis Doctoral, que se ha estructurado en 13 capítulos, se indican a continuación.

En primer lugar, se pretendió ampliar el conocimiento sobre la susceptibilidad de *Listeria monocytogenes* a

diferentes biocidas y antibióticos mediante el estudio de las concentracions mínimas inhibitorias (MICs) y de las concentracions mínimas bactericidas (MBCs). Se observó una elevada prevalencia de resistencia a antibióticos en las cepas estudiadas, hecho que pone de manifiesto la importancia de adoptar medidas encaminadas a controlar la resistencia de este microorganismo a los antimicrobianos, especialmente teniendo en cuenta la necesidad de tratamiento con antibióticos en los casos de listeriosis invasiva. Las correlaciones positivas encontradas entre las MICs y las MBCs de biocidas y antibióticos con distintos modos de acción apuntan a la presencia de mecanismos de resistencia cruzada o de co-resistencia.

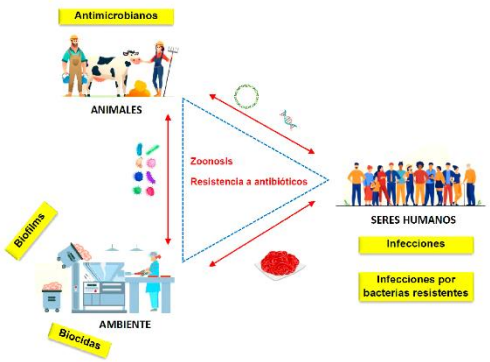


Figura 1: Algunos aspectos del enfoque Una Salud, en relación con las zoonosis y la resistencia a los antibióticos (Fuente: Rodríguez-Melcón *et al.*, 2024).

El segundo objetivo fue determinar si la exposición a dosis bajas de biocidas puede modificar la susceptibilidad a los antibióticos o a otros biocidas en cepas de *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (VRE). Se puso de manifiesto que el contacto con concentraciones subinhibitorias de algunos aditivos, descontaminantes o desinfectantes provoca una reducción de la susceptibilidad de las bacterias a los compuestos, la adaptación cruzada a otros biocidas y un aumento de su resistencia a los antibióticos, a la vez que modifica la hidrofobicidad de la superficie celular (aspecto que se encuentra relacionado con la capacidad de las bacterias para formar biofilm). Por ello, debería evitarse el uso de concentraciones subinhibitorias de biocidas en los entornos de procesado de alimentos.

En tercer lugar, se ha valorado la utilidad de la técnica de citometría de flujo para determinar si la adaptación previa a determinados biocidas modifica el porcentaje de células de *L. monocytogenes* supervivientes a distintos tratamientos con tetraciclina. Se ha comprobado que la citometría de flujo es una técnica útil, rápida y sencilla para estudiar la resistencia a los antibióticos de las bacterias sometidas a diferentes condiciones. Mediante este método se ha observado que el contacto de *L. monocytogenes* con dosis bajas de cloruro de benzalconio y, especialmente, de ácido peracético, incrementa la resistencia de las células bacterianas a la tetraciclina.

El cuarto objetivo fue conocer la prevalencia, los niveles y los patrones de resistencia a antibióticos de *L. monocytogenes* en carne de pollo en el noroeste de la Península Ibérica (España y Portugal). Se detectaron células de *L. monocytogenes* en algún estado fisiológico (viables cultivables, viables no cultivables o inactivadas) en el 85% de las muestras analizadas (Figura 2). El método clásico de detección de *L. monocytogenes* en alimentos (UNE-EN ISO 11290-1:2018) tiene la limitación de que no permite detectar las células viables no cultivables. Por otro lado, la q-PCR, técnica para la que se ha encontrado un límite de detección de 2,15 log_{10} ufc/g, no es útil cuando la bacteria está presente en bajas concentraciones. Estas

circunstancias reflejan la conveniencia de combinar ambas técnicas (dependiente e independiente de cultivo) para mejorar la detección de *L. monocytogenes* en alimentos. Todas las cepas presentaron resistencia a varios antibióticos (entre 3 y 7).

Figura 2: Resumen gráfico del cuarto objetivo desarrollado (Fuente: Rodríguez-Melcón *et al.*, 2022).

Por otra parte, se determinó el efecto de diferentes aditivos sobre la prevalencia y los patrones de resistencia a antibióticos de *L. monocytogenes* en carne de pollo picada. De los tres aditivos alimentarios añadidos a la carne, nitrito sódico, nisina y ácido láctico, únicamente el último redujo los niveles microbianos en las condiciones de aplicación. Por otro lado, los tres compuestos provocaron un aumento de los niveles de resistencia a antibióticos en las cepas de *L. monocytogenes* presentes de forma natural en la carne.

El sexto objetivo se centró en determinar la arquitectura y la viabilidad de las biopelículas formadas por varias especies bacterianas sobre distintas superficies de contacto a diferentes tiempos y temperaturas de incubación. El análisis de los parámetros estructurales (determinados con el programa informático BioRCA, desarrollado por el grupo de investigación SEGURALI, de la Universidad de León) y de las reconstrucciones tridimensionales de los biofilms de *S. enterica*, *L. monocytogenes*, MRSA y VRE, estudiados por microscopía láser confocal de barrido (CLSM), indica que estos microorganismos forman biopelículas compactas sobre poliestireno y vidrio en 24 horas, hecho que pone de manifiesto la necesidad de realizar la desinfección de las superficies y equipos inmediatamente tras su uso con el objeto de prevenir la formación de biofilms por estas bacterias patógenas. En vidrio, y sobre todo en grafeno, las biopelículas producidas presentan el menor biovolumen, por lo que los recubrimientos de monocapa de grafeno pueden ser de utilidad práctica para reducir la formación de biofilms por esta bacteria.

El séptimo objetivo fue conocer la distribución espacial y el biovolumen de las bacterias en biofilms monoespecie y mixtos (formados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas), a lo largo de 10 días de incubación a 10 °C. Se ha comprobado que el biovolumen y la distribución de las bacterias en los biofilms depende de la presencia de otros grupos microbianos. Los biofilms mixtos presentan un modelo espacial de doble capa, con las bacterias Gram-positivas (*L. monocytogenes*, MRSA o VRE) en el fondo del biofilm y las células de *S. enterica* situadas la capa superior (Figura 3). Este patrón de distribución en dos capas debería tenerse en cuenta a la hora de desarrollar procedimientos efectivos de desinfección.

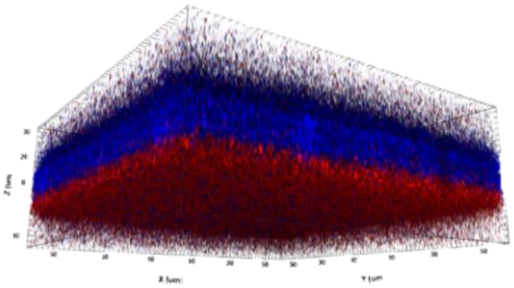


Figura 3: Proyecciones tridimensionales de un biofilm mixto formado por *Salmonella* Agona (azul) y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VRE, rojo) tras 120 horas de incubación a 10 °C (Fuente: Rodríguez-Melcón *et al*., 2021).

El octavo objetivo consistió en determinar, mediante CLSM, el efecto de concentraciones bajas de hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio sobre los biofilms de *L. monocytogenes*. A concentraciones de 1,5 MIC, el cloruro de benzalconio reduce marcadamente la biomasa, pero no la viabilidad, de las biopelículas de *L. monocytogenes*. Estos resultados sugieren que podría producirse el desprendimiento de células vivas de las biopelículas tratadas con concentraciones bajas de este desinfectante, lo que implicaría la posible diseminación de bacterias vivas a partir del biofilm, con el consiguiente riesgo para la Salud Pública.

El noveno objetivo ha sido determinar, mediante CLSM, el efecto de varias concentraciones de hipoclorito de sodio y cloruro de benzalconio sobre la capacidad de *L. monocytogenes* para formar biofilms. Las concentraciones bajas de cloruro de benzalconio pueden favorecer el desarrollo de biopelículas en cepas de *L. monocytogenes* resistentes a este compuesto, en diferente medida según los mecanismos de resistencia involucrados. Se trata de un hallazgo destacable, teniendo en cuenta que la formación de biopelículas juega un papel importante en la persistencia de este microorganismo en las instalaciones de procesado de alimentos. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de aplicar concentraciones de biocidas adecuadas con el objeto de prevenir la formación de biopelículas por *L. monocytogenes.*

El décimo y último objetivo se centró en conocer el efecto de diferentes concentraciones del bacteriófago P100 sobre las biopelículas de *L. monocytogenes*. Se ha demostrado la potencial utilidad de este fago como una alternativa eficaz para el control y erradicación de los biofilms formados por *L. monocytogenes*, con óptimos resultados a concentraciones iguales o superiores a 8 $\log_{10}$ ufp/ml.

Los resultados de esta Tesis Doctoral permiten una mejor comprensión de los fenómenos de resistencia a los antibióticos, tolerancia a los biocidas y capacidad para formar biofilm en bacterias zoonósicas sometidas a diferentes condiciones. Este conocimiento puede ser de utilidad para optimizar las estrategias encaminadas al control de estos desafíos para la Salud Pública, tanto en la Industria Alimentaria como en el Sistema Sanitario.

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (INIA; RTA2014-00045-C03-02), Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-098267-R-C33) y Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Proyectos LE164G18 y LE018P20). Cristina Rodríguez Melcón ha sido beneficiaria de una ayuda de la Junta de Castilla y León destinada a financiar la contratación predoctoral de personal investigador, cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

REFERENCIAS

[1] Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. Food Frontiers, https://doi.org/10.1002/fft2.458, **2024**, 1–29.

[2] Rodríguez-Melcón, C., Esteves, A., Panera-Martínez, S., Capita, R. Alonso-Calleja, C. Antibiotics, https://doi.org/10.3390/antibiotics11121828 **2022**, 11(12), 1828.

[3] Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Hernando, A., Riesco-Peláez, F., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. Food Microbiology, https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103616, **2021**, 94, 1036.

ORALES

EVOLUCIÓN DEL MICROBIOMA Y RESISTOMA DEL LOMO Y SOLOMILLO DE CERDO A LO LARGO DE SU CADENA DE PRODUCCIÓN Y DE SU VIDA ÚTIL

Fernández-Trapote E.[1], Cobo-Díaz JF.[1], Cordero-García R.[1], Oliveira M.[1], Puente A.[1], Berdejo D.[1,3], Puente H.[2], Arguello H.[2], Álvarez-Ordóñez A.[1]

1 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos e Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, 24071, León, España
2 Departamento de Sanidad Animal, Universidad de León, 24071, León, España
3 Departamento de Producción Animal y Ciencia Alimentaria, Universidad de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, 50013 Zaragoza, España (centro de trabajo actual)

jcobd@unileon.es

Resumen / Abstract

La microbiota tiene un gran impacto en la calidad y seguridad de los alimentos cárnicos, pero se sabe poco sobre la diversidad microbiana presente en mataderos e industrias cárnicas, la cual puede llegar al producto final a través de diferentes superficies de contacto. También es importante la posibilidad de que estas superficies sirvan como reservorios de microorganismos con resistencia a antimicrobianos, lo que podría facilitar la entrada de genes de resistencia a antimicrobianos (GRA) en la cadena alimentaria.

El objetivo ha sido caracterizar la microbiota y su resistoma de una industria cárnica porcina, evaluando la evolución de la microbiota en las fases de sacrificio y despiece y siguiendo hasta el final de vida útil dos piezas de carne (solomillo y lomo). Además, se ha estudiado la influencia de las diferentes superficies de contacto y no contacto de la industria en la dinámica microbiana y del resistoma. Para ello se recolectaron 221 muestras que se analizaron mediante secuenciación metagenómica.

Un análisis de SourceTracker determinó que la composición bacteriana de las medias canales después del oreo se veía influenciada por las superficies del matadero, con un aporte de Anoxybacillus flavithermus y Acinetobacter johnsonii desde la zona sucia del matadero, y de Brevibacterium auranticum y Psycrobacter sp. desde la sala de oreo. Además, las superficies de la sala de despiece representaron una fuente de Pseudomonas lundensis, Brochothrix thermosphacta, Leuconostoc gelidum y Lactilactobacillus sakei, que mostraron elevadas abundancias relativas al final de la vida útil.

La gran abundancia de GRA en la canal recién sacrificada disminuye notablemente a lo largo de la cadena de producción, desde el sacrificio al despiece y envasado de la carne, aunque las superficies muestreadas podrían actuar como reservorios de GRA. Destaca la presencia de GRA frente a tetraciclinas en regiones plasmídicas y frente a betalactámicos y aminoglicósidos en regiones cromosómicas asociadas a Acinetobacter en las superficies de la sala de despiece.

Palabras clave / Key words

Metagenomas, m*icrobioma, ambientes de procesado de alimento,* genes de resistencia a antimicrobianos

En el presente trabajo se analizó el microbioma y resistoma (conjunto de genes de resistencia a antimicrobianos) de una industria cárnica que incluye matadero y sala de despiece, y donde se llegan a procesar 700 cerdos por hora. Se muestrearon 20 cerdos, procedentes de 4 granjas distintas, desde justo después del sacrificio hasta el final de la vida útil de 2 piezas de carne: lomo y solomillo. Además, diferentes muestras ambientales fueron tomadas para inferir la influencia del ambiente en la microbiota de los productos cárnicos.

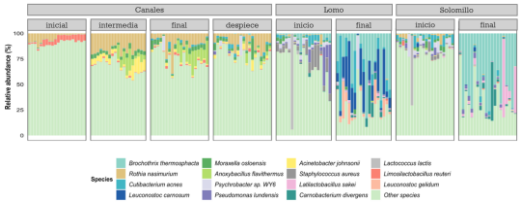


Figura 1: Abundancia relativa de las especies bacterianas mayoritarias en canales y productos cárnicos.

El análisis taxonómico global de las muestras de canales y carnes mostró una alta prevalencia de *Rothia nasimurium* y *Limosilactobacillus reuteri* tras el sacrificio (canal inicial), junto a *Anoxybacillus flavithermus*, *Moraxella osloensis* y *Acinetobacter johnsonii* en las mismas canales muestreadas durante la línea de procesado (Fig. 1), siendo *Anoxybacillus, Moraxella* y *Psychrobacter* previamente encontrados como los géneros más abundantes en ambientes de industria cárnica (Zwirzitz *et al.*, 2020). La gran variabilidad de especies encontrada en lomo y solomillo al inicio de la vida útil es desplazada por una clara dominancia de *Brochothrix thermosphacta*, *Leuconostoc carnosum* y *Latilactobacillus sakei* en dichos productos al final de su vida útil, los cuales parecen provenir de las superficies de contacto con el alimento, como indican los resultados obtenidos del análisis de SourceTracker (Fig. 2). Dentro de éstas, *B. thermosphacta* y *L. carnosum* son típicas bacterias alterantes de productos cárnicos (Nychas *et al.*, 2008), mientras que *L. sakei* es prevalente en ciertos productos cárnicos e incluso comúnmente empleado como cultivo iniciador (Montarnari et al., 2018).

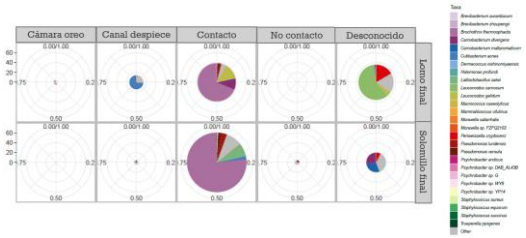


Figura 2: Análisis de SourceTracker de los productos finales después de su vida útil. En columnas se indican posibles fuentes de la microbiota de las muestras indicadas en filas. El tamaño del círculo es proporcional al porcentaje de influencia mientras que las porciones coloreadas indican el nivel de influencia de la especie correspondiente.

Además, el análisis de SourceTracker determinó que la composición bacteriana de las medias canales después del oreo se veía influenciada por las superficies del matadero, con un aporte de *Anoxybacillus flavithermus* y *Acinetobacter johnsonii* desde la zona sucia del matadero, y de *Brevibacterium auranticum* y *Psycrobacter* sp. desde la sala de oreo (Fig. 3).

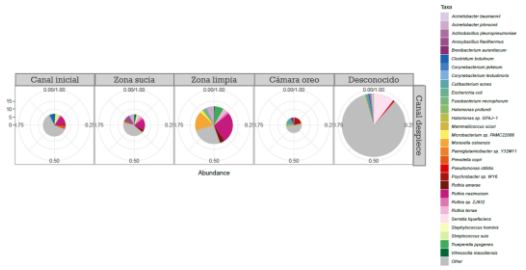


Figura 3: Análisis de SourceTracker de la canal antes de entrar en la sala de despiece y corte. En columnas se indican posibles fuentes de la microbiota de las muestras indicadas en filas. El tamaño del círculo es proporcional al porcentaje de influencia mientras que

las porciones coloreadas indican el nivel de influencia de la especie correspondiente.

Al realizar el análisis del resistoma, se observó una gran abundancia de genes de resistencia a antimicrobianos (GRA) en la canal recién sacrificada, principalmente asociados a resistencias a tetraciclinas, disminuyendo dicha cantidad de GRA a lo largo de la cadena de producción (Fig. 4). Dicha prevalencia de resistencias a tetraciclinas, junto a aminoglicosidos y beta-lactámicos, ha sido observada anteriormente en industrias cárnicas (Cobo-Díaz *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022; Alvarez-Molina *et al.*, 2023), y se puede deber al uso extendido de este tipo de antimicrobianos en el sector porcino (Lekagul *et al.*, 2019).

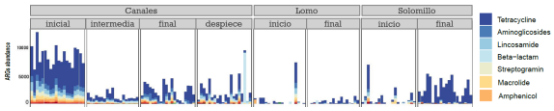


Figura 4: Abundancia de GRA en muestras de canales y piezas cárnicas, clasificadas según la qué familia de antimicrobianos a la que confieren resistencia. Los valores indican conteos por millón de secuencias.

Finalmente, en el estudio del resistoma a nivel de *contigs* se observó que los GRA que confieren resistencia a tetraciclinas, principalmente encontrados en regiones plasmídicas, y los que confieren resistencia a beta-lactámicos, mayormente en regiones cromosómicas, están principalmente asociados a *Acinetobacter* y fueron encontrados sobre todo en las superficies del matadero. Los GRA de resistencia a aminoglicósidos fueron encontrados en la sala de despiece, también asociados a *Acinetobacter* (Fig. 5). Dicha prevalencia de *Acinetobacter* dentro del resistoma de una industria cárnica ha sido descrita anteriormente tanto mediante técnicas metagenómicas (Cobo-Díaz *et al.*, 2021) como de cultivo de cepas (Lupo et al., 2014; Carvalheira *et al.*, 2017).

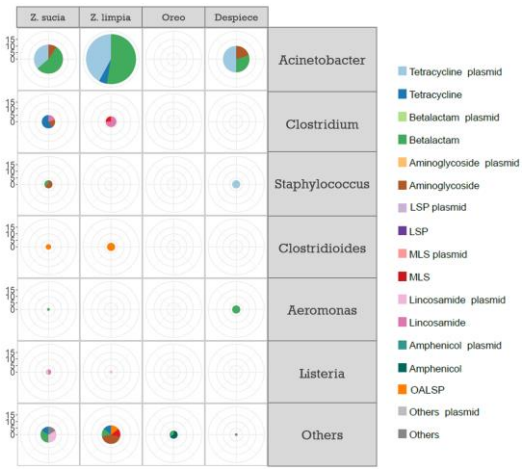


Figura 5: Análisis del resistoma a nivel de *contigs*. El tamaño del círculo es proporcional al número de *contigs* encontrados por tipo de muestra (columna) y se asignaron al género indicado en las filas. Las fracciones de color indica a qué familia de antimicrobiano confieren resistencia los genes encontrados, y en el caso de haber sido encontrados en plásmidos se indica con la terminación "plasmids". O: oxalidizona, A: anfenicol, L: lincosamida, M: macrólidos, S: estreptomicina, P: polimixina.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la industria cárnica que nos dio la oportunidad de realizar el muestreo intensivo y exhaustivo que nos permitió seguir 20 cerdos a lo largo de toda la línea de producción incluyendo el final de la vida útil de los lomos y solomillos.

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Europea bajo el programa de investigación e innovación Horizonte 2020, de la Unión Europea, mediante el acuerdo de subvención no. 818368 (MASTER); y por el Programa Estatal de Generación de Conocimiento y Fortalecimiento Científico y Tecnológico del Sistema de I+D+i y de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad, con código de proyecto PID2020-118813GB-I00.

REFERENCIAS

[1] B. Zwirzitz, S.U. Wetzels, E.D. Dixon, B. Stessl, A. Zaiser, I. Rabanser, S. Thalguter, B. Pinior, F.-F. Roch, C. Strachan, J. Zanghellini, M. Dzieciol, M. Wagner, E. Selberherr. NPJ Biofilms Microbiomes, **2020**, 6, 26.

[2] G.-J.E. Nychas, P.N. Skandamis, C.C. Tassou, K.P. Koutsoumanis. Meat Sci, **2008**, 78(1-2), 77-89.

[3] C. Montanari, F. Barbieri, M. Magnani, L. Grazia, F. Gardini, G. Tabanelli. Front Microbiol, **2018**, 9, 2003.

[4] J.F. Cobo-Díaz, A. Alvarez-Molina, E.A. Alexa, C.J. Walsh, O. Mencía-Ares, P. Puente-Gómez, E. Likotrafiti, P. Fernández-Gómez, B. Prieto, F. Crispie, L. Ruiz, M. González-Raurich, M. López, M. Prieto, P. Cotter, A. Alvarez-Ordóñez. Microbiome, **2021**, 9, 204.

[5] L. Li, Y. Xiao, C. Wang, R.H. Olsen, H. Meng, L. Shi. Int J Food Microbiol, **2022**, 371, 109674.

[6] A. Alvarez-Molina, J.F. Cobo-Díaz, E.A. Alexa, F. Crispie, M. Prieto, M. López, P.D. Cotter, A. Alvarez-Ordóñez. Food Res Int, **2023**, 173, 113442. et al., 2023

[7] A. Lekagul, V. Tangcharoensathien, S. Yeung. Vet Anim Sci, **2019**, 7, 100058.

[8] A. Lupo, D. Vogt, S.N. Seiffert, A. Endimiani, V. Perreten. J Food Prot, **2014**, 77(11), 1976-1981.

[9] A. Carvalheira, R. Casquete, J. Silva, P. Teixeira. Int J Food Microbiol, **2017**, 243, 8-63.

BACTERIÓFAGOS PARA EL CONTROL DE AISLADOS DEL *ENTEROBACTER CLOACAE COMPLEX* EN VEGETALES FRESCOS

Alberto Pintor-Cora[1], Andrea Carpintero[1], Ángel Alegría[1], José María Calleja[1], Jesús A. Santos[1]

1 Departamento de Higiene y tecnología de los alimentos, Universidad de León

apintc@unileon.es , acarpp00@estudiantes.unileon.es , aaleg@unileon.es, jm.rcalleja@unileon.es, j.santos@unileon.es

Resumen /Abstract

El Enterobacter cloacae complex *(ECC) es un grupo de patógenos oportunistas usualmente resistente a antibióticos que está presente con frecuencia en vegetales. Los bacteriófagos se plantean como una alternativa para el control del ECC en estos productos. Los virus fueron aislados a partir de efluentes bovinos mediante siembra en TSB semisólido y purificados a partir de las placas líticas observadas, obteniendo un fago con efectividad frente a todas las cepas antibiorresistentes del ECC estudiadas (n=24). El fago obtenido fue identificado mediante microscopía electrónica de transmisión y secuenciación de los genes que codificaban las* major capsid proteins *(MCPs), siendo asignado a la subfamilia* Vequintavirinae*. La estabilidad del fago frente a diferentes condiciones (% NaCl y pH) fue evaluada mediante el equipo Biotrac, observando un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de la bacteria huésped en rangos de pH 5-7 y 0,5-2,0 % de NaCl . La efectividad del fago fue, además, evaluada mediante recuento de supervivientes sobre hojas de lechuga, obteniendo reducciones de hasta 1,1 log.*

Palabras clave / Key words

Fagos, biocontrol, Enterobacter, vegetales, resistencia a antimicrobianos

La cadena alimentaria actúa como una vía crucial de diseminación de patógenos antibiorresistentes desde entornos animales, antropogénicos y ambientales hasta el consumidor. Dentro de estas bacterias, el *Enterobacter cloacae complex* (ECC) es un grupo de patógenos oportunistas de interés, involucrado con frecuencia en infecciones respiratorias, del tracto urinario y tejidos blandos. El carácter virulento de este complejo se da en simultaneidad a un amplio abanico de resistencias intrínsecas y adquiridas a antibióticos de primera línea como las penicilinas, cefalosporinas o las quinolonas, así como de último recurso, como los carbapenémicos y la colistina [1], [2].

Numerosos estudios previos han señalado los vegetales frescos como reservorios de aislados del ECC con potencial patógeno y resistencia a antibióticos [3], [4], [5], [6]; hecho indicativo sobre el posible papel de estos productos como vías relevantes de propagación de aislados con impacto para la salud pública.

La desinfección de este tipo de productos, en caso de ser aplicada, está usualmente basada en lavados con desinfectantes como el NaClO o el ácido peracético. Estas etapas,

no obstante, se encuentran asociadas a problemas como la contaminación cruzada vehiculizada a través del agua, la aparición de cambios sensoriales en el producto, la generación de compuestos indeseables, la reducción de la vida útil del producto, su escasa capacidad de penetración y, especialmente, la aparición de resistencias cruzadas entre biocidas y antibióticos [[7], [8], [9].

En este contexto, el uso de bacteriófagos se plantea como una alternativa viable para el control de la diseminación de patógenos antibiorresistentes a través de los vegetales frescos. Los bacteriófagos, virus que infectan a bacterias, son alternativas sostenibles que pueden solventar algunos de los problemas asociados a los biocidas clásicos.

Existen productos basados en fagos para la desinfección en la industria alimentaria destinados a la eliminación de patógenos alimentarios clásicos como *Listeria*, *E. coli* o *Campylobacter*, aunque su aplicación se ve limitada por la falta de un marco regulador claro [10]. El uso de cócteles con propósito de controlar de la diseminación de patógenos oportunistas y/o bacterias antibiorresistentes como el ECC en alimentos resulta un campo con poco desarrollo

En base a lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue el aislamiento y caracterización de fagos activos frente al ECC para su aplicación en la desinfección de vegetales frescos.

El aislamiento de los bacteriófagos se realizó a partir de diferentes efluentes obtenidos de una granja de producción bovina conforme al procedimiento descrito por Schwarz & Mathieu [11]. Brevemente, los efluentes fueron centrifugados filtrados a través de membranas de nitrocelulosa con poro de 0,22 µm y posteriormente enriquecidos frente a la bacteria diana de *E. kobei* AG07E. El enriquecimiento fue centrifugado y filtrado y posteriormente inoculado en TSB 0,5 % agar junto con 100 µl de un cultivo exponencial de la bacteria diana.

Los fagos fueron purificados desde las calvas de lisis obtenidas, que fueron recuperadas, resuspendidas en buffer SM [Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, MgSO4 0,008 M, gelatina 0,01 %, pH 7,5] y propagadas en TSB CaCl2 2 mM frente a la bacteria diana. Este procedimiento fue repetido al menos 2 veces para asegurar la pureza del bacteriófago.

El título de bacteriófagos en suspensión fue determinado mediante un procedimiento equivalente de siembra en TSB semisólido y posterior recuento de placas de lisis, ajustando el título al valor deseado con buffer SM

La morfología de los fagos fue estudiada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los virus fueron adsorbidos sobre una rejilla de cobre-carbono mediante contacto con una suspensión en buffer SM durante 20 min, teñidos con ácido fosfotúngstico 2 % durante 5 min y posteriormente visualizados mediante TEM a un voltaje de aceleración de 100 Kv.

Las secuencias codificantes para las Major ca*psid proteins* (MCPs) fueron amplificadas (Fw: GCC GAT TAA TAT TGC GAT LGGA YTT YTT, Rv: CCA GCA TAA AGG TCA TAA ATT TCC AYT TYT C [12]), secuenciadas y comparadas con otras disponibles en NCBI virus (www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus). El

análisis filogenético de las secuencias fue realizado mediante alineación con ClustalW y posterior aplicación del algoritmo UPGMA, estimando las distancias mediante el modelo *maximum composite likelihood* y un *bootstrapping* de 1000 repeticiones.

El rango de huésped fue establecido mediante la aplicación de una gota (*spot*) de 10 µl de la suspensión de fagos (7 log PFU/mL) sobre una siembra en césped realizada desde una solución 0,5 McFarland. La actividad lítica fue testada frente a diferentes especies del ECC (n=24) (que incluían aislados resistentes a colistina, carbapenémicos y cefalosporinas), además de frente a otras enterobacterias como *E. coli* (n=6), *Citrobacter* spp. (n=1), *Klebsiella pneumoniae* (n=1) y *Salmonella enterica* (n=1).

La estabilidad de los fagos en condiciones de estrés alimentario (pH 4-7 y 0,5-4 % NaCl) fue evaluada mediante el equipo Biotrac 4500 (Sy-Lab), comparando los cambios en la señal eléctrica producidos en TSB 2 mM $CaCl_2$ inoculado únicamente con la bacteria respecto de TSB 2 mM $CaCl_2$ que además contenía el fago.

El equipo Biotrac emplea los cambios en la señal eléctrica de un medio de cultivo para monitorizar el crecimiento bacteriano. La relación entre el crecimiento bacteriano y la señal eléctrica se establece a través del tiempo de detección, un parámetro que se define como el tiempo necesario para alcanzar un valor umbral de impedancia (3,5 %). Los incrementos del tiempo de detección observados en presencia del fago respecto del valor control en ausencia de éste, pueden ser asociados a un efecto inhibitorio del virus sobre el crecimiento de la bacteria diana.

La MOI (multiplicidad de infección) más eficiente fue determinada mediante el recuento de supervivientes tras un tratamiento *in vitro* de 30 min a temperatura ambiente frente a suspensiones en solución salina (0,85 % NaCl) de la bacteria diana. Las suspensiones fueron diluidas y sembradas en superficie en agar MacConkey.

Por último, la actividad bactericida del fago fue evaluada sobre una matriz alimentaria mediante su aplicación sobre piezas de lechuga de 2,5 x 2,5 cm. Las hojas de lechuga fueron descontaminadas bajo luz UV durante 30 min y posteriormente inoculadas con concentraciones conocidas de la bacteria diana. El tratamiento consistió en la inmersión en una suspensión fágica en buffer SM a una MOI 1:1 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se inocularon, asimismo, dos controles, uno de inmersión en únicamente buffer SM (a fin de observar el posible efecto de arrastre del líquido) y uno de no inmersión.

Las porciones de lechuga, una vez tratadas, fueron homogeneizadas en 10 ml solución salina y diluciones apropiadas fueron sembradas en placas de Agar MacConkey para el recuento de supervivientes. El ensayo fue repetido al menos por quintuplicado.

La fase de aislamiento permitió la obtención de un bacteriófago activo (FENT2) frente al 100 % de las cepas del *ECC* ensayadas que incluían especies como *E. ludwigii*, *E. hormaechei* y *E. kobei*, pero que no resultó eficaz frente a ningún aislado fuera de este grupo.

La clasificación taxonómica del bacteriófago se realizó mediante un estudio polifásico a nivel genético y morfológico (Figuras 1 y 2).

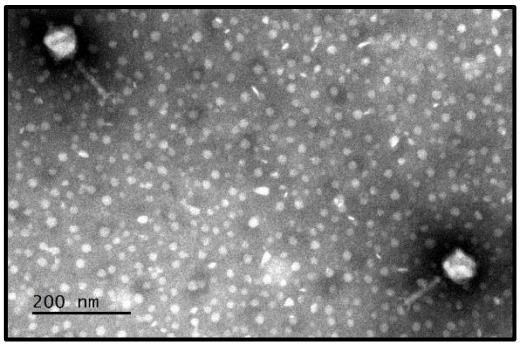


Figura 1: fotografía de microscopía electrónica de transmisión de una preparación del fago FENT2. La barra horizontal indica una escala de 200 nm

Los bacteriófagos FENT2 presentaban una morfología uniforme en la preparación, con cabezas icosaédricas (≈80 x 67 nm) y colas retráctiles (≈100 nm) que se adscriben al morfotipo de un miovirus.

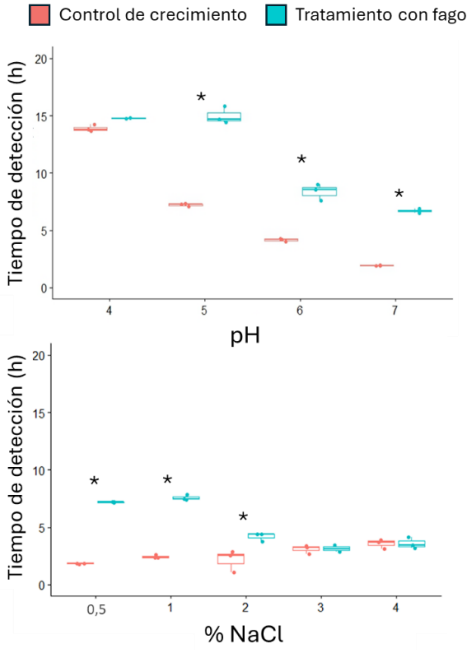


Figura 2: análisis filogenético de las secuencias que codifican para las *major capsid proteins* de diferentes géneros de virus. Los números que aparecen sobre los nodos indican el valor de *bootstrapping* tras 1000 réplicas.

Se observó que la secuencia MCP del virus resultaba similar a los géneros de la subfamilia *Vequintavirinae*, y muy próxima al género *Seunavirus* (Figura 2), hecho concordante con su morfología.

Los fagos de la familia *Vequintavirinae* son huéspedes comunes de enterobacterias habiéndose descrito su especificidad frente a cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cronobacter sakazakii* y *Enterobacter hormaechei* (NCBI Virus). Otros autores han reportado el aislamiento de bacteriófagos anti-enterobacter pertenecientes a taxones como *Tevenvirinae* [13] o *Drexlerviridae* [14] que, en este último caso, presentaban rangos de huésped más amplios, con actividad frente a aislados de *Citrobacter* spp. o *Escherichia coli*.

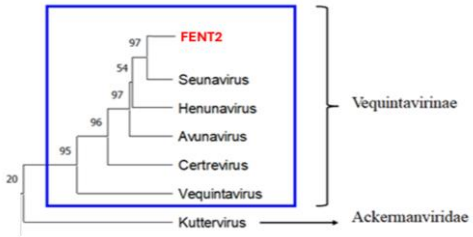


Figura 3: relación del tiempo de detección (Biotrac) obtenido en el control de crecimiento y en el tratamiento con el fago FENT2 en diferentes condiciones de pH y NaCl. Un asterisco indica la existencia de diferencias significativas bajo la condición ensayada.

Como puede observarse en la Figura 3, el fago producía incrementos significativos (p<0,05) del tiempo de detección en el rango de pH 5-7 y 0,5-2,0 % NaCl, decayendo a concentraciones más elevadas de sal o valores de pH más ácidos. Otros autores describen una tolerancia al pH ácido similar en bacteriófagos anti-Enterobacter de la familia *Drexlerviridae* [14]. La tolerancia al estrés alimentario es un atributo de especial interés para la aplicación en la industria alimentaria. La versatilidad mostrada por bacteriófagos como FENT2 sugiere su potencial uso en productos con diversa ecología microbiana.

La eficiencia máxima del FENT2 en el tratamiento *in vitro* se observó a una MOI=1:1, que permitía obtener reducciones de 1,5 log sobre suspensiones de la bacteria diana en solución salina. Este valor de MOI fue seleccionado para ser empleado en el ensayo sobre la matriz alimentaria.

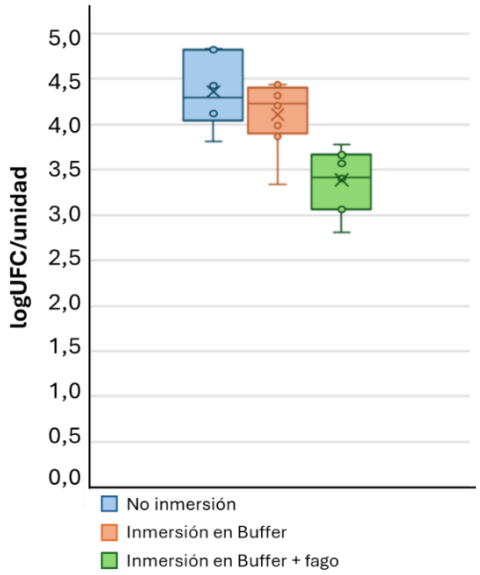


Figura 4: recuento de supervivientes (cepa *E. kobei* AG07E) obtenido en los diferentes tratamientos realizados sobre lechuga. La línea horizontal dentro de la caja representa la mediana, el símbolo X representa la media.

El tratamiento de inmersión con el fago resultó exitoso para la reducción de la presencia de *Enterobacter kobei* AG07E de la superficie de la lechuga, logrando reducciones significativas (p<0,05) de en torno 1,1 log. La eficacia de la descontaminación de productos vegetales con fagos varia en un amplio rango, encontrando valores que van de 1 a 7 reducciones logarítmicas en poblaciones de *E. coli*, *Listeria* o *Salmonella* [8]. La combinación con otros métodos de desinfección, un aumento del tiempo de contacto o la inclusión de diferentes bacteriófagos en un cóctel pueden resultar en incrementos de la magnitud del efecto bactericida.

Los resultados obtenidos son indicativos de la potencial aplicación de FENT2 para el control de bacterias del *Enterobacter cloacae complex* resistentes a antimicrobianos en productos vegetales frescos de consumo directo como la lechuga.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la alianza EURECA-PRO la financiación de este trabajo por medio de la iniciativa "microproyectos".

REFERENCIAS

[1] M. L. Mezzatesta, F. Gona, y S. Stefani, Future Microbiol, 2012, 7, pp. 887-902

[2] M. K. Annavajhala, A. Gomez-Simmonds, y A. C. Uhlemann, Front Microbiol, 2019, 10, pp. 1-8

[3] C. Xedzro, T. Shimamoto, L. Yu, H. Zuo, Y. Sugawara, M. Sugai, T. Shimamoto, Microbiol Spectr, 2023, 11, p. e01063-23

[4] S. H. Moon, Z. Udaondo, X. Li, X. Yang, S. R. Jun, y E. Huang, J Glob Antimicrob Resist, 2021 26, pp. 264-265

[5] S. H. Moon, Z. Udaondo, K. Z. Abram, X. Li, X. Yang, E.L. DiCaprio, S.Jun, E. Huang, Food Control, 2022, 132, p. 108559

[6] A. Pintor-Cora, A. Alegría, J. Ramos-Vivas, M.-L. García-López, J. A. Santos, y J. M. Rodríguez-Calleja, LWT-Food Science and Technology, 2023, 188, p. 115382

[7] A. G. de Melo, S. Levesque, y S. Moineau, Current Opinion in Biotechnology, 2018, 49, pp. 185-190

[8] M. Zaczek, B. Weber-Dabrowska, y A. Górski, J Appl Microbiol, 2015, 118, pp. 537-556

[9] N. Chanishvili, T. Chanishvili, M. Tediashvili, y P. A. Barrow, JCTB, 2001,76, pp. 689-699

[10] A. Vikram, M. T. Callahan, J. W. Woolston, M. Sharma, y A. Sulakvelidze, Curr Opin Biotechnol, 2022, 78, p. 102805

[11] C. Schwarz & J. Mathieu, Capítulo 7: "Isolation of Enterococcus Bacteriophages from Municipal Wastewater Samples Using an Enrichment Step", en "Bacteriophages Methods and Protocols", (Humana press, 2024)

[12] Y. Born, L. E. Knecht, M. Eigenmann, M. Bolliger, J. Klumpp, y L. Fieseler, Arch Virol, 2019, 164, pp. 819-830

[13] M. Cieślik, M. Harhala, F. Orwat, K. Dąbrowska, A. Górski, y E. Jończyk-Matysiak, Viruses, 2022, 14, p. 1518

[14] J. P. González-Gómez, S. N. Rodríguez-Arellano, B. Gomez-Gil, M. de J. Vergara-Jiménez, y C. Chaidez, Virology, 2024, 595, p. 110100

UNDERSTANDING THE MICROBIOME AND RESISTOME DYNAMICS IN A POULTRY BURGER PROCESSING LINE

Natalia Merino[12], Elisa Pagán[1], Daniel Berdejo[1], Colin J. Worby[2], Mark Young[2], Abigail L. Manson[2], Rafael Pagán[1], Ashlee M. Earl[2], Diego García-Gonzalo[1]

1 Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), 50013 Zaragoza, Spain.
2 Infectious Disease and Microbiome Program, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA.

merino@unizar.es, epagan@unizar.es, berdejo@unizar.es, cworby@broadinstitute.org, youngm@broadinstitute.org, amanson@broadinstitute.org, pagan@unizar.es, aearl@broadinstitute.org, diego.garcia@unizar.es

Resumen /Abstract

Traditionally, surveillance programs for food products and processing environments have focused on targeted pathogens and resistance genes. Recent advances in high-throughput analysis allow for more comprehensive monitoring. This study assessed the microbiome and resistome of a poultry burger processing line using culturing techniques and whole metagenomic sequencing (WMS). Samples included meat, burgers, and various work surfaces. Microbiome analysis revealed spoilage microorganisms as the main microbiota, including Pseudomonas spp., Psychrobacter spp., Shewanella spp., and Brochothrix spp. Cleaning and disinfection (C&D) procedures altered the microbial composition of surfaces, which still harbored Hafnia spp. and Acinetobacter spp. after C&D. Resistome analysis showed a low overall abundance of resistance genes. However, biocide resistance genes were frequently found. This study demonstrates the utility of combining culturing techniques and WMS for comprehensive microbiome and resistome characterization in food processing lines.

Palabras clave / Key words

Poultry processing plant; Food processing environments; Microbiome; Resistome; Culturing techniques; Metagenomics; Antimicrobial Resistance Genes; Biocides; Cleaning and Disinfection

Traditionally, surveillance programs for food products and processing environments have employed culturing techniques to monitor targeted microorganisms based on their threat level [1]. However, recent advances in high-throughput sequencing have enabled to conduct these monitoring activities in an untargeted manner, providing broader insights not only into the microbial communities (microbiome) but also on the entire repertoire of antimicrobial resistance genes (resistome) in surveillance samples [2]. Thus, this investigation aimed to assess the microbiome and resistome of a poultry burger processing line by combining culturing techniques and whole metagenomic sequencing (WMS).

This study was conducted in a burger processing line of a poultry processing plant, where different poultry products and food-contact surfaces were sampled during different production cycles on two different production days. The sample collection comprised meat, burger and various working surfaces during production and after cleaning and disinfection (C&D) procedures. Culturing techniques were used to isolate and quantify specific microbial groups (mesophiles, psychrotrophes, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacterales* and lactic acid bacteria). WMS involved DNA isolation, sequencing and bioinformatic analysis to determine both the microbiome and resistome.

The results of culturing techniques indicated that *Pseudomonadaceae* exhibited the highest microbial counts, followed by lactic acid bacteria and *Enterobacterales* in both meat and burger samples (Figure 1A). In addition, culturing techniques revealed great differences between clean and utilized surfaces, highlighting the role of C&D procedures in reducing the microbial load of food-contact surfaces (Figure 1B).

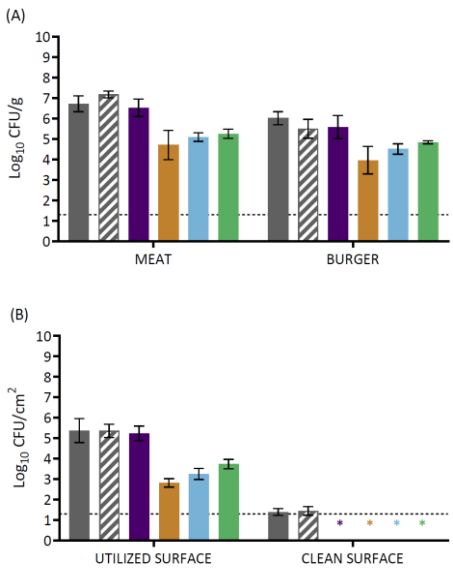


Figure 1. Microbial counts throughout the burger processing line. Mesophiles (■), psychrotrophes (▨), *Pseudomonadaceae* (■), *Enterobacterales* (■), rod-shaped lactic acid bacteria (■), and spherical-shaped lactic acid bacteria (■) counts in different poultry products (A) and surfaces (B) throughout the processing line. Horizontal dotted line represents the limit of detection. * means that microbial counts are below the limit of detection

WMS identified the core microbiota of meat and burger samples as *Pseudomonas* spp., *Psychrobacter* spp., *Shewanella* spp. and *Brochothrix* spp. Additionally, it demonstrated that C&D procedures altered the microbial composition of surfaces samples. While surface samples collected during burger production were dominated by the microbiota present in meat and burger samples, those collected after C&D procedures were dominated by *Hafnia* spp. and *Acinetobacter* spp. the detection limit (Figure 2).

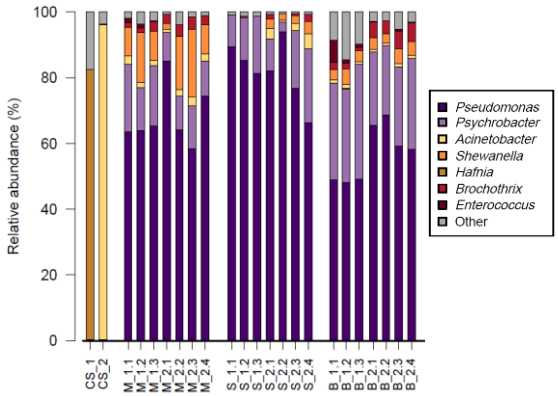


Figure 2. Microbial composition throughout the burger processing line. Relative abundances of the main microbial genera in different samples throughout the burger processing line. CS: Clean surface samples; M: Meat samples; S: Utilized surface samples; B: Burger samples. The first number of the sample code corresponds to the production day and the second number corresponds to the production cycle.

Resistome analysis by WMS revealed a low abundance of resistance genes overall (Figure 3), suggesting that effective

interventions during processing may mitigate their transmission [3]. However, the frequent occurrence of biocide resistance genes and the presence of ARGs even after C&D procedures may indicate potential biofilm formation or inefficient application of C&D protocols [4,5].

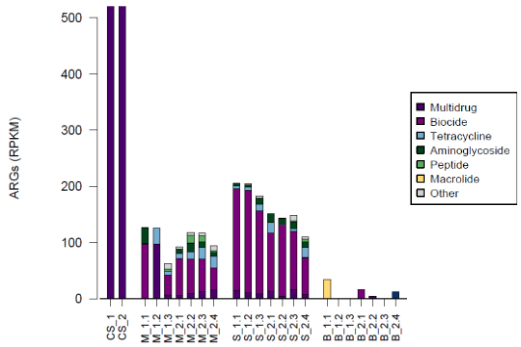


Figure 3. Resistome profile throughout the burger processing line. Normalized abundance of drug classes in the different samples throughout the burger processing line. CS: Clean surface samples; M: Meat samples; S: Utilized surface samples; B: Burger samples. The first number of the sample code corresponds to the production day and the second number corresponds to the production cycle.

Overall, this study demonstrates the utility of combining culturing techniques and WMS for comprehensive microbiome and resistome characterization in food processing lines.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Grant PID2021-123404NB-I00 funded by MICIU/AEI/10.13039/ 501100011033 and by "ERDF A way of making Europe" and by the Government of Aragón (Grant Grupo AESA A06_23R). Department of Science, Technology, and University Education of the Government of Aragón (Spain) provided N. Merino with a grant to carry out this research. Grant FPU17/02441 funded by MICIU/AEI/10.13039/501100011033 and by "ESF Investing in your future" was awarded to E. Pagán to carry out this research. This project has been funded in part with Federal funds from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, under Grant Number U19AI110818 to the Broad Institute.

REFERENCIAS

[1] M. W., Allard, R., Bell, C. M., Ferreira, N., Gonzalez-Escalona, M., Hoffmann, T., Muruvanda, A., Ottesen, P., Ramachandran, E., Reed, S., Sharma, E., Stevens, R., Timme, J., Zheng, & E. W., Brown, *Curr Opin Biotechnol*, **2018**, *49*, 224-229.

[2] C. J., Doyle, P. W., O'Toole & P. D., Cotter. *Environ. Microbiol.*, **2017**, *19*, 4382-4391.

[3] N. R., Noyes, X., Yang, L. M., Linke, R. J., Magnuson, A., Dettenwanger, S., Cook, I., Georgnaras, D. E.,Woerner, S. P., Gow, T. A., McAllister, H., Yang, J., Ruiz, K. L., Jones, C. A., Boucher, P. S., Morley, & K. E., Belk.. *eLife*, **2016**, *5*, 13195.

[4] A., Alvarez-Molina, J. F., Cobo-Díaz, E. A., Alexa, F., Crispie, M., Prieto, M., López, P. D., Cotter, & A., Alvarez-Ordóñez. *Food Res. Int.*, **2023**, *173*, 113442.

[5] V., Valentino, G., Sequino, J. F., Cobo-Díaz, A., Álvarez-Ordóñez, F., De Filippis, & D., Ercolini. *Food Res. Int.*, **2022**, *162*, 112202.

IN-DEPTH ANALYSIS OF THE AUSTRIAN CHEESE MICROBIOME REVEALS HIGH TAXONOMIC AND FUNCTIONAL INTERACTIONS WITH THE PRODUCTION FACILITY ENVIRONMENT

Alejandro J. Alcañiz[1] *, Rocío Olmo[1,2], Franz-Ferdinand Roch[3], Monika Dzieciol[3], Viktoria Neubauer[2,3], Antonio Lourenco[4], Francesco Rubino[5], Evelyne Selberherr[3], Martin Wagner[2,3] & Narciso M. Quijada[1,2,3]

1 Dpt. Microbiology and Genetics. Institute for Agrobiotechnology Research (CIALE). University of Salamanca, Spain.
2 FFoQSI GmbH – Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety and Innovation, Tulln. Austria.
3 Centre for Food Science and Veterinary Public Health, Clinical Department for Farm Animals and Food System Science, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria.
4 Food Biosciences Department, Teagasc Food Research Centre, Moorepark, Fermoy, County Cork, Ireland.
5 Queen's University Belfast, Belfast, Great Britain

*alejandrojial@usal.es, rol@usal.es, Franz-Ferdinand.Roch@vetmeduni.ac.at, Monika.Dzieciol@vetmeduni.ac.at, Viktoria.Neubauer@ffoqsi.at, Antonio.Lourenco@teagasc.ie, francesco.rubino@cnr.it, Evelyne.Selberherr@vetmeduni.ac.at, Martin.Wagner@vetmeduni.ac.at, nmq@usal.es

Resumen / Abstract

Vorarlberger Bergkäse (VB) is a hard-washed-rind cheese produced from raw milk of alpine cows in western Austria with Protected-Designation-of-Origin, without the addition of ripening cultures and ripened from 3 to 18 months. Previous studies have examined their associated microbiota, identifying certain microorganisms (e.g., Brevibacterium, Corynebacterium, and Staphylococcus) highly represented throughout the ripening process. These taxa also exhibit high transcriptional activity, particularly in the degradation of milk components and the synthesis of organoleptic compounds. Within the framework of the MASTER EU-Consortium, 13 VB facilities were selected for sampling raw materials, final products, and food-contact- (FCS) and non-food-contact surfaces (NFCS) in different production areas. The total DNA of the samples (n=269) was sequenced using shotgun sequencing. The effect analysis of the different areas over the cheese microbiota showed that the brine and the FCS-NFCS from ripening rooms highly influenced the VB rinds. However, the ripened VB cores maintained a distinct microbiota from their rinds and remained similar to that of fresh cheeses and processing FCS-NFCS, dominated by lactic-acid bacteria (starters cultures), among others. The functional analysis revealed the potential to produce crucial organoleptic compounds such as diacetyl or propionate. The recovery of genomes directly from the metagenomes (MAGs) allowed the exploration of the functional content of microorganisms present in the cheese. Some of these microorganisms have been isolated and are currently being tested in vivo on cheeses, to verify their impact on the organoleptic and hygienic characteristics of VB.

The bioinformatic analysis enabled the detection of additional features crucial for product quality and safety. Although ESKAPEE bacteria were found in processing areas, they were absent in the final products. However, a low overall presence of genes involved in the production of biogenic amines was detected, highlighting role of ripening in the quality and safety of cheese products.

Palabras clave / Key words

Hard-washed-rind cheese, bioinformatic, shotgun metagenomic, microbiome, Metagenome-assembled genome.

El queso Vorarlberger Bergkäse (VB) es un queso de corteza lavada artesanal de leche cruda con denominación de origen protegida, producido en la región occidental de Vorarlberg, Austria. Su producción no incluye cultivos de maduración externos, y el proceso de salado varía según el producto, así como la maduración (de 3 a 18 meses). Este tipo de queso es particularmente apreciado por su sabor y aroma intensos y complejos, que se desarrollan durante el proceso de maduración y que dependen de la actividad de la microbiota en la corteza para su maduración. Esta microbiota, que difiere de la del interior del queso, es crucial para el desarrollo de las propiedades organolépticas y actúa como una barrera natural contra patógenos [1].

Estudios recientes han identificado diversos taxones bacterianos implicados en el proceso de maduración, tales como Brevibacterium, Corynebacterium y Staphylococcus [2][3], destacando una alta actividad transcripcional en la degradación de componentes de la leche y la producción de compuestos organolépticos [4], cuya combinación, le otorgan su “personalidad” al queso VB.

El enfoque de este trabajo está en la importancia de entender estos procesos microbianos para estandarizar la producción, mejorar las propiedades del queso y prevenir problemas de calidad alimentaria.

En el marco del consorcio MASTER de la UE [5], se seleccionaron 13 instalaciones de VB para el muestreo de materias primas (leche, suero lácteo y salmuera), productos finales (corteza y centro de quesos frescos y madurados) y superficies en contacto (FCS) y no en contacto (NFCS) con el producto por las diferentes áreas dentro de la cadena de producción (cámara de pre-madurado y cámara de maduración, sala de procesamiento y zona de empaquetado).

Se tomaron un total de 269 muestras de ADN que se secuenciaron mediante *shotgun sequencing*, para llevar a cabo un análisis metagenómico que permitiera caracterizar el microbioma con mayor resolución.

El análisis del microbioma reveló claras diferencias, tanto desde el punto de vista taxonómico (*MetaPhlan 4*) [6] como funcional (anotación con *KEGG*) [7], en el proceso de maduración. Omitiendo los microorganismo utilizados como cultivo iniciador (*Lactobacillus delbrueckii* y *Staphylococcus thermophilus*), las especies más representativas en todas las superficies (FCS y NFS) fueron *Staphylococcus equorum*, *Corynebacterium casei*, *Acinetobacter johnsonii* y *Brevibacterium linens* y *B. aurantiacum*. La corteza del queso maduro presentó un perfil muy parecido al de la sala de maduración, con dominancia de *Brevibacterium spp*. y *C. casei*. Por el contrario, el núcleo de los quesos VB madurados mantuvo una microbiota similar a la del queso fresco,

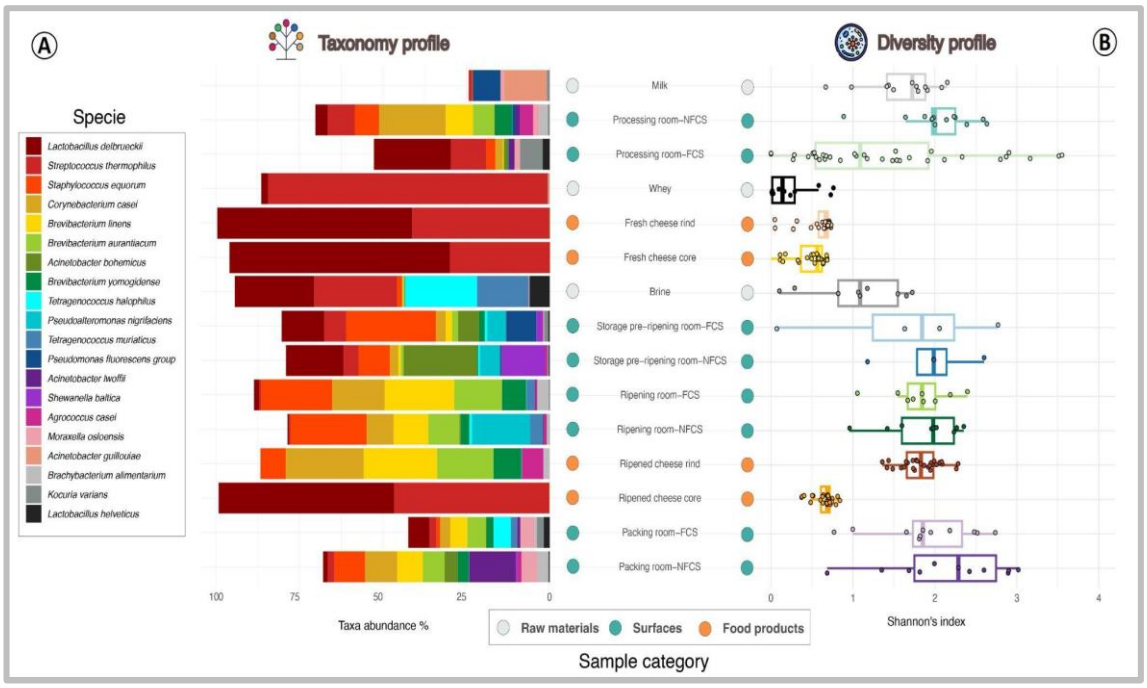


Figura 1. Abundancia relativa bacteriana y valores de alfa-diversidad en las diferentes materias primas, productos y superficies presentes a lo largo del proceso de producción de VB. **A)** Abundancia relativa de las 20 especies más abundantes, **B)** Índice Shannon de alpha-diversidad. El eje Y corresponde a los diferentes conjuntos de muestras agrupadas según su origen de toma.

dominado por los cultivos iniciadores (Figura 1). Las bacterias de las cortezas maduradas de VB no estaban asociadas a cultivos iniciadores ni influidas por las materias primas, lo que resalta el impacto del entorno de procesamiento en el desarrollo de la microbiota que contribuye al producto final (Figura 2). La evaluación de los perfiles taxonómicos y funcionales mostró una relación muy directa entre ellos, lo que sugiere que, en las diferentes muestras, las funciones son taxo-específica. La corteza y el núcleo de queso fresco y el núcleo de queso madurado agruparon muy próximos en base a un perfil taxonómico y funcional similar, mientras que las cortezas de queso madurado se agruparon más cerca de aquellas superficies que podrían haber tenido una mayor contribución sobre su composición. (Figura 3).

Se caracterizaron los genomas de *S. equorum* a partir de los ensamblados de metagenomas (MAGs) para las diferentes empresas de VB, así como de otras empresas pertenecientes al consorcio MASTER [5] con localizaciones geográficas diferentes dentro del marco europeo: España, Italia e Irlanda. De estas nuevas empresas, se añadieron al análisis tanto muestras de quesos (fresco, semicurado y curado) como de embutidos. Esta especie tiene especial actividad proteásica/esterásica [4]. El agrupamiento de los MAGs indicó una selección por proceso más que por entorno geográfico *per se*.

Para definir las cualidades del queso, se elaboró un perfil para cada muestra de las diferentes enzimas (asignadas como ortólogos de la base de datos de *KEGG*) [7], con capacidad potencial de generación de compuestos organolépticos que se clasificaron según la clase de compuesto, y asociándolas al sabor y el aroma que aportan al queso. En el núcleo de los quesos finales destacaron compuestos tales como ácidos carboxílicos (p. ej. acetato y ácido láurico), que proporcionan principalmente notas afrutadas y picantes, cetonas como el diacetilo que aportan una textura cremosa

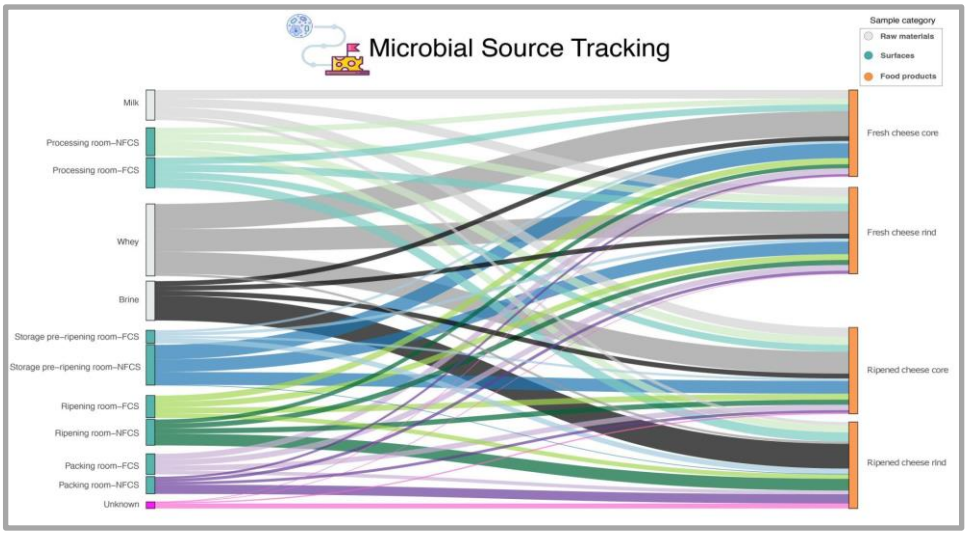


Figura 2. Fuentes microbianas y el impacto sobre los productos, estimadas utilizando *SourceTracker v1.0* y visualizado mediante un *Sankey-plot*. Las muestras ambientales (*source*) se representan en la parte izquierda del gráfico y los productos VB (*sink*), en la parte derecha. El ancho de línea de los flujos individuales entre ellos detalla la contribución/proporción media estimada de los microorganismos de las muestras de origen a la comunidad microbiana de los respectivos productos.

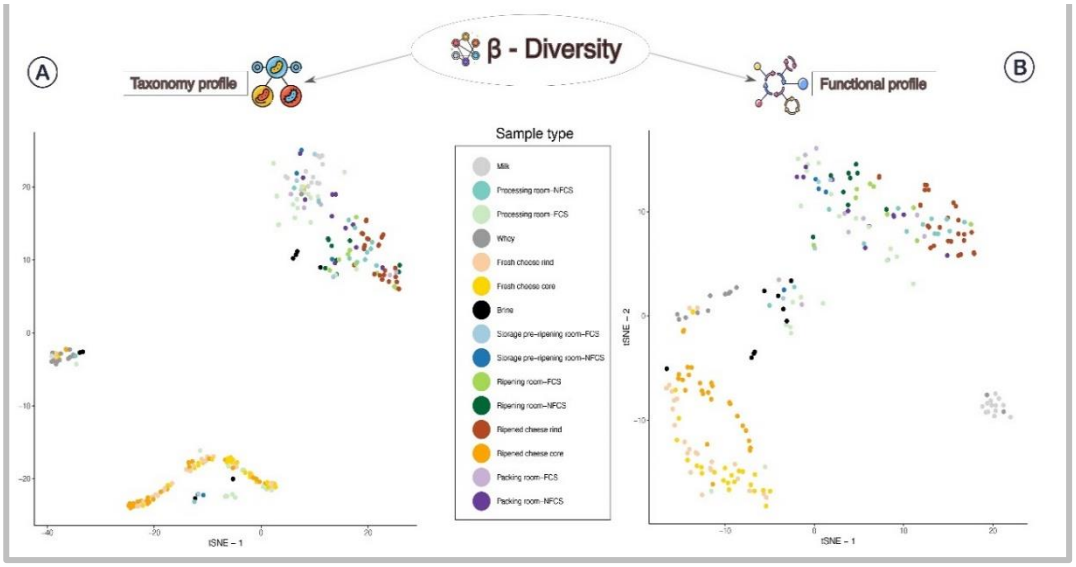


Figura 3. t-SNE *(t-distributed Stochastic Neighbor Embedding)* para el análisis de la beta-diversidad a nivel de perfil taxonómico (**A**) y funcional (**B**). Las muestras están coloreadas según su origen: superficies ambientales (FCS o NFCS), materias primas o productos alimentarios.

y mantequillosa, o alcoholes como el etanol que añade complejidad gustativa con matices a alcohol.

Llegados a este punto del análisis cabría cuestionarse si "configurando" el microbioma del ambiente y/o de inicio de maduración podríamos incrementar la calidad del queso.

El análisis bioinformático permitió detectar características adicionales cruciales para la calidad y seguridad alimentaria, así como del ámbito clínico. Por un lado, bacterias patógenas multirresistentes a antibióticos dentro del grupo ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*, *Enterobacter spp.* y *Escherichia coli*) [8] y, por el otro, la potencialidad de generar

aminas biógenas (histamina, putrescina, espermina, triptamina, etc.), con efectos toxicológicos asociados, por parte de la microbiota presente en la cadena de producción [9].

Aunque se encontraron bacterias ESKAPEE (probablemente por la manipulación) como *E. coli* y *K. pneumoniae* en la zona de procesamiento y empaquetado (FCS y NFCS), así como en la leche y la salmuera, estas estaban ausentes en los productos finales de VB. Esto pone de manifiesto la influencia del proceso de maduración y las condiciones del entorno sobre la microbiota, creando un ambiente competitivo y seguro para una correcta fermentación.

Se detectó una baja presencia general de genes implicados en la producción de aminas biógenas, a excepción de una alta prevalencia general de putrescina, tanto en el entorno como en los productos alimentarios.

La aplicación de técnicas metagenómicas en el análisis microbiológico del queso es crucial para garantizar la seguridad alimentaria, monitorear la calidad del producto y entender mejor las dinámicas microbianas que afectan a su producción y conservación.

AGRADECIMIENTOS

This work was funded by the Horizon 2020 Research and Innovation Program of the European Union, under grant agreement No.818368 (MASTER). NMQ is currently funded by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program through the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 101034371. ROL work has been supported by grant FJC2021-047100-I funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by "European Union NextGenerationEU"/PRTR». AL work has been supported by Research Leaders 2025 programme cofunded by Teagasc and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement number 754380. AJA is currently funded by the Investigo program and the European Union, NextGenerationEU.

REFERENCIAS

[1] Montel, M., *et al.*, (**2014**). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136-154. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019

[2] Quijada, N. M., *et al.*, (**2018**). Autochthonous facility-specific microbiota dominates washed-rind Austrian hard cheese surfaces and its production environment. *International Journal of Food Microbiology*, 267, 54-61. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.025

[3] Quijada, N. M., *et al.*, (**2020**). Austrian raw-milk hard-cheese ripening involves successional dynamics of non-inoculated bacteria and fungi. *MDPI AG*. doi:10.3390/foods9121851

[4] Quijada, N. M *et al.*, (**2022**). Metatranscriptomic analyses unravel dynamic changes in the microbial and metabolic transcriptional profiles in artisanal Austrian hard-cheeses during ripening. *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fmicb.2022.813480

[5] https://www.master-h2020.eu/

[6] Blanco-Míguez, A., *et al.*, (**2023**). Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlAn 4. *Springer Science and Business Media LLC*. doi: 10.1038/s41587-023-01688-w

[7] Kanehisa, M., *et al.*, (**2022**). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Oxford University Press (OUP).* doi: 10.1093/nar/gkac963

[8] Miller, W. R., & Arias, C. A. (**2024**). ESKAPE pathogens: Antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Springer Science and Business Media LLC*. doi: 10.1038/s41579-024-01054-w

[9] Linares, D. M., *et al.*, (**2016**). Biogenic amines in dairy products. *Informa UK Limited*. doi: 10.1080/10408398.2011.582813

COMPONENTES DE LA MATRIZ DE *BIOFILMS* FORMADOS POR MICROORGANISMOS AISLADOS DE SUPERFICIES DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA COMO POTENCIALES FACTORES DE PERSISTENCIA EN LAS SUPERFICIES

Josué Jara Pérez[1,2], Víctor Galileo Almendro-Vedia[1,2], Ainhoa Zaurín Villegas[1], Alejandro Pulido González[1], Alberto Aragón Ramírez[1,2], Rubén Escobar Jurado[1,2], Natalia Hernando Ospina[1], Leónides Fernández Álvarez[1,2], Juan Miguel Rodríguez Gómez[2,3], Belén Orgaz Martín[1,2]

1. Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
2. Instituto Pluridisciplinar. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
3. Sección Departamental de Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

josujara@ucm.es, vgavedia@ucm.es, ainhoaza@ucm.es, apulid02@ucm.es, alberara@ucm.es, rubenjues@ucm.es, nather03@ucm.es, leonides@ucm.es, jmrodrig@ucm.es, belen@ucm.es

Resumen / Abstract

Algunos microorganismos presentes en las superficies de la industria alimentaria (IA) son capaces de persistir en el tiempo formando biofilms, comprometiendo la seguridad de los alimentos. Los componentes mayoritarios de la matriz podrían ser considerados como un factor de virulencia al estar directamente ligados a la dificultad de su eliminación tras la limpieza y desinfección. El objetivo del trabajo fue estudiar las diferentes composiciones de la matriz de biofilms producidos por microorganismos aislados de superficies de la IA para relacionarlas con su persistencia. Para ello, se identificaron aislados de diferentes superficies de la IA y se estudió tanto su capacidad para formar biofilms. Se seleccionaron los patógenos de especial relevancia a nivel de patogenicidad en la IA para observar sus diferencias en la producción de proteínas amiloides y carbohidratos en la matriz empleando tinciones específicas y microscopía confocal de barrido láser. Se observaron diferencias a nivel de capacidad de adhesión, así como en la composición de sus matrices, sugiriendo matrices más adhesivas y difíciles de eliminar en función del patógeno presente en la biopelícula. Está información podría ser relevante para el desarrollo de nuevas estrategias para su eliminación.

Palabras clave / Key words

Biofilms, matriz extracelular, virulencia, limpieza y desinfección, persistencia, patógenos alimentarios

Introducción

Dentro de la Industria Alimentaria (IA), la presencia de microorganismos que puedan comprometer la seguridad alimentaria supone un gran problema a abordar debido a sus consecuencias. La necesidad de conseguir un ambiente aséptico para la producción de alimentos se encuentra en continuo estudio y desarrollo [1,2]. Algunos de los microorganismos patógenos con más relevancia en la IA son *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. o *Salmonella enterica*, entre otros [1]. Muchos de estos microorganismos han sido descritos como ubicuos y buenos formadores de *biofilms*, mostrando dificultad en su eliminación [3].

Los *biofilms* o biopelículas bacterianas pueden ser definidas como comunidades bacterianas embebidas en una matriz extracelular formada por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y adheridas tanto entre ellas como a una superficie biótica o abiótica [3,4]. Los componentes principales de esta matriz son agua, carbohidratos, proteínas y ADN extracelular [4]. Específicamente, componentes como los carbohidratos y las proteínas están directamente relacionados con la capacidad de persistencia que tienen los *biofilms* a resistir a tratamientos de limpieza y desinfección, por lo que deben ser considerados como factores de virulencia [5,6]. Algunos autores han descrito los carbohidratos y las proteínas de la matriz como los componentes con mayor relevancia a la hora de establecer *biofilms* maduros, debido a la complejidad creada por los propios entrecruzamientos moleculares, repercutiendo directamente sobre su resistencia a antimicrobianos, o debido a su relación con las primeras etapas de adhesión [5,7,8,9,10].

Existen técnicas bioquímicas para cuantificar los carbohidratos y proteínas en muestras tomadas de superficies en contacto con alimentos y que sean susceptibles a la formación de *biofilms* [11]. Sin embargo, existe la necesidad de profundizar en el estudio de estos e implementar técnicas avanzadas que no solo nos permitan cuantificar, sino estudiar su organización especial dentro del *biofilm*, ya que esto podría guiar al conocimiento de sus cimientos más internos.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la capacidad de formación de *biofilms* de microorganismos aislados de superficies en contacto con alimentos de la IA y la descripción de sus principales componentes de la matriz extracelular, así como la organización espacial de estos dentro del *biofilm*, para relacionarlos con su persistencia.

Material y Métodos

<u>Aislamiento e identificación de los microorganismos</u>

Se muestrearon diferentes superficies en contacto directo con alimentos con ayuda de hisopos estériles. Las muestras se sembraron en los medios de cultivo sólidos (BHI, CNA, MCK, y MRScys), tanto para el recuento como para la selección de las diferentes morfologías encontradas. Cada morfología única se aisló e identificó tras extraer su ADN , seguido de una amplificación vía PCR y secuenciación parcial del gen rRNA 16S.

Cinética de crecimiento y producción de biomasa

Utilizando una batería de aislados de interés, se inoculó una placa multipocillo con una suspensión normalizada de cada aislado y se realizó la cinética de crecimiento a 37ºC utilizando el equipo de lectura de placas Varioskan Lux (Abs 600 nm). De igual manera, utilizando el mismo equipo y una absorbancia de 570 nm, se realizó una determinación de la biomasa (matriz + células) producida por los aislados utilizando una tinción con Cristal Violeta al 0.2%.

Estudio de capacidad de adhesión

Los *biofilms* invitro se realizaron utilizando un sistema con superficies verticales semisumergidas denominado carrusel, donde se inocularon 60 mL de medio de cultivo con el aislado normalizado deseado. Se extrajeron muestras de los carruseles a 24 y 48 h, las cuales fueron lavadas con solución salina y posteriormente rascadas con hisopos estériles para desprender los *biofilms* formados en ellas. Estos hisopos se introdujeron en 1 mL de agua de peptona y tras ser agitados con ayuda de un Vortex se realizó una batería de diluciones decimales para su posterior siembra en medio sólido BHI. Los recuentos se realizaron tras incubar las placas a 37ºC durante 24 horas.

Determinación de componentes por microscopía confocal de barrido láser

Muestras de 24 y 48 h fueron extraídas de la misma manera que para el estudio de su adhesión y se realizó una tinción durante 1 hora con 200 microlitros de los reactivos *Carbotracer* 680 y *Amytracker* 480 (Ebba-biotech®) para teñir tanto los carbohidratos como las proteínas, respectivamente. Posteriormente, se lavaron con abundante tampón PBS (0.1M) y fueron visualizadas en un microscopio ECLIPSE Ti con un módulo confocal Nikon C2. El análisis de biovolumen y la reconstrucción en 3 dimensiones de las imágenes obtenidas se realizó utilizando el software Imaris 8.0.1.

Resultados

Los géneros más frecuentemente identificados fueron *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y miembros de la família *Enterobacteriaceae*.

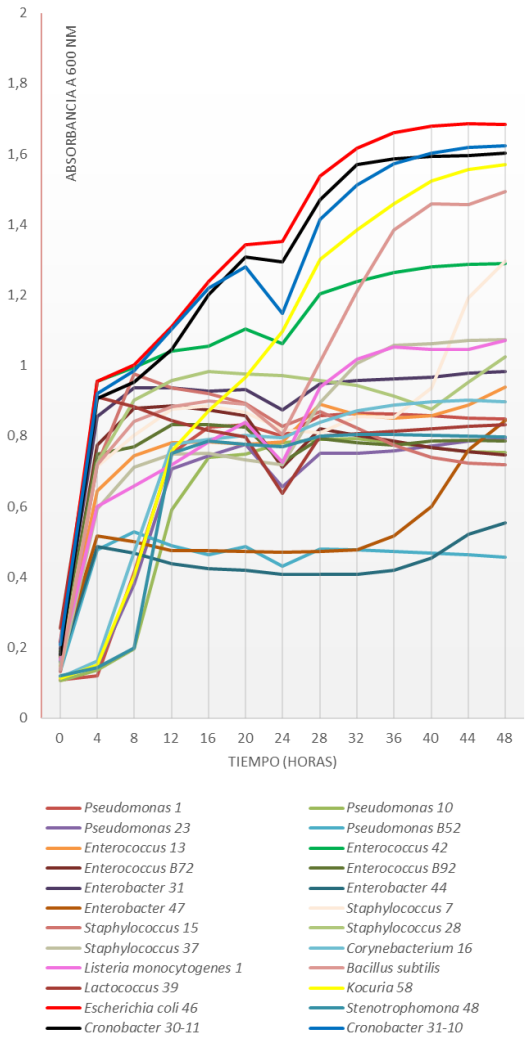


Figura 1: Cinéticas de crecimiento en términos de absorbancia de los microorganismos aislados de superficies en contacto con los alimentós.

Las cinéticas de crecimiento mostraron que varios aislados de los géneros *Escherichia*, *Cronobacter*, *Bacillus*, *Listeria* y *Staphylococcus* tuvieron una mayor capacidad de crecimiento respecto al resto, llegando a alcanzar su máximo a las 48 horas (Figura 1). Por otro lado, en términos de producción de biomasa, todos ellos mostraron una buena capaceidad de formar *biofilms* bajo las condiciones estudiadas, observándose en algunos casos una caida de la absorbancia a las 48 horas, indicando el desprendimiento del *biofilm* maduro.

Para el estudio de la capacidad de adhesión, se seleccionaron 4 aislados en función de su capacidad de crecimiento, producción de biomasa y relevancia en la IA. Todos ellos mostraron una buena capacidad de adhesión y viabilidad tras 48 h creciendo adheridos a la superfície.

Las tinciones mostraron diferentes organizaciones de carbohidratos y proteínas dentro de las matrices estudiadas. En el caso de *E.coli* 46 y *Cronobacter* 31-10, se observo una mayor concentración de proteínas en las capas más profundas del *biofilm*, sirviendo como primeros cimientos de la estructura. En el caso de *L. monocytogenes* 1, se observo una producción de proteina muy leve, quedando las células simplemente recubiertas de una fina capa de carbohidratos. Por otro lado, *Staphylococcus* 28 mostró que sus capas internas estaban formadas tanto por proteinas como por carbohidratos, mientras que las capas superiores del *biofilm*, formadas principalmente por proteina, parecían recubrir la estructura a modo de protección externa (Figura 2).

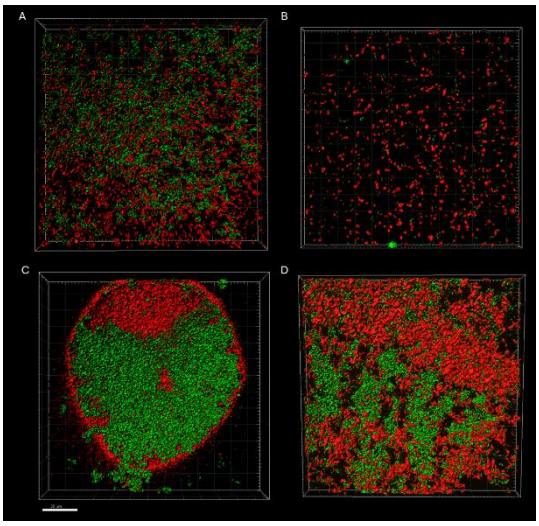


Figura 2: Organización espacial de proteinas (verde) y carbohidratos (rojo) en la matriz de *biofilms* maduros. A: *E. coli* 46, B: *L. monocytogenes* 1, C: *Staphylococcus* 28, D: *Cronobacter* 31-10.

Los valores de biovolumen (**Tabla 1**) muestran lo observado en las imágenes de microscopía confocal, donde *L. monocytogenes* 1 mostró una capacidad reducida para producir proteínas comparado con el resto de patógenos. A pesar de que se pudieron observar valores próximos en la producción de estos componentes entre el aislado *Staphylococcus* 28 y las dos enterobacterias testadas, es importante considerar la disposición espacial de estos.

Tabla 1: Biovolumen de proteínas y carbohidratos de la matriz de diferentes *biofilms* formados por los patógenos de la IA.

	Biovolumen proteínas amiloides (μm^3)	Biovolumen carbohidratos (μm^3)	Espesor máximo (μm)
E.coli 46	$1{,}78 \pm [2{,}61] \times 10^4$	$1{,}88 \pm [1{,}65] \times 10^4$	$10{,}44 \pm 2{,}67$
L.monocytogenes 1	$7{,}28 \pm [6{,}72] \times 10^2$	$1{,}86 \pm [12] \times 10^3$	$5{,}67 \pm 1{,}41$
Staphylococcus 28	$1{,}24 \pm [0{,}69] \times 10^4$	$1{,}13 \pm [0{,}26] \times 10^4$	$6{,}67 \pm 3{,}72$
Cronobacter 31-10	$7{,}94 \pm [5{,}11] \times 10^3$	$1{,}38 \pm [3{,}91] \times 10^4$	$8{,}71 \pm 2{,}81$

Conclusiones

El aumento de la producción de los componentes principales de la matriz del *biofilm*, en función de la composición microbiana, podria sugerir matrices más adhesivas y difíciles de eliminar. El conocimiento de la producción de estos, así como de su distribución espacial dentro del *biofilm*, podría guiarnos hacia nuevas estrategias para su eliminación, dirigiendo la acción de los compuestos antibiofilm hacia las capas más internas de este para facilitar su desprendimiento completo, o hacia las capas superiores para desproteger a los microorgnaismos de los tratamientos posteriores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación PID2022-139262OB-I00.

REFERENCIAS

[1] Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. Frontiers in microbiology, 9, 898.

[2] Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021). Microbial biofilms in the food industry—A comprehensive review. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18(04), 2014.

[3] Olanbiwoninu, A. A., & Popoola, B. M. (2023). Biofilms and their impact on the food industry. Saudi Journal of Biological Sciences, 30(2), 103523.

[4] Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature reviews microbiology, 2(2), 95-108.

[5] Singh, S., Datta, S., Narayanan, K. B., & Rajnish, K. N. (2021). Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 19, 1-19.

[6] Singh, A., Amod, A., Pandey, P., Bose, P., Pingali, M. S., Shivalkar, S., ... & Samanta, S. K. (2022). Bacterial biofilm infections, their resistance to antibiotics therapy and current treatment strategies. Biomedical Materials, 17(2), 022003.

[7] Liang, Z., Nilsson, M., Kragh, K. N., Hedal, I., Alcàcer-Almansa, J., Kiilerich, R. O., ... & Tolker-Nielsen, T. (2023). The role of individual exopolysaccharides in antibiotic tolerance of Pseudomonas aeruginosa aggregates. Frontiers in Microbiology, 14, 1187708.

[8] Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 3(4), a010306.

[9] Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. Nature reviews microbiology, 12(1), 49-62.

[10] Piras, C., Di Ciccio, P. A., Soggiu, A., Greco, V., Tilocca, B., Costanzo, N., ... & Roncada, P. (2021). S. aureus biofilm protein expression linked to antimicrobial resistance: A proteomic study. Animals, 11(4), 966.

[11] Wagner, E. M., Pracser, N., Thalguter, S., Fischel, K., Rammer, N., Pospíšilová, L., ... & Rychli, K. (2020). Identification of biofilm hotspots in a meat processing environment: Detection of spoilage bacteria in multi-species biofilms. International Journal of Food Microbiology, 328, 108668.

DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN NUEVO MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO PARA *SALMONELLA*

Gutiérrez M.[1], Guillén S.[2], Cebrián G.[1]

[1] Universidad de Zaragoza/ Facultad de Veterinaria/ Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/ Tecnología de los Alimentos. Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA). Calle de Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España.
[2] Universidad Politécnica de Cartagena/ Departamento de Ingeniería Agrónoma. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, España.

m.gutierrez@unizar.es

Resumen / Abstract

Salmonella es un microorganismo patógeno alimentario responsable de miles de casos de toxiinfección alimentaria en Europa cada año. La legislación actual establece límites muy estrictos para el mismo, en la mayoría de los casos ausencia en 25 gramos. Esto, junto a otros factores como la interferencia de matrices complejas, deriva en protocolos de detección laboriosos y largos que resultan de poca utilidad en muchos escenarios. El objetivo de este estudio fue desarrollar y validar un nuevo medio de enriquecimiento para Salmonella, aplicable a distintas serovariedades y matrices, y estable a temperatura ambiente. Para alcanzar este objetivo se testaron diferentes formulaciones y suplementos, seleccionándose aquella que simultáneamente resultaba más selectiva (favorable a Salmonella) mientras que permitía la recuperación de células dañadas. Los resultados mostraron que este medio podría reemplazar de forma satisfactoria a los actuales medios de pre-enriquecimeinto y enriquecimiento para su posterior aplicación junto con distintas técnicas de detección de Salmonella utilizadas en la actualidad (inmunoquímicas y moleculares).

Palabras clave / Key words

Salmonella, patógeno alimentario, detección, medio de enriquecimiento.

La relevancia de *Salmonella* en el contexto de la seguridad alimentaria es de sobra conocida, y es que aunque existen numerosas medidas de control y una extensa legislación, en 2022 fue el patógeno responsable del mayor número de toxiinfecciones de origen alimentario en humanos en Europa, con 65.208 casos de enfermedad confirmados [1]. A pesar de los avances de los últimos años, los métodos de detección existentes siguen presentando algunos déficits o problemas. Si bien es cierto que las técnicas más convencionales incluyen un paso previo de enriquecimiento no selectivo para recuperar las células dañadas, la interferencia de matrices complejas y/o muy contaminadas puede retrasar esta recuperación, dando como resultado posibles falsos negativos. Aunque son sencillas de implementar, requieren de gran cantidad de tiempo y material, lo que las hace poco eficientes. Otras alternativas,

como los métodos inmunoquímicos y basados en ácidos nucleicos, ofrecen una mayor rapidez, sensibilidad y especificidad, pero pueden arrojar falsos positivos si no son capaces de distinguir entre células vivas o muertas, y en ocasiones requieren igualmente de un paso previo de enriquecimiento. En cualquier caso, ninguna de estas técnicas tiene por sí sola la sensibilidad suficiente para alcanzar los límites establecidos en la legislación (ausencia en 10 o 25 g de alimento) [2], ni son capaces de resolver completamente otros retos de la detección de *Salmonella*, como la gran variabilidad intraespecífica, o la presencia de células en estado viable pero no cultivable. Superar estos obstáculos requiere del desarrollo de métodos válidos para múltiples tipos de matrices y eficientes en tiempo y coste, fiables, eficaces para detectar el mayor número posible de serovariedades sin perder especificidad, y con la sensibilidad suficiente para alcanzar los límites definidos por la legislación.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un nuevo medio de enriquecimiento para *Salmonella*, que pudiera ser aplicable como parte tanto de metodologías de detección tradicionales como junto a métodos más novedosos (inmunoquímicos, q-PCR, etc.), que fuera estable a temperatura ambiente y que pudiera comercializarse tanto en polvo como en solución.

Para ello se evaluaron distintas formulaciones y suplementos selectivos, hasta obtener aquellas combinaciones que permitían la recuperación y crecimiento de *Salmonella* (dosis inoculadas de entre 1-10 UFC/ml) en distintas matrices más o menos complejas, como leche cruda, huevo, carne picada y cama avícola (gallinaza). De entre estas se seleccionaron aquellas donde se obtenía un crecimiento de 6-8 ciclos logarítmicos en 24 horas, eficaces en un número representativo de serovariedades/cepas (**Figura 1**) y matrices, y que permitían la recuperación completa de células de *Salmonella* dañadas subletalmente (80-99,9% de células dañadas) por distintos agentes o tratamientos (calor (55 °C/ 20 min), (ácido cítrico pH 2,0/ 20 min), y 4 h de congelación a -20 °C seguido de 4 ciclos de descongelación (25 °C/30 min) y congelación (-20 °C/30 min)).

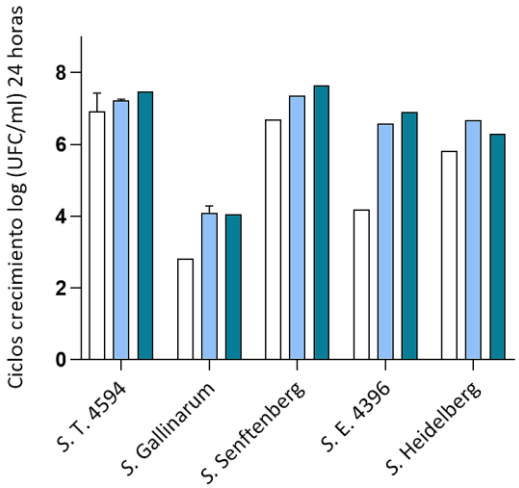


Figura 1: Ciclos de crecimiento en 24 h/37 °C de 5 serovariedades/cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inoculadas a dosis de 1-10 UFC/ml en yogur natural diluido 1:10 w/v con distintos medios de enriquecimiento (Agua de Peptona Tamponada (□), Formulación 1 (■) y 2 (■)).

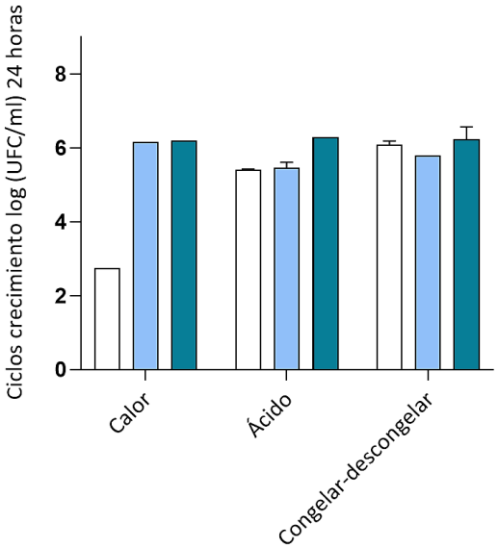


Figura 2: Ciclos de crecimiento en 24 h/37 °C de *S.* Typhimurium CECT 4594 inoculada a dosis de 1-10 UFC/ml en leche cruda diluida 1:10 v/v con distintos medios de enriquecimiento (Agua de Peptona Tamponada (□), Formulación 1 (□) y 2 (■)) tras distintos tratamientos: calor, ácido y ciclos de congelación y descongelación.

Los resultados, tal y como refleja la **Figura 2**, muestran cómo este medio permitía la recuperación de las células de *Salmonella* de una matriz altamente contaminada como es la leche cruda en todas las condiciones estudiadas, mejorando incluso al medio de pre-enriquecimiento utilizado habitualmente en los métodos de detección tradicionales (Agua de Peptona Tamponada).

Asimismo, también se evaluó la estabilidad de este nuevo medio y sus componentes frente a un tratamiento térmico (esterilización a 121 °C/15 min) y durante su almacenamiento (ensayo acelerado de hasta 3 meses a 37 °C), como paso previo a una futura comercialización. Los distintos ensayos confirmaron que ninguno de los suplementos ni el medio completo perdían efectividad en las condiciones evaluadas. Como paso final se realizó una validación de su efectividad en distintas aplicaciones/técnicas (q-PCR, LFIC, microbiología tradicional) en comparación con algunos métodos ya existentes para la detección de este patógeno, incluyendo en el estudio distintas serovariedades/cepas y matrices más y menos complejas (leche cruda, queso curado, huevo crudo, chorizo, carne picada, vegetales de cuarta gama y cama avícola), donde se demostró, de nuevo, que el nuevo medio de enriquecimiento tanto junto a LFIC como a q-PCR era comparable a la metodología ISO para la detección de *Salmonella*.

Los resultados obtenidos indican que el nuevo medio desarrollado es eficaz en la recuperación de distintas cepas de *Salmonella* en matrices problemáticas, es estable en solución a temperatura ambiente y es compatible con sistemas de detección rápida como la q-PCR o la inmuno-cromatografía. No se detalla la composición del medio pues actualmente se encuentra en proceso de ser patentado.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación y Next Generation EU: PDC2021-121037-I00.

REFERENCIAS

[1].European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), *EFSA J.* **2023**, *21*(12).

[2].Comisión Europea (CE), *Diario Oficial de la Unión Europea*, **2005**, *338*(1–24).

PÉRDIDA DE EFICACIA DEL ÁCIDO LÁCTICO FRENTE A VARIANTES RESISTENTES A CIPROFLOXACINA DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Campillo, R.[1], Pardos, C., García-Penas, I.[1], Pagán, R.[1], García-Gonzalo, D.[1]

[1]Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50013 Zaragoza, España.

Diego.Garcia@unizar.es

Resumen / Abstract

El ácido láctico (AL) es un ácido orgánico natural con propiedades antimicrobianas ampliamente utilizado en la industria alimentaria, como sucede en la desinfección superficial de canales de bovino. La posible interrelación entre la resistencia a antibióticos (RAM) y la tolerancia a otros antimicrobianos podría poner en entredicho la eficacia del AL frente a patógenos RAM. En este estudio se evaluó la presencia de tolerancia cruzada al AL en 5 variantes resistentes (VRs) a ciprofloxacina (CIP) de Salmonella Typhimurium LT2 ($STVR_1$-$STVR_5$), comparándolas con su homóloga parental (STWT). Dos de la VRs a CIP mostraron una mayor resistencia al AL (incrementando el riesgo de supervivencia hasta 1000 veces aproximadamente), confirmando que la RAM a CIP puede reducir la eficacia del AL. La secuenciación del genoma de las VRs reveló mutaciones en genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, como soxR, ramR, rpoD y cyaA. La mayor capacidad de respuesta al estrés oxidativo parece estar relacionada tanto con la resistencia a CIP como con la tolerancia cruzada frente al AL.

Palabras clave / Key words

Antibióticos; resistencia a antibióticos; Salmonella Typhimurium; secuenciación del genoma completo; desinfección; ácido láctico; tolerancia cruzada.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los *antibióticos* (RAM) se ha relacionado con unos 5 millones de muertes a escala global [1], posicionándola entre una de las diez mayores amenazas para la salud pública a las que se enfrenta la humanidad [2]. La cadena agroalimentaria juega un papel fundamental en la aparición y diseminación de RAM [3], entre las que preocupa especialmente la RAM a la ciprofloxacina (CIP) en bacterias de *Salmonella* spp. [4]. De este modo, han sido multitud las medidas de prevención y control implantadas en las últimas décadas desde la granja hasta la mesa (*farm-to-fork*).

Una de estas medidas es la aprobación del ácido láctico (AL) para la desinfección superficial de canales de bovino en mataderos, cuya contribución al desarrollo de RAM se consideró poco probable [5]. Sin embargo, más recientemente se ha establecido una interrelación entre los

mecanismos de tolerancia a agentes empleados para el control de patógenos, como el AL, y los mecanismos RAM [6].

Así, bacterias RAM podrían hacerse más tolerantes a agentes como el AL (i.e., tolerancia cruzada), limitando sus propiedades antibacterianas, facilitando la llegada de estas bacterias RAM al consumidor final, provocando enfermedades de difícil tratamiento.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de tolerancia cruzada al ácido láctico (AL) en 5 variantes resistentes ($STVR_1$-$STVR_5$) a la ciprofloxacina (CIP) de *S.* Typhimurium LT2 (STWT), previamente aisladas en nuestro laboratorio.

METODOLOGÍA

Las variantes resistentes (VR) fueron aisladas tras exponer cíclicamente a STWT a dosis crecientes de CIP en caldo de crecimiento Mueller Hinton (**Figura 1)**. La adquisición de RAM a CIP fue constatada determinando las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI, datos no mostrados).

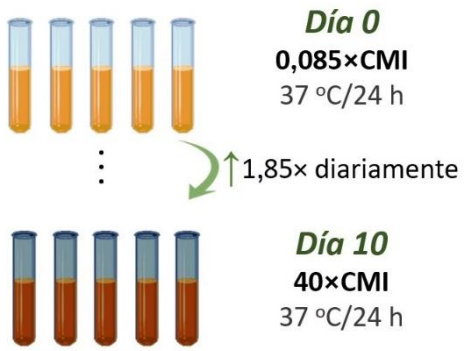


Figura 1: diseño experimental de la obtención de variantes resistentes (VR) a ciprofloxacina (CIP). CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

La evaluación de la presencia de tolerancia cruzada al AL se realizó en frascos de vidrio. Para ello, poblaciones de STWT y $STVR_1$-$STVR_5$ en fase estacionaria de crecimiento fueron expuestas a dosis del 1% (v/v) de AL en caldo triptona de soja (pH ≈ 3,5) a temperatura controlada (25 °C). Inicialmente, se realizó un tratamiento de cribado de las cinco VRs evaluando su supervivencia al AL (1%) tras 40 minutos de tratamiento. Posteriormente, se determinó la curva de supervivencia frente al AL (1%) de las variantes más tolerantes.

Para evidenciar las mutaciones genómicas responsables de los fenotipos descritos, se secuenció el genoma completo de las VRs mediante tecnología Illumina, y se comparó con el de STWT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los ensayos de cribado, 2 de las 5 VR mostraron una mayor tolerancia al AL que STWT (**Figura 2**). La inactivación de $STVR_1$ y $STVR_2$ fue significativamente menor (p < 0,05), incrementándose el riesgo de supervivencia aproximadamente 10 y 1000 veces, respectivamente.

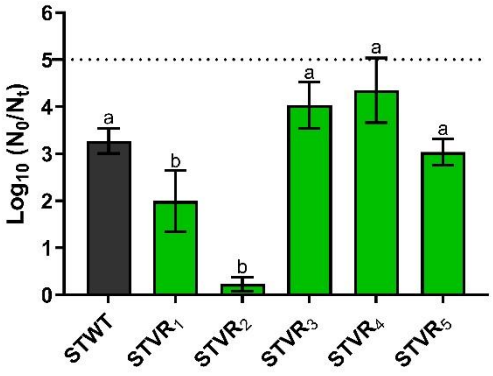


Figura 2: Ciclos log_{10} inactivados de STWT (•) y $STVR_1$-$STVR_5$ (•) tras un tratamiento de 40 min en caldo triptona de soja con ácido láctico (1%) a 25 °C. N_0 ≈ 3×10^7 CFU/mL. La línea discontinua de puntos indica el límite de detección. Diferentes letras (^{a,b}) indican diferencias significativas (p < 0,05).

Asimismo, la determinación de las curvas de supervivencia (**Figura 3**) permitió describir que para inactivar el primer ciclo log_{10} de $STVR_1$ se requirió incrementar hasta un 50% el tiempo de tratamiento respecto a STWT, y un 400% para $STVR_2$.

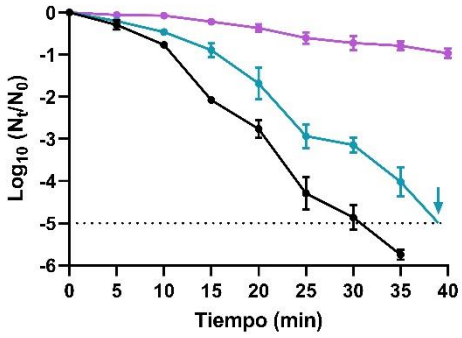


Figura 3: Curva de supervivencia de STWT (•), $STVR_1$ (•) y $STVR_2$ (•) tras un tratamiento en caldo triptona de soja con ácido láctico (1%) a 25 °C. $N_0 \approx 3\times10^7$ CFU/mL. La línea discontinua de puntos indica el límite de detección.

La secuenciación del genoma de las VR reveló mutaciones en genes previamente relacionados con la RAM y la respuesta al estrés oxidativo (*soxR* en $STVR_1$, y *ramR*, *rpoD* y *cyaA* en $STVR_2$; **Tabla 1**).

Tabla 1. Mutaciones en el genoma de $STVR_1$ y $STVR_2$ respecto a STWT.

Cepa	Gen	Tipo de mutación	Cambio
$STVR_1$	*thrS*	Del sin CML	GCG 620
	soxR	Del sin CML	GTA 380
$STVR_2$	*ramR*	SNV	G74C
	rpoD	Ins sin CML	GCC 1764
	cyaA	Del con CML	ATGA 2252

Del: deleción; Ins: inserción; SNV: variación de nucleótido simple; CML: cambio del marco de lectura (CML).

La VR que desarrolló mayor tolerancia al AL fue aquella que mostró mayor número de genes mutados relacionados con el estrés oxidativo. Las proteínas codificadas por *soxR* y *ramR* actúan como represores en sus respectivos regulones, y mutaciones en los mismos han sido relacionadas con una pérdida de su función represora y el consiguiente aumento en la transcripción de los genes de respuesta al estrés *soxS* y *ramA* [7]. De forma similar, mutaciones en *cyaA* pueden suponer una reducción en la síntesis de cAMP, desencadenando mecanismos de respuesta similares [8]. Por otra parte, la mutación descrita en *rpoD* (factor sigma principal) podría suponer grandes cambios en el transcriptoma, siendo uno de ellos la tolerancia al estrés oxidativo [9].

La evaluación del efecto individual de estas mutaciones en el contexto genético de STWT permitirá discernir el impacto de las mismas sobre la tolerancia al AL y la respuesta bacteriana al estrés oxidativo, relevante en los mecanismos de evolución adaptativa conducentes a la generación de bacterias RAM.

CONCLUSIONES

La consecución de este estudio ha permitido concluir que: a) la exposición cíclica a CIP de STWT puede conducir a variantes RAM con tolerancia cruzada al AL, b) la tolerancia cruzada descrita al AL podría tener como base una mejor respuesta al estrés oxidativo conducida por mutaciones en genes reguladores (*soxR*, *ramR*, *rpoD* y *cyaA*), y c) eventuales alelos genéticos en poblaciones bacterianas que confieran RAM, como *S*. Typhimurium resistente a CIP, podrían reducir el efecto bactericida del AL en la desinfección superficial de canales de bovino, facilitando su diseminación en la cadena agroalimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por MICIU/ AEI /10.1303 9/501100011033 (Proyecto PID2021-12340

4NB-I00), "FEDER Una manera de hacer Europa" y Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento del Gobierno de Aragón.

REFERENCIAS

[1] Murray et al., *LANCAO*, **2022**, *399*, 12-18.

[2] Antimicrobial resistance, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance. Consultado: 24/06/2024

[3] Sagar et al., *IJFMDD*, **2023**, *391-393*, 110148.

[4] EFSA y ECDC, *EJFOA6*, **2023**, *21*, 7867.

[5] Comisión Europea, *OJELD3*, **2013**, *L34*, 1-3.

[6] Giacometti et al., *ABSNC4*, **2021**, *10*, 671.

[7] Holden et al., *FCIMAB*, **2020**, *11*, 828.

[8] Barth et al., *MIBLAO*, **2009**, *155*, 1680-1689.

[9] Zhi-Zhou et al., JIAOAT, **2023**.

IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA ADQUIRIDA DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM FRENTE A SULFITO SÓDICO

Jorge Andaluz-Arbe, Alejandro Cadarso, Alberto Fau, Diego García-Gonzalo, Rafael Pagán, Diego Gómez, Daniel Berdejo

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2). Universidad de Zaragoza – CITA, Zaragoza, España.

j.andaluz@unizar.es

Resumen / Abstract

Salmonella enterica es uno de los agentes patógenos de mayor preocupación en la industria alimentaria que ha demostrado ser capaz de generar resistencias frente a diversos compuestos antimicrobianos.
Este trabajo persigue evaluar el efecto del sulfito sódico sobre la aparición de variantes resistentes (VR) en poblaciones de S. Typhimurium e identificar los genes mutados responsables del desarrollo de dichas resistencias.
Se realizaron ensayos de evolución sometiendo a S. Typhimurium a una concentración subinhibitoria de sulfitos durante un periodo de 20 días y, posteriormente, se evaluó su resistencia determinando la concentración mínima inhibitoria. Además, se llevó a cabo la secuenciación del genoma para identificar los cambios genéticos de las cepas aisladas.
Los resultados evidenciaron que una exposición al sulfito sódico puede conducir al aislamiento de VR de S. Typhimurium con una resistencia directa de hasta 38 veces superior a la cepa original. La caracterización genotípica reveló mutaciones en genes como el flhC (regulador de la biosíntesis flagelar) y el cadC (activador transcripcional del operón cad).
Estos resultados respaldan la necesidad de conocer las causas del desarrollo de estas resistencias y su impacto en la Seguridad Alimentaria.

Palabras clave / Key words

Salmonella Typhimurium, sulfito sódico, conservadores alimentarios, resistencia antimicrobiana, Secuenciación del Genoma Completo, Seguridad Alimentaria

1. INTRODUCCIÓN

En el año 2022, *Salmonella enterica* fue el segundo patógeno alimentario más notificado y la principal causa de brotes alimentarios en la Unión Europea. Los principales serotipos de *S. enterica* implicados en infecciones en humanos fueron *S*. Enteritidis y *S*. Typhimurium [1].

A pesar de los esfuerzos llevados a cabo por la Unión Europea para mejorar la seguridad alimentaria, las enfermedades y los brotes de origen alimentario siguen teniendo un elevado impacto en la Salud Pública [2, 3] y ello se ha visto agravado por el surgimiento y la diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos a lo largo de la cadena alimentaria [4].

Recientemente, se ha demostrado la gran capacidad de adaptación y evolución frente a otros antimicrobianos [5]. En este sentido, existe la posibilidad de la aparición de resistencia genética a los aditivos utilizados en la conservación de alimentos.

Dentro del grupo de los conservadores alimentarios, el sulfito sódico se suele utilizar en los preparados de carne con el fin de inhibir o ralentizar la proliferación microbiana, entre la que se encuentra *S. enterica.* En la UE, este conservador se encuentra regulado por el Reglamento (CE) nº 1333/2008.

Con el fin de satisfacer la demanda de alimentos mínimamente procesados, la industria alimentaria ha tenido que desarrollar nuevas estrategias de conservación de alimentos menos intensas, lo cual podría actuar como un agente estresante y conducir a la aparición de variantes resistentes (VR) [6]. Por este motivo, la aparición de VR frente a los conservadores alimentarios también podría dar lugar a resistencias cruzadas frente a antibióticos, como ha sido evidenciado por [5], lo que, además, podría dificultar también el tratamiento de su infección.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del sulfito sódico sobre la aparición de VR en poblaciones de *S*. Typhimurium e identificar los genes mutados responsables de la presentación de dicha resistencia.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Microorganismo

En este estudio se ha utilizado el microorganismo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium LT2 (SeWT) proporcionado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 722).

2.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La determinación de la CMI se llevó a cabo según lo establecido por el Método M100-S24 del Clinical and Laboratory Standards Institute [7].

A partir de un cultivo en fase exponencial (0,5 McFarland), se prepararon cultivos en TSBYE con una concentración inicial de 10^5 UFC/mL, en presencia de un gradiente de concentraciones de sulfito sódico: 450-14.400 mg/L. La CMI se determinó mediante la lectura de la densidad óptica a 620 nm con un lector de placas Nunc™ de 96 pocillos (Multiskan® EX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

2.3. Ensayos de evolución dirigida de sulfito sódico

Los ensayos de evolución se llevaron a cabo sometiendo a 5 líneas de *S*. Typhimurium a una concentración subinhibitoria de sulfito sódico de 900 mg/L, la mitad del valor de la CMI, durante un periodo de tiempo de 20 días.

Posteriormente, se determinó la CMI de cada población frente al mismo conservador alimentario y, en base a los datos obtenidos, se aislaron 40 cepas. Todas las cepas evolucionadas fueron confirmadas como *Salmonella* spp. mediante amplificación de los genes *rfvB* y *trkA* por PCR.

2.4. Caracterización genotípica de las cepas evolucionadas

La extracción del DNA de las cepas evolucionadas se llevó a cabo mediante el

DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). A continuación, se midió la concentración de DNA con un fluorómetro Qubit™ 4 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Singapur) y se estandarizaron las muestras a 20 ng/mL. Posteriormente, las muestras se enviaron a GeneWiz (Leipzig, Alemania) para realizar una Secuenciación del Genoma Completo mediante la tecnología Illumina.

Las mutaciones del genoma de cada cepa se visualizaron mediante el software Integrative Genomics Viewer (IGV) (Universidad de San Diego, San Diego, California, EEUU) y se identificaron los cambios en los aminoácidos mediante la herramienta de traducción Expasy (Instituto Suizo de Bioinformática, Lausana, Suiza). La función de cada uno de los genes fue obtenida de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, Maryland, EEUU).

Previamente a la identificación de las mutaciones, se descartaron aquellas con una frecuencia de detección menor al 20% y las correspondientes a la cepa parental.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento de variantes resistentes

La Tabla 1 muestra que, después de una exposición de 20 días al sulfito sódico, las líneas evolucionadas de *S*. Typhimurium mostraron un incremento en su resistencia directa 38 veces superior a la de la cepa parental.

Tabla 1: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de sulfito sódico para la cepa parental *S.* Typhimurium LT2 (SeWT) y las líneas evolucionadas (Línea 1-5).

	CMI (mg/L Na_2SO_3)
SeWT	2.700
Línea 1	103.797
Línea 2	103.797
Línea 3	103.797
Línea 4	103.797
Línea 5	103.797

Posteriormente, por cada línea de evolución, se aislaron 8 colonias presuntivas en agar XLD de *Salmonella* spp., 5 con morfología típica y 3 con diferente morfología. A continuación, se evaluó la CMI de cada cepa aislada, obteniendo un resultado de 103.797 mg/L para todas ellas.

3.2. Identificación de las mutaciones en las variantes resistentes

Finalmente, se seleccionaron entre 2 y 3 aislados por cada línea de evolución, atendiendo a su morfología y se realizó la secuenciación de un total de 11 aislados.

La caracterización genotípica evidenció distintos genes afectados por las mutaciones en función de la línea evolucionada estudiada, descartando un patrón común en la evolución de las cepas.

De forma general, las variaciones genéticas detectadas fueron las que se encuentran en la tabla 2.

Los genes más involucrados en la resistencia frente al sulfito sódico fueron: STM1491 (relacionado con el sistema de transporte de prolina/glicina betaína de tipo ABC), *ung* (uracilo DNA-glicosilasa), *mreB* (proteína determinante de la forma de la varilla) y

cadC (activador transcripcional de operón *cad*).

Tabla 2: Variaciones genéticas más destacadas durante la caracterización genotípica de las VRs. SNV: variación de un único nucleótido; Del: deleción, *Frame shift*: cambio del marco de lectura; PRO: Prolina; GLU: Ácido glutámico; LYS: Lisina; SER: Serina; ILE: Isoleucina y MET: Metionina.

Gen	Locus tag	Mutación	Cambio
	STM1491	SNV: G315A	Mutación silenciosa (PRO105)
ung	STM2647	Del: -G 258	*Frame shift* (PRO86)
mreB	STM3374	SNV: G409A	GLU137LYS
cadC	STM2557	SNV: G49T	SER16ILE
		SNV: G1350A	MET450ILE

4. CONCLUSIÓN

Los resultados respaldan que *S.* Typhimurium es capaz de desarrollar resistencias antimicrobianas frente al sulfito sódico tras una exposición prolongada. La caracterización genotípica de los aislados ha permitido identificar los cambios genéticos del incremento de dicha resistencia.

Finalmente, cabe destacar que este hecho demuestra que se necesitan más estudios para evaluar la probabilidad de generación de resistencias en presencia de conservantes alimentarios y su impacto en la Seguridad Alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Grupo A06_23R: Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria (AESA).

PROCEDIMIENTO Nº PI-PRD/2023-002. Concurso público para la contratación de 3 investigadores con categoría investigador predoctoral en formación, mediante contrato predoctoral (Art. 21 Ley 14/2011, de 1 de junio, modificado por el Art. 19 de la Ley 17/2022 de 5 de septiembre).

Proyecto PID2021-123404NB-100 financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por "FEDER Una manera de hacer Europa"

REFERENCIAS

[1] EFSA, *EFSA J.*, **2023**, 21, pp. 30-65.

[2] S.M. Pires, B.N. Desta, L. Mughini-Gras, B.T. Mmbaga, O.E. Fayemi, E.M. Salvador, T. Gobena, S.E. Majowicz, T. Hald, P.S. Hoejskov, Y. Minato y B. Devleesschauwer, *Curr. Opin. Food Sci.*, **2021**, *39*, pp. 152-159.

[3] EFSA, *EFSA J.*, **2021**, 19, pp. 31-77.

[4] R. Capita y C. Alonso-Calleja, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2013**, *53*, pp. 11-48.

[5] D. Berdejo, E. Pagán, N. Merino, L. Botello-Morte, R. Pagán y D. García-Gonzalo, *Int. J. Food Microbiol.*, **2021**, *360*, pp. 109-443.

[6] J. Mortier, E. Gayán, R. Van Eyken, O.E. Torres Montaguth, L. Khodaparast, B. Houben, S. Carpentier, F. Rousseau, J. Schymkowtz y A. Aertsen, *mBio*, **2021**, *12*, pp. e0112921.

[7] Clinical & Laboratory Standards Institute, “Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically” (CLSI, 2018).

DEVELOPMENT OF USER-FRIENDLY BIOINFORMATIC TOOLS FOR THE ANALYSIS OF SHOTGUN SEQUENCING DATA AND THE INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS "USER-FRIENDLY" PARA EL ANÁLISIS DE DATOS DE SECUENCIACIÓN MASIVA DE ADN Y LA INVESTIGACIÓN DE RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS

Narciso M. Quijada[1] *, David Mendoza-Salido[1], Alejandro J. Alcañiz[1], Brad J. Hart[2], Carlos Sabater[3], David Abad[1], Francesco Asnicar[4], Jorge Rodríguez-Grande[5], José F. Cobo-Díaz[6], Livio Antonielli[7], María de Toro[8], Johanna Rhodes[9], Alicia Pageau[10], Anna Fijarczyk[10], Camille Bédard[10], Christian Landry[10]

[1] Department of Microbiology and Genetics, Institute for Agribiotechnology Research (CIALE), University of Salamanca, Spain
[2] Venter microbial lab, Clinical and Health Sciences, University of South Australia, Australia
[3] Dairy Research Institute of Asturias, Spanish National Research Council (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Spain
[4] Department of Cellular, Computational and Integrative Biology (CIBIO), University of Trento, Trento, Italy
[5] Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain
[6] Department of Food Hygiene and Technology and Institute of Food Science and Technology, Universidad de León, Spain
[7] AIT Austrian Institute of Technology GmbH, Tulln an der Donau, Austria
[8] Plataforma de Genómica y Bioinformática, Fundación Rioja Salud (CIBIR), Logroño, Spain
[9] Department of Medical Microbiology, Radboudumc, Nijmegen, Netherlands
[10] Dépt de Biochimie, de Microbiologie et de Bio-informatique, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Canada

*** Autor de correspondencia: nmq@usal.es**

Resumen / Abstract

En este trabajo presentamos varios software de código de código libre diseñados para el análisis de datos de secuenciación masiva de microbiomas con el objetivo de investigar las resistencias a antimicrobianos (RAM) con una premisa principal: que sean fáciles de usar. TORMES 2.0, transTORMES y torMAGs pueden trabajar directamente desde los archivos crudos de secuenciación y permiten el análisis completo de genomas bacterianos, la recuperación de MAGs de metagenomas y el análisis RNAseq. Respectivamente. ChroQueTas permite el análisis RAM en genomas fúngicos, buscando mutaciones en genes diana de los antifúngicos.

Palabras clave / Key words

Secuenciación masiva de ADN, bioinformática, microbioma, resistencia a antimicrobianos

El auge de las plataformas y tecnologías de secuenciación masiva de ADN en los últimos años nos permite realizar, con un alto nivel de detalle, el análisis de comunidades microbianas presentes en distintos ambientes, así como de características genómicas de especial interés, como los mecanismos de resistencia a antimicrobianos (RAM). Durante la preparación de librerías, el ADN total extraído de una muestra (de un aislado puro o de una comunidad compleja) se fragmenta, por lo que tras el proceso de secuenciación se generan una gran cantidad de lecturas (número y longitud variable en función de la química de secuenciación) en un archivo de texto plano conocido como FASTQ. A partir de estos archivos, pueden seguirse distintas aproximaciones con el objetivo de recuperar la información biológica contenida en la muestra. El análisis bioinformático de las lecturas supone la mayor limitación de las tecnologías de secuenciación de ADN, ya que se requiere una gran capacidad de computación, almacenamiento y de conocimientos programación que no están disponibles en todos los laboratorios de microbiología. Por ello, con el fin y acercar estos análisis a la comunidad sin experiencia computacional hemos desarrollado distintos software y pipeline para analizar genomas, microbiomas y RAM con un objetivo principal: que sean "*user-friendly*".

TORMES 2.0 (The Outstanding Resource Minimizing Energy Scripting [1]) permite realizar un análisis genómico completo (*i.e.*, ensamblado de genomas, predicción de genes, anotación de proteínas contra distintos tipos de bases de datos, búsqueda de mecanismos RAM, de virulencia, enzimas que actúan sobre carbohidratos (CAZymes), de elementos genéticos móviles (EGM, e.g., plásmidos e integrones), Multi-Locus Sequence Typing (MLST), serotipado, subtipado, etc.) directamente a partir de datos crudos de secuenciación de ADN (de distintas plataformas) de cualquier especie bacteriana y siguiendo sólo unos pasos sencillos.

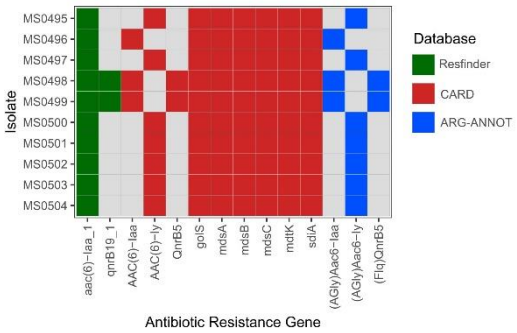


Figura 1: Ejemplo del análisis de RAM con tres bases de datos distintas de 10 cepas de *Salmonella enterica* con *TORMES 2.0*.

TORMES 2.0 incluye los software *transTORMES* y *TORMAGs*, que permiten además analizar datos de transcriptómica y recuperar genomas a partir de metagenomas (MAGs), respectivamente, siguiendo la misma premisa de operatividad amigable.

Por otro lado, la búsqueda de RAM en hongos es un tema poco estudiado debido a la complejidad biológica de estos genomas (e.g., presencia de introns y exones, variedad alélica) y la falta de bases de datos de referencia. Con el objetivo de investigar RAM en hongos y levaduras, hemos desarrollado el software *ChroQueTas* (Chromosome Query Targets [2]) que permite de manera muy sencilla analizar genomas de hongos y levaduras para encontrar RAM, las cuales suelen deberse a mutaciones en sitios concretos de las proteínas diana de los antifúngicos, utilizando para ello la base de datos de *FungAMR*, para la que se han minado más

de 300 publicaciones científicas y se han asignado mutaciones con distintos niveles de evidencia de RAM. *ChroQueTas* requiere como entrada directamente los archivos FASTQ o un genoma ensamblado en formato FASTA (sin necesitad de anotar), lo que facilita en gran medida la adquisición de estos datos por el investigador.

Tanto *TORMES 2.0* como *ChroQueTas* realizan todos los análisis de manera automática y almacenan todos los resultados para que estén a disposición del usuario. Una vez han terminado, resumen los principales en un archivo interactivo (tipo HTML) con figuras de alta calidad y tablas descargables que se puede abrir en cualquier navegador y que facilita la visualización de los resultados, siendo posible transferirse estos archivos cómodamente entre usuarios vía email.

En definitiva, *TORMES 2.0* y *ChroQueTas* permiten el análisis del genoma completo y/o la investigación de genes RAM a partir de datos de secuenciación directa de una manera fácil de usar, compatible y estandarizada, sin requerir habilidades computacionales profundas.

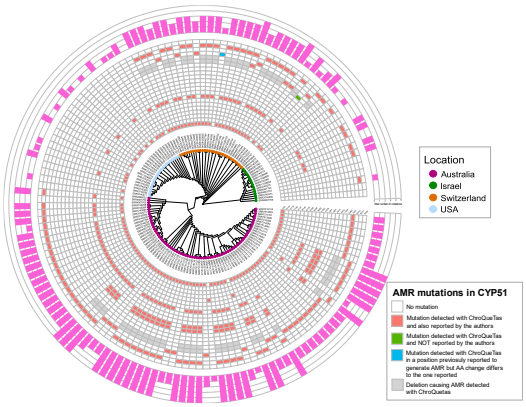


Figura 2: Ejemplo del análisis de RAM de 144 cepas de *Zymoseptoria tritici* con *ChroQueTas*.

AGRADECIMIENTOS

NMQ is currently funded by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program through the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 101034371. AJA is currently funded by the Investigo program and the European Union, NextGenerationEU. D.M.S. (MCIN/AEI/10.13039/501100011033 grant agreement No PRE2022-105868) thanks the State Research Agency (AEI) of the Ministry of Science, Innovation and Universities and the European Social Fund plus This work was supported by a GAPP project from Genome Québec and Genome Canada to CRL. CRL Holds the Canada Research Chair in Cellular Systems and Synthetic Biology.

REFERENCIAS

[1] Repositorio público de TORMES, https://github.com/nmquijada/tormes

[2] Repositorio público de ChroQueTas, https://github.com/nmquijada/ChroQueTas

IMPACTO DE LOS TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN EN EL RESISTOMA DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA REGIÓN DE MURCIA Y SU CAPACIDAD DE TRANSMISIÓN A LOS ALIMENTOS MEDIANTE LAS AGUAS DE RIEGO

López Cañizares, J.[1], Truchado, P.[1], Cobo, J.F.[2], Gil, M.I.[1], Álvarez-Ordóñez, A.[2], Allende, A.[1]

[1]Grupo de investigación en Microbiología y Calidad de Frutas y Hortalizas, CEBAS-CSIC, Murcia.
[2]Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos e Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, León.

jelopez@cebas.csic.es

Resumen/Abstract

Con el fin de satisfacer la demanda de agua necesaria para la agricultura, se propone el uso de las aguas regeneradas procedentes de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) como una alternativa sostenible. Sin embargo, el uso de estas aguas puede presentar riesgos para la salud pública, ya que puede contener microorganismos patógenos, bacterias resistentes a antibióticos (ARBs) y genes de resistencia (ARGs). En el caso del riego de hortalizas de hoja, el agua entra en contacto con la parte comestible del producto, por lo que existe un riesgo de transmisión del alimento al consumidor. El objetivo de este estudio es evaluar el impacto de los tratamientos de desinfección de dos EDARs de la Región de Murcia en el resistoma de las aguas residuales. Los sistemas de desinfección se basan en ozono y en ultrafiltración por membrana (MBR), por ser novedosos y poco implementados. Se tomaron muestras de agua de influentes y efluentes, se filtraron (0,2 µm) diferentes volúmenes (40 – 800 mL) y se extrajo el DNA de la fracción retenida en el filtro. El DNA se secuenció utilizando el protocolo de Oxford Nanopore para análisis metagenómico. En ambos influentes, los genes de resistencia a macrólidos, betalactámicos y tetraciclinas fueron los más abundantes, incluyéndose mph(E), msr(E), blaOXA o tet(Q). Los resultados muestran que los tratamientos de desinfección son eficaces reduciendo el número de ARGs presentes en el agua, pero se observaron diferencias entre ellos. El tratamiento con MBR fue más eficaz eliminando ARGs, por lo que sería el más recomendado para aguas de riego con el fin de reducir posibles riesgos para la salud pública.

Palabras clave/ Keywords

Estación depuradora de aguas residuales (EDAR), Membrane Bioreactor (MBR), ozono, Antimicrobial Resistance Genes (ARGs), Antimicrobial Resistant Bacteria (ARBs), influente, efluente.

INTRODUCCIÓN

El uso de aguas tratadas en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) se ha propuesto como una fuente alternativa de agua de riego para la agricultura. Sin embargo, estas aguas, si no son debidamente tratadas, pueden suponer un riesgo para la salud pública, debido a la presencia de riesgos biológicos como son las bacterias y virus, así como bacterias resistentes a los antimicrobianos (ARB) y sus genes de resistencia a antibióticos (ARGs)

[1][2]. En concreto, los ARGs pueden ser transferidos y acumularse en las frutas y hortalizas que han sido regadas con efluentes de EDARs [3]. Para intentar mitigar estos riesgos es importante, primero, determinar cuáles son los ARGs más relevantes en el núcleo urbano mediante el estudio del resistoma de las aguas residuales para, en una segunda fase, evaluar la eficacia de los distintos tratamientos utilizados en las EDARs sobre estos genes específicos [4]. De este modo, se puede reducir la propagación de ARGs en los cultivos regados con aguas regeneradas.

Este estudio se centra en evaluar el resistoma desde una aproximación metagenómica de aguas residuales de dos poblaciones, así como la eficacia de los tratamientos de regeneración implementados en dos EDARS que utilizan como sistemas de desinfección ozono y la ultrafiltración por membrana (MBR).

METODOLOGÍA

Se tomaron muestras de agua de dos EDARs ubicadas en la Región de Murcia que utilizan ozono y MBR como tratamientos terciarios. Dependiendo de las propiedades físico-químicas de las aguas se filtraron, haciendo uso de filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro (Sartorius, Göttingen, Alemania), diferentes volúmenes de agua de cada muestra (con un rango desde 40 mL para influente y 800 ml para el efluente). Para la extracción de DNA genómico se utilizó el kit DNeasy PowerWater Kit (QIAGEN, Netherlands) siguiendo las indicaciones del fabricante. La secuenciación del resistoma se llevó a cabo usando la tecnología Oxford Nanopore Sequencing y utilizando el kit *Native Barcoding Kit 24 (SQK-NBD114.24). Posteriormente, se llevó a cabo el análisis bioinformático donde las secuencias obtenidas fueron limpiadas y filtradas haciendo uso de Porechop (v0.4; github.com/rrwick/Porechop) y de NanoFilt (2.8.0,https://github.com/wdecoster/nanofilt), respectivamente. La base de datos utilizada para la búsqueda de ARGs fue ResFinder (v2.0,* https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/*)*

RESULTADOS

El análisis de las secuencias de las muestras del influente mostró que los grupos de ARGs que predominan se corresponden con el grupo de aquellos resistentes a macrólidos (38 %), seguidos de los betalactámicos (21 %), aminoglucósidos (17 %) y tetraciclinas (11 %). Otros grupos de ARGs, tales como sulfonamidas, trimetoprima o quinolonas, también fueron detectados, pero en menor porcentaje de abundancia relativa. Después de los tratamientos de depuración (primario y secundario) y de desinfección, se observó que en la EDAR que utiliza ozono como tratamiento de desinfección, el grupo mayoritario de ARGs que presentó fue el de los macrólidos (66 %), mientras que en la EDAR que utiliza MBR, fueron las tetraciclinas (36 %), seguidas de los aminoglucósidos (29 %) (**Figura 1**).

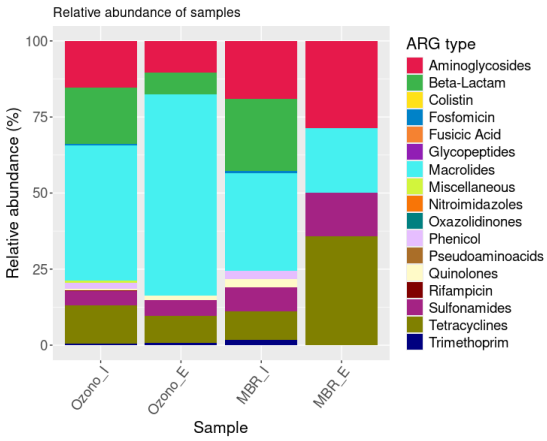


Figura 1. Abundancia relativa de ARGs por tipo de antibiótico. Influente (I), Efluente (E)

A nivel individual de ARGs, se observó que los promedios de copias por millón de lecturas (cpm) en los influentes de las dos EDARs no fueron muy diferentes, observándose 655 y 675 cpm entre las dos EDARs (ozono y MBR, respectivamente). Sin embargo, las diferencias se incrementaron en los efluentes de dichas EDARs, observándose promedios de cpm de 73 y 20 para las EDARs con tratamientos de ozono y MBR, respectivamente.

Los ARGs predominantes en los influentes de las EDARs fueron *mph(E)* y *msr(E)*. Otros ARGs que se detectaron fueron: *erm(B)*, *blaOXA*, *tet(Q)* o *sul1.* Un patrón similar se observó en los efluentes de la EDAR con tratamiento de ozono, no obstante, en la EDAR que utiliza MBR se observaron mayoritariamente los ARGs: *aadA13, erm(B)* y *sul1* (**Figura 2)**.

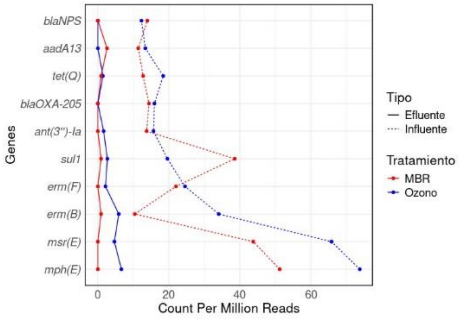


Figura 2. ARGs más abundantes representados por *count per million reads* en las muestras de influente y efluente.

En los efluentes, también se observó que el valor medio de cpm para estos ARGs se reducía significativamente con respecto al influente (**Tabla 1**). Los resultados obtenidos indican que ambos tratamientos (ozono y MBR) son capaces de reducir la presencia de ARGs en los efluentes de las EDARs, siendo el tratamiento con MBR capaz de reducir en mayor proporción las cpm totales.

Tabla 1. Porcentaje de reducción del número de genes tras la aplicación de los tratamientos de desinfección.

Sample	Porcentaje de reducción (%)
Ozono	89
MBR	97

CONCLUSIÓN

Este estudio pone de manifiesto que los tratamientos terciarios implementados en las EDARs de la Región de Murcia son capaces de reducir los niveles de ARGs de forma significativa. Entre los tratamientos estudiados, el sistema MBR resultó ser más eficaz que el de ozono en la eliminación de ARGs en el agua regenerada. Estos hallazgos indican que el tratamiento terciario con MBR es el más recomendado para la desinfección del agua en las EDARs, y su posterior utilización para el riego agrícola.

La reducción de ARGs contribuirá significativamente a la mitigación de posibles riesgos para la salud pública asociados con el uso de aguas regeneradas.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio está financiado por la Agencia Estatal de Investigación (MCIN, TED2021-131427B-C21 y TED2021-131427B-C22) del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia de la Unión Europea, y el programa AGROALNEXT (MCIN y fondos de NextGenerationEU, PRTR-C17.I1).

REFERENCIAS

[1] HJ Majeed, MV Riquelme, BC Davis, S Gupta, L Angeles, DS Aga, E Garner, A Pruden, PJ Vikesland. Evaluation of metagenomic-enabled antibiotic resistance surveillance at a conventional wastewater treatment plant, *Front. Microbiol.*, 2021, *12*, 657954.

[2] X Yin, Y Yang, Y Deng, Y Huang, L Li, LYL Chan, T Zhang. An assessment of resistome and mobilome in wastewater treatment plants through temporal and spatial metagenomic analysis, *Water Res.*, 2022, *209*, 117885.

[3] ID Kampouris, S Agrawal, L Orschler, D Cacace, S Kunze, TU Berendonk, U Klümper. Antibiotic resistance gene load and irrigation intensity determine the impact of wastewater irrigation on antimicrobial resistance in the soil microbiome, *Water Res.*, 2021, *193*, 116818.

[4] J Hubeny, E Korzeniewska, S Ciesielski, G Płaza, M Harnisz. The resistome of ESKAPEE pathogens in untreated and treated wastewater: a polish case study, *Biomolecules*, 2022, *12*,1160.

ANÁLOGOS CÁRNICOS: TENDENCIAS EN FORMULACIÓN ANTIMICROBIANA Y SU IMPACTO EN LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

Jofré A.[1], García-Álvarez de Toledo I.[1], Matas G.[2], Serra X.[2], Bover-Cid S.[1]

[1]IRTA, Funcionalidad y seguridad alimentarias, Finca Camps i Armet, 17121 Monells.
[2]IRTA, Calidad y tecnología alimentarias, Finca Camps i Armet, 17121 Monells.

anna.jofre@irta.cat

Resumen

A pesar del auge de los análogos cárnicos en los últimos años, los aspectos relacionados con su seguridad alimentaria son poco conocidos. El objetivo del presente estudio fue evaluar tendencias actuales en agentes antimicrobianos, identificar patógenos asociados a este tipo de productos y evaluar el potencial de crecimiento de Listeria monocytogenes *a través de ensayos tipo* challenge test *en análogos cárnicos comerciales. El análisis de la información proporcionada en el envase de productos disponibles en el mercado (base de datos Mintel GNPD: Base de datos Global de Nuevos Productos) mostró que dos tercios de ellos estaban formulados sin agentes antimicrobianos. Los ácidos orgánicos o sus sales, especialmente vinagre y sus variantes, fueron los más frecuentes. En las notificaciones publicadas en el sistema RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed)* L. monocytogenes *y* Salmonella *fueron los microorganismos patógenos más notificados. También se identificaron* Bacillus cereus, Clostridium *spp. y* Cronobacter sakazaki*. Los* challenge tests *para evaluar el comportamiento de L. monocytogenes en diferentes tipos de envasado (aire, vacío y MAP) y almacenamiento a 6,5 °C, mostraron una importante variabilidad en cuanto a la capacidad de crecimiento del patógeno. Dependiendo de la presencia de antimicrobianos en la formulación, el pH, los niveles de bacterias del ácido láctico y el tipo de envasado se observó desde una inhibición total de* L. monocytogenes *hasta potenciales de crecimiento del orden de 6,5 log. La aplicación de un enfoque basado en el concepto "*safety by design*" (seguridad basada en el diseño) que tenga en cuenta los factores intrínsecos y extrínsecos es esencial para el desarrollo de análogos cárnicos seguros durante toda la vida útil.*

Palabras clave

Patógenos, plant-based meat*, proteína alternativa, sustitutos de carne*

El incremento de la población mundial, junto con una preocupación por parte de la sociedad en relación a la salud, el impacto de la producción alimentaria en el medioambiente, el cambio climático y el bienestar animal, ha promovido un cambio hacia alimentos elaborados con fuentes de proteína alternativa, principalmente de base vegetal (*plant-based*) [1]. En base a esta demanda de los consumidores, la industria alimentaria está desarrollando productos innovadores que buscan dotar al mercado de diferentes fuentes de proteína de calidad. Es desde este enfoque, en el que análogos lácticos y cárnicos, entre otros productos basados en proteína alternativa, han presentado un auge en desarrollo y complejidad en los últimos años [2, 3]. Se trata de productos que imitan la apariencia, textura y sabor de derivados cárnicos como

las hamburguesas, salchichas o productos cocidos loncheados. Los aspectos relacionados con su seguridad alimentaria son poco conocidos, y tanto patógenos esporulados (e.g. *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum*) como patógenos vegetativos (e.g. *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*) se han descrito como peligros relevantes procedentes de materias primas y contaminación cruzada [2, 4, 5].

El objetivo de este estudio fue evaluar tendencias actuales en agentes antimicrobianos, identificar patógenos asociados a este tipo de productos y evaluar el potencial de crecimiento de *L. monocytogenes* a través de ensayos tipo *challenge test* en análogos cárnicos comerciales.

Antimicrobianos en análogos cárnicos

El estudio de las tendencias actuales en el uso de antimicrobianos en análogos cárnicos se realizó a través de la información proporcionada en el envase de productos disponibles en el mercado europeo mediante la base de datos Mintel GNPD (Base de datos Global de Nuevos Productos). Los productos analizados fueron de la categoría "meat substitutes" durante el período junio 2021- junio 2024.

Los resultados mostraron que entre un 25 y un 37% de los productos estaban formulados con antimicrobianos, hasta un máximo de tres, siendo los ácidos orgánicos y sus sales, especialmente el vinagre y sus variantes, los predominantes en las tres subcategorías analizadas: loncheados, salchichas y picados/migas (Figura 1).

Notificaciones relacionadas con alimentos e ingredientes a base de proteína alternativa

Las notificaciones del *Rapid Alert System for Food and Feed* (*RASFF*) europeo fueron utilizadas para obtener información sobre los riesgos microbiológicos asociados a la cadena de producción de alimentos a base de proteína alternativa.

Se realizó el análisis de las notificaciones publicadas entre 1997 y marzo de 2024. En total se examinaron 77.014 notificaciones. Se identificaron 161 notificaciones de productos veganos/vegetarianos con diferentes causas de alerta alimentaria, 25 relacionadas con detección de microorganismos.

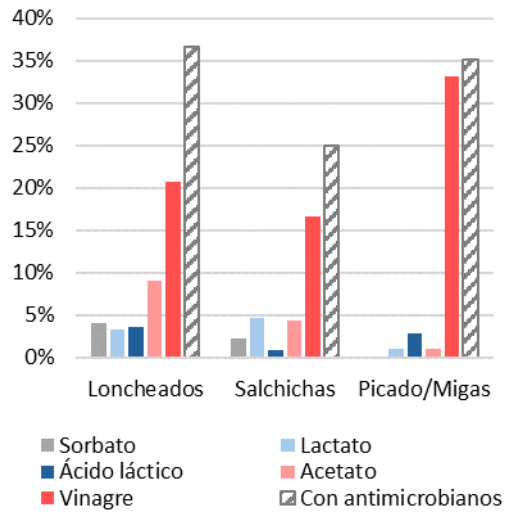


Figura 1: Antimicrobianos presentes en la formulación de los análogos cárnicos según información disponible en la etiqueta.

Salmonella fue el microorganismo con mayor incidencia en ingredientes o productos intermedios. La presencia de *Salmonella* en la cadena de distribución de la soja y su larga estabilidad en compuestos de baja actividad de agua ha sido descrita por diferentes autores [6, 7]. Por otra parte, las alertas relacionadas con *L. monocytogenes* implicaron alimentos ya elaborados (análogos cárnicos, lácteos, etc.) cuyas características permiten el desarrollo del patógeno, lo que se corresponde con la alta incidencia relacionada con alimentos

listos para el consumo, no solamente en aquellos productos basados en proteína alternativa [5].

Se detectaron también notificaciones para *B. cereus*, *C. perfringens* y *C. sakazakii,* microorganismos previamente asociados a estos alimentos [8].

Potencial de crecimiento de *L. monocytogenes* en análogos cárnicos

Los ensayos de laboratorio tipo *challenge test* para evaluar el potencial de crecimiento de *L. monocytogenes* se realizaron a través de la inoculación de una mezcla de 3 cepas del patógeno (CTC1034, 12MOB047LM y 12MOB053LM) en diferentes análogos cárnicos comerciales envasados en aire, vacío y MAP, conservados a 6,5 °C. La evolución del patógeno y las bacterias del ácido láctico (BAL) se monitorizó a través de recuentos en placa en medio cromogénico para *L. monocytogenes* (CHROMagar Listeria) y MRS, respectivamente.

Los *challenge test* con *L. monocytogenes* mostraron que el potencial de crecimiento del patógeno depende de la formulación (e.g. presencia de antimicrobianos), y del pH, así como de los niveles de BAL (añadidos como cultivos o endógenos) y del tipo de envasado. Se observó una inhibición total del crecimiento de *L. monocytogenes* en productos formulados con ácido láctico, vinagre y/o niveles altos de BAL. Por el contrario, se registraron potenciales de crecimiento del orden de 6,5 log en productos sin antimicrobianos ni BAL, un comportamiento similar al mostrado por el patógeno en otros alimentos cárnicos [9] y análogos [10].

La aplicación de un enfoque basado en el concepto "*safety by design*" (seguridad basada en el diseño de formulaciones de análogos cárnicos) que tenga en cuenta los principales factores intrínsecos para la inhibición del crecimiento microbiano (pH, a_w, presencia de antimicrobianos) y factores extrínsecos (e.g. tratamientos térmicos y envasado) es esencial para el desarrollo de análogos cárnicos seguros durante toda la vida útil.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PID2022-137090OR-I100 (Safe Meat Analogues made with Alternative Proteins (SafeMAAP) y ayuda para contratos Predoctorales PREP2022-000490 (recibida por IG), ambos financiados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y "FEDER Una manera de hacer Europa". Grupo de investigación consolidado (2021 SGR00468) financiado por AGAUR y el programa CERCA, Generalitat de Catalunya.

REFERENCIAS

[1] M Gräfenhahn and M Beyrer, *Foods*, **2024**, *13*, 1541.
[2] D Bogueva and DJ McClements, *Sustainability*, **2023**, *15*, 14336.
[3] R Ramsing, R Santo, BF Kim, D Altema-Johnson, A Wooden, KB Chang, et al., *Curr Environ Health Rep*, **2023**, *10*, 291-302.
[4] J Kabisch, G Joswig, C Böhnlein, G Fiedler, and CMAP Franz, *J Consum Prot Food S*, **2024**, *19*, 33-40.
[5] C Van Paepeghem, F Taghlaoui, A De Loy-Hendrickx, A Vermeulen, F Devlieghere, L Jacxsens, et al., *Int. J Food Microbiol*, **2024**, *410*, 110506.
[6] L McCallum, S Paine, K Sexton, M Dufour, K Dyet, M Wilson, et al., *Foodborne Pathog Dis*, **2013**, *10*, 159-64.
[7] MD Rocha, RD Chaves, L Freire, AKR Pia, MM Furtado, VO Alvarenga, et al., *Int. J Food Microbiol*, **2022**, *372*, 109695.
[8] Y Lin, X Cha, C Brennan, J Cao, and Y Shang, *Microorganisms*, **2023**, *11*, 2763.
[9] C Serra-Castelló, JCCP Costa, A Jofré, A Bolívar, F Pérez-Rodríguez, and S Bover-Cid, *Int. J Food Microbiol*, **2022**, *363*, 109491.
[10] Z Liu, M Shaposhnikov, S Zhuang, T Tu, H Wang, and L Wang, *Food Research International*, **2023**, *164*, 112408.

EFECTO DE FILMS ACTIVOS DE GELATINA Y QUITOSANO CON EXTRACTO DE SALVADO DE ARROZ EN LA CONSERVACIÓN DE CARNE FRESCA DE CERDO

Cabeza de Vaca M., Rocha Pimienta J., García-Parra J., Ramírez R., Delgado-Adámez J.

Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Instituto Tecnológico Agroalimentario (INTAEX). C/ Adolfo Suárez, s/n. 06071 BADAJOZ.

maria.cabeza@juntaex.es

Resumen

Entre las medidas de control de microorganismos en carne fresca de cerdo, altamente perecedera por el desarrollo microbiano, se encuentra el recubrimiento con films. La sustitución de materiales derivados del petróleo por biopolímeros, como el quitosano y la gelatina, para la obtención de films biobasados y biodegradables supone actualmente un reto. El salvado de arroz constituye un subproducto agroindustrial cuyo extracto (ESA) presenta una alta actividad antimicrobiana debido a la presencia de γ-oryzanol. El objetivo del presente estudio fue la producción de biofilms activos formulados con gelatina/quitosano o quitosano, con o sin extracto etanólico de ESA (0.5%), y la evaluación de su aplicación en la conservación sobre carne fresca. Del ESA se determinó su capacidad antimicrobiana frente a Escherichia coli y Listeria innocua, y de los biopolímeros se determinó la migración de γ-oryzanol y la actividad bacteriostática frente a E. coli y L. innocua. Finalmente, se realizó un seguimiento de las cargas de microorganismos aerobios psicrófilos y mesófilos totales en carne de cerdo envasada con estos biopolímeros durante 9 días en refrigeración (4ºC). El ESA presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 6.62% frente a E. coli y 6.42% frente a L. innocua. Las mayores liberaciones de γ-oryzanol estuvieron asociadas a los biopolímeros de gelatina/quitosano ($p \leq 0.001$). Sólo los films de quitosano mostraron actividad bacteriostática frente a E. coli y L. innocua, resultando más efectiva ($p \leq 0.001$) la formulación con ESA. La utilización de biofilms evitó el incremento de las poblaciones de microorganismos mesófilos y psicrófilos en carne fresca durante los nueve días de conservación, resultando más efectivo el quitosano, no detectándose microorganismos psicrófilos a día 9 con este biofilm. La incorporación de RBE mejoró este efecto en gelatina/quitosano frente a psicrófilos a día 9, y en quitosano frente a mesófilos a día 1 y día 5 y psicrófilos a día 5.

Palabras clave

Biofilms, quitosano, gelatina, salvado de arroz, carne, mesófilos, psicrófilos.

INTRODUCCIÓN

Entre las medidas de conservación de la carne fresca de cerdo, encaminadas a evitar el desarrollo de microorganismos y prolongar su vida útil, se encuentra el recubrimiento con films como barrera fisicoquímica frente al ambiente. Actualmente, la sustitución de materiales derivados del petróleo por biopolímeros, como el quitosano y la gelatina, para la obtención de films biobasados, de origen

natural, supone actualmente un reto social y ambiental. La adición de compuestos activos de origen natural en estos films para mejorar sus propiedades físicas, así como como sus propiedades bioactivas -antioxidantes y antimicrobianas- debido a la migración de estos compuestos desde el film a la matriz alimentaria, constituye una alternativa al uso de otro tipo de aditivos que pueden dar lugar a sustancias tóxicas. Concretamente, entre las fuentes de aditivos activos naturales, el salvado de arroz constituye un subproducto agroindustrial abundante y barato cuyo extracto (ESA) presenta una alta actividad antimicrobiana, debido a la presencia de una mezcla de ésteres de ácido trans-ferúlico y fitoesteroles conocida como γ-oryzanol, y que puede ser fácilmente adicionado para la obtención de biofilms activos. Con todo ello, el objetivo del presente estudio fue la elaboración de biofilms activos formulados con gelatina/quitosano (GL/Q) o quitosano (Q), con o sin extracto etanólico de ESA, y la evaluación tanto de sus propiedades antimicrobianas como de su aplicación para la conservación de carne fresca de cerdo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El extracto de salvado de arroz (ESA) se extrajo a partir de salvado arroz seco y molido, con etanol (100%) a 63ºC durante 120 min en agitación y secado en rotavapor hasta la evaporación total del etanol. Los biofilms activos se elaboraron en el laboratorio a partir de la solución acuosa de los biopolímeros de gelatina y quitosano conforme a las siguientes formulaciones: quitosano (2%), ácido láctico (1%), ESA (0,5%) y glicerol (1%) para los films de quitosano (Q); gelatina (3%), quitosano (1%), ácido láctico (0.4 %), ASE (0,5%) y glicerol (0,4%) para los films de gelatina/quitosano (GL/Q). Finalmente, se vertieron 20 g de las solucione en placas Petri (9 cm Ø), y se secaron durante 5 días a temperatura ambiente hasta la obtención de los films. Del ESA se determinó su capacidad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua* por microdilución en caldo [1], y de los biofilms se determinó la migración de γ-oryzanol en dos simulantes lipofílicos (etanol-50% y etanol-95%), así como la actividad bacteriostática frente a *E. coli* y *L. innocua* [2]. Finalmente, se realizó un seguimiento de los recuentos microbianas en filetes de lomo cerdo frescos recubiertos con estos films y envasados al vacío conservados durante 1, 5 y 9 días en refrigeración (4ºC), usando como control filetes sin film. Finalmente se realizó el recuento de microorganismos aerobios mesófilos y psicrófilos totales a partir de la siembra de 1 ml de extracto de carne, homogeneizada en agua de peptona, en diferentes diluciones decimales seriadas en placas con medio de cultivo estándar de agar (PCA) y la incubación a 30ºC durante 3 días o a 6.5ºC durante 7 días, respectivamente [2].

RESULTADOS

El ESA presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 6.62 % frente a *E. coli* y 6.42% frente *L. innocua*.

Respecto a las liberaciones de los compuestos activos del ASE por los biofilms, tan sólo se detectaron para el simulante etanol-95%. Las mayores liberaciones de γ-oryzanol estuvieron asociadas a los biopolímeros de GL/Q ($p \leq 0.001$), presentando ambos films un crecimiento

constante en las migraciones del ASE, con los máximos valores a partir de las 48 horas para GL/Q y a las 24 para Q ($p \leq 0.01$) (figura 1).

En relación con la actividad antimicrobiana de los biofilms tan sólo los de quitosano mostraron actividad bacteriostática frente a *E. coli* y *L. innocua*, no detectándose para los de gelatina/quitosano (figura 2). De manera global, los dos tipos de biofilms de quitosanos lograron la inhibición de ambos microrganismos a lo largo del ensayo. Sin embargo, los biofilms activos con adición de ESA resultaron más efectivos ($p \leq 0.001$), presentando los menores recuentos de *E. coli* a partir de las 48 horas y de *L. innocua* desde las 24 horas y manteniendo en todos los casos valores menores de 4 log UFC ml^{-1}.

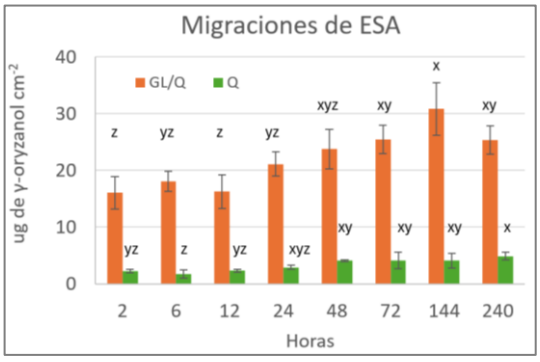


Figura 1: Evolución de la liberación del ESA de los films activos en etanol 95%. x, y, z: indican diferencias significativas dentro de un mismo film ($p \leq 0.01$).

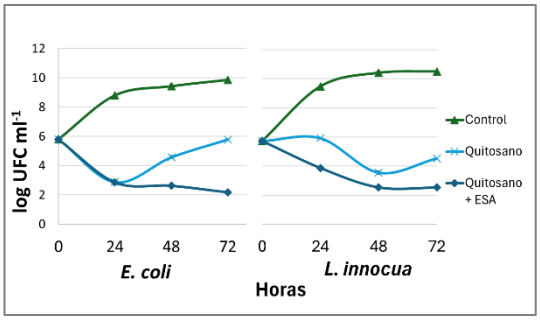


Figura 2: Evolución de la actividad bacteriostática de los films de quitosano frente a *E. coli* y *L. innocua.*

Finalmente, en la aplicación de los biofilms para la conservación de carne de cerdo en refrigeración el empleo de ambos biofilms evitó el incremento de las poblaciones de microorganismos mesófilos y psicrófilos en la carne fresca al final del ensayo (día 9), manteniéndolos dentro de su vida útil, con recuentos inferiores a 6 log CFU g^{-1} (tabla 1). Sin embargo, se observaron diferencias entre ambos biofilms a lo largo de los nueve días de conservación. Tal y como se observó *in vitro*, los biofilms de Q presentaron una mayor capacidad de antimicrobiana que GL/Q. Así, el biofilm Q resultó más efectivo que GL/Q para ambos tipos de microorganismos desde el día 1, no llegándose a detectar la presencia de microorganismos psicrófilos a día 9 con los biofilms Q. La incorporación de RBE mejoró el efecto antimicrobiano en GL/Q únicamente frente a psicrófilos a día 9, mientras que en Q lo mejoró frente a mesófilos a día 1 y día 5 y a psicrófilos a día 5.

Tabla 1: Recuentos de las cargas microbianas en carne de lomo de cerdo fresco con diferentes tratamientos de biofilms durante 9 días en refrigeración. a, b y c: indican diferencias significativas. Niveles de significación: ns $p>0.05$, ** $p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$.

	Control	Film sin ESA	Film con ESA	Sig.
		Mesófilos Día 1		
GL/Q	5.46±0.74	4.46±0.44	5.03±0.42	ns
Q	5.68±0.15 a	4.43±0.28 b	3.37±0.27 c	***
Sig.	ns	ns	**	
		Mesófilos Día 5		
GL/Q	4.58±0.22 a	2.81±0.19 c	4.02±0.17 b	***
Q	6.39±0.15 a	4.42±0.33 b	3.11±0.53 c	***
Sig.	***	***	**	
		Mesófilos Día 9		
GL/Q	6.83±0.15 a	5.53±0.24 b	5.58±0.30b	***
Q	7.77±0.25 a	4.33±0.23 b	4.12±0.27 b	***
Sig.	***	***	***	
		Psicrófilos Día 1		
GL/Q	4.21±0.11	4.04±0.48	4.51±0.32	ns
Q	5.13±0.33 a	2.68±0.38 b	2.56±0.22 b	***
Sig.	**	**	***	
		Psicrófilos Día 5		
GL/Q	4.58±0.34	3.83±1.05	4.23±0.32	ns
Q	8.67±0.15 a	3.93±0.29 b	2.67±0.59 c	***
Sig.	***	ns	**	
		Psicrófilos Día 9		
GL/Q	6.59±0.28 a	6.35±0.25 a	5.70±0.16 b	***
Q	7.57±0.20 a	nd b	nd b	***
Sig.	***	***	***	

CONCLUSIONES

El extracto de salvado de arroz mostró actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *L. innocua*. La incorporación de éste en los biofilms de gelatina y quitosano mostró liberaciones en etanol-95% e incrementó la actividad antimicrobiana *in vitro* de los biofilms de quitosano. La aplicación de biofilms de gelatina/quitosano y quitosano en carne fresca de cerdo resultaron eficaces en el control microbiano, presentando mejores resultados los films de quitosano. La adición de extracto de salvado de arroz mejoró la eficacia de manera puntual.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este trabajo fueron obtenidos dentro del proyecto InnoTecConEx, enmarcado dentro del Programa Operativo FEDER Extremadura 2021-2027. Actuación 1A1103. Desarrollo de la capacidad de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, cofinanciado al 85%.

REFERENCIAS

[1] S. Martillanes, M. C. Ayuso-Yuste, M. V. Gil, R. Manzano-Durán, J. Delgado-Adámez, Food Research International, 2018, 111, 299–305.

[2] M. Cabeza de Vaca, M. R. Ramírez-Bernabé, D. T. Barrado, J. R. Pimienta, J. Delgado-Adámez, 2024, Foods, 13, 972.

INFLUENCIA DEL ÁCIDO OXÁLICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A DE ASPERGILLUS NIGER EN UN SISTEMA MODELO DE HIGO

Cristina Hidalgo[12], Santiago Ruiz-Moyano[12], Ana Isabel Galván[12], Manuel Joaquín Serradilla[2], María del Carmen Caballero[12] y Alicia Rodríguez[12]

1 Universidad de Extremadura/ Instituto Universitario de Recursos Agrarios (INURA), Escuela de Ingenierías Agrarias/ Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Avda. Adolfo Suárez s/n 06007, Badajoz, España
2 Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura. Avda. Adolfo Suárez s/n 06007, Badajoz, España

cristinahr@unex.es

Resumen

El cultivo tradicional del higo seco comprende una maduración escalonada, un secado progresivo a diferentes tiempos y un contacto con el suelo, favoreciendo el crecimiento y desarrollos de mohos como Aspergillus niger. La importancia de esta especie radica en la capacidad de producir ocratoxina A (OTA), cuyo contenido máximo en los higos secos ha sido establecido en la legislación debido a su toxicidad. Los elicitores se han posicionado como una alternativa natural frente al uso de los fungicidas químicos para el control de patógenos en las frutas. En particular, la aplicación pre-cosecha del ácido oxálico (AO) induce la defensa contra patógenos fúngicos en la planta, mejorando la calidad del fruto. No obstante, se desconoce su impacto directo en el crecimiento y producción de micotoxinas de A. niger. El objetivo fue estudiar el efecto del AO sobre el crecimiento in vitro de la cepa toxigénica A. niger CVJ63, y evaluar su impacto en la producción de OTA en las condiciones de temperatura, actividad de agua (a_w) y de pH propias del higo seco. El efecto de la a_w fue crucial para el crecimiento de A. niger CVJ63, siendo los valores cercanos a 0,92 los que disminuyeron el desarrollo del moho. El AO a la mínima concentración (1 mM) permitió retrasar la fase exponencial de crecimiento del A. niger. En etapas intermedias del crecimiento de A. niger, el AO moduló el efecto del pH, observándose mayor velocidad de crecimiento a menores valores de pH. La cantidad de OTA encontrada fue mínima a una a_w de 0,92, no detectándose influencia por parte del AO y del pH. En conclusión, el empleo del AO a la mínima concentración estudiada (1 mM) en condiciones de baja a_w (0,92) permitiría retrasar la fase exponencial de crecimiento de A. niger en el higo seco, otorgando al agricultor un mayor margen de tiempo para incorporar acciones correctivas. Además, el AO podría mejorar la calidad del higo seco sin promover la producción de OTA.

Palabras clave

Ácido oxálico, A. niger, ocratoxina A, higo seco, bioscreen, medio sintético de higo

1. Introducción

El cultivo tradicional del higo seco comprende una maduración escalonada, un secado progresivo a diferentes tiempos y un contacto con el suelo, favoreciendo el crecimiento y desarrollo de mohos como *Aspergillus niger* [1]. La importancia de esta especie radica en su capacidad para producir ocratoxina A (OTA), cuyo contenido máximo en los higos secos ha sido establecido en la legislación debido a su

toxicidad [2]. Los elicitores se han posicionado como una alternativa natural frente al uso de los fungicidas químicos para el control de patógenos en las frutas. En particular, la aplicación pre-cosecha del ácido oxálico (AO) induce la defensa contra patógenos fúngicos en la planta, mejorando la calidad del fruto [3]. No obstante, se desconoce su impacto directo en el crecimiento y producción de micotoxinas de *A. niger*.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del AO sobre el crecimiento *in vitro* de la cepa toxigénica *A. niger* CVJ63, y evaluar su impacto en la producción de OTA en las condiciones de temperatura, actividad de agua (a_w) y de pH propias del higo seco.

2. Material y métodos

La evaluación del impacto de la concentración de AO, pH y actividad de agua (a_w) en el crecimiento de *A. niger* CVJ63 y su capacidad para sintetizar OTA se realizó aplicando un modelo mediante un diseño experimental Box-Behnken (BBD) con el software StatGraphics Centurion XVI Versión 16.1.18. Se tuvieron en cuenta tres factores: concentración de AO, pH y a_w (Tabla 1).

El experimento se realizó en un medio de cultivo semi-sólido con un 25% de zumo de higo de la variedad *Calabacita*, 10% de extracto de levadura (5%, p/v), 3,2% de solución de agar (0,4%, p/v) y proporciones variables de una solución de glicerol (80% p/p), agua destilada, AO 0,2M e hidróxido de sodio 1N. El medio de cultivo se inoculó con la solución de esporas (10^5 esporas/mL) de la cepa de *A. niger* CVJ63 al 1%. Como control negativo se utilizó el medio de cultivo sin inocular. Posteriormente, se inocularon 10 pocillos por carrera con 250 µL en una placa multipocillos.

Tabla 1. Carreras experimentales del diseño Box-Behnken (BBD).

a_w	AO (mM)	pH
Puntos factoriales		
0,990	1,5	6,30
0,955	2,0	5,60
0,990	2,0	5,95
0,990	1,0	5,95
0,920	2,0	5,95
0,920	1,0	5,95
0,955	2,0	6,30
0,955	1,0	5,60
0,920	1,5	6,30
0,955	1,0	6,30
0,990	1,5	5,60
0,920	1,5	5,60
Puntos centrales		
0,955	1,5	5,95
0,955	1,5	5,95
0,955	1,5	5,95

La dinámica de crecimiento de *A. niger* CVJ63 en las diferentes condiciones ensayadas fue monitorizada en un turbidímetro automático Bioscreen C cada 30 min a una densidad óptica (DO) de 600 nm. Las placas multipocillos se incubaron sin agitación en el Bioscreen C con un ciclo de temperaturas que simulaban las temperaturas diurnas y nocturnas medias existentes en el cultivo del higo durante los meses estivales. La duración del experimento fue de 10 días. Los datos de absorbancia fueron obtenidos utilizando el software "Easy Bioscreen Experiment" (EXEcperiment) proporcionado por el

fabricante del equipo y exportados a Microsoft® Excel 365. A continuación, el conjunto de datos sin procesar obtenidos de las lecturas del Bioscreen C se sometieron a un análisis posterior para obtener el tiempo de detección (TTD) para una DO de 0,25; 0,5; 1, 1,25, 1,5, 1,75 y 2 utilizando una plantilla de Microsoft® Excel [4].

La extracción de OTA se realizó al final del tiempo de incubación a partir del contenido de cada pocillo y se determinó con un equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC Agilent Serie 1260 Infinity II (Agilent Technologies, EE.UU.) acoplado a un detector de fluorescencia (Agilent) siguiendo la metodología [5].

Para el análisis estadístico se aplicó un diseño experimental BBD combinado con la metodología de superficie de respuesta (RSM) para determinar los efectos de la a_w, concentración de AO y pH sobre el crecimiento y la producción de OTA de la cepa de *A. niger* CVJ63. La RSM se realizó empleando el software StatGraphics Centurion XVI. Para cada factor experimental, el software generó un análisis de varianza (ANOVA), estableciendo la significación estadística al nivel de confianza del 95%.

3. Resultados y discusión

La Tabla 2 proporciona los valores P de los factores (a_w, AO y pH) y su interacción obtenidos del ANOVA, así como la correlación del modelo para la TTD a una DO 0,25 y la producción de OTA.

Los valores de R^2 ajustada fueron muy elevados (superiores al 98%), para la TTD DO 0,25, indicando que los modelos explicaron la mayor parte de la variabilidad de los datos. Entre los factores analizados, el efecto, tanto lineal (negativo) como cuadrático (positivo) de la a_w fue el que más influyó en el modelo de la TTD DO 0,25 (Tabla 2). El modelo estimó el crecimiento más lento del moho (valor de TTD más alto) a la menor a_w estudiada (a_w 0,92), mientras que los valores estimados para la minimización de la TTD fueron a la mayor a_w evaluada (a_w 0,99).

Tabla 2. Valores P del análisis de varianza de los factores a_w, Ac. oxálico y pH para TTD OD 0,25 y OTA analizados de *A. niger*.

Factores	TTD 0,25	OTA
Valores_P[1]		
A: a_w	**0,000**	**0,006**
B:Ácido oxálico	**0,025**	0,890
C:pH	0,087	0,320
AA	**0,000**	0,128
AB	0,111	0,850
AC	0,224	0,117
BB	0,341	0,614
BC	0,842	0,700
CC	0,372	0,177
R^2	99,39	86,43
R^2 (ajustada por g.l.)	98,28	62,00
Optimización (MIN)		
Valores_P[1]		
a_w	0,990	0,920
Ácido oxálico	1,58	2,00
pH	5,92	5,88
Valor óptimo	2103	0
Optimización (MAX)		
a_w	0,920	0,990
Ácido oxálico	1,00	1,73
pH	6,30	5,60

Factores	TTD 0,25	OTA
Valor óptimo	6563	6556

El factor de AO mostró efecto significativo lineal para la TTD DO de 0,25. En cambio, no se observó efecto significativo cuadrático. El modelo mostró un crecimiento más lento del moho (TTD más alto) a una concentración de AO de 1 mM, mientras que para la minimización de la TTD se predijo una concentración de AO de 1,58 mM. El valor de pH no mostró efecto significativo lineal ni cuadrático. En cuanto a las interacciones entre los factores, la a_w no mostró interacción con los demás factores. Por otro lado, se destaca la interacción significativa entre el AO y el pH en los modelos a partir de valores de TTD de una DO de 1 hasta DO 2 (datos no mostrados).

En la Figura 1 se representan las curvas de crecimiento de *A. niger* en las condiciones óptimas de a_w y AO obtenidas para la TTD a una OD 0,25 (Tabla 2). La mínima a_w y concentración de AO empleadas permitieron retrasar la fase exponencial de crecimiento de *A. niger*.

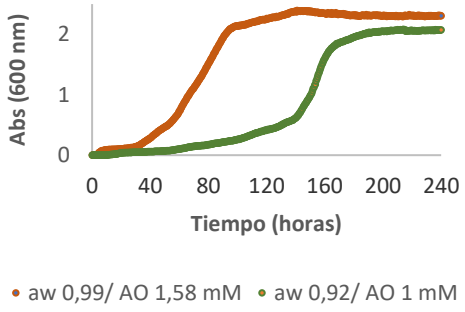


Figura 1. Curvas de crecimiento de *A. niger* en las condiciones óptimas de a_w y ácido oxálico obtenidas para la TTD OD 0,25.

En lo que respecta a la producción de OTA (Tabla 2), si bien la R^2 ajustada de modelo para la OTA es más discreta (62 %), nuevamente fue la a_w el factor que presentó un efecto negativo significativo, aunque en este caso solo lineal. A la mayor a_w de estudio de 0,99 la estimación de acumulación de OTA fue > 6500 ppb, mientras que a 0,92 este metabolito no sería producido por la cepa de *A. niger*. En cambio, no se observaron efectos de la concentración de AO ni del pH, así como tampoco de las interacciones entre los factores de estudio.

4. Conclusiones

En conclusión, el empleo del AO a la mínima concentración estudiada (1 mM) en condiciones de baja a_w (0,92) permitiría retrasar la fase exponencial de crecimiento de *A. niger* en el higo seco, otorgando al agricultor un mayor margen de tiempo para incorporar acciones correctivas. Además, el AO podría mejorar la calidad del higo seco sin promover la producción de ocratoxina A.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el proyecto PID2020-115359RR-C22. C. Hidalgo agradece el contrato predoctoral FPU21/04548.

REFERENCIAS

[1] Sanzo, R., Carabetta, S., Campone, L., Bonavita, S., Iaria, D., Fuda, S., ... & Russo, M. Assessment of mycotoxins co-occurrence in Italian dried figs and in dried figs-based products. *J. Food Saf.*, **2018**, *38*, e12536.

[2] Eur-lex.europa.eu, https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2022/1370/oj . Accessed: 27 de junio de 2024

[3] Hasan, M. U., Singh, Z., Shah, H. M. S., Kaur, J., Woodward, A., Afrifa-Yamoah, E., & Malik, A. U. Oxalic acid: A blooming organic acid for postharvest quality preservation of fresh fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.*, **2023**, *206*, 112574.

[4] Medina, A., Lambert, R. J. W., & Magan, N. Rapid throughput analysis of filamentous fungal growth

using turbidimetric measurements with the Bioscreen C: A tool for screening antifungal compounds. *Fungal Biol*., **2012**, *116*(1), 161–169.

[5] Danial, A. M., Medina, A., Sulyok, M., & Magan, N. Efficacy of metabolites of a Streptomyces strain (AS1) to control growth and mycotoxin production by *Penicillium verrucosum*, *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus fumigatus* in culture. *Mycotoxin Res*., **2020**, *36*, 225-234.

ANÁLISIS DE CLONES Y PLÁSMIDOS DE *ESCHERICHIA COLI* PORTADORES DE *BLA*$_{SHV-12}$ Y *BLA*$_{CTX-M-14}$ PROCEDENTES DE ANIMALES DE PRODUCCIÓN

Sandra A. Martínez-Álvarez[1*], Susana Sanz[1], Pierre Châtre[2], Carmen Olarte[1], María de Toro[3], Pauline François[2], Isabel Benito[1], Minerva Viguera[1], Myriam Zarazaga[1], Jean-Yves Madec[2], Marisa Haenni[2], Carmen Torres[1]

[1]Grupo OneHealth-UR, Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño (España).
[2]ANSES - Universidad de Lyon, Unidad de Resistencia a los Antibióticos y Virulencia Bacteriana - Lyon (Francia)
[3]Plataforma de Genómica y Bioinformática, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño (España).

Resumen / Abstract

Para comprender mejor el papel de las granjas de pollos de engorde y de cerdos como reservorios y vehículos de diseminación de *E. coli* (Ec) seleccionamos 15 BLEE-Ec recuperados de ambas granjas ubicades en La Rioja (España) para su secuenciación del genoma completo. Todos los Ec-*bla*$_{SHV-12}$ pertenecían a la granja de pollos de engorde y *bla*$_{CTX-M-14}$ a las granjas de cerdos co-albergando además el gen de resistencia a colistina (*mcr-1.1*). La localización de los genes *bla*$_{BLEE}$ se asignó mayoritariamente a IncI1-*bla*$_{CTX-M-14}$ e IncHI2-*bla*$_{SHV-12}$ aunque en algunas cepas se observó la localización de estos genes en plásmidos de tipo IncF. Además, la presencia de integrones también fue notoria (*intI1-dfrA17-aadA5-qacE-sul1* o *intI1-estX-psp-aadA2-cmlA1-aadA-qacL*-IS*440-sul3*), lo que, combinado con su localización en plásmidos movilizables y conjugables o transposones puede suponer un importante reto para la salud pública.

Palabras clave / Key words:

RAM, granja de pollos, granja de cerdos, One Health, genómica, plásmidos, transferencia

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En los últimos tiempos, la resistencia a los antibióticos (RAM) ha aumentado rápidamente y se ha convertido en una de las mayores amenazas para la salud pública mundial. El amplio uso de antibióticos en medicina humana y ganadería ha sido reconocido como uno de los principales factores que contribuyen a la aparición y propagación de la RAM. Aunque se sabe que la mayoría de los casos adquiridos en la comunidad están causados en gran medida por enzimas mediadas por plásmidos pertenecientes a la familia CTX-M, también se han notificado casos asociados a la producción de SHV-12 y TEM-52. Los aislados de BLEE-Ec han cobrado una notoria presencia desde las últimas décadas, convirtiéndose en uno de los determinantes de más rápida propagación no sólo en humanos, sino también en animales productores de alimentos, de compañía, fauna salvaje o incluso en el

medio ambiente. La transmisión de BLEE-Ec más allá del entorno hospitalario podría comprometer la futura utilidad de los antibióticos debido a la propagación de estos genes en elementos genéticos codificados de alta movilidad (plásmidos, transposones). Nuestro objetivo fue evaluar la interacción entre los clones bacterianos BLEE-Ec y los plásmidos involucrados en su fructífera diseminación para obtener una visión holística de la interfaz humano-animal-medio ambiente.

METODOLOGÍA

Se seleccionaron 15 aislados BLEE-Ec a partir de estudios previos [1-3] procedentes de dos granjas (de pollos de engorde y de cerdos) de la región de La Rioja (España). Las muestras se inocularon en medios selectivos y las presuntas Ec se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI-Biotyper, Bruker). Todos los procedimientos fueron revisados y avalados por el comité ético de la Universidad de La Rioja. Las pruebas de sensibilidad a antibióticos se realizaron por el método de difusión en disco de acuerdo con el documento *Clinical Standards Laboratory and Standards Institute* [4]. Se evaluó la actividad frente a 11 antibióticos: ampicilina [AMP], amoxicilina/clavulánico [AMC], ceftazidima [CAZ], cefotaxima [CTX], cefoxitina [FOX], imipenem [IPM], ciprofloxacino [CIP], gentamicina [GEN], cloranfenicol [CHL], trimetoprim/sulfametoxazol [SXT] y tetraciclina [TET]. Además, se realizó el método de sinergia de doble disco para detectar la producción de BLEEs empleando cefotaxima, ceftazidima y amoxicilina/clavulánico [4]. Como cepa control se utilizó Ec ATCC 25922. Los 15 aislados BLEE-Ec se sometieron a secuenciación de genoma completo mediante lecturas cortas (Illumina NovaSeq 600) y lecturas largas (Oxford Nanopore, MinION). Los análisis bioinformáticos realizados se llevaron a cabo mediante el empleo de tipado molecular por MLST (http://enterobase.warwick.ac.uk), ResFinder 4.5.0 y VirulenceFinder 2.0 (90% de identidad y 60% de longitud mínima) para estimar la resistencia a los antibióticos y la virulencia, respectivamente. Cuando fue necesario, los contigs se ensamblaron, curaron y anotaron manualmente utilizando herramientas bioinformáticas adicionales como Artemis y SnapGene, BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), ORFfinder (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf), ISfinder (www-is.biotoul.fr) y la base de datos UniProt (http://www.uniprot.org [consultado el 05 de mayo de 2024)]. Se utilizó EasyFig 2.1 para visualizar las comparaciones de genes de resistencia.

RESULTADOS

En la granja de pollos las cepas BLEE-positivas fueron productoras de SHV-12, mientras que en la granja de cerdos la producción de BLEEs estaba mediada por CTX-M-14 además de co-albergar *mcr-1* en algunos casos. Los STs detectados fueron diversos en ambos: i) granja de pollos asociado a ST68/ST117/ST770/ST1684/ST15985 (nuevo linaje detectado), ii) granja de cerdos asociado a ST453/ST542/ST4038. La ubicación de bla_{BLEE} en: i) Ec-porcino $bla_{CTX-M-14}$ fue localizado en su mayoría en IncI1 (n=5, 90-110 kpb) y en algunos en plásmidos IncF (n=2, 100-110 kpb) ii) Ec-avícola bla_{SHV-12} fue localizado en su mayoría en IncHI2 (n=16/220-250 kbp) y otros en plásmidos IncF (n=3/150-180 kpb). Solamente los

plásmidos IncF-*bla*$_{CTX-M-14}$ y los plásmidos IncHI2-*bla*$_{SHV-12}$ portaban adicionalmente otros genes RAM en su mayoría insertos en integrones de clase 1 (*intI1-dfrA17-aadA5-qacE-sul1 o intI1-estX-HAD-aadA2-cmlA1-aadA1-qacL-IS26-sul3* respectivamente). La resistencia a colistina detectada en los aislados de origen porcino estuvo mediada por *mcr-1.1* y localizado en un plásmido IncX4 (33 kpb) flanqueado en todos los casos por DUF2806 domain-containing protein-*mcr-1-pap2* family protein.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID2019-106158RB-I00 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) de España. Sandra A. Martínez-Álvarez tiene una beca predoctoral del Gobierno de La Rioja (FPI-CAR-3597).

REFERENCIAS

[1] Martínez-Álvarez S, Sanz S, Olarte C, Hidalgo-Sanz R, Carvalho I, Fernández-Fernández R, Campaña-Burguet A, Latorre-Fernández J, Zarazaga M, Torres C. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from the Broiler Farm Environment, with Detection of SHV-12-Producing Isolates. *Antibiotics* **2022**; 11(4):444. doi: 10.3390/antibiotics11040444.

[2] Sanz S, Olarte C, Alonso CA, Hidalgo-Sanz R, Gómez P, Ruiz-Ripa L, Torres C. Identification of Enterococci, Staphylococci, and *Enterobacteriaceae* from Slurries and Air in and around Two Pork Farms. *J Food Prot*. **2018**; 81(11):1776-1782. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-098.

[3] Sanz S, Olarte C, Hidalgo-Sanz R, Ruiz-Ripa L, Fernández-Fernández R, García-Vela S, Martínez-Álvarez S, Torres C. Airborne Dissemination of Bacteria (Enterococci, Staphylococci and *Enterobacteriaceae*) in a Modern Broiler Farm and Its Environment. *Animals* **2021**; 11(6):1783. doi: 10.3390/ani11061783.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. *CLSI* Supplement M100-Ed33. National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA, **2023**.

RED DE INOCUIDAD ALIMENTARIA PARA EL DESARROLLO, ARMONIZACIÓN Y ADOPCIÓN DE METODOLOGÍAS BASADAS EN "ONE HEALTH" ENFOCADAS A LA EVALUACIÓN DE NUEVOS RIESGOS MICROBIOLÓGICOS (ONEHEALTH4FOOD)

Perez-Rodríguez, F.[1], Allende, A.[2], Bover, S.[3], Calderón, V.[4], Carrasco, E., Cebrian Auré, G.[5], de Toro, M.[6], Guix, S.[7], Fernández-Escámez, P.[8], Martínez-Urtaza, J.[9], Palop, A.[8], Perez de Juan, J.[10], Prieto Maradona, M.[11], Risalde Moya, M.A.[1], Rodrigo Aliaga, M.D.[11], Seral, C.[5], Valero, A.[1]

1 Universidad de Córdoba (UCO)
2 CSIC-Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)
3 Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)
4 Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)
5 Universidad de Zaragoza (UNIZAR)
6 Fundación Rioja Salud -Centro de Investigación Biomédica de la Rioja (CIBIR)
7 Universidad de Barcelona
8 Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT)
9 Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)
10 Centro Nacional de Tecnología y Seguridad de Alimentos (CTNA)
11 Universidad de León (UNILEON)
12 CSIC-Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA)

fernando.perez@uco.es

Resumen

La Red Temática OneHealth4Food busca integrar un enfoque multisectorial "One Health" para gestionar la seguridad alimentaria en España, uniendo investigadores en un marco colaborativo. La red tiene como objetivo avanzar en las estrategias de detección, prevención y control, utilizando nuevas fuentes de información, modelos matemáticos, y técnicas avanzadas como NGS y WGS. La Red impactará en la toma de decisiones y medidas de control, contribuyendo a reducir las toxiinfecciones alimentarias globalmente.

Abstract

The OneHealth4Food Thematic Network seeks to integrate a "One Health" multisectoral approach to manage food safety in Spain, bringing researchers together in a collaborative framework. The network aims to advance detection, prevention, and control strategies using new information sources, mathematical models, and advanced techniques such as NGS and WGS. The network will impact decision-making and control measures, contributing to the reduction of global foodborne illnesses.

Palabras clave:

Seguridad Alimentaria, Cambio climático, Patógenos Alimentarios, Microbiología Predictiva, Técnicas de Secuenciación Masiva

Key words:

Food Safety, Climate change, Food pathogens, Predictive Microbiology, Next Generation Sequencing

Una de las consecuencias de la degradación de la salud medioambiental es el surgimiento o resurgimiento de peligros microbiológicos que afectan directamente a la inocuidad de los alimentos que consumimos. El cambio climático, el crecimiento demográfico y los nuevos sistemas productivos, junto al aumento de las antibiorresistencias, configuran un contexto complejo, donde los peligros microbiológicos conocidos o nuevos, originados en diferentes situaciones, pueden transmitirse a lo largo de la cadena alimentaria, generando nuevas dinámicas de riesgo. Estas nuevas dinámicas del riesgo alimentario no pueden mitigarse o prevenirse con un enfoque tradicional o tratándolas como un elemento separado e independiente a otros problemas de salud, sino que se necesita de una visión global y una estrategia multisectorial, basada en el concepto "One Health", que integre información de diferentes disciplinas. La Red Temática OneHealth4Food pretende proporcionar una base metodológica que pueda servir para integrar el enfoque multisectorial (salud humana, animal y medio ambiental) en la evaluación y gestión de la seguridad alimentaria en España. La Red está constituida por investigadores en el campo de la seguridad alimentaria y en áreas afines de "One Health", creando un marco de colaboración y de sinergias, en el contexto alimentario, que sentará las bases metodológicas de un enfoque integrado en la Evaluación de Riesgos microbiológicos en la cadena alimentaria. Con ello se persigue el desarrollo y adopción de estrategias de detección, prevención y control frente a las nuevas amenazas o amenazas reemergentes, que surgen de los diversos retos actuales. La Red aborda la búsqueda de nuevas fuentes de información para el estudio de nuevos patógenos alimentarios, la recopilación y análisis de modelos matemáticos, que se incluirán en una herramienta de la Red, para su acceso y aplicación. También se analiza el papel de las técnicas de Next Generation Sequencing (NGS) y Whole Genome Sequencing (WGS) como herramientas de monitorización y alerta temprana frente a peligros conocidos y nuevos (Figura 1). Otro aspecto de relevancia es el desarrollo de una metodología de priorización de riesgos basada en un enfoque cuantitativo, y considerando la incertidumbre. Finalmente, la Red está desarrollando diferentes talleres sobre casos y temas específicos donde se pone en práctica los resultados generados en las diferentes actividades. En la Red se auna el conocimiento que existe actualmente en Universidades y Centros Públicos de Investigación de prestigio, que

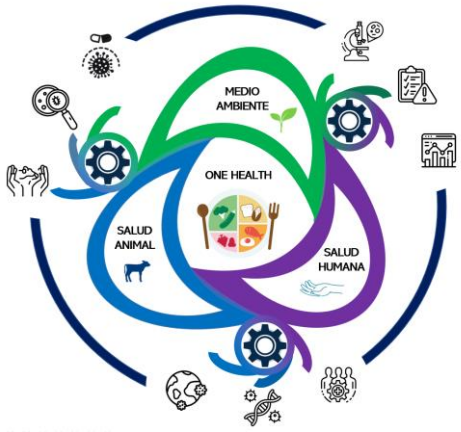


Figura 1. Concepto de la red OneHealth4Food

cuentan con investigadores que han pertenecido o pertenecen a instituciones encargadas de la Evaluacion de Riesgos como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), Agencia de Seguridad Alimenaria y Nutrición (AESAN), intituciones autonomicas relacionadas con la seguridad alimentaria, consultores internacionales para USAID o la Unión Europea en Evaluacion de Riesgos. Con todo ello, la Red pretende lograr un elevado impacto en la toma de decisiones y aplicación de medidas de control por parte de autoridades sanitarias y empresas productoras. En

resumen, se espera que la Red contribuya, desde una perspectiva de “One Health”, a reducir el impacto de las futuras toxiinfecciones de transmisión alimentaria en un mundo global.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo fue financado por la Red OneHealth4Food, con referencia RED2022-134545-T, financiada en la convocatoria 2022 de ayudas a «REDES DE INVESTIGACIÓN», en el marco del Programa Estatal para Impulsar la Investigación Científico-Técnica y su Transferencia, del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2021-2023.

PERFIL METATAXONÓMICO EN LA FERMENTACIÓN DE TRONCO DE BRÓCOLI COMO NUEVO ALIMENTO FUNCIONAL

Salas-Millán, J.A[1,2]; Aznar, A [3]; Aguayo, E.[2,1]

1Grupo de Calidad Alimentaria y Salud, Instituto de Biotecnología Vegetal (UPCT), Campus Muralla del Mar, 30202 Cartagena, España.
2JimboFresh International SLL, C/Mina Buena Suerte, 1, 30360 La Unión, Murcia, España.
3Departamento de Ingeniería Agronómica, UPCT, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, España

Resumen/Abstract

En este trabajo se ha utilizado el tronco de brócoli, un subproducto de la cosecha de brásicas, para la elaboración de un nuevo alimento funcional. Los troncos de brócoli fueron lavados, cortados en rodajas y fermentados en tarros de cristal a 25 ºC durante 6 días en salmuera al 6 % (p/v). Se estudiaron dos aderezos: ajo y semillas de mostaza, mientras que el grupo testigo no recibió ningún aderezo. Tras la fermentación, los troncos fueron conservados a 5 ºC durante 6 días. En el sexto día, los troncos de brócoli alcanzaron los recuentos máximos de bacterias ácido lácticas (>8 log ufc·g-1), manteniéndose estables hasta el día 12 a 4 °C. El análisis metataxonómico permitió clasificar más del 95% de las muestras a nivel de género, aunque solo entre el 25 y el 30% se clasificaron a nivel de especie. Los géneros más prevalentes fueron Lactobacillus, Leuconostoc y Lactococcus, correspondiente a bacterias ácido-lácticas presentes en todos los aderezos, sin diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Se identificaron 1009 especies de bacterias, siendo Latilactobacillus sakei la especie predominante, seguida de Lactobacillus curvatus, Leuconostoc kimchi y Leuconostoc carnosum. Este estudio demuestra la diversidad microbiana obtenida mediante la fermentación espontánea de los troncos de brócoli y destaca la importancia de transformar subproductos agrícolas dentro del marco de una economía circular.

Palabras clave / Key words

Probiótico, brásica, encurtido, ácido-lácticas

Este proceso de fermentación se llevó a cabo utilizando el fitobioma autóctono del tallo de brócoli crudo. Los recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL) (Fig. 1) fueron relativamente bajos en el tallo de brócoli crudo, según los valores de los recuentos en vegetales de estudios previos (2,0-4,0 log ufc·g^{-1}) (1). Después de tres días de fermentación, las BAL aumentaron significativamente en todos los tratamientos, con resultados similares (8,0 a 8,5 log ufc·g^{-1}), manteniéndose estables en todos los tratamientos durante el almacenamiento en frío. Las bacterias mesófilas también aumentaron siguiendo una tendencia similar de las BAL.

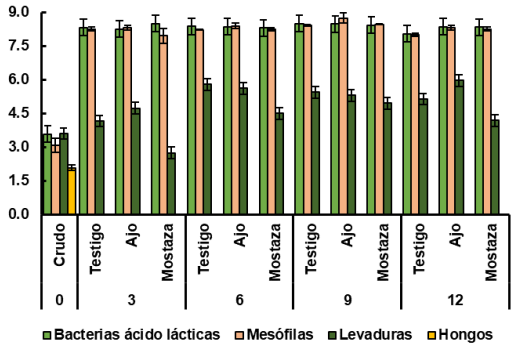


Figura 1. Análisis microbiológico de tronco de brócoli al día 0 (crudo), durante su fermentación (días 3 y 6, a 25 ºC), seguido de su almacenamiento en frío (días 9 a 12, a 4 ºC), utilizando diferentes aderezos (sin aderezo, testigo; aderezo de ajo y aderezo de mostaza).

En el día 0, el recuento de mohos fue de 2,1 log ufc·g^{-1} y disminuyó a niveles indetectables (<1,7 log ufc g^{-1}) desde el día 3 hasta el final del almacenamiento en frío, debido principalmente a la disminución del pH por la producción de ácido láctico, otros ácidos orgánicos o a la producción de metabolitos secundarios que comprometieron la estabilidad y viabilidad de los mohos (2). Por otro lado, los recuentos de levaduras aumentaron el día 3, con pequeños cambios en función de los tratamientos (Fig. 1).

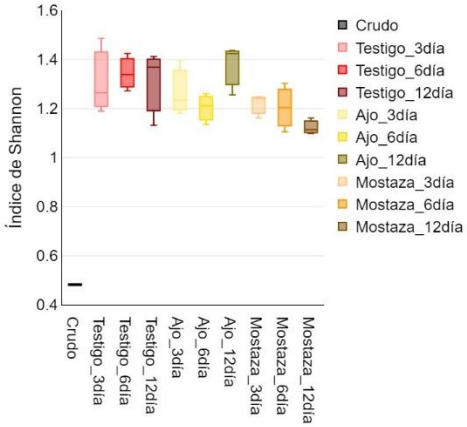


Figura 2. Índice de Shannon de tronco de brócoli al día 0 (crudo), durante su fermentación (días 3 y 6, a 25 ºC), seguido de su almacenamiento en frío (días 9 a 12, a 4 ºC), utilizando diferentes aderezos (sin *aderezo, testigo; aderezo de ajo y aderezo de mostaza).*

Según los resultados de metataxonómica obtenidos durante el proceso de fermentación y el almacenamiento en frío, más del 95% de las lecturas se clasificaron como géneros en todas las muestras, pero tan solo el 25-30% se clasificaron a nivel de especie. La diversidad bacteriana, calculada según el índice de diversidad de Shannon, que aumentó después de 3 a 12 días (1,22-1,37), con un ligero descenso el día 12 en el aderezo de mostaza, donde disminuyó a 1,12. Estos resultados confirman el aumento de la diversidad bacteriana a través del proceso de fermentación espontánea, coincidiendo con los resultados reportados en estudios anteriores (3).

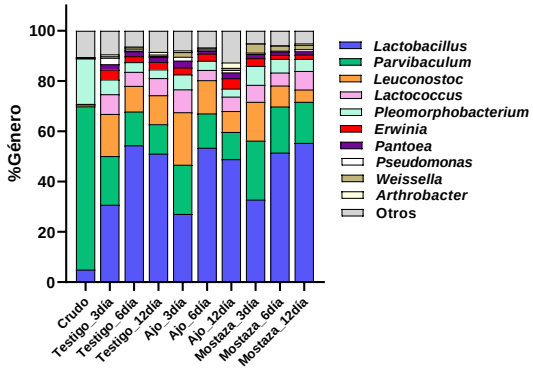


Figura 3. Abundancia relativa a nivel de género en el tronco de brócoli al día 0 (crudo), durante su fermentación (días 3 y 6, a 25 ºC), seguido de su almacenamiento en frío (días 9 a 12, a 4 ºC), utilizando diferentes aderezos (sin *aderezo, testigo; aderezo de ajo y aderezo de mostaza).*

La Fig. 3 muestra la distribución a nivel de género durante la fermentación y tras el proceso de refrigeración. El filo *Proteobacteria* (géneros *Parvibaculum*, *Pleomorphobacterium*, *Pseudomonas*, y *Erwinia*) fue desplazado principalmente por los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus* tras los tres días de fermentación en todos los aderezos y testigo. Estos últimos tres géneros

mencionados pertenecen al grupo de BAL, que incluyen *Weisella*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus* y *Tetragenoococcus* (4), normalmente encontrados en otros fermentados de hortalizas como *kimchi*, *chucrut*, *gundruk* y *pao cai* (5). En el día 0, las BAL representaron solo el 6,73% del fitobioma del tallo de brócoli. Esta proporción aumentó al 57-60% en el día 3 y superó el 70% en los días 6 y 12.. Los géneros de BAL que se identificaron en todas las muestras, por orden de abundancia, fueron: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Weisella* (Fig. 3). *Lactobacillus* fue el más abundante en todos los tratamientos, incrementándose del 22 al 28% en el día 3 y del 18 al 26% en el día 6. Se mantuvo estable durante el almacenamiento en frío al final del experimento, con un ligero incremento en el aderezo de mostaza (4%).

El análisis metagenómico a nivel de especie no identificó ninguna especie por el género *Parvibaculum*, a pesar de ser la más abundante en las muestras crudas, seguido del género *Pleomorphobacterium*. Por ello, *Pleomorphobacterium xiamenense* fue la especia más abundante en el tallo de brócoli crudo. La cantidad de esta especie disminuyó drásticamente después del día 3 estabilizándose entre el 3 y el 5% en todos los aderezos durante todo el proceso de fermentación y almacenamiento en frío. La principal bacteria identificada en todos los tratamientos fue *Latilactobacillus sakei* subsp. *carnosus*, una bacteria microaerófila, mesófila y grampositiva que normalmente se aísla de la carne fermentada. Algunos autores han reportado esta especie como predominante en la fermentación del *kimchi*, específicamente la subsp. *carnosus* (6). Otras especies de BAL, con una abundancia relativa del 1 al 5%, también fueron identificadas en el producto fermentado. Entre ellas se encontraron *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc kimchii* y *Leuconostoc carnosum*. Todas ellas se han descrito en otros alimentos fermentados y en brásicas fermentadas (7).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es resultado del programa AGROALNEXT y ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN) con fondos de la Unión Europea NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) y por la Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma Región de Murcia. J.A. Salas-Millán agradece el apoyo financiero recibido del MCIN y de JimboFresh International SLL a través de una beca 'Industrial PhD' (DIN2019-010837).

REFERENCIAS

1. Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. Food Microbiol. 2013 Feb 1;33(1):1–10.

2. Satora P, Skotniczny M, Strnad S, Piechowicz W. Chemical composition and sensory quality of sauerkraut produced from different cabbage varieties. LWT - Food Science and Technology. 2021 Jan 1;136:110325.

3. Liang H, Chen H, Zhang W, Yu C, Ji C, Lin X. Investigation on microbial diversity of industrial Zhacai paocai during fermentation using high-throughput sequencing and their functional characterization. LWT - Food Science and Technology. 2018 May 1;91:460–6.

4. Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A. Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, fourth edition [Internet]. 4th ed. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition. 2011. 1–761 p.

5. Liu D, Zhang C, Zhang J, Xin X, Liao X. Metagenomics reveals the formation mechanism of flavor metabolites during the spontaneous fermentation of

potherb mustard (Brassica juncea var. multiceps). Food Research International. 2021 Oct 1;148:110622.

6. Jung JY, Lee SH, Jin HM, Hahn Y, Madsen EL, Jeon CO. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. Int J Food Microbiol. 2013 May 15;163(2–3):171–9.

7. Maoloni A, Ferrocino I, Milanović V, Cocolin L, Corvaglia MR, Ottaviani D, et al. The microbial diversity of non-Korean kimchi as revealed by viable counting and metataxonomic sequencing. Foods https://www.mdpi.com/2304-8158/9/11/1568/html

DISEÑO DE UN CONSORCIO DE MICROORGANISMOS PARA LA FERMENTACIÓN DE VINOS BASE PARA CAVAS DE ALTA GAMA

Judit Pardo[1], Estéfani García-Rios[1], Antonio Ruiz[1], Marta Martir[2], Flor Sainz[2], Laura Tragant[2] y José M. Guillamón[1]

[1]Departmento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC), Avda. Agustín Escardino, 7, 46980 Paterna (VALENCIA)
[2]CODORNIU, S.A., Avinguda Jaume de Codorníu, s/n 08770 Sant Sadurní d'Anoia Barcelona

Resumen / Abstract

La elaboración de vino es un paradigma de interacciones microbianas porque varios microorganismos coexisten e interactúan influyendo en la predominancia de las especies de levaduras y bacterias lácticas durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica. La disponibilidad de inóculos seleccionadas, generalmente basados en cepas de la especie Saccharomyces cerevisiae, fue un gran avance biotecnológico para asegurar fermentaciones y estandarizar año tras año la calidad de los vinos. Sin embargo, las fermentaciones espontáneas permiten una mayor interacción de microorganismos y conducen a productos más diferenciales, con mayor riqueza aromática y una mayor tipicidad, a pesar de que son más difíciles de manejar y menos reproducibles. Por todo ello, el objetivo de este trabajo ha sido la selección y diseño de un consorcio de levaduras autóctonas para la fermentación de los vinos base de cavas de alta gama de la empresa CODORNÍU, aumentando la diversidad y manteniendo el control de las fermentaciones inoculadas. Durante las vendimias 2021 y 2022, se analizaron las dinámicas de poblaciones de fermentaciones espontáneas provenientes de fermentaciones de la variedad Xarel.lo. Se aislaron un total de 1920 cepas pertenecientes a 18 especies diferentes de levaduras, con predominio de los géneros Pichia *y* Hanseniaspora *y de las especies* Torulaspora delbrueckii *y* Saccharomyces cerevisiae. *Representantes de cada una de estas especies han sido sometidas a un fenotipado masivo frente a caracteres de interés enológico, tales como tolerancia a etanol, pH, baja temperatura y SO2. Tras este fenotipado, se han seleccionado las cepas más aptas para el proceso y se han establecido consorcios consistentes en dos cepas de no-*Saccharomyces *y una cepa de* S. cerevisiae*, que eran inoculadas secuencialmente en mosto sintético y mosto natural. Los resultados demuestran el impacto de las diferentes cepas en la calidad organoléptica de los vinos finales.*

Palabras clave / Key words

Inóculos mixtos, fermentación alcohólica, consorcios microbianos, interacciones microbianas, Saccharomyces cerevisiae, no-Saccharomyces

El objetivo global de este proyecto de colaboración entre el IATA y la bodega CODORNIU es seleccionar y diseñar un consorcio de cepas de levaduras que lleven a cabo la fermentación alcohólica de mosto de la variedad Xarel.lo destinado a vino base para cava de alta gama. Las cepas serán co-inoculadas o inoculadas secuencialmente y tendrán que asegurar un final de fermentación correcto, a la vez que un

producto diferente de la inoculación de una cepa comercial de *S. cerevisiae*, como se ha realizado hasta ahora. Para alcanzar dicho objetivo, se han analizado las poblaciones de uva de la variedad Xarel.lo, de la finca de cava premium la Fideuera, de los pies de cuba espontáneos, elaborados con las uvas de la anterior finca, y de las fermentaciones espontáneas llevadas a cabo con las uvas de la misma variedad y finca, durante las vendimias 2021 y 2022. En la vendimia de 2021 se analizaron un total de 672 cepas pertenecientes a un total de 14 especies diferentes. El número de colonias analizadas se amplió a un total de 1248 colonias durante la vendimia 2022, distribuidas en un total de 13 especies (Tabla 1). El método utilizado para la identificación de especies fue el análisis de restricción de los amplificados de la región ribosomal ITS (RFLPs de ITS-PCR) [1] .

Tabla1: Diversidad de especies identificadas en los diferentes substratos analizados (uvas, pie de cuba y mosto y fermentación)

Substrato de aislamiento	Vendimia 2021 (Especies identificadas)	Vendimia 2021 (Especies identificadas)
Uva	-	*Aereobasidium pullulans* *Vishniacozyma carnescens* *Filobasidium floriforme Filobasidium magnum*
Pies de cuba (PdC)	*Picchia occidentalis* *Pichia manshurica* *Pichia terrícola* *Hanseniaspora uvarum* *Saccharomyces cerevisiae*	*Torulaspora delbrueckii* *Hanseniaspora uvarum* *Hanseniaspora guillermondii* *Hanseniaspora vineae* *Saccharomyces cerevisiae*
Mosto prensa		*Torulaspora delbrueckii* *Candida galbrata* *Metschnikowia sp.* *Hanseniaspora uvarum* *Naganishia albida*
Fermentación	*Hanseniaspora uvarum* *Pichia kudriavzevii* *Lachancea thermotolerans* *Torulaspora delbrueckii* *Pichia membranaefaciens* *Wicherhamiella pararugosa* *Rhodotorula mucilaginosa* *Kregervanrija fluxuum* *Metschikowia pulcherrima* *Zygosaccharomyces bailii* *Saccharomyces cerevisiae*	***Torulaspora delbrueckii*** *Hanseniaspora vineae* *Hanseniaspora uvarum* *Saccharomyces cerevisiae*

Además, entre las colonias de *S. cerevisiae* aisladas en ambas vendimias, se genotipaban, mediante el uso fundamentalmente de dos técnicas: el análisis de restricción del DNA mitocondrial (RFLPs mtDNA) [2] y los elementos delta [3]. Entre las más de 600 colonias analizadas encontramos una gran diversidad de cepas de S. cerevisiae, sin embargo, había una cepa que mostraba un patrón mayoritario tanto en los pies de cuba como durante la fermentación. Esta cepa, nombrada por nosotros como COD5, fue la cepa mayoritaria al final de las fermentaciones espontáneas. Debido a esta gran capacidad de imposición, ha sido seleccionada como la cepa de *S. cerevisiae* autóctona para formar parte de los consorcios microbianos.

Diseño del consorcio microbiano

En una primera etapa, decidimos seleccionar cepas pertenecientes a aquellas especies de levaduras no-*Saccharomyces* en las que la bibliografía ha destacado alguna característica de interés enológico y que habían mostrado una presencia significativa en algún momento de la fermentación alcohólica. En la figura 1 se muestran las especies seleccionadas, de las cuales se seleccionaron al menos 5 cepas que aparecían en diferentes fases del proceso. Todas estas cepas (un total de 30) eran sometidas a un proceso intenso de fenotipado en base a las características más importantes desde el punto de vista enológico, tal como se refleja en la **figura 1**. Para dicho fenotipado, las diferentes cepas eran crecidas en placas multipocillo en un mosto sintético donde se iba variando los diferentes parámetros ensayados. Una vez determinadas las curvas de crecimiento se calculaba tanto la tasa máxima de crecimiento (µmax) como el área bajo la curva (AUC). En base a estos dos parámetros se seleccionó la cepa con mejor comportamiento frente a estas características de interés enológico. Especialmente importante fue la tolerancia al bajo pH, al SO2 y la baja temperatura, como consecuencia de la importancia de

estos parámetros en la fermentación del vino base para cava.

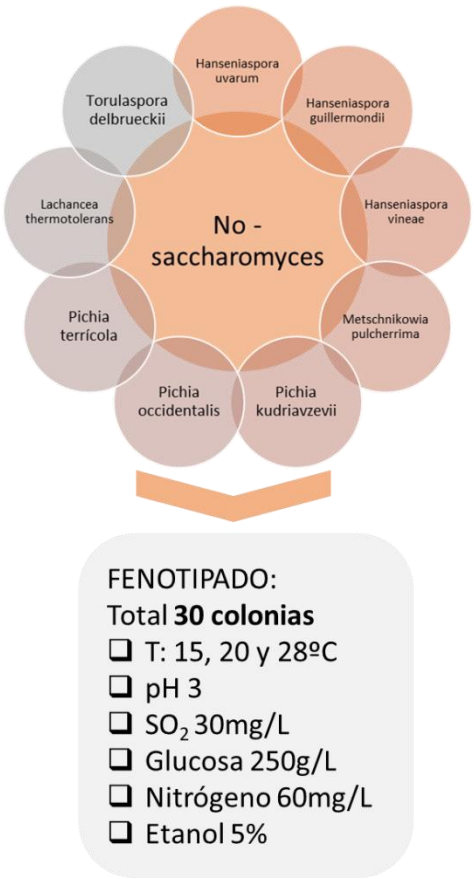


Figura 1: Especies seleccionadas de no-Saccharomyces para el diseño de consorcios microbianos y características enológicas analizadas en cada una de las mismas

Tras el fenotipado se han seleccionado una cepas de las siguientes especies: *Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Hanseniaspora vineae*. Estas especies eran inoculadas de dos en dos en un mosto de la variedad Xarel.lo y, posteriormente, se inoculaba (a las 24 horas) la cepa de *S. cerevisiae* COD5, siguiendo el esquema que se muestra en la **figura 2**.

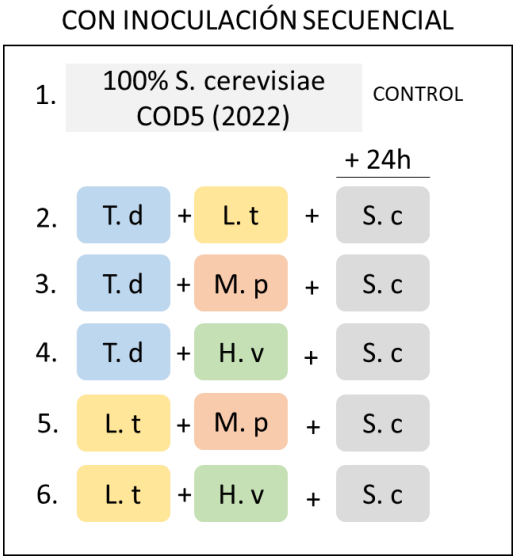


Figura 2: Diseño de consorcios de levaduras para la fermentación de vinos bases de la variedad Xarel.lo (pruebas de laboratorio)

En estos momentos estamos analizando las fermentaciones de laboratorio con los mencionados consorcios. En base a los parámetros enológicos (azúcares residuales, glicerol, etanol y ácidos orgánicos), consumo de nitrógeno, aromas y análisis sensorial, seleccionaremos el consorcio que será inoculado durante la vendimia 2024 en un fermentador semi-industrial (500L) en las instalaciones de la bodega CODORNIU.

El objetivo será reproducir la diversidad microbiana y la tipicidad de los vinos base obtenidos, algunos años, mediante fermentaciones espontáneas, pero con el control que representa una fermentación inoculada.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto "Desarrollo de nuevo protocolo de vinificación basado en la investigación de nuevos inóculos mixtos de Sacharomyces y no-Sacharomyces" (INOLEVAMIX), perteneciente al PERTE AGROALIMENTARIO: "TRANSFORMACIÓN INNOVADORA DEL CAMINO DEL VINO HACIA UNA SECTOR MÁS DIGITALIZADO Y SOSTENIBLE" (PAG-020100-2023-276).

REFERENCIAS

[1] Guillamón JM, Sabaté J, Barrio E, Cano J, Querol A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Arch Microbiol. 1998 May;169(5):387-92

[2] Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramón D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. Appl Environ Microbiol. 1992 Sep;58(9):2948-53.

[3] Legras JL, Karst F. Optimisation of interdelta analysis for Saccharomyces cerevisiae strain characterisation. FEMS Microbiol Lett. 2003 Apr 25;221(2):249-55

MICROBIAL BIODIVERSITY OF TRADITIONAL FERMENTED PRODUCTS FROM THE LAZIO REGION IN ITALY

Ilaria Di Biase[1], Maria De Sena[1], Maria del Collado Olid Lopez [1,2,] Diamante Maresca[1], Irene Giordano[1], Gianluigi Mauriello[1]

1 University of Naples Federico II / Department of Agricultural Sciences / Microbiology section / Via Università, 100 80055 -Portici (Napoli).
2 University of Jaén /Department of Health Science / Microbiology section /Campus Las Lagunillas, 23071- Jaén.

ilaria.dibiase@unina.it ; maria.desena@unina.it ; mcol0006@red.ujaen.es ; diamante.maresca@unina.it ; irene.giordano@unina.it ; giamauri@unina.it.

Abstract

The typical products of the Lazio region are characterized by a variety of native microorganisms that confer unique organoleptic and sensory properties.
This project aims to isolate and characterize both genotypically and phenotypically the key microorganisms involved in typical food productions of the Lazio region. The primary goal is to have a detailed mapping of microbial biodiversity to contribute to the valorization of these products. A total of 29 samples of typical products were collected from local producers in various areas. These samples included 27 cheeses, 1 milk sample, and 1 salami sample. Microorganism isolation was performed using standard microbiological analyses on selective media incubated at different temperatures. A total of 874 colonies were subjected to phenotypic characterization based on morphology, Gram reaction, and the presence of specific enzymes such as oxidase and catalase.
For precise identification at the species and genus level, molecular methods based on DNA analysis were employed. DNA was extracted from the isolated colonies using commercial kits. The 16S rRNA gene is a highly conserved region of the 16S ribosomal RNA present in all bacteria and characterized by variable regions that allow for bacterial discrimination at the species level. This gene was amplified by PCR and sequenced. The obtained sequences were compared against reference sequence databases to identify the microorganisms present in the samples.
Results revealed the presence of genera Lactococcus, Streptococcus, Staphylococcus, and Enterococcus. These findings suggest a rich microbial diversity within the samples.

Key words

Fermented foods / Microbial Biodiversity / Microbiological analysis / Lazio Italy Region

Introduction

Microorganisms exhibit the richest repertoire in terms of chemical composition and molecular biodiversity in nature [1]. This diversity is fundamental for the functioning of a habitat, especially in the maintenance of ecological processes or the control of pathogens within the ecosystem [2]. Despite their relevance, these microscopic organisms have as extensive and varied an existence as it is unexplored as only between 0.1 and 10% of microbial species are known depending on the habitat

considered [3]. Functional biodiversity is crucial in ecological assessments of microorganisms within a specific ecosystem, primarily because little is known about the relationship between the structural and functional diversity of these microorganisms [4].

An important example of a microbial ecosystem is found in fermented foods, where the presence and activity of microorganisms are essential for the production of the food itself [5]. This is the case with typical products from the Lazio region, characterized by a variety of indigenous microorganisms that impart unique organoleptic and sensory properties. These products result from fermentation, a crucial process that contributes to their nutritional value and the health benefits they provide [6].

Over the years, various approaches have been adopted to control and examine the microbiota present in a medium, aiming to manage microbiological quality and consequently assess food safety by mapping the microorganisms present in a particular type of food [7]. This involves studying bacteria, yeasts, and other microorganisms that are crucial in the fermentation process to understand how these microbes interact, influence fermentation processes, and contribute to the sensory qualities and health benefits of the final products [8].

In recent years, the evolution of molecular biology has led to the development of new technologies where DNA is extracted directly from a sample and the microbiota can be identified by analyzing the resulting sequences from these methods, allowing both genotypic and phenotypic characterization of key microorganisms involved in such food products [9].

Goals to achieve

-Develop a mapping of microbial biodiversity, contributing to the valorization of these products, by analyzing typical food productions from the Lazio region.

-Characterize both genotypically and phenotypically the key microorganisms involved in these food products.

Materials and methods

1st) Identification of typical food productions

In this first phase, various fermented products will be selected, focusing particularly on dairy and meat charcuterie. This selection will be based on production process analysis, prioritizing products promising higher microbial biodiversity, and conducting field research. Additionally, visiting producers to select suitable facilities for subsequent sampling is essential, as it allows for a detailed review of the production process and implementation of practices that may be involved in identifying and reducing microbial diversity.

2nd) Sampling

Sampling will be conducted according to the specific matrix, using various procedures dictated by ISO reference standards, previous experiences, and process conditions. In any case, procedures will aim to obtain samples that are as representative as possible of the sampling matrix, ensuring that transportation and time between sampling and analysis follow a consistent pattern (transported refrigerated and analysis initiated within 24 hours of

sampling), identifying the real consistency of the samples. In total, 29 samples of typical products from local producers in various areas were collected (27 cheeses, 1 milk sample, and 1 salami sample).

3rd) Microbiological culture analysis

Samples will undergo microbiological culture analysis, involving dilution and subsequent plating for colony counting (Fig. 1). Isolation will be performed using standard microbiological analyses on selective media, incubated at different temperatures for the major microbial groups constituting the microbiome of raw matrices, focusing on lactic acid bacteria, micrococci, yeasts, and molds involved in the transformation of these products.

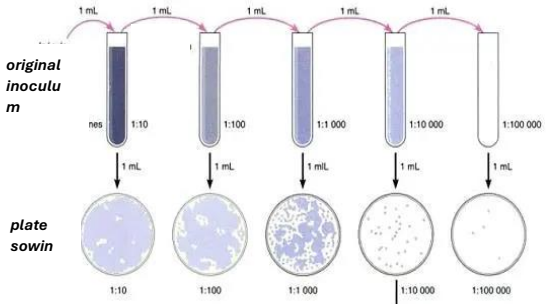


Figure 1: Dilution and subsequent plating.

Furthermore, the use of culture media for isolating potentially pathogenic species or serotypes, such as *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, aims to describe microbial biodiversity. A representative number of microbial cultures were obtained, resulting in a total of 874 different colonies, to undergo purification and characterization at both phenotypic and molecular levels.

4th) Biotyping of microbial isolates

Microbial isolates subjected to phenotypic investigations are based on morphology, Gram reaction, and the presence of specific enzymes such as oxidase and catalase, with these tests aimed at taxonomic and technological characterization.

On the other hand, molecular analysis is crucial for identifying microbial isolates obtained through total DNA extraction. Samples undergo bacterial DNA extraction and purification, followed by amplification via PCR of the V3 region of the 16S rRNA gene (Fig.2). This generates amplicons that are analyzed through pyrosequencing, with subsequent comparison of sequences in databases.

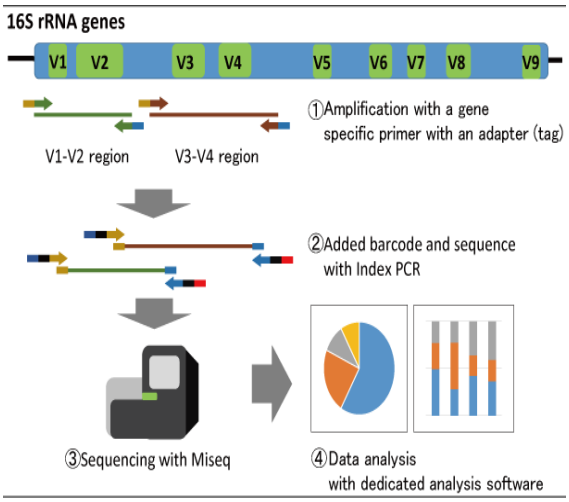


Figure 2: Representative amplification scheme.

Moreover, total DNA is also used for applying fingerprinting techniques to characterize the isolate at strain level, ultimately aiming to maintain a collection of at least 200 different strains characterized at species level, with known technological properties.

Results

The methods employed help identify the functional roles of different microbes and their contributions to the fermentation process. Coupled with the use of bioinformatic tools, we can obtain a comprehensive view of the complexity and microbiological variability of all microbial

species (in some cases, down to the genus level) present in the studied food sample.

This research underscores the importance of microbial diversity in traditional fermented foods, often involving intricate interactions among different microbial species, resulting in diversity that can impact the safety, quality, and nutritional profile of foods [10].

The results revealed the presence of genera (Fig. 3), such as *Lactococcus, Streptococcus, Staphylococcus,* and *Enterococcus*, suggesting a rich microbial diversity within the samples.

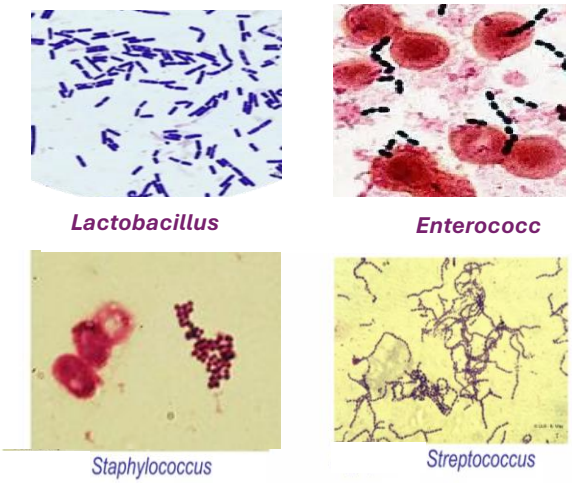


Figure 3: Photographs of the resulting genres

Studying these dynamics can lead to enhanced fermentation techniques, ensuring consistent quality and discovering new health benefits associated with these traditional foods, focusing on maintaining consistent quality over time.

AGRADECIMIENTOS

This work has been funded by the ARSIAL Lazio Region, with thanks to the Director Prof. Danilo Ercolini; to the Accounting Office and to the Office of Research Management. It has been carried out specifically in the Department of Agricultural Sciences of the Federico II University of Naples, and monitored by prof. Gianluigi Mauriello of the Microbiology Section.

REFERENCIAS

1. Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). "The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles." Science, 320(5879), 1034-1039. https://doi.org/10.1126/science.1153213

2. Van der Heijden, M. G. A., et al. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. Ecology Letters, 11(3), 296-310. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x

3. Larsen, N., et al. (1991). Phylogenetic relationships of the domain Archaea. Archives of Microbiology, 155(2), 194-200. https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576

4. Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science, 54(4), 655-670. http://dx.doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x

5. Marco, M. L., et al. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. Current Opinion in Biotechnology, 44, 94-102. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010

6. Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*, *100*(6), 1171-1185. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x

7. Cocolin, L., & Ercolini, D. (2008). Microbial ecology of fermented foods and beverages. Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74520-6

8. Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E.,& Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(42), 15611-15616. https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103

9. Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. Microbiological Reviews, 51(2), 221-271. https://doi.org/10.1128%2Fmr.51.2.221-271.1987

10. Tamang, J. P., & Fleet, G. H. (2009). Yeasts diversity in fermented foods and beverages. *Yeast biotechnology: diversity and applications*, 169-198. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4_9

INCIDENCIA Y ALTERACIÓN DE *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS* EN ZUMOS DE FRUTAS

Colás-Medà P., Neggazi I., Viñas I., Alegre I.

Unidad de Biología y Tecnología de Postcosecha, Departamento de Tecnología, Ingeniería y Ciencia de Alimentos, Centro AGROTECNIO-CERCA (Av. Rovira Roure 191, 25198, Lleida, España)

isabel.alegre@udl.cat

Resumen

Alicyclobacillus acidoterrestris es un microorganismo alterante que tienen la capacidad de producir en los zumos un sabor y aroma anómalos sin producir gas ni cambios de color. Al tratarse de una bacteria acidófila, termorresistente y formadora de endosporas puede resistir la pasteurización y los tratamientos de altas presiones hidrostáticas (HPP) aplicados en los zumos, llegando a desarrollarse en un ambiente ácido como el de los zumos de fruta cuando se dan condiciones óptimas. El análisis de 150 muestras de zumos pasteurizados o tratados con HPP reveló que el 18,0 % de los zumos analizados presentaban contaminación por A. acidoterrestris. Las cepas aisladas se *caracterizaron según su capacidad de crecimiento a diferentes pH y temperaturas, así como por su capacidad de producir guayacol, sustancia responsable de la alteración del zumo. Los resultados mostraron que 5 de las 27 cepas fueron capaces de desarrollarse a temperatura ambiente (20 y 25 °C). Se seleccionaron las 4 cepas que mostraron mayor capacidad de producir guayacol y se determinó el comportamiento de sus esporas en zumo de naranja y zumo de uva negra a lo largo de 7 días de almacenamiento a 45 °C. Los aislados de A. acidoterrestris estudiados mostraron mayor tasa de crecimiento y de producción de guayacol en zumo de naranja (146,5-371,2 µg/L), mientras que en zumo de uva negra el crecimiento de todas los aislados de A. acidoterrestris se inhibió. Sin embargo, aunque la población no se incrementó durante la conservación en este zumo, se detectaron niveles de guayacol entre 15,0-64,6 µg/L a los 7 días.*

Palabras clave

Alterante, esporulado, zumo, guayacol, CG-MS

Alicyclobacillus acidoterrestris es uno de los microorganismos alterantes que más preocupa a los productores de zumo. La alteración que ocasiona se atribuye a la producción de guayacol, un compuesto que causa sabores y aromas anómalos en los zumos, descritos como medicinales o ahumados, lo que lleva al rechazo del producto por parte de los consumidores y ocasiona pérdidas económicas significativas para los productores. *A. acidoterrestris* es una bacteria acidófila, termorresistente y formadora de endosporas que resiste a los tratamientos convencionales, como la pasteurización y las altas presiones hidrostáticas (HPP), utilizados para

garantizar la calidad y seguridad alimentaria de los zumos. Con el objetivo de **conocer la incidencia de esta bacteria en zumos de frutas del mercado español**, se analizaron 150 muestras de zumos tratados con pasteurización o HPP. Parte de las muestras fueron adquiridas en los lineales de distintos supermercados (127 muestras) y otras fueron suministradas por empresas elaboradoras de zumo (23 muestras) como productos intermedios que se utilizan posteriormente para mezclas. Como resultado, se detectó *A. acidoterrestris* en 27 de las muestras (21 muestras de supermercado (17,3 %) y 5 muestras intermedias (21,7 %)), representando una incidencia del 18,0 % del total analizado. Los aislados obtenidos y la cepa de referencia CECT 7094T se caracterizaron en función de su crecimiento en caldo BAT a diferentes temperaturas (entre 20 y 60 °C) y diferentes pH (entre 2 a 4,5) y por su capacidad para producir guayacol en condiciones óptimas (caldo BAT enriquecido con ácido vainílico (100 mg/L) a pH 4.0 durante 24 h a 45°C). La cuantificación de guayacol en caldo BAT se realizó mediante un ensayo colorimétrico de la enzima peroxidasa.

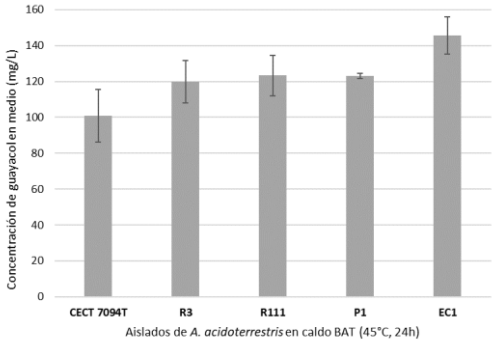


Figura 1: concentración de guayacol (mg/L) producida por cuatro de las cepas de *A. acidoterrestris* aisladas de zumos y de la cepa de colección CECT 7094T en condiciones *in vitro* tras 24h de incubación a 45°C en caldo BAT.

Los resultados mostraron diferencias significativas entre aislados en cuanto a la capacidad de crecimiento a diferentes pH y temperaturas. Aunque se confirmó que la temperatura óptima de crecimiento de los aislados fue de 45 °C, algunos destacaron (R42, EC10, EZ13 y EC1) por su capacidad de crecer a temperaturas de 20 y 25 °C. Por lo que respecta a los resultados obtenidos de la capacidad de producción de guayacol, todos los aislados produjeron el compuesto detectándose concentraciones entre 74,1 y 145,6 mg/L a las 24 h. El aislado EC1 también destacó por producir la mayor cantidad de guayacol (145,6 ± 10,3 mg/L). No obstante, no se observaron diferencias significativas respecto a otros aislados como P1, R111 y R3 (123,2 ± 1,4, 123,2 ± 11,4 y 119,9 ± 11,8 mg/L de guayacol, respectivamente) (Figura 1). Mientras que la cepa de referencia CECT 7094T bajo las mismas condiciones produjo 100,7 ± 14,7 mg/L de guayacol.

Para que *A. acidoterrestris* produzca guayacol en los zumos, es necesario que los compuestos precursores del guayacol estén presentes. Existen varias rutas metabólicas mediante las cuales puede generarse guayacol, por lo que no se puede atribuir su producción a un solo precursor. Entre los principales precursores descritos del guayacol se encuentran el ácido vainílico, el ferúlico y la vainillina. A nivel de laboratorio se ha observado que si existe la presencia de precursores y una población bacteriana de 10^4 ufc/mL puede darse la producción de guayacol. Sin embargo, este proceso puede verse afectado por factores intrínsecos del zumo (pH, contenido en sólidos solubles o presencia de compuestos antimicrobianos) y extrínsecos (como la temperatura de almacenamiento [1,2].

Para **entender mejor el comportamiento de *A. acidoterrestris* en zumos de frutas,** se seleccionaron los 4 aislados que mostraron una mayor capacidad de producción de guayacol en condiciones óptimas, y junto a la cepa de referencia CECT 7094T, **se estudió su comportamiento en zumo de naranja y zumo de uva negra**. Inicialmente se caracterizaron los zumos cuantificando los compuestos fenólicos más relevantes, incluyendo los precursores del guayacol más conocidos. Con el objetivo de acercarnos más a la realidad se utilizó una suspensión de esporas para la inoculación de los zumos, puesto que es en esta forma en la que suele encontrarse este alterante en el campo, siendo una de las vías de contaminación principales de la materia prima. Se determinó la capacidad de crecimiento de las cepas en los zumos a 45 °C, mediante siembra en medio YSG, y su capacidad de producción de guayacol a los 7 días. La cuantificación de guayacol en zumo se llevó a cabo empleando cromatografía de gases acoplado a un detector de masas obteniendo un límite de cuantificación de 4 µg/L en zumo.

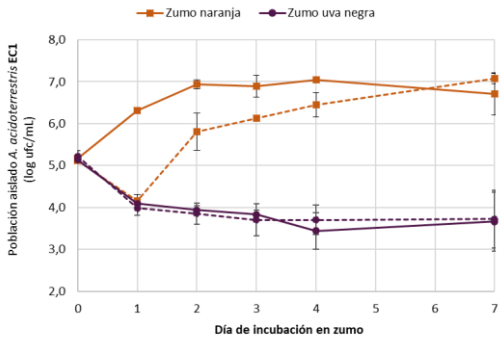


Figura 2: evolución de la población de células totales (línea continua) y esporas (línea discontinua) de la cepa EC1 de *A. acidoterrestris* en zumo de naranja y zumo de uva negra a lo largo de la incubación del zumo a 45 °C.

Todos los aislados estudiados mostraron crecimiento en zumo de naranja, incrementando las poblaciones de células totales y esporas entre 1 y 2 unidades logarítmicas a los 7 días. Al contrario, en zumo de uva negra el crecimiento de algunos aislados se vio inhibido (R111 y P1, datos no mostrados) mientras que en el resto de los aislados se observó una reducción de la población de entre 0,7 y 1,5 unidades logarítmicas a los 7 días, siendo la cepa EC1 la que mostró la mayor reducción en zumo de uva negra (Figura 2).

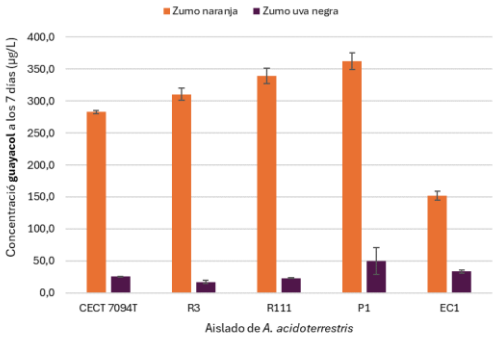


Figura 3: concentración de guayacol (µg/L) en los zumos de naranja y uva negra a los 7 días tras el crecimiento de las distintas cepas de aislados de *A. acidoterrestris* durante 7 días a 45 °C.

En cuanto a la producción de guayacol a los 7 días, en el zumo de naranja se detectaron concentraciones de guayacol entre 146,5 y 371,2 µg/L, destacando las cepas P1 y R111 como las más productoras (362,3 ± 12,6 y 339,1 ± 12,3 µg/L, respectivamente) (Figura 3). En cambio, en el zumo de uva negra se observó una menor producción de guayacol sin diferencias significativas entre aislados con valores entre 15,0 y 64,6 µg/L de guayacol. Aunque en el zumo de uva negra la concentración de guayacol producida pueda parecer insignificante respecto a la observada en zumo de naranja, ésta se encuentra por encima de 2 µg/L, concentración descrita a partir de la cual se percibe el olor de guayacol en el zumo de naranja[3]. Se ha descrito el umbral de detección del guayacol en otros zumos

como el de manzana (0,91 µg/L[4]), sin embargo, no se conoce el umbral de detección en zumo de uva negra. Por lo tanto, el consumidor podría identificar el zumo de uva negra como alterado, ya que la concentración media que se cuantificó (29,7 ± 13,9 µg/L) es 15 veces superior al umbral descrito en naranja y 30 veces superior al descrito en manzana.

Los resultados del perfil fenólico de ambos zumos mostraron diferencias en cuanto a la composición y cantidad de algunos de los compuestos analizados. En el zumo de uva negra se observaron cantidades significativas de compuestos como el ácido protocatecuico, epicatequina y kaempferol (datos no mostrados), de los que se ha descrito su actividad antibacteriana [4]. Sin embargo, estos compuestos estaban presentes a baja concentración en el zumo de naranja. En cuanto a los compuestos considerados como precursores, el ácido ferúlico estuvo presente en ambos zumos, siendo tres veces más abundante en el zumo de naranja, mientras el ácido vainílico únicamente se detectó a elevada concentración en el zumo de uva negra y la vainillina en el zumo de naranja (Tabla 1).

Tabla 1: concentración de compuestos precursores del guayacol en el zumo de naranja y zumo de uva negra utilizado en el crecimiento de *A. acidoterrestris*.

Precursores del guayacol (µg/L)	Zumo Naranja	Zumo Uva negra
Ácido ferúlico	1372,5 ± 6,6	478,2 ± 13,4
Vainillina	87,7 ± 2,2	<LD
Ácido vainílico	<LD	434,8 ± 15,0

Con este estudio se confirmó que incluso cuando no existe crecimiento del alterante en el zumo, causado por la presencia de factores intrínsecos como componentes antimicrobianos, *A. acidoterrestris* es capaz de producir alteración en condiciones óptimas de temperatura. Además, se ha observado una incidencia elevada de la bacteria en zumos de fruta comerciales, por lo que unas buenas prácticas de producción y desinfección son esenciales para prevenir la contaminación por *A. acidoterrestris*, ya que como se ha confirmado puede llegar incluso a alterar zumos donde la presencia de compuestos antimicrobianos es elevada. Para aquellos productos que no van a conservarse en refrigeración se hace imprescindible la búsqueda de nuevas estrategias que puedan complementar tratamientos como la pasteurización o las HPP para prevenir la alteración de los zumos por *A. acidoterrestris.*

AGRADECIMIENTOS

Los autores se complacen en agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación (QUALISAFEJUICE PID2019-106645RB-I00 y *ALIPAT PID2022-139224OB-I00) su apoyo financiero y a la Universidad de Lleida por la aportación de la beca predoctoral a (BOU-220/2020 UdL).*

REFERENCIAS

[1] I. Neggazi, P. Colás-Medà, I. Viñas, S. Garza, I. Alegre, *International Journal of Food Microbiology,* **2023**, *396*, 1-7.

[2] A. Spinelli, A. Sant'Ana, S. Rodrigues-Junior, P. R. Massaguer, *Applied and Environmental Microbiology,* **2009**, *75 (23)*, 7409-7416.

[3] P.R. Pérez-Cacho, M.D. Danyluk, R. Rouseff, *Food Chemistry*, **2011**, *129*, 45-50.

[4] M.C. Lima, C. Paiva de Sousa, C. Fernandez-Prada, J. Harel, J.D. Dubreuil, E.L. de Souza, *Microbial Pathogenesis*, **2019**, *130*, 259–270

CONTROL DE *ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS* EN ZUMO DE NARANJA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UV-C Y HPP COMBINADO CON TEMPERATURA Y ANTIMICROBIANOS

Neggazi I.[1], Pinto C. A.[2], Saraiva J. A.[2], Colás-Medà P.[1], Viñas I.[1], Alegre I.[1]

1 Unidad de Biología y Tecnología de Postcosecha, Centro AGROTECNIO-CERCA Departamento de Tecnología, Ingeniería y Ciencia de Alimentos (Av. Rovira 191, 25198, Lleida, España)
2 Universidade de Aveiro, Campus Universitario de Santiago, LAQV-REQUIMTE, Departamento de Química, (3810-193, Aveiro, Portugal)

isabel.alegre@udl.cat

Resumen

La persistencia de Alicyclobacillus acidoterrestris en zumos de frutas debido a su resistencia a métodos convencionales como la pasteurización térmica y las altas presiones hidrostáticas (HPP) representa un reto para la industria de zumos. Para abordarlo, se han explorado alternativas como la radiación ultravioleta C (UV-C) y el uso simultaneo de altas presiones hidrostáticas (HPP) con temperaturas moderadas y compuestos antimicrobianos. Se evaluó la efectividad de la UV-C en dos etapas distintas del proceso de producción de zumo de naranja (desinfección de la fruta y tratamiento del zumo), aplicando dosis de 0-60 kJ/m^2 en la superficie de la fruta y entre 0-400 kJ/m^2 en zumo inoculado. Una dosis UV-C de 18 kJ/m^2 en la piel de naranja redujo las esporas de A. acidoterrestris hasta 2 unidades logarítmicas, sin embargo, en zumo fue necesaria una dosis de hasta 300 kJ/m^2 para obtener una reducción similar debido a la baja penetración de la UV-C. Como alternativa para el control de las esporas de A. acidoterrestris en zumo*, se investigó la combinación de HPP con temperatura (500 MPa a 70 °C y 600 a 65 °C) y nisina. Los tratamientos redujeron la población de A. acidoterrestris entre 3,4 y 4,4 unidades logarítmicas. Tras el tratamiento, las muestras se almacenaron durante 12 días a 45 °C y se determinó la evolución de la población de células totales y esporas y la alteración del zumo a los 12 días. Solo los tratamientos con antimicrobianos inhibieron el desarrollo de A. acidoterrestris durante la conservación, manteniendo la población por debajo del límite de detección.*

Palabras clave

Nisina, guayacol, esporas

La presencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumos de frutas cada vez preocupa más a los productores de zumos, ya que sus esporas resisten los tratamientos convencionales como la pasteurización térmica y a tratamientos alternativos como las altas presiones hidrostáticas (HPP). Como consecuencia de su supervivencia en el zumo, cuando las esporas se encuentran en condiciones favorables, germinan y la

bacteria altera el producto produciendo un olor y sabor desagradables, lo que conlleva al rechazo por parte del consumidor. Esta alteración se debe a la producción de diferentes compuestos, entre los cuales se encuentra el guayacol. Ruiz Perez-Cacho y Rouseff [1] reportaron que el guayacol se puede detectar por su olor a partir de una concentración de 2 µg/L en zumo de naranja. Frente a esta problemática, se proponen varias estrategias de control para reducir la incidencia de este microorganismo durante el proceso de producción del zumo de naranja. Algunas de las alternativas que se proponen son la aplicación de radiación ultravioleta de onda corta C (UV-C) y el uso combinado de las HPP con temperaturas moderadas y compuestos antimicrobianos.

Se evaluó la eficacia de la aplicación de UV-C en naranja, tanto la fruta como en el zumo [2] para el control de dos cepas de *A. acidoterrestris*, una cepa de referencia (CECT 7094T) y una cepa previamente aislada de un zumo de manzana pasteurizado (TA-1.183). En primer lugar, se preparó un concentrado de esporas de cada una de las cepas de *A. acidoterrestris* y se inoculó la piel de la naranja a 5 log ufc/cm^2 y el zumo a 5 log ufc/mL. A continuación, se aplicaron los tratamientos de radiación UV-C, a una longitud de onda de 254 nm y una intensidad de aproximadamente 100 W/m^2. Los tiempos de tratamiento para la superficie del fruto oscilaron entre 3 segundos y 10 minutos (0,3- 59,9 kJ/m^2) y en el zumo entre 5 y 60 minutos (31,4-370,6 kJ/m^2).

En los resultados obtenidos de la piel de la naranja, se observó que con una dosis UV-C de 0,3 kJ/m^2 se redujo significativamente la población de esporas de ambas cepas, en 0,8 ± 0,2 unidades logarítmicas para la cepa CECT 7094T (Figura 1A) y en 0,9 ± 0,1 unidades logarítmicas para la cepa TA-1.183 (Figura 1B). Sin embargo, al incrementar la potencia de 18,0 a 59,9 kJ/m^2 para CECT 7094T y de 5,9 a 59,9 kJ/m^2 para TA-1.183, no se detectaron variaciones significativas en la población de esporas. Tras 10 minutos de exposición (62,8 ± 0,8 kJ/m^2) se observó una reducción significativa de 2,28 ± 0,21 y 2,08 ± 0,23 unidades logarítmicas para *A. acidoterrestris* CECT 7094T y TA-1.183, respectivamente.

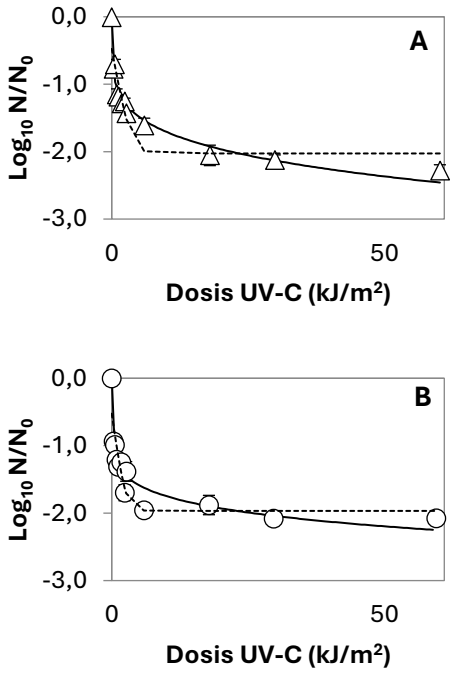


Figura 1: Curvas de supervivencia de las esporas de *A. acidoterrestris* CECT 7094T (**A**) y *A. acidoterrestris* TA-1.183 (**B**) en piel de naranja durante el tratamiento con radiación UV-C.

En cuanto a la inactivación de las esporas de *A. acidoterrestris* en zumo de naranja, una radiación de 94,4 kJ/m^2 redujo las esporas de la cepa CECT 7094T en 0,5 ± 0,1 unidades logarítmicas (Figura 2A). Al aumentar la potencia a 157,2 kJ/m^2, la reducción fue de 1,3 ± 0,2 unidades logarítmicas. Para la cepa TA-1.183 (Figura 2B), una potencia de 125,9 kJ/m^2 redujo las esporas en 0,7 ± 0,2 unidades logarítmicas, mientras que a 278,8

kJ/m^2, la reducción fue de 1,7 ± 0,3 unidades logarítmicas. Tras una exposición de 60 minutos (370,6 kJ/m^2) se lograron reducciones de 2,8 ± 0,4 y 2,2 ± 0,6 unidades logarítmicas para *A. acidoterrestris* CECT 7094T y TA-1.183 en zumo, respectivamente.

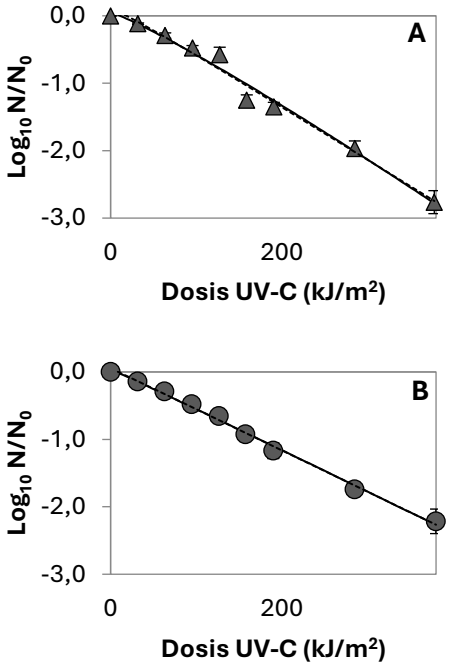


Figura 2: Curvas de supervivencia de las esporas de *A. acidoterrestris* CECT 7094 T (**A**) y *A. acidoterrestris* TA-1.183 (**B**) en zumo de naranja durante el tratamiento con radiación UV-C.

Por tanto, se demostró que la radiación ultravioleta UV-C (254 nm) puede reducir la población de esporas de *A. acidoterrestris* en piel y zumo de naranja. Sin embargo, para obtener efectividades similares a las observadas en la piel fue necesario tratar el zumo durante 60 minutos. Debido a la baja penetración de la radiación UV-C en zumos turbios, se estudió el tratamiento HPP combinado con temperatura y nisina como alternativa.

En primer lugar, se preparó un concentrado de esporas de una cepa de *A. acidoterrestris* previamente aislada de un concentrado de zumo de manzana (EC1)[3] . Paralelamente, se prepararon muestras de zumo con nisina a dos dosis distintas (0,02 y 0,05 g/L), que se inocularon para obtener una población inicial de esporas de *A. acidoterrestris* de aproximadamente 10^5 ufc/mL. Seguidamente, las muestras se sometieron a dos tratamientos de presión y temperatura (500 MPa a 70 °C y 600 MPa a 65 °C). Inmediatamente después del tratamiento se determinó la población de células totales y esporas de cada una de las muestras. Tras 12 días de conservación a 45 °C se volvió a determinar población de células totales y esporas, así como la concentración de guayacol en el zumo.

Como se puede observar en la Figura 3, el tratamiento combinado de presión y temperatura (500 MPa a 70 °C) con ambas dosis de nisina (0,02 y 0,05 g/L) resultó en una reducción significativa de la población de células totales y esporas, logrando reducciones de 4,2 ± 0,1 y 4,3 ± 0,0 unidades logarítmicas, respectivamente. En contraste, el zumo sin nisina mostró una menor disminución, con reducciones de 1,5 ± 1.1 y 1,4 ± 1,0 unidades logarítmicas en células totales y esporas, respectivamente.

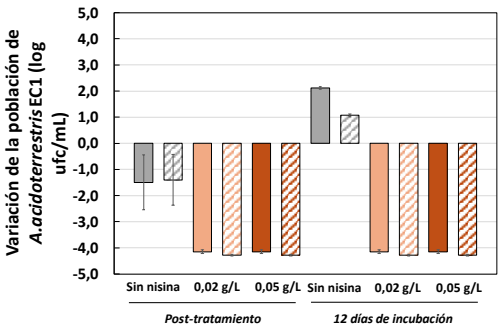


Figura 3. Variación de la población de células totales (barras lisas) y esporas (barras con líneas) de *A. acidoterrestris* en el zumo de naranja sin nisina y con 0,02 y 0,05 g/L de nisina tras aplicar un tratamiento combinado de 500 MPa+70 °C y a los 12 días de incubación a 45 °C.

Tras 12 días de incubación a 45 °C, la población de células totales y esporas, en ambas dosis de nisina aplicadas se mantuvieron estables al mismo nivel de reducción. Sin embargo, en el zumo sin nisina, se observó un incremento de 2,1 ± 0,1 y 1,1 ± 0,1 unidades logarítmicas de la población de células totales y esporas, respectivamente, respecto a la población inicial en zumo. En cuanto a la producción de guayacol a los 12 días, se detectaron cantidades de 5,0 ± 0,4 y 4,1 ± 0,6 µg/L de guayacol en las dosis 0,02 y 0,05 g/L de nisina, respectivamente. En cambio, en el zumo sin nisina tratado previamente con 500 MPa+70 °C se detectaron mayores concentraciones de guayacol (179,2 ± 41,2 µg/L de guayacol (datos no mostrados).

Al aplicar un segundo tratamiento combinado de temperatura y presión (600 MPa a 65 °C) (Figura 4), la reducción de la población de células totales y esporas fue menor en comparación al tratamiento aplicado a 500 MPa a 70 °C. Sin embargo, se observó la misma reducción en el zumo sin nisina que en zumo con las dos dosis de nisina aplicadas, alcanzando reducciones de 3,4 ± 0,0 y 3,6 ± 0,0 unidades logarítmicas, para células totales y esporas, respectivamente.

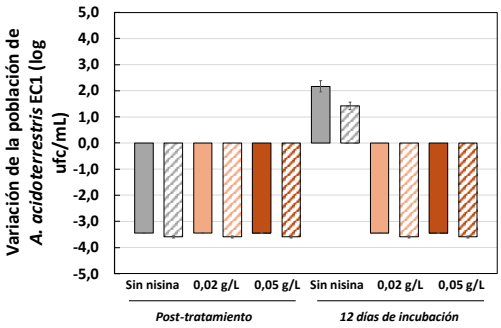


Figura 4. Variación de la población de células totales (barras lisas) y esporas (barras con líneas) de *A. acidoterrestris* en el zumo de naranja sin nisina y con 0,02 y 0,05 g/L de nisina tras aplicar un tratamiento combinado de 600 MPa+65 °C y a los 12 días de incubación a 45 °C.

Tras 12 días de incubación a 45 °C del zumo tratado con 600 MPa+65 °C, la variación de la población de células totales y esporas a 0,02 y 0,05 g/L de nisina se mantuvo constante, mientras que en el zumo sin nisina se observó una variación positiva de 2,2 ± 0,2 y 1,4 ± 0,1 unidades logarítmicas para células totales y esporas, respectivamente, respecto la población en zumo antes del tratamiento. Respecto al guayacol producido en el día 12 de incubación a 45 °C, en el zumo con nisina se cuantificaron 7,0 ± 0,7 y 10,0 ± 2,2 µg/L de guayacol, en las dosis 0,02 y 0,05 g/L de nisina, respectivamente. En cambio, en el zumo sin nisina, los niveles de guayacol alcanzaron 203,3 ± 53,4 µg/L (datos no mostrados).

En el estudio realizado se ha observado una elevada efectividad en la aplicación de radiación de UV-C en piel de naranja. Asimismo, la combinación de nisina con HPP y temperaturas moderadas puede ser una buena estrategia de control de las esporas de *A. acidoterrestris* en zumo de naranja.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación (QUALISAFEJUICE PID-2019-106645RB-I00, ALIPAT PID PID2022-139224OB-I00) por el apoyo financiero, así como a la Universidad de Lleida por otorgar la beca predoctoral (BOU-220/2020 UdL).

REFERENCIAS

[1] P. Ruiz Perez-Cacho, R. Rouseff, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, *56 (21)*, 9785-9796.

[2] P. Colás-Medà, I. Nicolau-Lapeña, I. Viñas, I. Neggazi, I. Alegre, *Foods,* **2021**, *10 (4)*, 855.

[3] I. Neggazi, P. Colás-Medà, I. Viñas, S. Garza, I. Alegre, *International Journal of Food Microbiology,* **2023**, *396*, 1-7.

AGUA ACTIVADA POR PLASMA COMO ALTERNATIVA INNOVADORA EN LA ELIMINACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Francés Á.[1], D'Arcangelo S.[2], Oliveira M.[1], Cordero-García R.[1], González-Raurich M.[1], Álvarez-Ordóñez A.[1], López M.[1]

[1]Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, 24071, León, España
[2]Universidad "Gabriele d'Annunzio" Chieti-Pescara, Departamento de Farmacia, 66100, Chieti, Italia

afranr@unileon.es

Resumen

El agua activada por plasma (PAW) está siendo considerada en la actualidad como una estrategia muy prometedora en la eliminación de microorganismos, tanto patógenos como alterantes, adheridos a las superficies de equipos utilizados en el procesado de alimentos. Sin embargo, apenas se conoce la influencia que ejerce la energía aplicada para la obtención del plasma sobre la capacidad letal del PAW resultante. En consecuencia, este estudio se planteó con el objetivo de determinar las propiedades fisicoquímicas (pH, conductividad eléctrica (CE), potencial de óxido-reducción (ORP)) y la efectividad de 5 PAWs obtenidas en distintas condiciones de generación de plasma por burbujeo, variando el voltaje (120-200 V), frecuencia (1200-2450 Hz) y tiempo (240-700 segundos) de descarga eléctrica utilizada para la ionización del aire, para inactivar las células de un cóctel de 3 cepas de Listeria monocytogenes adheridas a acero inoxidable, tras su crecimiento a 12 °C durante 6 días. Asimismo, se determinó el contenido de nitratos, nitritos, peróxido de hidrógeno y ozono en todas las PAWs.

La activación del agua desionizada, con valores de pH, ORP y CE de 6,4 ± 0,2; 378 ± 61 mV y 1,8 ± 0,8 µS/cm, provocó su acidificación, entre 2,1 y 2,6 unidades, y un aumento de los valores de ORP y CE hasta en 342 mV y 143,2 µS/cm, respectivamente. Además, en todas las PAWs se observó un incremento del contenido de nitratos (6-12 ppm) y ozono (0,2-0,3 ppm), mientras que no se detectó un incremento de nitritos y peróxido de hidrógeno. Por otra parte, tras 60 minutos de exposición de las biopelículas a las diferentes PAWs, se observaron reducciones que oscilaron entre 3,1 y 3,5 ciclos logarítmicos, lo que pone de manifiesto que las condiciones de generación del PAW no determinaron, en gran medida, su efectividad antimicrobiana.

Palabras clave

Agua activada por plasma, actividad antimicrobiana, biopelícula, Listeria monocytogenes

La colonización de las instalaciones de procesado de alimentos con biopelículas microbianas contribuye a la contaminación cruzada y al deterioro de los alimentos, además de suponer un grave riesgo para la salud de los consumidores [1]. Asimismo, es

necesario mencionar que los métodos tradicionales de desinfección poseen ciertas limitaciones para eliminar estas complejas estructuras. Por ello, en las últimas décadas, se ha comenzado a desarrollar y evaluar tecnologías emergentes de desinfección con una potencial aplicación en la industria alimentaria que, además, eviten el desarrollo de resistencias microbianas [2]. En consecuencia, este estudio se llevó a cabo con el propósito de evaluar la capacidad para eliminar biopelículas del agua activada por plasma (PAW), que es el producto resultante de la exposición del agua a la acción del plasma atmosférico no térmico, así como de caracterizar química y fisicoquímicamente las PAWs obtenidas bajo diferentes condiciones de generación de plasma.

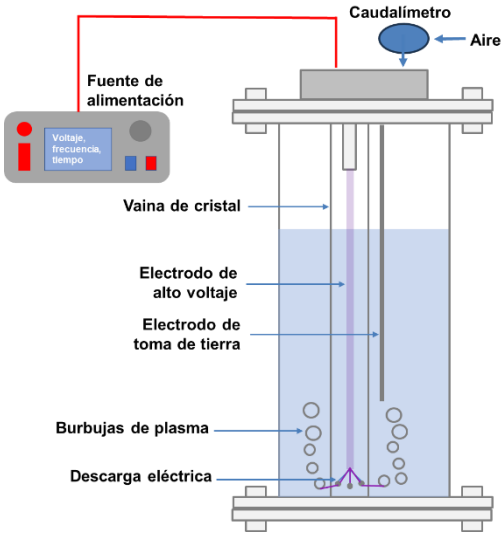


Figura 1: esquema de producción de PAW mediante un reactor de generación de plasma por burbujeo.

Se obtuvieron 5 PAWs mediante el empleo de un reactor de generación de plasma por burbujeo (**Figura 1**; PlasmaLeap Technologies) variando el voltaje, la frecuencia y el tiempo de descarga eléctrica utilizada para la ionización del aire (**Tabla 1**). Tras la activación del agua, se determinaron diferentes parámetros fisicoquímicos (pH, potencial de oxidación-reducción (ORP), conductividad eléctrica (CE)) y químicos (contenido de nitratos, nitritos, peróxido de hidrógeno, ozono). Inmediatamente tras la generación del PAW, este se aplicó sobre una biopelícula formada por un cóctel de 3 cepas de *Listeria monocytogenes* crecidas durante 6 días a 12 °C sobre acero inoxidable, recuperando posteriormente las células supervivientes con un hisopo, para calcular las reducciones logarítmicas logradas.

Tabla 1: condiciones de generación de PAW.

PAW	Condiciones de activación
A	150 V, 1200 Hz, 400 s
B	200 V, 1200 Hz, 400 s
C	150 V, 2000 Hz, 700 s
D	175 V, 1600 Hz, 240 s
E	175 V, 1600 Hz, 550 s

La aplicación de plasma a muestras (500 mL) de agua desionizada (pH 6,4 ± 0,2; ORP 378 ± 61 mV; CE 1,8 ± 0,8 µS/cm) originó, en todos los casos, su acidificación (con valores de pH comprendidos entre 3,8 ± 0,1 - 4,3 ± 0,3), mientras que aumentó su ORP (588 ± 112 – 720 ± 10 mV) y CE (47 ± 16 – 145 ± 7 µS/cm), comportamiento ya descrito en estudios previos [3]. Asimismo, se observó un incremento del contenido de nitratos y ozono (**Tabla 2**), que oscilaron entre 5,9 y 11,8 ppm y entre 0,16 y 0,27 ppm, respectivamente, aunque no se detectaron cambios en las concentraciones de nitritos y peróxido de hidrógeno.

Tabla 2: contenido de nitratos (NO_3^-) y ozono (O_3), expresados en ppm, de las PAWs generadas.

PAW	NO_3^- (ppm)	O_3 (ppm)
A	5,93 ± 0,23	0,27 ± 0,08
B	11,15 ± 0,37	0,27 ± 0,06
C	11,79 ± 0,61	0,16 ± 0,07
D	8,25 ± 0,35	0,19 ± 0,09
E	10,21 ± 0,51	0,19 ± 0,11

La aplicación de las diferentes PAWs a las biopelículas de *L. monocytogenes* durante 60 minutos ejerció un efecto antibacteriano similar, logrando inactivaciones que oscilaron entre 3,1 y 3,5 ciclos logarítmicos (**Figura 2**), lo que pone de manifiesto, además de la gran capacidad desinfectante de la solución, que las condiciones estudiadas para su generación no condicionaron, en líneas generales, su posterior efecto letal.

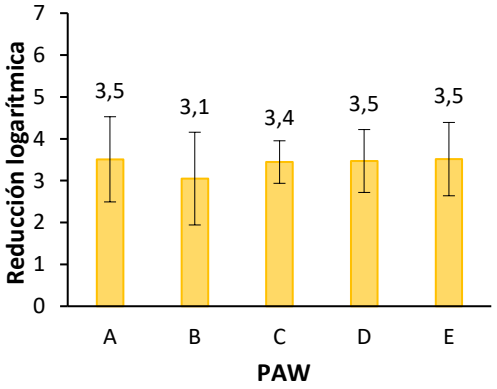


Figura 2: inactivación de la población de células de *L. monocytogenes*, crecidas en biopelícula, tras su exposición durante 60 minutos a la acción de diferentes PAWs obtenidas en distintas condiciones de descarga eléctrica.

Asimismo, no se detectó la existencia de correlaciones entre las concentraciones de nitrato u ozono presentes en el PAW y el grado de inactivación alcanzado, lo que podría indicar que estas especies químicas reactivas no son las únicas responsables del efecto antimicrobiano, sino que podrían desempeñar un papel importante otros compuestos citotóxicos más inestables, como el radical hidroxilo, anión superóxido, peroxinitrito u oxígeno singlete [4,5].

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se ha realizado dentro del marco del proyecto PID2020-113658RB-C22 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033. Ángel Francés agradece a la Universidad de León la concesión de un contrato predoctoral.

REFERENCIAS

[1] A. Álvarez-Ordóñez, L. M. Coughlan, R. Briandet y P. D. Cotter, *Annual Review of Food Science and Technology*, **2019**, 10, 173-195.

[2] T. Mazaheri, B. R. H. Cervantes-Huamán, M. Bermúdez-Capdevila, C. Ripolles-Avila y J. J. Rodríguez-Jerez, *Microorganisms*, **2021**, 9, 1-19.

[3] J. G. Rothwell, D. Alam, D. A. Carter, B. Soltani, R. McConchie, R. Zhou, P. J. Cullen y A. Mai-Prochnow, *Journal of Applied Microbiology*, **2022**, 132, 2490-2500.

[4] M. López, T. Calvo, M. Prieto, R. Múgica-Vidal, I. Muro-Fraguas, F. Alba-Elías y A. Álvarez-Ordóñez, *Frontiers in Microbiology*, **2019**, 10, 622.

[5] A. Mai-Prochnow, R. Zhou, T. Zhang, K. Ostrikov, S. Mugunthan, S. A. Rice y P. J. Cullen, *Biofilms and Microbiomes*, **2021**, 7, 1-12.

NANOPORE ADAPTIVE SAMPLING PARA LA DETECCIÓN MEJORADA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*: UN ENFOQUE CUASIMETAGENÓMICO

Illán Ortega, G.[1], Allende, A.[1], Cobo-Díaz, J.F.[2], Gil, M.I.[1], Álvarez-Ordóñez, A.[2], Truchado, P.[1]

1 Grupo de investigación en Microbiología y Calidad de Frutas y Hortalizas, CEBAS-CSIC, Murcia.
2 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos e Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, León.

gillan@cebas.csic.es

Resumen / Abstract

Listeria monocytogenes, la bacteria causante de la listeriosis, es un patógeno alimentario importante que sigue provocando brotes toxiinfecciosos a nivel mundial. Debido a los riesgos que plantea para la salud, la monitorización y vigilancia en plantas de procesado de alimentos es esencial. Actualmente, para evaluar el riesgo y detectar la presencia de L. monocytogenes, es necesario realizar la secuenciación del genoma completo (WGS) de los aislados a partir de un medio selectivo, lo que permite una caracterización detallada del patógeno. Sin embargo, esta metodología es dependiente de cultivo, por lo que no representa a toda la comunidad bacteriana. La secuenciación metagenómica directa es independiente de cultivo y ofrece una metodología única para llenar vacíos de conocimiento sobre la ecología microbiana de muestras alimentarias. Sin embargo, la alta carga bacteriana y la complejidad de los microbiomas en entornos de producción y procesamiento de alimentos, así como las limitaciones en la profundidad de secuenciación, hacen inviable el uso de este método, para la detección de cepas patógenas en muestras ambientales y alimentarias. Para solventar estas limitaciones, este trabajo propone el uso de Nanopore Adaptive Sampling (NAS), basado en el enriquecimiento controlado por software como una alternativa a los métodos tradicionales de laboratorio, como la separación inmunomagnética. NAS opera mediante una línea de procesamiento bioinformático que, durante la secuenciación, compara los nucleótidos de moléculas individuales con un genoma de referencia de la especie de interés cada ~0.4 segundos. De esta manera, se secuencian un mayor número de lecturas del patógeno. En este trabajo, se presentan los resultados obtenidos de comparar la metagenómica convencional y el NAS para la identificación de L. monocytogenes.

Palabras clave / Key words

Listeria monocytogenes, cuasimetagenómica, secuenciación shotgun, Nanopore, Adaptive Sampling

1. Introducción

Listeria monocytogenes es un patógeno de preocupación para el sector agroalimentario, por ser la causa de la listerioris, y de numerosas retiradas de producto, con el coste que esto supone para las empresas [1]. Su detección y caracterización durante la producción primaria y/o el procesado de alimentos es crucial para garantizar la seguridad alimentaria y la salud pública [2]. La secuenciación metagenómica por shotgun , independiente de cultivo, permite la detección de cepas específicas de L. monocytogenes y en tiempos más cortos que el WGS a partir de aislados . Sin embargo, esta metodología presenta limitaciones a la hora de detectar patógenos presentes en muy baja concentración, incluso cuando se utiliza un enriquecimieto previo [4], [5]. El objetivo de este estudio es comparar diferentes metodologías con el fin de aumentar la abundancia de las lecturas de *L. monocytogenes* obtenidas durante la secuenciación de muestras ambientales como son suelo, agua de riego, productos vegetales y superficies. Las técnicas utilizadas fueron la separación inmunomagnética (IMS), la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), y el uso de técnicas de enriquecimiento controlado por software (Nanopore Adaptive Sampling, NAS).

2. Material y métodos

Se tomaron por duplicado muestras ambientales procedentes de un invernadero, entre las que se incluyeron agua de riego, suelo, superficies del invernadero (p. ej. cajas de recolección) y material vegetal. Cada réplica fue suplementada con 250 mL de medio de enriquecimiento diferente, y se utilizaron dos enriquecimientos: half Fraser-Fraser (hF-F) y Listeria Broth (LB). Todas las muestras se inocularon con 1 ufc/mL de un coctel de dos cepas de *L. monocytogenes* previamente aislada del ambiente de líneas de procesado de vegetales frescos cortados y caracterizadas como secuencia tipo (ST), ST155 y ST6. Las muestras suplementadas con LB se incubaron a 30 °C durante 48 h y las de half Fraser fueron primero pre-enriquecidas a 30ºC durante 24h y enriquecidas en Fraser a 37ºC hasta las 48 horas. De cada muestra, se tomaron 2 alícuotas de 30 mL a diferentes tiempos, 6, 12, 24 y 48 horas (n=16). Todas las alícuotas se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min y se les descartó el sobrenadante. A uno de los dos pellets obtenidos, se le extrajo el ADN directamente y el otro fue tratado con IMS y enriquecido con MDA. La IMS se llevó a cabo mediante el uso de las perlas Dynabeads® anti-Listeria y el MDA con el kit Qiagen REPLI-g UltraFast Mini (Cat no: 150023) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN de todas las muestras fue extraído usando el kit de extracción Qiagen DNeasy PowerSoil Pro-Kit (Qiagen, Germantown, USA). La PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real se realizó utilizando un sistema de detección de secuencias QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Instrument (ABI, Applied Biosystems, Madrid, España). Las concentraciones de cebadores y sondas y las condiciones para cuantificación fueron las descritas por Rodríguez-Lázaro et al., [6]. Las librerías de secuenciación fueron preparadas usando el Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24, Oxford Nanopore, Oxford, UK), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las librerías fueron secuenciadas usando el aparato MiniON MK1C con las Flow Cells R.10.4.1 (FLO-MIN114, Oxford, UK) durante 48 horas.

2.1 Bioinformatica

El demultiplexado de las lecturas y eliminación de los adaptadores fue realizado mediante el uso de Porechop v0.2.4 [7]. Las lecturas con una calidad (Q) menor a 9 fueron eliminadas mediante NanoFilt v2.8.0 [8]. Un análisis de calidad de las lecturas se efectuó con NanoPlot v1.42.0 [9]. Las abundancias relativas de cada muestra se calcularon mediante la asignación taxonómica de las lecturas con Kraken2 v2.1.3 [10] y Bracken 2.2.0 [11], usando la base de datos Standard-16 (https://benlangmead.github.io/aws-indexes/k2) y las gráficas se realizaron mediante un script de R. Para la identificación y caracterización de las cepas de *L. monocytogenes* presentes en la muestra metagenómica se utilizó StrainGE v1.3.9 [12], preparando una base de datos a partir de los 256 genomas de *L. monocytogenes* disponibles en el NCBI. La secuencia tipo de los genomas de referencia se determinó mediante la herramienta mlst v2.23.0(https://github.com/tseemann/mlst) usando el esquema de Moura et al. [13].

3. Resultados

3.1 Selección del medio de enriquecimiento

Los enriquecimientos están diseñados para incrementar la concentración del patógeno, así como para reducir la diversidad de microorganismos presentes en la muestra. En este estudio se compararon dos medios de enriquecimiento para la detección de *L. monocytogenes* durante 48 h; hF-F, y LB. La **Figura 1** muestra los CTs de *L. monocytogenes* detectados por qPCR a cada una de las horas analizadas. Los resultados obtenidos muestran niveles de CTs sucesivamente más bajos en las muestras enriquecidas con LB en comparación con las de hF-F, principalmente a las 12 y 24 horas de crecimiento *de L. monocytogenes,* lo que indica una mayor concentración de *L. monocytogenes* en dichas muestras. En base a estos resultados, las muestras enriquecidas en LB fueron las seleccionadas para su secuenciación.

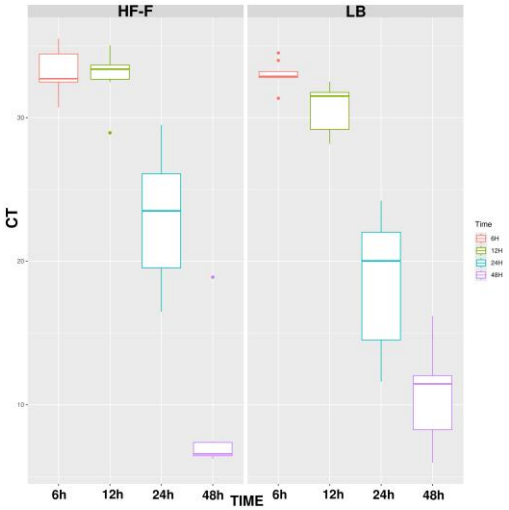


Figura 1: Comparación de los caldos de cultivo y la duración de los enriquecimientos de todas las muestras. Box-plot representan los CT (Cycle Threshold, en inglés) en las muestras enriquecidas con hF-F (izquierda) y LB (derecha).

3.2 Estimación de la abundancia relativa

Inicialmente, las lecturas se asignaron a un taxón mediante Kraken2 para evaluar la abundancia relativa del género *Listeria* spp. en la muestra (**Figura 2**). Las muestras con 6 y 12 horas de incubación, con y sin IMS-MDA, no han llegado a registrar lecturas ligadas al género *Listeria* spp. En la muestra de 24 horas sin IMS-MDA, un 2,6 % (1969 lecturas) de las lecturas totales fueron asignadas a *Listeria* spp., con IMS-MDA se asignaron un 20,6 % (942 lecturas). Respecto a las muestras de 48 horas, se obtuvo un 1.3% (1343 lecturas) y un 44,5% (3550 lecturas) sin y con IMS-MDA respectivamente. Aunque a las 48 horas se obtuvo un mayor número de lecturas usando la combinación IMS-MDA, las lecturas sin IMS-MDA tienen una calidad y longitud media superior **(Figura 3).**

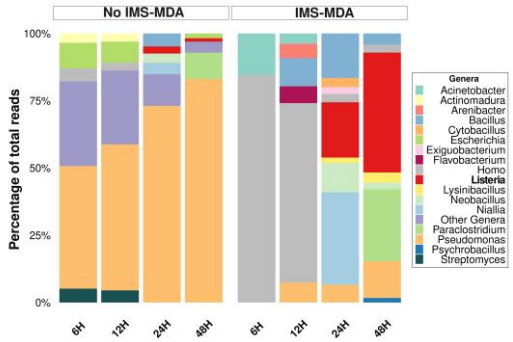


Figura 2: Análisis taxonómico de las muestras de suelo, comparando los resultados obtenidos sin IMS-MDA (izquierda) y con IMS-MDA (derecha).

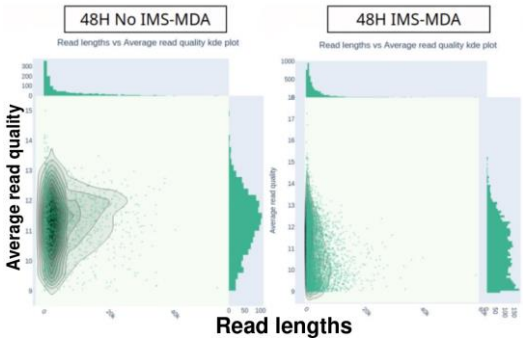


Figura 3: Comparación de la calidad de las lecturas asignadas a *Listeria* spp. de las muestras de suelo a las 48 horas de incubación. En el eje X se describe la longitud de la lectura y en el eje Y valor de calidad (Q phred score).

3.3. Identificación de las cepas de *Listeria monocytogenes*

Mediante StrainGE, se identificaron las cepas de *L. monocytogenes* inoculadas artificialmente en las muestras. Primero, se determinó qué genomas de referencias son los más representados en la muestra. Los genomas identificados se denominan 3BS29 y AUSMDUOOOO7774 en la base de datos del NCBI y NZ_CP075871.1 y NZ_CP045969.1 en RefSeq, respectivamente. La secuencia tipo (ST) de estos genomas se corresponde con la ST6 para 3BS29 y ST155 para AUSMDUOOOO7774, coincidiendo con las cepas inoculadas. La cepa ST6 presenta una abundancia relativa del 1,274 % y 0,160 % en las muestras de 24 y 48 horas sin IMS-MDA, respectivamente. En las muestras con IMS-MDA, su abundancia es del 3,181 % y 7,644 % (**Figura 4A**). La cepa ST155 mostró una abundancia del 0,637 % y 0,732 % en las muestras de 24 y 48 horas sin IMS-MDA, respectivamente. En las muestras con IMS-MDA, su abundancia fue del 0,868 % y 1,520 %.

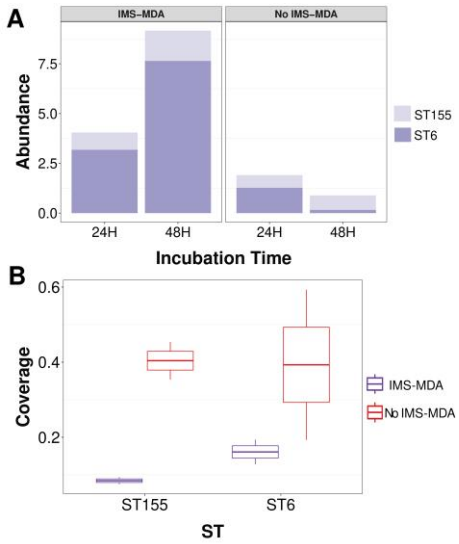


Figura 4. A) Gráfico de barras que muestra el porcentaje de abundancia relativa que tienen las cepas de *L. monocytogenes* en las muestras de suelo. A la derecha las muestras "No IMS-MDA" sin el tratamiento y a la izquierda con el tratamiento "IMS-MDA". B) Boxplot en el que se observa el nivel de cobertura que poseen las cepas (eje X), ST155 a la izquierda y ST6 derecha.

Al caracterizar las cepas con la herramienta StrainGR de StrainGE, se calculó la cobertura y el número de lecturas únicas para cada cepa. En la **Figura 4B**, se puede ver como la cepa ST6 tiene una cobertura de X0.593 y X0.193 en las muestras de 24 y 48 horas sin IMS-MDA, mientras que en las muestras con IMS-MDA se observa una abundancia del X0.194 y X0.128. La cepa ST155 alcanzó un X0.454 y un X0.354 en las muestras de 24 y 48 horas sin IMS-MDA, a diferencia de las muestras con IMS-MDA que obtuvo un X0.075 y un X0.094. En términos del número de lecturas, las muestras tratadas con IMS-MDA presentaron un mayor recuento, a pesar de tener una menor cobertura.

5. Conclusiones

La asignación de lecturas mediante Kraken2 para determinar la abundancia relativa del género *Listeria* spp. en las muestras inoculadas revela una elevada variabilidad entre los diferentes tiempos de incubación y el uso de IMS-MDA. En las muestras incubadas durante 6 y 12 horas, tanto con IMS-MDA como sin este tratamiento, no se detectaron lecturas asignadas a *Listeria* spp. Esto sugiere que el tiempo de incubación es un factor crucial para la detección de *Listeria* spp*. y* que el tratamiento con IMS-MDA no puede reducirlo, ya que periodos más cortos pueden no permitir la proliferación suficiente de la bacteria para ser detectada por la secuenciación.

La técnica de IMS-MDA ha ayudado a aumentar la abundancia de *Listeria* spp. y el número de lecturas, pero la calidad de secuenciación ha disminuido. Esto puede ser debido a que el MDA beneficia la formación de lecturas quiméricas [14], las cuales no pueden ser unidas a los barcodes. Esto ha provocado que, aunque se obtenga mayor número de lecturas, la cobertura y calidad de secuenciación disminuya considerablemente. Es necesario evaluar la combinación del uso de la cuasimetagenómica y técnicas como el NAS, para aumentar la abundacia relativa del patógeno a evaluar del microbioma nativo de la muestra [15].

AGRADECIMIENTOS

Este estudio está financiado por la Agencia Estatal de Investigación, MCIN/AEI/10.13039/501100011033 (PID 2022-1417080B–I00), “ERDF A way of making Europe”, y el programa AGROALNEXT (MCIN y fondos de NextGenerationEU, PRTR-C17.I1).

Referencias

[1] World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations (Eds.), "**Listeria monocytogenes in ready-to-eat (RTE) food: Attribution, characterization and monitoring**" (World Health Organization, 2022).

[2] J. Osek, B. Lachtara, K. Wieczorek, **Food Sci. Nutr.**, 2022, **10**, 2825-2854.

[3] A. Ottesen, P. Ramachandran, Y. Chen, et al., **BMC Infect. Dis.**, 2020, **20**, 83.

[4] M. Díaz, H. Aird, T. Lê Viết, A. Gutierrez, N. Larke-Mejia, O. Omelchenko, L. Moragues-Solanas, J. Fritscher, N. Som, J. McLauchlin, F. Hildebrand, F. Jørgensen, M. Gilmour, Pre-print, 2024, https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3910281/v1.

[5] E. Wagner, A. Fagerlund, S. Langsrud, T. Møretrø, M. R. Jensen, B. Moen, **Appl. Environ. Microbiol.**, 2021, **87**, e0177421.

[6] D. Rodriguez-Lázaro, M. Hernández, M. Scortti, T. Esteve, J. A. Vázquez-Boland, M. Pla, **Appl. Environ. Microbiol.**, 2004, **70**, 1366–1377.

[7] R. R. Wick, L. M. Judd, C. L. Gorrie, K. E. Holt, **Microb. Genomics**, 2017, **3**, 10.

[8] W. De Coster, S. D’Hert, D. T. Schultz, M. Cruts, C. Van Broeckhoven, **Bioinformatics**, 2018, **34**, 15, 2666-2669.

[9] W. De Coster, R. Rademakers, **Bioinformatics**, 2023, **39**, 5.

[10] D. E. Wood, J. Lu, B. Langmead, **Genome Biol.**, 2019, **20**, 1.

[11] J. Lu, F.P. Breitwieser, P. Thielen, S.L. Salzberg, **PeerJ Comp. Sci.**, 2017, **3**, e104.

[12] L. R. van Dijk, B. J. Walker, T. J. Straub, C. J. Worby, A. Grote, H. L. Schreiber, C. Anyansi, A. J. Pickering, S. J. Hultgren, A. L. Manson, T. Abeel, A. M. Earl, **Genome Biol.**, 2022, **23**, 1.

[13] A. Moura, A. Criscuolo, H. Pouseele, M. M. Maury, A. Leclercq, C. Tarr, J. T. Björkman, T. Dallman, A. Reimer, V. Enouf, E. Larsonneur, H. Carleton, H. Bracq-Dieye, L. S. Katz, L. Jones, M. Touchon, M. Tourdjman, M. Walker, S. Stroika, T. Cantinelli, V. Chenal-Francisque, Z. Kucerova, E. P. C. Rocha, C. Nadon, K. Grant, E. M. Nielsen, B. Pot, P. Gerner-Smidt, M. Lecuit, S. Brisse, **Nat. Microbiol.**, 2016, **2**, 16185.

[14] N. Lu, Y. Qiao, Z. Lu, J. Tu, **Comput. Struct. Biotechnol. J.**, 2023, **21**, 1688-1696.

[15] S. Martin, D. Heavens, Y. Lan, **Genome Biol.**, 2022, **23**, 11.

LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DEL MEDIO DE TRATAMIENTO, UN PARÁMETRO CRÍTICO PARA LA SUPERVIVENCIA DE *ANISAKIS* A LOS PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

Abad, V.[1], Escursell, N.[2], Peiró, T.[2], Grasa, J.[3], Calvo, B.[3], Cebrián, G.[1], Álvarez, I.[1]

[1] Universidad de Zaragoza/Facultad de Veterinaria/ Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Tecnología de alimentos/ Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2). C/Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza
[2] Scanfisk Seafood S.L. Carretera de Cogullada n° 65, Calle P, Parcela, 29, 50014, Zaragoza
[3] Universidad de Zaragoza/Escuela de Ingeniería y Arquitectura/Departamento de Ingeniería/ Mecánica. Mec. de Medios Continuos y Teor. de Estructuras/Centre for Biomedical Research Network in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN). C/ María de Luna, 3, 50018, Zaragoza

vabad@unizar.es; ialvalan@unizar.es

Resumen

Los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF) han demostrado ser eficaces para inactivar Anisakis en pescado, y esta inactivación aumenta con la conductividad eléctrica del medio de tratamiento. Mediante simulaciones numéricas, se pudo evidenciar que los Anisakis reciben un mayor campo eléctrico al aumentar la conductividad eléctrica del medio, explicando la mayor inactivación observada. Con los datos experimentales obtenidos se ha desarrollado una ecuación matemática que permite predecir la inactivación de Anisakis en ventrescas de merluza en los rangos de estudio (1-5 kV/cm, 10-40 kJ/kg, 7-30 µs y 0,4 a 10 mS/cm).

Palabras clave

Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje, simulación numérica, Anisakis, conductividad eléctrica

Introducción

Recientemente, se ha demostrado que los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF) son eficaces para inactivar *Anisakis* [2,3,4] y se ha descrito que la conductividad eléctrica del medio de tratamiento es un parámetro que condiciona la eficacia letal de los mismos [4]. Sin embargo, se desconoce la causa responsable de esta mayor eficacia letal. Se plantea la hipótesis de que la distinta conductividad eléctrica de las células del pescado con respecto a la de *Anisakis* [5] podría afectar al campo eléctrico aplicado en cada tipo de célula. Sin embargo, medir este campo eléctrico es complicado. El uso de herramientas de simulación numérica podría ayudar a evidenciar esta circunstancia. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la conductividad eléctrica del medio en la letalidad de *Anisakis* spp en piezas de

pescado y relacionarlas con las simulaciones numéricas del campo eléctrico en los parásitos, pescado y medio de tratamiento.

Metodología

Se aplicaron tratamientos PEF (campo eléctrico: 1-5 kV/cm, anchura de pulso: 7-30 µs, energía específica: 10-40 kJ/kg, y conductividad eléctrica: 0,4-10 mS/cm) a ventrescas de merluza (*Merluccius merluccius*) parasitadas y sumergidas en medios de diferente conductividad eléctrica (0,4-10 mS/cm). Para ello se usó un equipo PEF Pilot Dual (30 kV, 1300 A) de ELEA Technologies (Quakenbrück, Alemania). Tras los tratamientos, se extrajeron los *Anisakis* y tras 3 horas se determinó la supervivencia de *Anisakis* mediante el test de movilidad descrito por la EFSA [1]. Para las simulaciones numéricas, se utilizó el software COMSOL Multiphysics 5.3 simulando una cámara de 3 x 3 cm. El cálculo del campo eléctrico (*E*) se determinó en base a las siguientes ecuaciones:

$$E = \nabla V; \nabla * J = \nabla J * [\sigma(T)\nabla V] = 0$$

donde *V* es el voltaje, y *J* el amperaje. Se utilizaron como conductividades eléctricas: medio de tratamiento 0,4-10 mS/cm, merluza 5 mS/cm y *Anisakis* 0,5 mS/cm.

Con los resultados obtenidos en el laboratorio y las simulaciones, se definió una ecuación matemática por regresión múltiple que permitió predecir el porcentaje de supervivencia de *Anisakis* tras un tratamiento PEF en medios de distinta conductividad eléctrica.

Resultados

La Figura 1 muestra el porcentaje de *Anisakis* supervivientes a un mismo tratamiento PEF (1 o 3 kV/cm, 40 kJ/kg, 7 µs) cuando la conductividad del medio de tratamiento variaba de 0,4 a 10 mS/cm. Como se observa, la inactivación incrementó con la conductividad pasando de un 20% a prácticamente la completa inactivación en los estudios a 3 kV/cm.

La simulación numérica permitió determinar que al aumentar la conductividad del medio de 0,4 a 8 mS/cm, el campo eléctrico en el parásito se incrementaba de unos 1,2 a 5,5 kV/cm (Figura 2) lo que justificaría la mayor inactivación observada en la Figura 1.

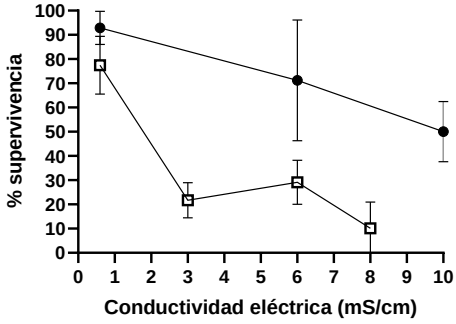


Figura 1: Influencia de la conductividad eléctrica del medio en el porcentaje de *Anisakis* supervivientes tras tratamientos PEF en ventresca de merluza: 1 (●) y 3 (□) kV/cm a 40 kJ/kg y pulsos de 7 µs.

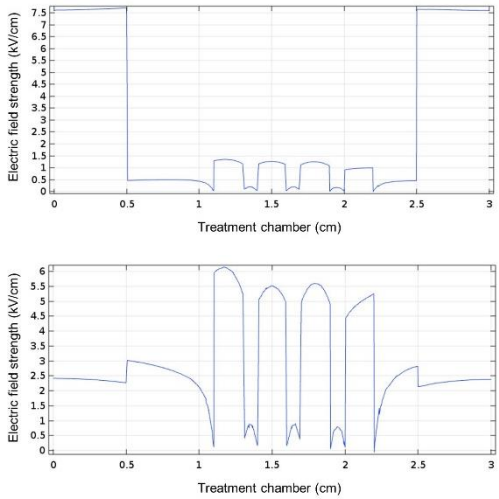


Figura 2. Campo eléctrico simulado al aplicar un tratamiento PEF de 3 kV/cm en medios de 0,4 (arriba) y 8 (abajo) mS/cm.

Con los datos experimentales obtenidos, se desarrolló una ecuación matemática por regresión múltiple que permitió describir el

efecto de la conductividad (σ, 0,4-10 mS/cm) en la supervivencia (*S*) de *Anisakis* en ventresca tras tratamientos PEF:

$$\% S = 139,2 - 14,5E - 0,97W - 0,39P - 0,69\sigma - 1,77\sigma E; (R^2 = 0,936),$$

donde *E* es el campo eléctrico (1-5 kV/cm), *W* la energía específica (10-40 kJ/kg), y *P* la anchura de pulso (7-30 µs). La Figura 3 muestra la relación entre estos parámetros para una energía de 10 kJ/kg y una anchura 7 µs. Esta ecuación se validó con nuevos resultados obtenidos en el laboratorio obteniendo un R^2=0,897 entre los valores reales y los estimados por la ecuación.

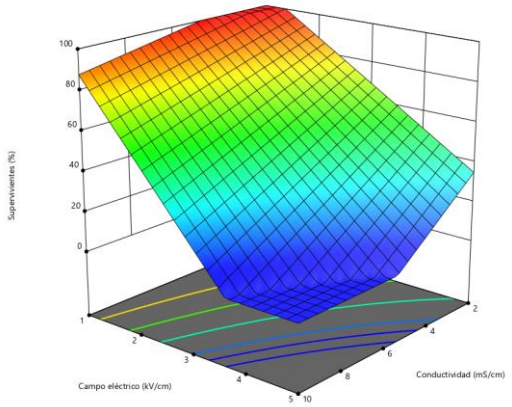


Figura 3. Efecto del campo y la conductividad eléctrica en la supervivencia de *Anisakis* en ventrescas tras tratamientos PEF (10 kJ/kg, 7 µs).

Conclusiones

La letalidad de un mismo tratamiento PEF incrementó con la conductividad eléctrica del medio de tratamiento debido a un mayor campo eléctrico alcanzado en el parásito con respecto al pescado. Se desarrolló una ecuación que permite predecir la inactivación de *Anisakis* en ventresca de merluza por tratamientos PEF de distinta intensidad y conductividades eléctricas.

.

AGRADECIMIENTOS

Al Gobierno de Aragón (ParaFree LMP170_21, A03_23R y contrato de V. Abad). A la Cátedra SAMCA de Desarrollo Tecnológico de Aragón y a la Cátedra AgroBank-UdL.

REFERENCIAS

[1] European Food Safety Authority (EFSA). "Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products". *EFSA J.*, **2010**, 8, 10–42.

[2] V. Abad, M. Alejandre, E. Hernández, J. Raso, G. Cebrián, I. Álvarez-Lanzarote. "Evaluation of Pulsed Electric Fields (PEF) Parameters in the

Inactivation of *Anisakis* Larvae in Saline Solution and Hake Meat" *Foods,* **2023**, 12, 264.

[3] C. Onitsuka, K. Nakamura, D. Wang, M. Matsuda, R. Tanaka, Y. Inoue, R. Kuroda, T. Noda, K. Negoro, T. Negoro, T. Namihira. "Inactivation of anisakis larva using pulsed power technology and quality evaluation of horse mackerel meat treated with pulsed power". *Fish. Sci.*, **2022**, 88, 337–344.

[4] C. Onitsuka, K. Nakamura, D. Wang, M. Matsuda, R. Tanaka, Y. Inoue, T. Namihira. "Dependence of anisakid larva inactivation by pulsed power on various parameters". *J Food Eng.*, **2024**, 360, 111715.

[5] G.S. Choudhury, W.G. Jenks, J.P. Wikswo, C.G. Bublitz. "Effects of Parasite Attributes and Injected Current Parameters on Electromagnetic Detection of Parasites in Fish Muscle". J Food Sci., **2002**, 67, 3381-3387

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE *S. CEREVISIAE* ASISTIDA POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEF): EFECTO DE LA INTENSIDAD DE TRATAMIENTO

Marín-Sánchez J.1, Berzosa A. 1, Álvarez I. 1, Raso J1 y Sánchez-Gimeno C1.

[1]Universidad de Zaragoza/ Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2/Departamento de P.A.C.A./ Tecnología de los Alimentos. Miguel Servet 177
j.marin@unizar.es

Resumen / Abstract

Yeasts may represent an alternative valuable novel protein source. Electroporation of microbial cells by Pulsed Electric Fields (PEF) has emerged as an effective technique for improving protein extraction. Application of PEF for this purpose requires understanding how the treatment may affect events related to protein extraction such as the pore size or the release of proteases from yeast vacuoles. After electroporation of the biomass of a S. cerevisiae brewing strain by PEF treatments of different intensities (15 kV/cm, 43.3 to 207.0 kJ/kg), cells were incubated at 25°C, for monitoring over time the extraction of proteins, and amino acids, and the proteolytic enzyme activity.

After 1 hour of extraction, 15% of total content of proteins were extracted independently of the intensity of the PEF treatment. However, by increasing extraction time until 72 hours, extraction of proteins and amino acids was more efficient in the yeast biomass treated in the range of total specific energies from 43.4 kJ/kg to 121.1 kJ/kg. Extraction yields for the most intense treatments applied (164.1 and 207 kJ/kg) decreased by 27 and 54%, respectively. For the different PEF treatments applied, a positive correlation was observed between protein extraction and proteolytic activity. This suggests that more intense PEF treatments caused protease inactivation, impairing the protein hydrolysis required for releasing the cytoplasmic proteins of higher molecular weight.

The results of this study shows that the increment of the intensity of the PEF treatment did not seem to increase the size of pores of the cytoplasmic membrane of S. cerevisiae and consequently did not increase the protein extraction yield. In fact, surpassing a certain threshold may lead to diminished extraction due to the denaturation of proteases that are pivotal in yeast protein extraction from electroporated yeast cells.

Palabras clave / Key words

Electroporación, Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje, Extracción de proteínas, Saccharomyces cerevisiae, Actividad proteasa / Electroporation, Pulsed Electric Fields, Protein extraction, Saccharomyces cerevisiae, Protease activity.

Para la producción de proteínas de levaduras se puede utilizar como nutrientes residuos de la industria alimentaria o de pueden obtener a partir de la biomasa procedente de procesos fermentativos como la generada durante la elaboración de la cerveza o el vino contribuyendo de esta manera a conseguir los objetivos de la economía circular.

El uso de las proteínas de las levaduras como ingrediente alimentario requiere su extracción. Para ello, generalmente se utilizan procedimientos mecánicos, químicos o enzimáticos que provocan la rotura de la pared celular. Aunque la eficacia de estos procedimientos es alta, con ellos se consigue una extracción de proteínas poco selectiva obteniéndose extractos contaminados con el resto de los componentes celulares.

La tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) representa una prometedora alternativa para la extracción de biomoléculas localizadas en el citoplasma de levaduras. Los tratamientos PEF provocan un fenómeno denominado electroporación, que consiste en el incremento de la permeabilidad celular como consecuencia de la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células[2]. El incremento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática permite extraer componentes intracelulares sin comprometer la estructura celular consiguiéndose extractos más puros. La eficacia de la tecnología PEF en la mejora de la extracción es función del grado de permeabilización de la membrana citoplasmática que depende tanto del número como del tamaño de los poros formados y, a su vez, de las condiciones de tratamiento aplicadas.

El objetivo de este estudio fue investigar la influencia de la intensidad de los tratamientos PEF en la extracción de proteínas de *S. cerevisiae.*

La biomasa de *S. cerevisiae* S-04 se trató en flujo continuo (3 L/h) a una intensidad de campo eléctrico de 15 kV/cm y diferentes tiempos de tratamiento modificando la frecuencia de aplicación de pulsos de una anchura de 3 µs. La energía específica de los tratamientos aplicados varió entre 43.3 a 207.0 kJ/kg, que se correspondían con temperaturas de salida de la biomasa entre 30 y 70 °C. Tras la aplicación del tratamiento, la temperatura de la biomasa se disminuyó en pocos segundos por debajo de 25 °C en un intercambiador de calor colocado tres la cámara de tratamiento. Las células tratadas fueron incubadas a 25 °C para monitorizar la extracción de proteínas y aminoácidos, así como la actividad de enzimas proteolíticas a lo largo del tiempo. La concentración total de estos compuestos en las células de levadura se determinó tras su completa destrucción mecánica mediante un molino de perlas.

La Figura **1A** se muestra que, independientemente de la intensidad del tratamiento, trascurrida una hora, se logró extraer el 15% de las proteínas presentes en el citoplasma de la biomasa de *S. cerevisia*e. A medida que se prolongó el tiempo de incubación, la extracción de proteínas aumentó progresivamente siendo la extracción más eficaz en la biomasa tratada por los tres tratamientos menos intensos. Mientras que se obtuvo alrededor del 50% de las proteínas totales con estos tratamientos transcurridas 72 horas de incubación, la extracción con los tratamientos de una energía específica de 161.4 y 207.0 kJ/kg fue de un 44 y un 26% respectivamente.

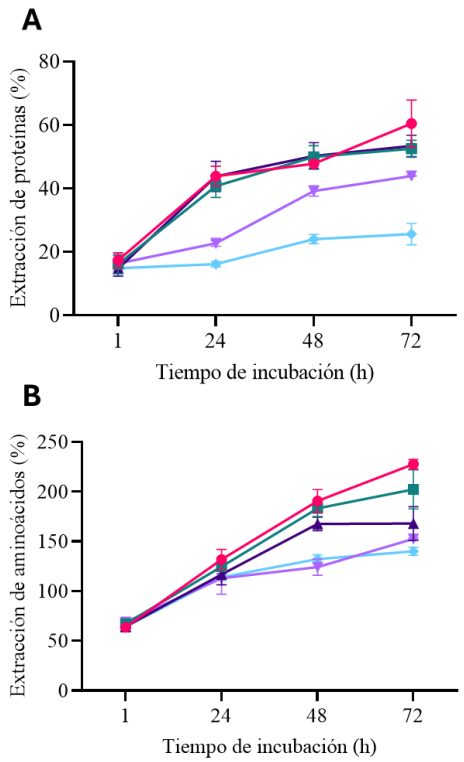


Figura 1: Extracción de proteínas (**A**) y aminoácidos (**B**) de células de *S. cerevisiae* tratadas con PEF a diferentes intensidades de tratamiento (43.3 kJ/kg (●), 84.0 kJ/kg (■), 121.1 kJ/kg (▲), 161.4 kJ/kg (▼) y 207.0 kJ/kg (◆)) a lo largo del tiempo de incubación a 25°C. Los valores de extracción se presentan como porcentajes relativos a la extracción total obtenida mediante molino de perlas.

Por lo que respecta a la extracción de aminoácidos (Figura **1B)**, tras 24 horas de incubación, se extrajeron prácticamente la totalidad de los aminoácidos presentes en la biomasa de la levadura independientemente del tratamiento aplicado. Sin embargo, al prolongar el tiempo de incubación, la extracción de aminoácidos continuó aumentando, alcanzando una concentración entre un 62% y un 128% superior a la inicial en el citoplasma de las células de *S. cerevisiae* tratadas con PEF de menor energía específica total (43.3 a 121.1 kJ/kg). En el resto de los tratamientos, la concentración aumentó entre un 40% y un 50%. El incremento observado en la extracción de aminoácidos por encima de la concentración presente inicialmente en la biomasa de levadura se atribuye a fenómenos proteolíticos desencadenados por el tratamiento PEF. La electroporación de la membrana citoplasmática provoca un desequilibrio osmótico en el citoplasma que produce la plasmólisis de la vacuola y la liberación de proteasas. Estas proteasas hidrolizan las proteínas provocando por un lado la liberación de aminoácidos que salen al exterior de la célula. Por otro lado, estas proteasas fragmentan a las proteínas facilitando su salida a través de los poros provocados por el tratamiento PEF.

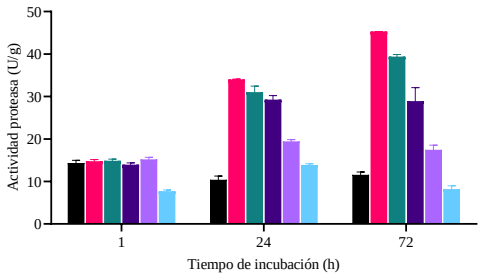


Figura 2: Actividad proteasa de las células de *S. cerevisiae* tratadas con PEF a diferentes intensidades de tratamiento (Control (●), 43.3 kJ/kg (●), 84.0 kJ/kg (●), 121.1 kJ/kg (●), 161.4 kJ/kg (●) y 207.0 kJ/kg (●)).

La **Figura 2** muestra la actividad proteasa en la biomasa de *S. cerevisiae* sin tratar y tras los distintos tratamientos PEF a lo largo del tiempo de incubación. Tras 1 hora de incubación la actividad enzimática detectada en la biomasa de levadura tratada por PEF fue similar a la de la biomasa control, salvo en el caso de la biomasa que recibió el tratamiento más intenso (207.0 kJ/kg). Tras 24 horas de incubación, la actividad proteasa aumentó significativamente en la biomasa sometida a los tratamientos de menor intensidad (43.3 a 121.1 kJ/kg), y se mantuvo constante en la biomasa control y en la tratada a mayores intensidades. El incremento de la actividad proteasa observado en la biomasa

que recibió los tratamientos menos intensos puede estar relacionado con el hecho bien conocido que algunas proteasas endógenas requieren un proceso de activación y que dicho proceso se aceleró como consecuencia de la plasmólisis de las vacuolas[3].

Por otro lado, los tratamientos PEF más intensos con los que se alcanzaban temperaturas de salida de la biomasa de 60 y 70 °C provocarían la desnaturalización de una proporción de las proteasas endógenas disminuyendo la actividad proteasa en la biomasa. Esta menor actividad proteasa explicaría porque la extracción de proteínas y aminoácidos fue menos eficiente en la biomasa tratada con los tratamientos más intensos (161.4 y 207.0 kJ/kg).

Los resultados de este estudio indican que el aumento en la intensidad del tratamiento PEF no pareció aumentar el tamaño ni el número de los poros de la membrana citoplasmática *de S. cerevisiae*, y por lo tanto no incrementó el rendimiento de extracción de proteínas. De hecho, la aplicación de tratamientos de mayor intensidad resulta contraproducente debido a la desnaturalización de proteasas, que juegan un papel clave en la extracción de proteínas de las células de levadura tratadas por PEF.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido posible gracias a la concesión del proyecto PEFREV (PID2020-113620RB-I00) de la Agencia Española de Investigación y a la beca FPI concedida J. M-S. por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

REFERENCIAS

1. Oliveira AS, Ferreira C, Pereira JO, Pintado ME, Carvalho AP. Valorisation of protein-rich extracts from spent brewer's yeast (Saccharomyces cerevisiae): an overview. Biomass Convers Biorefin **2022**. https://doi.org/10.1007/s13399-022-02636-5.

2. Kotnik T, Kramar P, Pucihar G, Miklavčič D, Tarek M. Cell membrane electroporation - Part 1: The phenomenon. IEEE Electrical Insulation Magazine **2012**;28:14–23. https://doi.org/10.1109/MEI.2012.6268438.

3. Hecht KA, O'Donnell AF, Brodsky JL. The proteolytic landscape of the yeast vacuole. Cell Logist **2014**;4:e28023. https://doi.org/10.4161/CL.28023

PLASMA FRÍO EN COMBINACIÓN CON UNA NANOEMULSIÓN DE D-LIMONENO COMO HERRAMIENTAS PARA EL CONTROL DE *BACILLUS CEREUS*

Fernández-Felipe, M.T.[1], Valdez-Narváez M.I.[1], Martínez A.[1], Palop A.[2], Rodrigo, D.[1]

[1]Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Paterna, Valencia, Spain.
[2] Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, Spain

*Autor correspondiente: lolesra@iata.csic.es

Resumen

Bacillus cereus es un patógeno alimentario cuyas esporas son capaces de sobrevivir a tratamientos térmicos de cocción convencionales. Se ha encontrado en granos de soja y productos derivados, por lo que surge la necesidad de investigar alternativas para su higienización. El objetivo de este estudio es determinar el efecto del plasma frío como tecnología de desinfección en harina de soja, en combinación con una nanoemulsión de D-limoneno para inhibir/reducir el crecimiento de B. cereus durante el almacenamiento refrigerado en una simulación de bebida de soja formulada con dicha harina y utilizando un caldo de cultivo sintético como matriz control. En primer lugar, la harina inoculada con esporas de B. cereus se somete a un tratamiento con plasma frío de aire sintético (20% O_2 y 80% N_2), a una presión de 0.80 mbar y con una potencia de 300W durante 30 minutos. En el caso de la matriz control, este tratamiento se realiza sobre la superficie de portaobjetos previamente inoculado con esporas. Tras el tratamiento por plasma, se reconstituye la bebida a partir de la harina de soja y se adiciona el caldo nutritivo en el caso de la matriz control. Posteriormente, se germinan las esporas (80ºC, 10 min), se adiciona una nanoemulsión de D-limoneno 50 mM, y se lleva a cabo un estudio de viabilidad de B. cereus durante el almacenamiento refrigerado (10ºC) a lo largo de 10 días. Los resultados muestran que el tratamiento con plasma reduce la concentración de esporas alrededor de un ciclo logarítmico en la harina de soja, mientras que en superficie se reduce por debajo del LOD. En cuanto al almacenamiento refrigerado, el D-limoneno tiene un efecto bacteriostático sobre B. cereus en caldo nutritivo, mientras que en la matriz de soja no se observa ningún efecto sobre el microorganismo.

Palabras clave:

plasma frío, capacidad antimicrobiana, nanoemulsion de D-limoneno, B. cereus, seguridad alimentaria.

1. INTRODUCCIÓN

B. cereus es un patógeno alimentario común, que se ha aislado en diversas matrices de soja (Anjos et al., 2020). Debido a que sus esporas son capaces de sobrevivir a los tratamientos térmicos convencionales, es crucial investigar alternativas para su eliminación (Valdez-Narváez, 2023). El plasma frío (CP) y las nanoemulsiones de D-limoneno (DLN) han surgido como alternativas prometedoras (Garre et al., 2020; Niemira, 2012). El CP es un gas

ionizado que puede generarse aplicando una corriente eléctrica a un gas de alimentación como el aire y contiene especies reactivas y radiación UV, lo que le otorga propiedades antibacterianas (Yau et al., 2018). Por otra parte, el D-limoneno es un compuesto natural que se encuentra en los aceites esenciales cítricos y ha sido ampliamente estudiado por sus actividad antibacteriana. Las investigaciones han demostrado que el D-limoneno nanoemulsionado presenta una mayor capacidad antibacteriana que el aceite esencial de D-limoneno (Hou et al., 2022). El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del CP como tecnología de desinfección en la materia prima (harina de soja) y también del efecto combinado con DLN, como antimicrobiano, para controlar el crecimiento de *B. cereus* durante el almacenamiento refrigerado de simulación de bebidas de soja formuladas con dicha harina. Adicionalmente, para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en función de la matriz también se incluyó en el estudio una muestra control (caldo nutritivo).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepa de *B. cereus* y esporulación

Se utilizó un cultivo liofilizado de *B. cereus* (cepa CECT 148) de la Colección Española de Cultivos Tipo. El liofilizado se rehidrató con Nutrient Broth (Scharlab, Barcelona, España) y se incubó a 32°C en agitación continua para obtener células vegetativas. Para la esporulación, se prepararon 20 frascos con Agar Nutritivo Fortificado (Scharlab, Barcelona, España), inoculados con 0.5mL de células vegetativas y se incubaron a 32°C durante 24h. La tasa de esporulación se monitoreó por microscopía de contraste de fase hasta alcanzar el 90% en 7 días. Las esporas se recogieron, se lavaron con agua bi-destilada y se centrifugaron a 2500g, 4°C durante 15 minutos en una centrífuga Beckman (rotor JLA-16.250), repitiendo el proceso 4 veces. Finalmente, se almacenaron en agua destilada estéril a 4°C hasta su uso.

2.2. Procesado de muestras

2.2.1. Preparación e inoculación de muestras

El grano de soja amarilla (*Glycine max*) se adquirió en un comercio local y la harina se obtuvo triturando con un molino (IKA A11 basic, IKA-Werke GmbH, Staufen, Alemania). Se pesaron 4g de la harina en botellas de borosilicato de 100 mL por triplicado para cada uno de los siguientes casos: tratamiento con CP, tratamiento con DLN, tratamiento conjunto con CP y DLN y control (sin tratar). Las muestras se inocularon con 100 µL de la preparación de esporas de *B. cereus*, a una concentración inicial de 10^9 UFC/mL. Por otra parte, se inoculó la misma cantidad de esporas sobre portaobjetos de borosilicato (24 x 50 mm), con el objetivo de determinar el efecto de los tratamientos sin matriz alimentaria (matriz control).

2.2.2. Tratamientos con CP

Los tratamientos por plasma se llevaron a cabo utilizando un equipo de descarga de barrera dieléctrica (Pico-AR-200-PCCE7, Diener GmbH, Ebhausen, Alemania). Las muestras de harina y portaobjetos se colocaron en una bandeja de borosilicato en el centro de la cámara del equipo. El aire sintético (20% de O_2 y 80% de N_2) sirvió como gas de proceso, operando a una presión de 0.80 mbar, con una potencia de 300W y 30 minutos de exposición al tratamiento.

2.2.3. Reconstitución de matrices y germinación de esporas

Las muestras de harina se reconstituyeron con 40 mL de agua destilada estéril. Para el caso de la muestra control, las esporas inoculadas en portaobjetos se resuspendieron y se llevaron a un volumen final de 40 mL con nutrient broth (Scharlab, Barcelona, España), como medio modelo. La germinación se llevó a cabo mediante tratamiento térmico. Para ello, las muestras reconstituidas se introdujeron en un baño de agua a 80°C y se trataron de manera isoterma durante 10 min.

2.2.4. Preparación de DLN y adición en matrices reconstituidas

La fase aceitosa de la nanoemulsión se preparó mezclando 6 mL de Tween 80 (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y 8 mL de D-limoneno (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania); la fase acuosa se preparó mezclando 13.75 mL de propilenglicol (Guinama, Valencia, España) y 22.25 mL de agua destilada. Ambas fases se combinaron y homogeneizaron utilizando un procesador ultrasónico (Hielscher UP400St Teltow Berlín, Alemania) equipado con una punta de sonotrodo S24d40. Las emulsiones se sometieron a sonicación continua durante 30 min trabajando a una amplitud constante del 100% con una potencia máxima de 400W, hasta alcanzar el límite de energía impuesto de 12000Wxs. El periodo de trabajo se fijó en 3s con una pausa de 1s entre los tiempos de trabajo para producir las fuerzas disruptivas que disminuyeron el tamaño de las gotas. La temperatura de la nanoemulsión se mantuvo constante a unos 20ºC colocando el tubo de nanoemulsión en un baño de hielo. La distribución del tamaño de las gotas se determinó mediante el método de dispersión de luz láser con Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). La distribución media del tamaño de gota de la nanoemulsión de D-limoneno fue de 0.340 µM.

La concentración final de D-limoneno en las nanoemulsiones fue de 1M. Las nanoemulsiones se alicuotaron en tubos de ensayo previamente esterilizados y se almacenaron en refrigeración hasta su uso. La nanoemulsión se añadió a las bebidas de soja y a la matriz control a una concentración final de D-limoneno de 50 mM.

2.2.5. Estudios de almacenamiento

Las muestras se almacenaron a 10°C con agitación continua a 400 rpm durante 240h para simular condiciones de refrigeración abusiva. Se tomaron muestras en intervalos específicos de tiempo (0, 24, 72, 144, 192, 216 y 240h) y se realizaron diluciones decimales por duplicado en agua de peptona al 0.1% (p/v) (Scharlab, Barcelona, España). Además, se sembraron duplicados de estas diluciones en placas de Agar Nutritivo (Scharlab, Barcelona, España) complementado con almidón (1 g/L) (Scharlab, Barcelona, España) y se incubaron a 30°C durante 18-24 horas antes de contar manualmente las unidades formadoras de colonias (UFC).

2.3. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados experimentales se expresaron como el logaritmo de la concentración bacteriana (UFC/mL). Para determinar diferencias significativas entre muestras se empleó el software IBM Statistical Packaging for Social Sciences, versión 29.0 (IBM SPSS Statistics, NY, USA. Se llevó a cabo la prueba t-student en el caso de variables con dos niveles, utilizando un intervalo de confianza del 95% y para variables con más de dos niveles se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía (p-valor < 0.05) y la prueba de contrastes

post-hoc Tukey para determinar entre qué muestras había diferencias.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evalúa la viabilidad de *B. cereus* en caldo nutritivo como medio modelo para determinar el efecto de los tratamientos en ausencia de matriz alimentaria. Los resultados de logN obtenidos durante el almacenamiento para cada tratamiento se muestran en la figura 1.

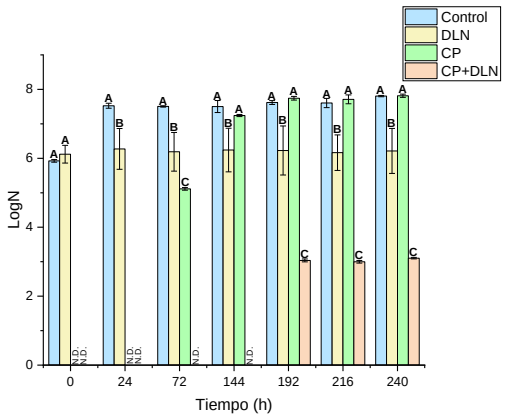


Figura 1: Resultados LogN de *B. cereus* durante el almacenamiento en medio modelo a 10°C. Los resultados se expresan como media ± error estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre control, DLN, CP y CP+DLN (p-valor < 0.05).

En el caso de los tratamientos con plasma, no se detectaron supervivientes de 0 a 24h de incubación en medio modelo, logrando una gran inactivación de las esporas inoculadas en la superficie de portaobjetos, por debajo del límite de detección (LOD). La alta efectividad del CP en la inactivación de microorganismos patógenos en superficies está demostrada en estudios previos (Misra et al., 2011). Sin embargo, esta gran reducción inicial de esporas no implica una inactivación total, ya que los pocos supervivientes pudieron crecer y cuantificarse a partir de las 72h de almacenamiento, sin diferencias significativas en los resultados de logN con respecto al control de 144 a 240h. Por otro lado, los tratamientos con DLN mostraron un efecto bacteriostático sobre el microorganismo, manteniendo valores de logN de alrededor de 6 ciclos logarítmicos durante todo el período de almacenamiento y presentando diferencias significativas con respecto al control de 24 a 240h y respecto a los tratamientos con plasma de 72 a 240h. Se ha documentado que el D-limoneno puede inhibir el crecimiento bacteriano (Han et al., 2021), aunque se requieren más estudios para comprender plenamente el mecanismo de acción de este compuesto sobre la inhibición del crecimiento de *B. cereus*. En las muestras tratadas tanto con CP como con DLN, se observó un efecto sinérgico. Por una parte, el plasma logró una gran reducción en la carga inicial de esporas y por otra parte, el D-limoneno mostró un efecto bacteriostático durante el almacenamiento y, aunque se observó un ligero crecimiento de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos a las 192h, se obtuvieron diferencias significativas en los resultados de logN con respecto al control y a todos los tratamientos.

También se evalúa el efecto del CP y de DLN en la viabilidad de *B. cereus* durante el almacenamiento en simulación de bebidas formuladas con harina de soja y los resultados obtenidos se muestran en la figura 2. Los tratamientos con plasma en harina de soja logran reducir la carga de esporas en aproximadamente 1 ciclo logarítmico, mostrando diferencias significativas en los resultados de logN en comparación con el control a tiempo 0h en la bebida reconstituida. Sin embargo, el microorganismo vuelve a crecer con el tiempo, alcanzando niveles similares al control y sin mostrar diferencias significativas entre las 24 y 240h. Por otro lado, no se observa ningún efecto bacteriostático en las bebidas con DLN. De hecho, el microorganismo crece durante el almacenamiento, sin diferencias

significativas con respecto al control. Por último, en las muestras tratadas con plasma y DLN, solamente se determina el efecto del plasma en la reducción inicial de esporas.

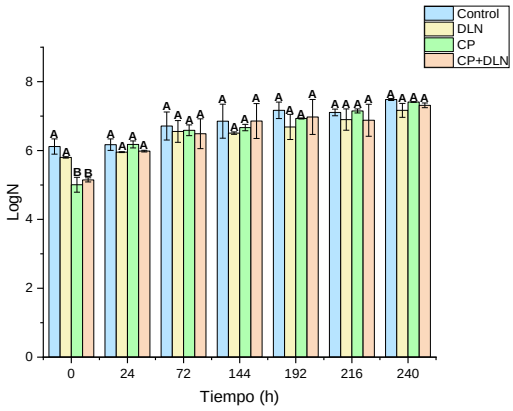


Figura 2: Resultados LogN de *B. cereus* durante el almacenamiento en bebida de soja a 10°C. Los resultados se expresan como media ± error estándar. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre control, DLN, CP y CP+DLN para un mismo tiempo de almacenamiento (p-valor < 0.05).

En resumen, la harina de soja interfiere en los tratamientos por CP y DLN. Baerdemaeker et al. (2023) reportaron que las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) del plasma interactúan con los componentes de los alimentos, reduciendo la eficacia de los tratamientos en la inactivación de microorganismos. Por lo tanto, está claro que la harina de soja ejerce un efecto barrera y, como resultado, se obtiene una menor reducción de la carga de esporas en comparación con los tratamientos de plasma en superficie. En cuanto a la efectividad del DLN, está descrito que se puede ver afectada por interacción con componentes presentes en la matriz alimentaria como son la grasa y la fibra (Maté et al., 2017), por lo que esta puede ser la razón por la que no se observa un efecto bacteriostático en las condiciones estudiadas.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que los tratamientos con CP utilizando aire sintético logran reducir la carga inicial de esporas en harina de soja y en la superficie de portaobjetos. No obstante, el efecto es más pronunciado en la superficie que en la matriz alimentaria. Por otra parte, DLN demuestra capacidad para inhibir el crecimiento del microorganismo a lo largo del almacenamiento en una matriz simple como el medio modelo. Sin embargo, no se observa ningún efecto de DLN sobre el microorganismo en bebidas formuladas con harina de soja, lo cual podría deberse a interacciones específicas entre el D-limoneno y esta matriz.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033, "ERDF A way of making Europe" y por la "Unión Europea" [subvenciones PID-2020-11631RB-C31 y PRE-2021-098627].

REFERENCIAS

[1] Anjos, T. R. D., Cavicchioli, V. Q., Lima, J. A. S., Vasconcellos, A. N., Vaz, A. C. N., Rossi, G. A. M., Campos-Galvao, M.E.M.; Todorov, S.D.; Mathias, L.A.; Shocken-Iturrino, R.P.; Nero, L.A. & Vidal, A. M. C. (2020). Unsatisfactory microbiological aspects of UHT goat milk, soymilk and dairy beverage of goat milk and soy protein: A public health issue. *Food Sci. and Technol.*, *40*, 349-354. https://doi.org/10.1590/fst.14019

[2] De Baerdemaeker, K., Van Reepingen, A., Nikiforov, A., De Meulenaer, B., De Geyter, N., & Devlieghere, F. (2023). Non-thermal plasma decontamination using a multi-hollow surface dielectric barrier discharge: impact of food matrix composition on bactericidal efficacy. *Foods*, *12*(2), 386. *https://doi.org/10.3390/foods12020386*

[3] Garre, A., Espín, J. F., Huertas, J. P., Periago, P. M., & Palop, A. (2020). Limonene nanoemulsified with soya lecithin reduces the intensity of non-isothermal treatments for inactivation of Listeria

monocytogenes. *Sci. Rep.*, *10*(1), 3656. https://doi.org/10.1038/s41598-020-60571-9

[4] Han, Y., Chen, W., & Sun, Z. (2021). Antimicrobial activity and mechanism of limonene against Staphylococcus aureus. *J. Food Saf.*, *41*(5), e12918. https://doi.org/10.3390/molecules25010033

[5] Hou, C., Hazeena, S. H., Hsieh, S., Liu, B., Chen, M., Wang, P., … & Liang, Y. (2022). Effect of d-limonene nanoemulsion edible film on banana (musa sapientum linn.) post-harvest preservation. *Molecules,* *27*(19), 6157. https://doi.org/10.3390/molecules27196157

[6] Maté, J., Periago, P. M., Ros-Chumillas, M., Grullón, C., Huertas, J. P., & Palop, A. (2017). Fat and fibre interfere with the dramatic effect that nanoemulsified D-limonene has on the heat resistance of Listeria monocytogenes. *Food microbiol.*, *62*, 270-274. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.03

[7] Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., & Cullen, P. J. (2011). Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Eng. Rev.*, *3*, 159-170. https://doi.org/10.1007/s12393-011-9041-9

[8] Niemira, B. A. (2012). Cold plasma decontamination of foods. *Annu. Rev. of Food Sci. and Technol.*, *3*(1), 125-142. https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101132

[9] Valdez-Narváez, M. I., Grau-Fuentes, E., Morató, N., Garzón-Lloría, R., & Rodrigo, D. (2023). Joint effect of heat, pH and grape extract on *Bacillus cereus* spores survival in a rice solution. *Food Sci. and Technol. Int.*, 10820132231216770. https://doi.org/10.1177/1082013223121677

[10] Yau, K. P. S., Murphy, A. B., Zhong, L., & Mai-Prochnow, A. (2018). Cold plasma effect on the proteome of pseudomonas aeruginosa – role for bacterioferritin. *Plos One, 13*(10), e0206530. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206530

ACTIVACIÓN POR PLASMA FRÍO DE AGUA DE MAR PARA EL CONTROL DE NOROVIRUS HUMANOS Y PATÓGENOS BACTERIANOS DURANTE LA PURIFICACIÓN DE MOLUSCOS BIVALVOS

Annamaria Pandiscia[1,2], Patrizio Lorusso[2], Alessio Manfredi[2], Gloria Sanchez[1], Valentina Terio[2], Walter Randazzo[1]

[1]Departamento de Tecnologías de Conservación y Seguridad Alimentaria, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los alimentos, IATA-CSIC, Avda. Catedrático Agustín Escardino 7, Valencia, Paterna 46980, España.
[2]Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad de Bari, Camino Provincial a Casamassima, Valenzano, 70010, Italia.

annamaria.pandiscia@uniba.it; wrandazzo@iata.csic.es.

Resumen

El plasma frío representa una tecnología prometedora para el control de patógenos en una plétora de aplicaciones en agricultura y alimentación. Los moluscos bivalvos pueden representar un problema de salud pública ya que en ocasiones su consumo se ha asociado a brotes virales y bacterianos. Por lo tanto, la regulación europea exige una etapa de depuración para los moluscos bivalvos dependiendo de la calidad de las aguas de la zona producción. Este estudio ha investigado la activación por plasma frío de agua de mar (PASWs), su composición reactiva de especies de oxígeno y nitrógeno (RONS), y la capacidad de inactivar patógenos víricos y bacterianos de transmisión alimentaria asociados a moluscos bivalvos. La inactivación de los bacteriófagos F-específicos (MS2) y somáticos (ϕ174), así como la de los modelos de norovirus humano (norovirus murino, MNV y virus de Tulane, TV) y norovirus humano (HuNoV GII.4) se determinaron utilizando recuentos de placas y ensayos de infectividad en cultivo celular, incluyendo el nuevo modelo de enteroides intestinales humanos (HIE) para HuNoV. Además, se caracterizó la cinética de inactivación de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Vibrio parahaemolyticus*. Los resultados mostraron la completa inactivación de fagos (6-8 log), los modelos (5-6 log), HuNoV (6 log) y patógenos bacterianos (6-7 log) durante las primeras 24 h, preservando la viabilidad de los mejillones. El análisis de los RONS permitió relacionar los nitritos (NO_2^-) con la inactivación microbiana. El estudio ha demostrado que el uso de PASW representa una tecnología adecuada para depurar eficazmente los moluscos bivalvos y así controlar el riesgo microbiológico asociado a su contaminación viral o bacteriana.

Palabras clave

moluscos bivalvos; inactivación; seguridad alimentaria; tecnología de procesado de alimentos; calidad del agua; contaminación

INTRODUCCIÓN

El plasma atmosférico no térmico, una tecnología con demostrados efectos antibacterianos, al aplicarse al agua produce agua activada por plasma (PAW). El ambiente altamente oxidante con pH reducido y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RONS), como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), nitrato (NO_3^-) e iones de nitrito (NO_2^-), es el principal factor responsable de la inactivación microbiana asociada a la PAW [1]. Los tratamientos a baja temperatura, el uso de aire como gas de trabajo, los tiempos de tratamiento cortos y la notable eficacia antimicrobiana, representan las características más prometedoras de la aplicación de la tecnología PAW en la industria alimentaria. Debido a su elevada capacidad filtradora, los mejillones pueden bioacumular patógenos de transmisión alimentaria, lo que representa un grave riesgo para la salud pública, si estos se consumen crudos o poco cocinados [2]. El norovirus humano (HuNoV) y *Vibrio* spp. son los agentes etiológicos más frecuentemente implicados en los brotes de transmisión alimentaria [3]. Teniendo en cuenta este riesgo, la Unión Europea (UE) clasificó las zonas de recolección de mejillones en tres niveles sanitarios (A, B y C) (UE/2019/627), siendo necesario un proceso de depuración para los moluscos de las zonas B y C. Para asegurar el cumplimiento de los criterios microbiológicos se determinan únicamente los niveles de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. [4,5]. Sin embargo, la continua ocurrencia de brotes evidencia la insuficiencia de los actuales procesos de depuración de moluscos [3]. Tomando en cuenta todos estos datos, planteamos la hipótesis de que el plasma frío de agua de mar (PASW) puede representar una opción sostenible y eficaz para la depuración de moluscos bivalvos y el control del riesgo microbiológico relacionado con la contaminación de estos. Para ello, determinamos la inactivación cinética *in vitro* de *E. coli* O157, *Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, bacteriófagos (MS2 y ϕ174), modelos de norovirus humano (norovirus murino, MNV, y virus Tulane, TV) y HuNoV GII.4 expuestos a tres PASWs diferentes utilizando técnicas de cultivo celular tradicionales y avanzadas para definir y caracterizar la inactivación bacteriana y viral. También se determinaron las especies de RONS. En última instancia, se evaluó el PASW más eficaz por su impacto en la citotoxicidad y la viabilidad del mejillón, simulando su aplicación industrial.

MATERIALES Y METODOS

Se recogieron muestras de agua de mar depurada (SW). Para los tratamientos se utilizó un plasma experimental de descarga de barrera dieléctrica (DBD) en configuración remota (Renasco S.R.L., Bari, Italia). Se empleó aire atmosférico como gas de alimentación, promoviendo el contacto directo entre la pluma de plasma y el SW. El generador de plasma se empleó con un voltaje de entrada de 230 V, una salida total de 800 V y una frecuencia de 30 kHz. Cada lote fue expuesto a tratamiento con plasma durante 10 (PASW10), 20 (PASW20) o 30 (PASW30) min, obteniendo tres PASWs diferentes. Se utilizaron SW y PBS como controles. La caracterización fisicoquímica de las PASWs se llevó a cabo antes e inmediatamente después de cada tratamiento con plasma. Se determinaron la inactivación cinética in vitro de *E. coli O157*, *Salmonella* spp. y *V. parahaemolyticus* mediante un ensayo de recuento en placa. Se utilizó un ensayo en placa de doble capa para cuantificar la inactivación de fagos utilizando las cepas de *E. coli* CECT 9198 y *E. coli* WG5 como cepas huésped para el bacteriófago MS2 DSM 13767 y ϕ174 (Bluephage), respectivamente. El MNV y TV se propagaron y ensayaron

respectivamente en células RAW 264.7 y LLC-MK2 para determinar la concentración mediante el ensayo de dosis infecciosa de cultivo celular 50% ($TCID_{50}$). También, se determinó la inactivación de HuNoV GII.4 utilizando el modelo de enteroides intestinales humanos (HIE). Para ello, se determinó la concentración de RNA de HuNoV a 1 hora post infección (hpi) y 48 hpi por RT-qPCR para evaluar la replicación viral[6].

Por último, se utilizaron mejillones mediterráneos (*Mytilus galloprovincialis*) de zona A para evaluar el efecto de PASW30 en los mejillones vivos, monitoreando durante 24 h la vitalidad, comprobando la apertura de sus válvulas y su capacidad de respuesta a estímulos externos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indican que MNV es más resistente que TV a los tratamientos de PASWs (Figura 1).

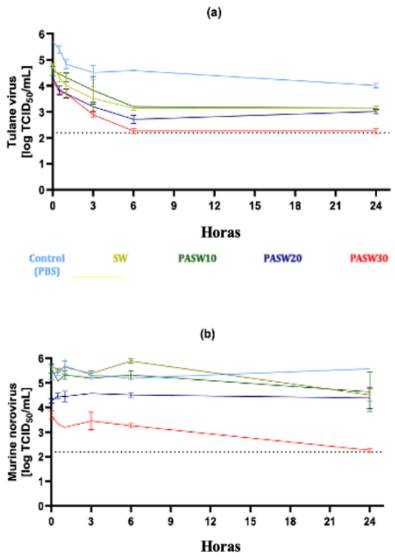


Figura 1. Cinética de inactivación del virus Tulane, TV (a) y el norovirus murino, MNV (b) en agua de mar activada por plasma.

Al comparar los virus modelos (MNV y TV) con HuNoV GII.4, la respuesta viral a las diversas PASWs fue cualitativamente comparable, siendo PASW30 capaz de prevenir completamente la replicación de todos los modelos víricos estudiados (Figura 1 y 2).

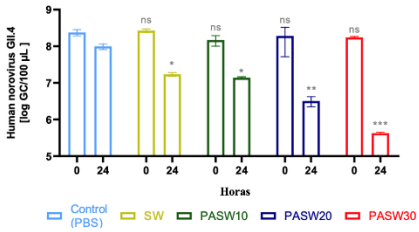


Figura 2. Replicación de HuNoV GII.4 después del tratamiento a PASW10, PASW20 y PASW30 durante 24 h.

Las barras de error indican SD; Los asteriscos indican una diferencia significativa entre las muestras y el control no tratado

(PBS) en puntos de exposición de tiempo análogos: ns, no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $p < 0,001$. Los datos se muestran como los valores promedios ± desviación estándar de tres experimentos independientes (n = 9)

Además, se observó una inactivación completa de los fagos MS2 y ϕ174 (6-8 log UFP/mL) tras el tratamiento de PASW30 tras 24 h, pero no para PASW10 o PASW20 (Figura 3).

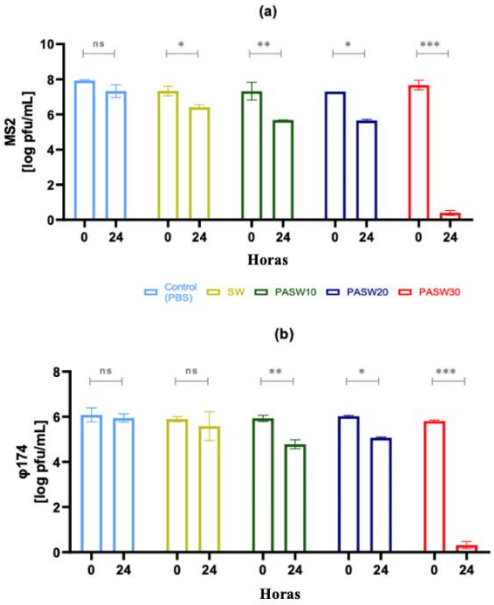


Figura 3. Inactivación de fagos, MS2 (a) y Φ174 (b) en agua de mar activada por plasma.

Las barras de error indican SD; Los asteriscos indican diferencias significativas entre los puntos temporales de cada muestra (n = 9): ns, no significativas; * p < 0,05; ** p < 0,01; p < 0,001.

Además, se demostró que PASW30 es eficaz en la inactivación de patógenos bacterianos como *E. coli* O157, *Salmonella* spp. y *V. parahaemolyticus.* Se logró una reducción significativa (>5 log) en los primeros 30 minutos de exposición, alcanzando la inactivación completa en 24 h para todas las bacterias analizadas (Figura 4). Estos datos en conjunto demuestran que la inactivación microbiana está asociada con la intensidad del tratamiento con plasma (PASW10 < PASW20 < PASW30), así como el tiempo de tratamiento. La caracterización fisicoquímica de las PASWs, indica que los NO_2^- pueden ser el principal agente responsable de la inactivación viral (Tabla 1).

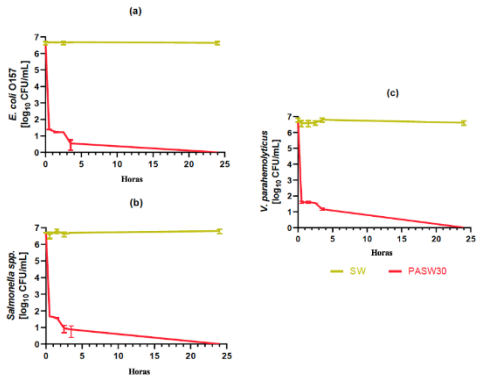


Figura 4: Inactivación de bacterias patógenas en agua de mar activada por plasma. (a) *E. coli O157*; (b) *Salmonella* spp.; (c) *V. parahaemolyticus*.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de las PASWs.

PASW	NO_2^- (mg/L)	NO_3^- (mg/L)	H_2O_2 (mg/L)	pH
SW	0	0	0	8,13 ± 0,31 [b]
PASW10	5 ± 0,5 [b]	25 ± 1 [a]	1 ± 0,2 [b]	7,95 ± 0,11 [b]
PASW20	0.5 ± 0,5 [a]	298 ± 3 [b]	5 ± 0,3 [c]	7,73 ± 0,17 [b]
PASW30	100 ± 0,5 [c]	310 ± 10 [b]	0.5 ± 0,1 [a]	5,00 ± 0,22 [a]

Diferentes letras indican diferencias significativas entre las PAWs (p < 0,05). Los datos se muestran como los promedio y desviación estándar de tres determinaciones físico-químicas independientes.

Finalmente, el estudio de viabilidad de los mejillones en PASW30 registró una tasa de supervivencia de los moluscos superior ak 82,5% tras 24h. Solo unos pocos estudios han investigado la activación por plasma frío en agua de mar y su aplicación en la inactivación microbiana [7]. Campell et al. investigaron la depuración efectiva de *E. coli y* coliformes totales en ostras bioacumuladas y depuradas en PASW obteniendo que durante 24 h la depuración redujo los coliformes totales y *E. coli* sin ningún efecto negativo sobre la viabilidad o calidad de los moluscos [8]. Estos resultados están en línea con los obtenidos en este estudio. Antes de poder evaluar la tecnología en estudios de escala piloto, futuras investigaciones deberían validar el efecto antiviral y antibacteriano de las PASWs en mejillones bioacumulados durante un proceso simulado de depuración.

En conclusión, este trabajo demuestra que el PASW representa una opción prometedora para depurar moluscos bivalvos y controlar los riesgos biológicos relacionados con la contaminación microbiológica, ya sea viral o bacteriana, debido a su alta eficiencia, corto período de tratamiento, sostenibilidad y rentabilidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a RENASCO S.R.L. por proporcionar el agua activada por plasma. También se agradece Mare Gioioso SRL (Bari, Italia) por proporcionar las muestras de agua de mar depuradas.

REFERENCIAS

1. Thirumdas, R.; Kothakota, A.; Annapure, U.; Siliveru, K.; Blundell, R.; Gatt, R.; Valdramidis, V.P. Plasma Activated Water (PAW): Chemistry, Physico-Chemical Properties, Applications in Food and Agriculture. Trends Food Sci Technol **2018**, 77, 21–31, doi:10.1016/j.tifs.2018.05.007.

2. Oliveira, J.; Cunha, A.; Castilho, F.; Romalde, J.L.; Pereira, M.J. Microbial Contamination and Purification of Bivalve Shellfish: Crucial Aspects in Monitoring and Future Perspectives – A Mini-Review. Food Control **2011**, 22, 805–816, doi:10.1016/j.foodcont.2010.11.032.

3. Aboubakr, H.A.; Williams, P.; Gangal, U.; Youssef, M.M.; El-Sohaimy, S.A.A.; Bruggeman, P.J.; Goyal, S.M. Virucidal Effect of Cold Atmospheric Gaseous Plasma on Feline Calicivirus, a Surrogate for Human Norovirus. Appl Environ Microbiol **2015**, 81, 3612–3622, doi:10.1128/AEM.00054-15.

4. EU REG 1441/2007

5. EU REG 2019/627

6. UNI EN ISO 15216-1:2017

7. Rahman, M.; Hasan, M.S.; Islam, R.; Rana, R.; Sayem, A.S.M.; Sad, M.A.A.; Matin, A.; Raposo, A.; Zandonadi, R.P.; Han, H.; et al. Plasma-Activated Water for Food Safety and Quality: A Review of Recent Developments. Int J Environ Res Public Health **2022**, 19. doi: 10.3390/ijerph19116630.

8. Campbell, V.M.; Hall, S.; Salvi, D. Antimicrobial Effects of Plasma-Activated Simulated Seawater (PASW) on Total Coliform and Escherichia Coli in Live Oysters during Static Depuration. Fishes **2023**, 8, doi:10.3390/fishes8080396.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM SL1344 CON MAYOR RESISTENCIA A DIFERENTES AGENTES ESTRESANTES Y TECNOLOGÍAS DE PROCESADO DE ALIMENTOS

Guillén S.[1,2], Nadal L.[2], Halaihel N.[3], Mañas P.[2] y Cebrián G.[2]

1 Dpto. de Ingeniería Agronómica e Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, Murcia, España.
2 Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 - (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, España.
3 Dpto. de I+D+i, Alquizvetek S.L, Zaragoza, España.

silvia.guillen@unizar.es

Resumen

En este estudio se seleccionaron variantes de Salmonella Typhimurium *SL1344 resistentes a distintos agentes estresantes o tecnologías de procesado de alimentos. Además, se realizó un estudio genético y fenotípico para explorar los mecanismos subyacentes a la adquisición de la resistencia. Se aislaron 4 variantes con mayor resistencia estable al medio ácido, al medio osmótico, a las altas presiones hidrostáticas (HHP) y a la luz ultravioleta C (UV-C) tras repetidas rondas de exposición a estos agentes y crecimiento de los supervivientes. Las variantes aisladas mostraron resistencia al menos a otro agente. Este aumento de la resistencia, en términos generales, tenía un coste en el crecimiento, y ejercía un impacto variable en la virulencia (principalmente en la capacidad de adhesión), aumentaba la resistencia a antibióticos, pero no influía en la capacidad de formar biofilm. El aumento de la resistencia podría ser debido a un aumento de la actividad RpoS, ya que el análisis de secuenciación del genoma completo reveló que en 3 de las 5 variantes se encontró una mutación en un factor anti-sigma que promueve la proteólisis de RpoS. Además, se verificó al cuantificar la expresión de varios genes regulados por* rpoS *y se observó que era mayor en estas variantes.*

Palabras clave

Salmonella, estrés, variantes resistentes, rpoS, análisis WGS

Los microrganismos del género *Salmonella* son un buen ejemplo de evolución y adaptación a distintos nichos y hospedadores. La aparición de variantes resistentes puede contribuir a la supervivencia y capacidad de adaptación. De hecho, estas variantes emergentes constituyen un excelente modelo para profundizar en la comprensión de los mecanismos implicados en la supervivencia y resistencia celular a las diferentes tecnologías y factores de estrés.

Existen varios enfoques para obtener dichas variantes con tolerancia estable, uno de ellos sería tras la aplicación de varios ciclos de tratamiento y crecimiento de supervivientes, o bien tras un único tratamiento del estrés ambiental o tecnología de procesado de alimentos.

En este estudio se seleccionaron variantes de *Salmonella* Typhimurium SL1344 resistentes a distintos estreses ambientales y tecnologías de conservación de los alimentos. Además, se realizó un estudio fenotípico y genético para explorar los mecanismos subyacentes a la adquisición de la resistencia.

Se aislaron 4 variantes resistentes al medio ácido, osmótico, a las altas presiones hidrostática (APH) y a la luz ultravioleta (UV-C) tras ciclos sucesivos de exposición a estos agentes seguido de una etapa de crecimiento de los supervivientes. Las condiciones de aislamiento y el número de ciclos aplicados se resumen en la tabla 1. Además, se incluyó en el análisis una variante resistente a los pulsos eléctricos (PEF) aislada previamente por Sagarzazu y col. (2013) [1] (SL-PEF). La metodología para la caracterización fenotípica y genotípica de las variantes resistentes aisladas se describen detalladamente en Guillén y col. (2024) [2].

Tabla 1: Condiciones utilizadas y ciclos aplicados para el aislamiento de variantes resistentes a diferentes estreses ambientales y tecnologías de conservación de alimentos. La concentración inicial de los tratamientos fue de 10^9 UFC/mL. La temperatura de los tratamientos fue 25 °C, excepto para el de NaCl que fue 37 °C.

Estrés o tecnología	Condiciones	Tiempo de tratamiento	Ciclos
Ácido	pH 2,5	180 min	5
NaCl	30% (p/v)	24 h	6
APH	300 MPa	10 min	8
UV-C	0.09 mW/cm^2	150 s	8

Los resultados indicaron que las variantes aisladas mostraron resistencia al menos a otro agente (Figura 1). Este aumento de la resistencia, en términos generales, tenía un coste en la capacidad de crecimiento, tanto en un medio rico en nutrientes como en medios con restricciones nutricionales. Ejercía un impacto variable en la virulencia (principalmente en la capacidad de adhesión). A su vez, aumentaba la resistencia a diferentes antibióticos, pero, sin embargo, este aumento de resistencia no influía en la capacidad de formación de biofilms.

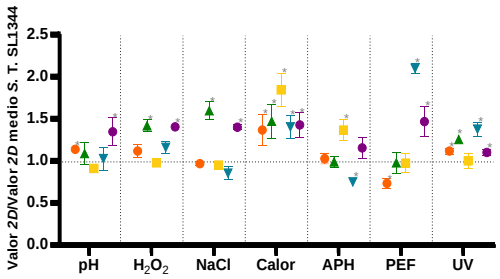


Figura 1: Resistencia a 7 estreses ambientales y tecnologías de conservación de las 5 variantes de *S.* Typhimurium SL1344 aisladas, SL-pH (●), SL-NaCl (▲), SL-HHP (■), SL-UV (▼) y SL-PEF (●). El parámetro representado es el valor *2D* medio de cada cepa dividido por el valor *2D* medio de la cepa parental, *S.* Typhimurium SL1344. Las barras de error se corresponden a la desviación estándar de las medias y el asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas (p <0,05) entre la cepa parental y la variante.

El análisis de la secuenciación del genoma completo nos permitió identificar los cambios genéticos responsables de estas diferencias fenotípicas, y reveló que en 3 de las 5 variantes (SL-NaCl, SL-UV y SL-PEF) se encontró una mutación en un factor anti-sigma que promueve la proteólisis de RpoS, el regulador de la respuesta general al estrés en bacterias Gram negativas. Por ello, se cuantificó la expresión de varios genes, *katE, katN* y *ostB,* que son regulados por *rpoS*, y se observó que, efectivamente, era mayor en estas variantes (Figura 2).

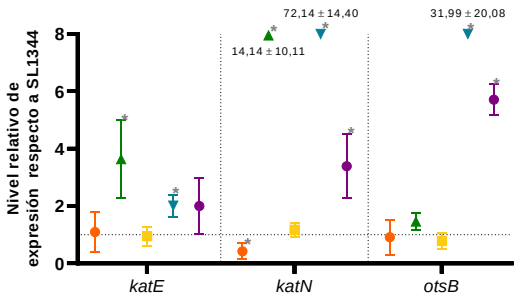


Figura 2: Expresión relativa de los tres genes estudiados ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en las variantes resistentes en

comparación con la cepa parental. SL-pH (●), SL-NaCl (▲), SL-HHP (■), SL-UV (▼) y SL-PEF (●). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de las medias y el asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas (p <0,05) entre la cepa parental y las variantes.

Este aumento de la actividad RpoS explicaría las menores velocidades de crecimiento observadas en estas 3 variantes, ya que conduciría a un aumento de la transcripción de genes implicados en la detención del crecimiento y la resistencia a diversos tipos de estrés.

Sin embargo, la extrapolación de nuestros resultados a un conjunto mayor de cepas (22) indica que no se puede establecer una relación directa entre la actividad de RpoS y la resistencia al estrés en el género *Salmonella*. En cualquier caso, esta conclusión debe tomarse con cautela, .

debido al relativo bajo número de cepas de *Salmonella* estudiadas y a que es muy probable que otros mecanismos celulares también influyan en la resistencia a la variedad de estreses aquí estudiados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha contado con el apoyo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional y del MINECO CICYT (proyecto AGL2017-84084-R).

REFERENCIAS

[1] N. Sagarzazu, G. Cebrián, R. Pagán, S. Condón, P. Mañas, *Int. J. Food Microbiol.*, **2013**, *166*, 219-225.

[2] S. Guillén, L. Nadal, N. Halaihel, P. Mañas, G. Cebrián, *Food Microbiol.*, **2023**, *113*, 104285

IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN CRUZADA DE BIOFILMS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE A JAMÓN COCIDO Y DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

Serrano Heredia, S. M.*, Sánchez Martín, J., López Carmona, J. L., Bonilla Luque, O. M., Valero Díaz, A. y Carrasco Jiménez, E.

Universidad de Córdoba / Facultad de Veterinaria / Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos /UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes (ENZOEM). Campus de Rabanales, 14014 Córdoba, España.

*t52sehes@uco.es

RESUMEN / ABSTRACT

Listeria monocytogenes *fue en 2022 la quinta zoonosis más frecuente en humanos en la Unión Europea (EFSA y ECDC, 2023). El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de supervivencia de tres cepas de* L. monocytogenes *(L1C5, L196 y L138) en estado planctónico y de biofilm en jamón cocido, con y sin almacenamiento y tras una digestión gastrointestinal* in vitro. *Por un lado, se crearon biofilms con una concentración inicial de* 10^4 *UFC/cm*^{2} *que se transfirieron por contacto a lonchas de jamón cocido durante 90 segundos. Por otro lado, se inocularon lonchas de jamón cocido con una suspensión de* Listeria *en estado planctónico con la misma concentración inicial. Posteriormente, todas las muestras se sometieron a digestión* in vitro *inmediatamente o después de un almacenamiento durante 7 días a 7 °C envasadas al vacío. Los resultados mostraron que* L. monocytogenes *estuvo presente en todos los escenarios estudiados tras el proceso de digestión, sobreviviendo a valores de pH de 3 y con una reducción significativa de la población microbiana respecto a la concentración inicial (*$p < 0,05$*). El nivel de células planctónicas se redujo en una mayor proporción que las células de biofilm tras la digestión, siendo más intensa la reducción cuando la digestión se realizó de forma inmediata tras el evento de contaminación. En conclusión,* L. monocytogenes *supone un riesgo para la salud pública debido a su capacidad de transferencia y supervivencia en condiciones ácidas.*

PALABRAS CLAVE / KEY WORDS

Biofilms, contaminación cruzada, microorganismo patógeno, digestión, alimentos listos para el consumo

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes fue en 2022, considerada la quinta zoonosis más reportada en humanos en la Unión Europea, presentando una tendencia estable entre 2018 – 2022 y un 18,1 % de mortalidad (EFSA y ECDC, 2023). *L. monocytogenes* presenta una alta capacidad de supervivencia a temperaturas de refrigeración (2 – 4 °C) y frente a diferentes condiciones de estrés, de pH (4,29) y a_w

(0,925) (Serrano-Heredia et al., 2024), pudiendo formar biofilms difíciles de eliminar en superficies, que favorecen la contaminación cruzada y que podrían transferirse a alimentos listos para el consumo durante el procesado.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de supervivencia de tres cepas de *L. monocytogenes* en estado planctónico y de biofilm después de ser sometidas a eventos de contaminación cruzada con jamón cocido listo para el consumo, un periodo de almacenamiento a 7 °C durante 7 días y un proceso de digestión gastrointestinal simulada *in vitro.*

MATERIAL Y MÉTODOS

Se desarrollaron biofilms de tres cepas de *L. monocytogenes* (L1C5, L196 y L138) previamente aisladas de industrias cárnicas, sobre cupones de acero inoxidable con un período de incubación de 5 días a 25 °C, hasta alcanzar una concentración de 10^4 UFC/cm^2. Posteriormente se transfirieron por contacto a lonchas de jamón cocido durante 90 segundos. Paralelamente, las muestras de jamón cocido listo para consumo se contaminaron con 10 µL de células de *Listeria* en estado planctónico con la misma concentración inicial utilizada para la formación de los biofilms. Posteriormente, las lonchas de jamón contaminadas se sometieron a digestión *in vitro* inmediatamente o después de un almacenamiento de 7 días a 7 °C envasadas al vacío, tal y como se muestra en la Figura 1.

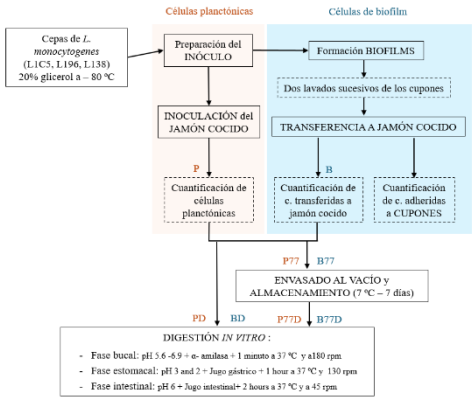


Figura 1: Esquema del diseño experimental del estudio. P: células planctónicas en jamón cocido (UFC/cm^2); B: células de biofilm en jamón cocido (UFC/cm^2); P77: P almacenadas a 7 °C - 7 días (UFC/cm^2); B77: B almacenadas at 7 °C - 7 días (UFC/cm^2); PD: P seguidas de una digestión inmediata (UFC /cm^2), BD: B seguidas de una digestión inmediata (UFC /cm^2); P77D: P77 seguidas de una digestión (UFC /cm^2); B77D: B77 seguidas de una digestión (UFC /cm^2).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos mostraron una tasa de transferencia global del biofilm de *L. monocytogenes* al jamón cocido de 11,61 %. En concreto, para las cepas L1C5, L196 y L138 el porcentaje de transferencia fue de 12,54 %, 11,65 % y 10,67 % respectivamente.

En la Figura 2 se muestra de forma comparativa la concentración global de *L. monocytogenes* durante todas las etapas estudiadas para las células de biofilm (tonos azules) y las células planctónicas (tonos naranjas). Atendiendo a los valores medios para el global de las cepas, se puede apreciar que las células de biofilm (B) en todos sus estadios presentaron recuentos superiores a las células planctónicas (P). En ambos casos, el proceso de digestión inmediata (D) supuso una reducción de la concentración inicial de B y P, siendo mayor en P, aunque mostrando en ambos casos una reducción significativa en la población

(p < 0,05). Además, el proceso de conservación de 7 días a 7 °C llevó a un aumento significativo de la población (p < 0,05) en el caso de B, pudiendo deberse a los mecanismos de resistencia de los biofilms. Este aumento de la concentración tras el proceso de conservación al vacío en refrigeración (B77) fue equivalente a la posterior reducción debido a la digestión (B77D), alcanzando así la misma concentración inicial de B. Sin embargo, en el caso de las células planctónicas (P), la conservación en refrigeración (P77) no produjo un aumento de la población de *L. monocytogenes* en el jamón cocido y la concentración tras la digestión (P77D) fue 0,11 log UFC/cm^2 superior a la concentración de P inicial.

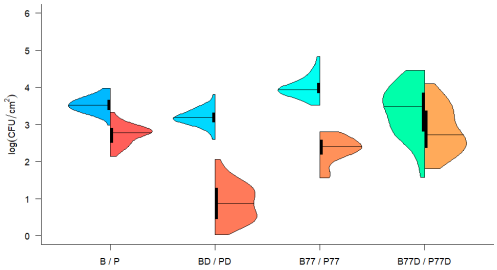


Figura 2: Comparación de células de biofilm y planctónicas de *L. monocytogenes* en las diferentes fases del diseño experimental para el global de las cepas. Tonos azules: células de biofilm; tonos naranjas: células planctónicas.

Por tanto, *L. monocytogenes* estuvo presente en todos los estadios estudiados (B, P, B77 y P77) tras el proceso de digestión (sobreviviendo a valores de pH de 3) y mostrando una reducción significativa en la población (p < 0,05).

CONCLUSIÓN

En conclusión, *L. monocytogenes* supone un riesgo para la salud pública debido a su capacidad de transferencia (11,61 %) y supervivencia en condiciones ácidas, ya que tanto P como B sobrevivieron a la digestión gastrointestinal *in vitro* a pH 3. Por tanto, en este estudio se demuestra que el estado de biofilm y la conservación en refrigeración al vacío durante 7 días a 7 °C son factores que incrementan la supervivencia de *L. monocytogenes.*

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación del Proyecto ASEQURA (PID2019-108420RB-C31), una Ayuda de Formación del Profesorado Universitario (FPU20/01342) y al Instituto de Investigaciones Marinas (IIM-CSIC) por el suministro de las cepas aisladas de L. monocytogenes *y que se han estudiado en esta investigación.*

REFERENCIAS

[1] EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. EFSA Journal, 21(12), e8442. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442

[2] S. M. Serrano-Heredia, Y. Le Marc, J. Sánchez-Martín, A. Possas, E. Carrasco, A. Valero. Inter-strain variability on the cardinal parameters (pH and A_w) of clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes* using turbidimetric measurements. *Int. J. Food Microbiol.* Volume 411, 2024, 110521, https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110521

VIGILANCIA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO RECOLECTADOS EN MERCADOS DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO - ECUADOR

Camila Guillén Camacho [1,2], Alejandra Razo [1], Silvia Espín [3] Lorena Mejía [1,2], y Sonia Zapata Mena [1,2]

1 Universidad San Francisco de Quito/Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales (COCIBA)/ Instituto de Microbiología. Campus Cumbayá, Diego de Robles s/n, Quito 170901, Ecuador
2 Universidad San Francisco de Quito/Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales (COCIBA)/ Instituto de Microbiología/Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Campus Cumbayá, Diego de Robles s/n, Quito 170901, Ecuador.
3 Municipio del Distrito Metropolitano de Quito/ Secretaría Metropolitana de Salud. Av. Río Amazonas y Jorge Washington, Quito 170743, Ecuador

cguillen@usfq.edu.ec

Resumen / Abstract

Listeria monocytogenes es un importante patógeno alimentario causante de la listeriosis. Esta enfermedad afecta principalmente a grupos vulnerables como embarazadas, ancianos, niños y personas inmunodeprimidas, y presenta una tasa de mortalidad, que puede llegar al 30%. En Ecuador no existe una vigilancia epidemiológica por parte de las entidades de control, ya que no es una enfermedad de notificación obligatoria. Sin embargo, se ha detectado L. monocytogenes en varios tipos de alimentos, principalmente quesos y embutidos. Este estudio se enfocó en alimentos listos para el consumo, por lo que, entre diciembre del 2021 y abril del 2023 en Quito–Ecuador, se recolectaron 833 muestras en 28 mercados en el Distrito Metropolitano de Quito. El 16,45% (137) fueron positivas para L. monocytogenes mediante la metodología MDS 3M. Las muestras de ensalada de vegetales (40,15%) y ají (29.93%) fueron los alimentos con mayor prevalencia. Se logró aislar el 59.85% (83 cepas) de las muestras positivas, identificando los 4 serogrupos responsables de la mayoría de los casos de listeriosis: ½a, ½b, ½c y IVb mediante técnicas de PCR. Es importante destacar que el serogrupo IVb se encontró en el 46,99% de los aislados alimentarios, mientras que otras especies de Listeria se aisló en el 20.73% de las muestras. La significativa prevalencia de L. monocytogenes en alimentos listos para el consumo en Quito resalta la necesidad de medidas de control y regulación durante la preparación y venta de estos productos. Estudios a nivel genómico son esenciales para el desarrollo de políticas de salud pública, regulaciones y prácticas para minimizar el riesgo de infecciones por Listeria monocytogenes

Palabras clave / Key words

Listeria monocytogenes, alimentos listos para el consumo, prevalencia, serogrupos, serogrupo IVb,

INTRODUCCIÓN

Listeria es un coco bacilo Gram positivo, que abarca diferentes especies, como: *L. monocytogenes, L. innocua, L. seeligeri, L. welshimeri, L. grayii* y *L. ivanovii*. *Listeria monocytogenes* destaca como un patógeno transmitido por alimentos que causa la listeriosis, afectando principalmente a grupos vulnerables. Aunque, se han descrito casos de listeriosis en humanos causados por *L. ivanovii* [5] y *L. innocua* [4].

Esta enfermedad afecta a grupos vulnerables como ancianos, personas inmunodeprimidas y mujeres embarazadas, pudiendo causar graves infecciones sistémicas graves y en el caso de mujeres embarazadas aborto, septicemia o meningitis neonatal [6]. La morbilidad de la listeriosis es baja en comparación con otras enfermedades transmitidas por alimentos, pero su mortalidad puede alcanzar entre el 20 a 30% de los casos [8]. La tipificación serológica de *Listeria monocytogenes* ha identificado trece serotipos, siendo los serotipos: 1/2a, 1/2b, y IVb los más comúnmente asociados con la enfermedad [10].

L. monocytogenes es un microorganismo ubicuo presente en agua y suelo; capaz de sobrevivir en condiciones de estrés como variaciones de temperatura y pH [9] y de formar biopelículas, lo que representa un desafío para su control en plantas de procesamiento y distribución de alimentos [6].

En Ecuador, la falta de vigilancia epidemiológica y la ausencia de notificación obligatoria de la listeriosis han limitado los estudios sobre la presencia de Listeria monocytogenes, que hasta ahora se han centrado en muestras de queso recolectadas en diversas provincias del país, sin abarcar otros alimentos listos para el [3].

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de muestras:

Un total de 833 muestras de alimentos listos para el consumo (Tabla 1) fueron recolectadas por la Secretaría de Salud del Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) desde enero del 2022 hasta mayo del 2023. Estas muestras fueron obtenidas de vendedores autónomos y puestos de ventas ubicados en mercados de comida dentro del DMQ y fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos USFQ.

Aislamiento e Identificación de *Listeria monocytogenes*

Se siguió las instrucciones del Sistema de Detección Molecular (MDS 3M) Kit *L. monocytogenes,* se realizó un enriquecimiento de 25 g de muestra en 225 ml del caldo Demi Frazer más el suplemento citrato férrico al 5%. Se incubó 24 horas a 37°C y posteriormente se realizó la metodología descrita en el Kit MDS.

Todas las muestras positivas de MDS 3M, se sembró en Palcam Listeria Selective Agar (BD) y se incubó durante 24 h a 37°C. Se aislaron las colonias verdes grisáceo que presentaban hidrólisis de esculina. Las colonias presuntivas se subcultivaron en agar nutritivo y posteriormente se realizó

Tabla1. Prevalencia de *Listeria* spp. en diferentes categorías de alimentos.

Categoría de muestras	Número de muestras analizadas	Positivos para MDS	Muestras positivas aisladas	Número de muestras positivas *Listeria* spp.							
				Listeria spp.	*Listeria seeligeri*	*Listeria innocua*	*L. monocytogenes*				
							1/2 a	1/2b	1/2c	IVb	Por identificar
Ají	214	41	28	2	-	4	2	3	1	9	7
Moluscos	1	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Semillas	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Comida preparada	71	6	2	-	-	1	-	-	-	-	1
Ensalada	222	55	33	1	2	4	-	4	-	15	6
Embutido listo para consumir	30	5	4	-	-	2	-	-	-	2	-
Hielo	14	3	2	-	-	-	-	-	-	2	-
Bebidas	86	6	1	-	-	-	-	-	-	1	-
Lácteos	75	4	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Fruta	11	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-
Vegetales	77	11	7	-	-	1		1	-	5	1
Salsas	18	5	5	-	-	-	-	-	-	4	-
Postres	12	0	0	-	-	-	-	-	-		-
Total	**833**	**137**	**83**	**3**	**2**	**12**	**2**	**8**	**1**	**39**	**15**

tinción Gram y prueba de catalasa. Aquellas colonias Grampositivas con morfología típica de cocobacilos o bacilos cortos que eran catalasa positiva se considerando aislados presuntivos de *Listeria monocytogenes.*

Extracción de ADN

El ADN de las colonias presuntivas para *Listeria monocytogenes* se extrajo mediante ebullición, resuspendiendo de 5 a 7 colonias en 300 ul de agua ultrapura. Posteriormente, el ADN se almacenó a

–20°C.

Amplificación por PCR de regiones de interés

Se verificaron y diferenciaron las colonias antes confirmadas, en cuanto a género y especie, mediante el uso de PCR punto final; usando como referencia el protocolo previamente descrito de Tao et al,. 2016. Se realizó una PCR convencional para cada par de cebadores, modificando la concentración a 0.3mM, y 0.25U para la Taq polimerasa.

Una vez confirmadas las muestras positivas para *L. monocytogenes*, la detección de serogrupos se llevó a cabo utilizando el protocolo establecido por Doumith et al., 2004, modificando las concentraciones de los primers a 0.3mM y a 0.8U la Taq polimerasa. Como control positivo se utilizó una cepa de *L. monocytogenes* ATCC 13932.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 833 muestras analizadas, el 16.45% (137) de los alimentos listos para el consumo resultaron positivos para *L. monocytogenes* mediante el kit de MDS 3M. La mayor prevalencia se observó en la categoría ensalada de vegetales (40.15%), seguida por muestras de ají (41, 29.93%). Esta contaminación puede atribuirse a la amplia distribución de este microorganismo en el medio ambiente, incluyendo agua y suelo, lo cual facilita la contaminación de las verduras durante el cultivo, cosecha, o

inclusive por la manipulación y almacenamiento [11]. En un estudio similar realizado en Chile, se reportó una prevalencia de 15,3% en ensaladas de verduras [1]. No se detectaron muestras positivas en la categoría de postres y semillas.

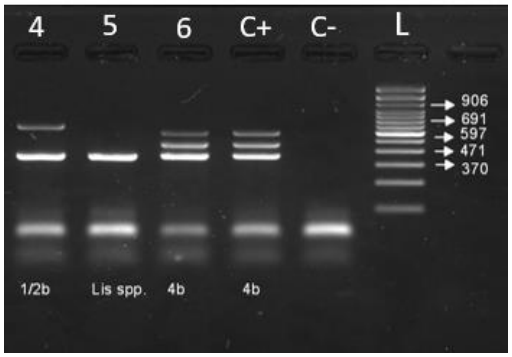


Figura 1: Gel de agarosa que muestra el producto amplificado con el patrón de bandas: 597 bp, 471 bp y 370 bp correspondiente a *L. monocytogenes* serogrupo 4b; 471 bp y 370 bp correspondiente al serogrupo 1/2b.

No obstante, solo se logró aislar 59,85% (82 cepas) de las muestras positivas por MDS. Entre estas cepas, se identificó *Listeria innocua* en 12 muestras (14,63%), *Listeria seeligeri* en 2 muestras (2,44) y *Listeria* spp en 4 muestras (4,88%), como se describe en la Tabla 1. Es conocido que *Listeria monocytogenes* puede coexistir con otras especies de *Listeria,* como *L. innocua*, tanto en plantas de procesamiento de alimentos como en los propios alimentos. A menudo, *L. monocytogenes* es superada por *L. innocua* en medios de cultivo tradicionales; sin embargo, su comportamiento en el entorno aún no se comprende completamente [7].

Se identificó *Listeria monocytogenes* en 65 muestras (79,27%) y mediante PCR se determinaron cuatro serogrupos: ½a, ½b, ½c y IVb (Figura1). El serogrupo IVb fue el más prevalente, representando el 79,27% (39/65), y pertenece al linaje I, siendo el serotipo mayormente asociado con listeriosis transmitida por alimentos [10]. El serogrupo ½b también fue significativo, con una prevalencia de 12,31% (8/65), asociado igualmente con casos de listeriosis humana. Los serogrupos menos prevalentes en este estudio fueron ½a (3,08%) y ½c (1,54%). 15 muestras de *L. monocytogenes* siguen siendo analizadas para determinar el serogrupo correspondiente.

CONCLUSIÓN

La significativa prevalencia de *L. monocytogenes* encontrada en varios tipos de alimentos listos para el consumo en Quito, especialmente en ensaladas y ají, indica un potencial riesgo para la salud de los consumidores. Este estudio resalta la importancia de monitorear la presencia de *L. monocytogenes* y subraya la necesidad de implementar medidas efectivas de control y regulación durante la preparación y venta de estos productos. Investigaciones a nivel genómico son esenciales para el desarrollo de políticas de salud pública, regulaciones y prácticas destinadas a minimizar el riesgo de infecciones por *Listeria monocytogenes.*

REFERENCIAS

[1] Cordano, A., & Jacquet, C. (2009). Listeria monocytogenes aislada de ensaladas de verduras vendidas en supermercados de Santiago, Chile: prevalencia y caracterización de la cepa. Revista internacional de Microbiología Alimentaria, 176-179.

[2] Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major Listeria monocytogenes serovars by multiplex PCR. J Clin Microbiol, 42, 3819-3822.

[3] Espinosa, E., Mejia, L., Villacis, J., Alban, V., & Zapata, S. (2022). Detection and genotyping of Listeria monocytogenes in artisanal soft cheeses from Ecuador. Rev Argent Microbiol, 53-56.

[4] Favaro, M., Sarmati, L., Sancesario, G., & Fontana, C. (2014). First case of Listeria innocua meningitis in a patient on steroids and eternecept. JMM Case Rep, 1.

[5] Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., & Leclercq, A. (2010). Human Listeriosis. Emerg Infect Dis, 16: 136-138.

[6] Jemmi, T., & Stephan, R. (2006). Listeria monocytogenes: food-borne pathogen and hygiene indicator. Rev. sci. tech, 571-580.

[7] Kathariou, S. (2022). Listeria monocytogenes Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective. Food Science Department and Program in Genomic Sciences, 65, 1811-1829.

[8] Laksanalamai, P., Steyer, S., Burall, L., & Datta, A. (2013). Genome sequences of Listeria monocytogenes serotype 4b variant strains isolated from clinical and environmental sources. Genome Announc, 1.

[9] Moorhead, S., & Dykes, G. (2004). Influence of the sigB gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two Listeria monocytogenes serotypes. International Journal of Food Microbiology, 63-72. doi:https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00332-5

[10] Muñoz, A., & Rodriguez, E. (2021). Distribución y caracterización fenotípica y genotípica de Listeria monocytogenes en aislamientos de alimentos, Colombia, 2010-2018. Biomédica.

[11] Sauders, B., Overdevest, J., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., & Lembo, A. (2012). Diversity of Listeria species in urban and natural environments. Applied and Environmental Microbiology, 4420-4433.

[12] Tao, T., Chen, Q., Bie, X., Lu, F., & Lu, Z. (2017). Investigation on prevalence of Listeria spp. and Listeria monocytogenes in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. Food Control, 73, 704-711.

EVALUACIÓN DEL RIESGO DE CONTAMINACIÓN POR *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN SISTEMAS DE AGRICULTURA CONTROLADA

María Ayala-San Nicolás, Ana Allende, Guillermo Illán-Ortega, Pilar Truchado, María Isabel Gil

Grupo de Investigación en Microbiología y Calidad de Frutas y Hortalizas. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. CEBAS-CSIC, E-30100 Murcia (España).

mayala@cebas.csic.es; aallende@cebas.csic.es; gillan@cebas.csic.es; ptruchado@cebas.csic.es; migil@cebas.csic.es

RESUMEN / ABSTRACT

Listeria monocytogenes *se asocia frecuentemente a toxiinfecciones alimentarias vinculadas a las frutas y hortalizas frescas. Los factores de riesgo se vinculan tanto a la producción primaria como a etapas de postcosecha, como el procesado y la conservación. Los nuevos sistemas de producción agrícola se basan en el uso de un ambiente controlado, lo que plantea retos adicionales para la seguridad alimentaria. Por ello, es importante evaluar los riesgos microbiológicos asociados a estas nuevas prácticas. El objetivo de este estudio fue la identificación de posibles vectores de contaminación por* L. monocytogenes *en un sistema de agricultura controlada de brotes de hortalizas. Para este fin, la instalación se visitó tres veces a lo largo de un año con una periodicidad de 3-4 meses. En cada visita, se muestrearon 14 puntos, obteniéndose un total de 155 muestras (incluidas réplicas). En cada muestra se analizó la presencia de* Listeria *spp. y* L. monocytogenes *(ISO 11290-1:2017 e ISO 11290-2:2017), incluyendo enriquecimiento primario y secundario, seguido de siembra en medios de cultivo selectivos (OCLA y MOX). La confirmación de los aislados se realizó por métodos moleculares (PCR). Se obtuvieron 48 aislados presuntivos, siendo 4 positivos para el gen* sigB*. El análisis mediante MALDI-TOF MS identificó tres de los aislados como* L. innocua*. Estos se asociaron a las cajas de recolección de las materias primas, así como a las columnas del invernadero. El cuarto aislado se identificó como* L. monocytogenes*, y fue obtenido de las calzas de los operarios. Este estudio pone en evidencia las posibles fuentes de contaminación en sistemas de agricultura controlada y la necesidad de establecer medidas de control específicas.*

PALABRAS CLAVE / KEY WORDS

Listeria monocytogenes, *invernadero, monitorización ambiental, fuentes de contaminación, vectores de contaminación.*

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva responsable de una de las enfermedades zoonóticas más graves, la listeriosis, caracterizada por altas tasas de hospitalización y mortalidad dentro de la Unión Europea [1]. Los productos vegetales frescos constituyen uno de los componentes principales de nuestra alimentación y su consumo es recomendado por las organizaciones

internacionales más prestigiosas en Salud y Nutrición [2, 3]. La Región de Murcia es el principal suministrador europeo de hortalizas de hoja en los meses de invierno, concentrando el 67% de las exportaciones españolas [4]. Numerosos organismos internacionales (FAO/WHO, EFSA, Codex Alimentarius) han considerado los vegetales frescos como un importante vehículo de transmisión de bacterias patógenas [5]. Estos vegetales se relacionan con brotes de toxiinfecciones alimentarias, ya que pueden contaminarse con patógenos en cualquier punto de la cadena [6], siendo las fases de producción y postcosecha críticas para el control de estos microorganismos.

La producción de hortalizas de hoja en sistemas de agricultura protegida, como son los invernaderos, que permiten controlar las condiciones ambientales y nutritivas, ha aumentado en los últimos años, debido a que permiten un mayor rendimiento con un uso más sostenible de recursos. Sin embargo, estos sistemas no son inherentemente más seguros microbiológicamente que los cultivos en campo abierto, ya que la contaminación puede producirse tanto por las prácticas agrícolas, como por el acantonamiento en las estructuras más complejas que tienen estos sistemas.

En enero de 2022, la FDA publicó un informe sobre un brote asociado con hortalizas de hoja cultivadas en invernadero, incluyendo una descripción general de los diferentes factores que contribuyeron potencialmente a la contaminación con patógenos humanos [7]. *L. monocytogenes* es un patógeno humano muy extendido en el medioambiente, por lo que la contaminación a partir de fuentes ambientales representa un papel crucial en la contaminación, además de ser capaz de crecer y multiplicarse a baja temperatura, convirtiéndose en un problema potencial en frutas y hortalizas refrigeradas. [8, 9].

Los estudios de prevalencia de patógenos transmitidos por los alimentos se han llevado a cabo, principalmente, en el entorno de producción en campo abierto [10, 11] y empresas de manipulación de frutas y hortalizas [11, 12]. Sin embargo, poco se sabe de la distribución y prevalencia en sistemas de producción más novedosos, como estos sistemas de agricultura controlada.

Materiales y Métodos

Para llevar a cabo la determinación de las posibles fuentes y vectores de contaminación de *L. monocytogenes*, se realizaron tres visitas a un invernadero comercial con una periodicidad de 3 a 4 meses. En cada una de las visitas, se tomaron muestras de 14 puntos (**Tabla 1**) dentro de la instalación, sumando un total de 155 muestras, incluyendo las réplicas de cada uno de los puntos.

Tabla 1. Lista de los puntos de muestreo.

Punto de muestreo	Nombre
1	Caja de cosecha
2	Aspiradora de hojas
3	Rueda de la aspiradora hojas
4	Cuchilla cosechadora
5	Rueda de la cosechadora
6	Paredes
7	Calzas
8	Suelo
9	Enmendante
10	Materia prima recolectada
11	Materia prima refrigerada
12	Agua de la balsa de riego
13	Agua del punto de riego
14	Cinta transportadora de la cosechadora

El análisis de las muestras medioambientales se realizó siguiendo los protocolos establecidos por las normas ISO 11290-1:2017 e ISO 11290-2:2017, con algunas modificaciones. Estos análisis

incluyeron etapas de enriquecimiento primario y secundario en medios Half-Fraser y Fraser, respectivamente, seguidas de la siembra en medios de cultivo selectivos OCLA y MOX. Tras la incubación, las colonias presuntivas de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* se analizaron mediante PCR para confirmar la presencia del gen *sigB*, característico del género *Listeria* [13, 14, 15]. Además, se realizó una identificación de algunos de los aislados mediante MALDI-TOF MS [16].

Resultados y Discusión

Del total de 155 muestras analizadas, se obtuvieron 48 aislados presuntivos de *Listeria* spp. Entre estos, cuatro resultaron positivos para el gen *sigB* (**Figura 1**). Mediante MALDI-TOF MS, tres de estos aislados se identificaron como *L. innocua*, encontrándose en las cajas de recolección de la materia prima y en las columnas del invernadero. Un cuarto aislado, identificado como *L. monocytogenes*, se encontró en las calzas de los operarios, lo que indica la presencia del patógeno en el suelo de la instalación.

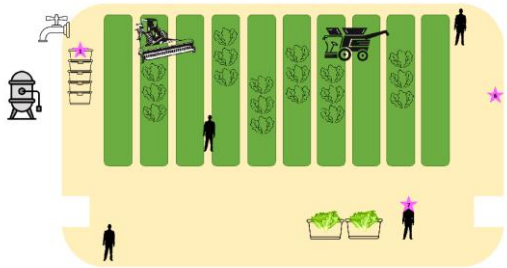


Figura 1. Esquema del invernadero. Las estrellas rosas indican los puntos de muestreo positivos para *Listeria* spp.

Los resultados obtenidos indican que los sistemas de agricultura controlada también están expuestos a microorganismos patógenos humanos. Las buenas prácticas agrícolas y de higiene, específicas para este tipo de sistemas, son necesarias de implementar como estrategias de prevención para evitar la contaminación del producto con microorganismos patógenos. La presencia de *L. innocua* en las cajas de recolección y en las columnas del invernadero sugiere que existen zonas en las que *Listeria* spp. puede permanecer y actuar como reservorio. Por otra parte, la detección de *L. monocytogenes* en las calzas de los operarios indica la necesidad de implementar mejores sistemas de limpieza y desinfección con el fin de eliminar dicha contaminación. Es esencial establecer sistemas de monitorización ambiental que confirmen la eficacia de los sistemas de limpieza y desinfección.

Este estudio pone de manifiesto la existencia de riesgos microbiológicos en los sistemas de agricultura controlada y la necesidad de desarrollar y establecer estrategias de prevención y control específicas. La identificación de los puntos críticos de contaminación es fundamental para poder diseñar e implementar prácticas de limpieza y desinfección eficaces. Realizar una monitorización ambiental de la instalación de producción es imprescindible para poder determinar la eficacia de las acciones correctivas y poder, así, reducir los riesgos microbiológicos de los alimentos vegetales para la salud pública.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio está financiado por la AEI (MCIN/AEI/10.13039/501100011033, PID 2022-1417080B–I00), Center for Produce Safety (CPS Award No. 2023CPS01), "ERDF A way of making Europe", y AGROALNEXT (Fondos de NextGenerationEU, PRTR-C17.I1). M. Ayala-San Nicolás tiene un contrato FPI (PREP2022-000449). Se agradece mucho la asistencia técnica de

Natalia Hernández, Silvia Andújar, Diego Sabater y Virginia Serrano.

REFERENCIAS

[1] EFSA, ECDC. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report, *EFSA J.*, **2022**, *20*(12), e07666.

[2] OMS, FAO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation, *WHO Tech. Rep. Ser.*, **2002**, *916*.

[3] FAO. Frutas y verduras – esenciales en tu dieta. Año Internacional de las Frutas y las Verduras 2021, **2020**.

[4] Proexport. Los números para no perderse. Asamblea General 2024, **2024**.

[5] AM Belias, LK Strawn, M Wiedmann, D Weller. Small produce farm environments can harbor diverse *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. populations, *J. Food Prot.*, **2021**, *84*(1), 113-121.

[6] EFSA. Development and implementation of a system for the early identification of emerging risks in food and feed, *EFSA J.*, **2010**, *8*(10), 1888.

[7] FDA, **2022**. https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/factors-potentially-contributing-contamination-packaged-leafy-greens-implicated-outbreak-salmonella

[8] M Norton, MA McCamey, KL Gall, JM Scarlett, KJ Boor, M Wiedmann. Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, *67*(1), 198-205.

[9] K Simmons, M Wiedmann. Identification and classification of sampling sites for pathogen environmental monitoring programs for *Listeria monocytogenes*: Results from an expert elicitation, *Food Microbiol.*, **2018**, *75*, 2-17.

[10] S Harrand, LK Strawn, PM Illas-Ortiz, M Wiedmann, DL Weller. *Listeria monocytogenes* prevalence varies more within fields than between fields or over time on conventionally farmed New York produce fields, *J. Food Prot.*, **2020**, *83*(11), 1958-1966.

[11] AM Belias, A Sbodio, P Truchado, D Weller, J Pinzon, M Skots, A Allende, D Munther, T Suslow, M Wiedmann, R Ivanek. Effect of weather on the die-off of *Escherichia coli* and attenuated *Salmonella enterica Serovar Typhimurium* on preharvest leafy greens following irrigation with contamination water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2020**, *86*(17), e00899-20.

[12] G Sullivan, M Wiedmann. Detection and prevalence of *Listeria* in U.S. produce packinghouses and fresh-cut facilities. *J. Food Prot.*, **2020**, *83*(10), 1656-1666.

[13] KK Nightingale, K Wiedham, M Wiedmann. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and food, *J. Bacteriol.*, **2005**, *187*(16), 5537-5551.

[14] P Vangay, EB Fugget, Q Sun, M Wiedmann. Food microbe tracker: a web-based tool for storage and comparison of food-associated microbes, *J. Food Prot.*, **2013**, *76*(2), 283-294.

[15] CA Bardsley, RH Orsi, S Clark, CM Murphy, JC McEntire, M Wiedmann, LK Strawn. Role of Whole Genome Sequencing in assessing resident and transient *Listeria monocytogenes* in a produce packinghouse, *J. Food Prot.*, **2024**, *87*(1), 100201.

[16] S Tsuchida, H Umemura, T Nakayama. Current status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology, *Molecules*, **2020**, *25*(20), 4775.

EVALUACIÓN DE LAS MEDIDAS DE CONTROL IMPLEMENTADAS PARA LA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN PLANTAS DE PROCESADO DE PRODUCTOS VEGETALES FRESCOS CONTRA *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Gómez-Galindo, M.*, Truchado, P., Ayala-San Nicolás, M., Gil, M.I., Allende, A.

Grupo de Investigación en Microbiología y Calidad de Frutas y Hortalizas, CEBAS-CSIC, Murcia, España

*migomez@cebas.csic.es

Resumen

Listeria monocytogenes está presente en las plantas de procesado de alimentos, incluidas aquellas dedicadas al procesado de productos vegetales frescos, lo que representa un riesgo para la seguridad alimentaria debido a su naturaleza ubicua y resistencia ambiental. El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de los distintos tratamientos de desinfección implementados en la industria para eliminar L. monocytogenes en las plantas de procesado de frutas y hortalizas frescas, así como profundizar en el conocimiento sobre su colonización y persistencia en ambientes de procesado. Se muestrearon tres líneas de procesado diferentes (lechuga iceberg rallada, frutas cortadas frescas y ensaladas preparadas) por triplicado (n=3) durante un periodo de 8 meses, tras los procedimientos de limpieza y desinfección. La detección y el recuento de Listeria spp. y L. monocytogenes se llevaron a cabo siguiendo la norma ISO 11290-1 modificada. Se identificaron 252 aislados de L. monocytogenes mediante PCR convencional. Los aislados fueron analizados mediante el método de análisis de variantes de loci múltiples (MLVA), usando un protocolo de PCR-multiplex para ocho loci, dividido en dos reacciones con cuatro loci cada una. El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis capilar, identificándose dos perfiles mayoritarios de MLVA, uno de los cuales disminuyó en prevalencia a lo largo de los muestreos. Para los aislados identificados, se evaluó su sensibilidad a los biocidas utilizados por la industria mediante incubación en presencia de estos, para la obtención de las curvas de crecimiento. Los resultados también muestran la caracterización fenotípica de la resistencia a antibióticos en los aislamientos mediante el método comercial Sensititre™ para grampositivos.

Palabras clave

Listeria monocytogenes, MLVA, biocidas, antimicrobianos, productos vegetales frescos

Introducción

Listeria monocytogenes es un patógeno humano que se transmite principalmente a través de los alimentos y que puede llegar a causar infecciones graves, constituyendo actualmente un desafío para la industria de procesado de productos vegetales frescos [1]. Cada vez más, existe la necesidad de poder identificar, de una forma eficaz y rápida, las

cepas de microorganismos patógenos que pueden ser responsables de una toxiinfección alimentaria. El objetivo es poder determinar rápidamente el agente causante, así como el posible vector, para evitar que más casos clínicos se sigan produciendo [2]. Muchas son las opciones que se están utilizando para identificar las cepas patógenas responsables de un brote de toxiinfección alimentaria [3]. Dentro de estas opciones, el análisis multi-locus de número variable de repeticiones en tándem (MLVA) es un método rápido de subtipificación molecular que permite identificar y diferenciar cepas de un microorganismo y agruparlas según sus relaciones genéticas [4]. Esta técnica, junto con otros métodos como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y la tipificación multi-locus de secuencias (MLST), están siendo reemplazadas en el área de seguridad alimentaria, por la utilización de la secuenciación del genoma completo (WGS) [5,6]. No obstante, siguiendo la línea de trabajos como el de Andrews et al. (2023) [7], la técnica MLVA puede ser una herramienta valiosa debido a su simplicidad, rapidez y rentabilidad para identificar y rastrear subtipos de *L. monocytogenes* en las plantas de procesado de alimentos. Aunque esta técnica no tiene el mismo poder discriminatorio que WGS para identificar clones persistentes [8], sigue siendo una poderosa herramienta de screening en determinadas circunstancias donde la tecnología WGS no es accesible para todas las industrias.

En el presente estudio, se llevó a cabo una monitorización ambiental de las líneas de proceso de tres industrias de productos vegetales procesados en fresco, entre los que se incluyó lechuga cortada, fruta cortada y ensaladas completas. El objetivo de la monitorización fue evaluar la eficacia de las actividades de limpieza y desinfección implementadas para el control de *Listeria* spp. y más específicamente de *L. monocytogenes*, en muestras obtenidas de las tres plantas con el fin de detectar las cepas persistentes. Asimismo, se evaluó las resistencias a biocidas y antimicrobianos de los aislados obtenidos en las líneas de procesado.

Monitoreo ambiental y tipificación MLVA

Se seleccionaron tres líneas de procesado de vegetales frescos (lechuga cortada, frutas cortadas y ensaladas preparadas) para realizar la monitorización ambiental después de la limpieza y desinfección de las instalaciones. La toma de muestras de superficies, su procesamiento, así como la confirmación por PCR de las muestras presuntivas de *L. monocytogenes* se llevó a cabo según trabajos anteriores [9]. Los aislados positivos se analizaron mediante la técnica MLVA. El procedimiento de MLVA se realizó según Sperry et al. (2008) [10] y Martín et al. (2018) [11]. El protocolo consistió en 2 reacciones diferentes de PCR multiplex. La primera reacción de PCR contenía primers para la amplificación de los locus Lm-2, Lm-8, Lm-10 y Lm-11, y la segunda PCR contenía primers para los locus Lm-3, Lm-15, Lm-23 y Lm-32. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis capilar automatizada en un equipo Spectrum Compact CE (Promega).

Resistencias a biocidas y antimicrobianos

De los aislados de *L. monocytogenes* identificados mediante los perfiles MLVA, se seleccionó un número representativo para determinar su sensibilidad a los distintos biocidas utilizados por la industria (**tabla 1**).

Cultivos frescos de los aislados se diluyeron a 10^1 log UFC/ml en caldo BHI en una placa de 96 pocillos Nunc™ Edge™. Cada aislado se expuso, por triplicado, a tres concentraciones de biocidas (33%, 5% y 2% de la solución stock). La evolución de las curvas de crecimiento se realizó en un lector de microplacas Infinite® M Plex (TECAN) a 37°C, con 24 ciclos de agitación orbital y lectura de absorbancia cada hora.

Tabla1: Listado de biocidas empleados en el protocolo de limpieza y desinfección en las instalaciones del colaborador industrial.

PRODUCTO COMERCIAL	COMPONENTES PRINCIPALES
P3-oxonia active	Peróxido de hidrogeno Ácido acético Acido peracético
Topactive 314	Hidróxido de sodio Hipoclorito de sodio Óxido de alquilamina
P3-topax 990	Óxido de alquilamina Ácido acético Alcoholes, C13-15, ramificados y lineales, etoxilados N-(3-Aminopropil)-Ndodecilpropano-1,3-diamina
P3-topax 66	Hipoclorito de sodio Hidróxido de sodio Óxido de alquilamina
Topaz AC3	Ácido fosfórico Óxido de alquilamina Ésteres fosfatos 2-(2-butoxietoxi)etanol

La misma selección de aislados utilizada para la resistencia a biocidas se utilizó para realizar la caracterización fenotípica de las resistencias a los antimicrobianos. Se transfirieron 200- 400µl de un cultivo fresco (10^8-10^9 log UFC/ml) de los aislados en BHI, a un tubo con agua estéril hasta ajustar su turbidez a un patrón 0,5 de McFarland mediante el uso de un nefelómetro Sensititre™. A continuación, se trasferían 10µl de cada inóculo a un tubo con caldo Mueller-Hinton. Se utilizó el sistema Sensititre AIM para la distribución del caldo en placas Sensititre GPALL1F™ (Thermo Scientific™), las cuales se incubaban a 37°C durante 24 horas. Los resultados se interpretaron siguiendo los valores límite epidemiológicos (ECOFFs, por sus siglas en inglés) del Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST).

RESULTADOS

Se muestrearon 231 puntos y un total de 22 fueron positivos para *L. monocytogenes* en el primero monitoreo. Se repitió el muestreo en los monitoreos ambientales 2 y 3 en los puntos que resultaron positivos en el primero. La **tabla 1** es un resumen de los aislados encontrados en cada muestreo. En total, se obtuvieron 252 aislados de *L. monocytogenes* a lo largo de la monitorización de las líneas de procesado

Tabla 2. Aislados de L. monocytogenes hallados en cada muestreo y línea. L: lechuga; F: frutas; EC: ensaladas completas. MA1: monitoreo ambiental

Linea	MA 1	MA 2	MA 3
L	11	33	5
F	24	9	-
EC	52	60	58
TOTAL	87	102	63

De todos los aislados estudiados, se obtuvieron dos perfiles de MLVA:

- Perfil 1: 3-13-1-3-15-1-3-15 (84% de los aislados)
- Perfil 2: 5-16-1-3-20-3-3-11 (16% de los aislados).

El perfil MLVA 1 fue el perfil mayoritario detectado a lo largo de los muestreos. Se observó una disminución en la detección del perfil 2 a lo largo de los

muestreos. En la mayoría de los casos, en el mismo punto de muestreo, solo se encontró un tipo de perfil. En el primer muestreo de la línea de procesado de ensaladas completas se detectó un perfil diferente (perfil MLVA 3: 3-13-1-3-19-3-3-14). Este perfil no se volvió a detectar en los muestreos siguientes.

En ninguno de los aislados estudiados se observó crecimiento en presencia de los desinfectantes comerciales. La curva mostrada en la **Figura 2** es un ejemplo de la cinética registrada. Por otra parte, entre todos los antibióticos probados, los aislados analizados resultaron, solo resistentes frente a gentamicina según los resultados de los ECOFFs.

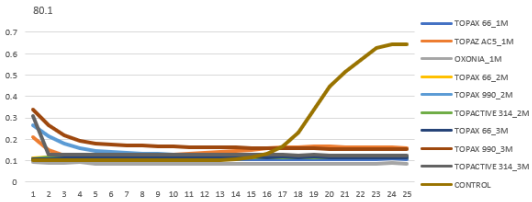


Figura 2. Curva de crecimiento de uno de los aislados de *L. monocytogenes;* frente a los diferentes desinfectantes empleados en cada muestreo.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio estuvo financiado por el programa AGROALNEXT (MCIN y fondos de NextGenerationEU, PRTR-C17.I), por el proyecto PID 2022-1417080B–I00 y el contrato FPU 19/05187 (Marisa Gómez-Galindo) ambos financiados por la Agencia Estatal de Investigación, MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y "ERDF A way of making Europe".

REFERENCIAS

[1] EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), K Koutsoumanis, A Allende, D Bolton, S Bover-Cid, M Chemaly , A De Cesare, L Herman, F Hilbert, R Lindqvist, M Nauta, R Nonno, L Peixe, G Ru, M Simmons, P Skandamis, E Suffredini, E Fox, RB Gosling, B Melero Gil, T Møretø, B Stessl, MT da Silva Felício, W Messens, A Cezara Simon, A Alvarez-Ordóñez. Persistence of microbiological hazards in food and feed production and processing environments. *EFSA Journal*, **2024**, *22*(1), e8521.

[2] MP Kabiraz, PR Majumdar, MMC Mahmud, S Bhowmik, A Ali. Conventional and advanced detection techniques of foodborne pathogens: A comprehensive review, *Heliyon*, **2023**, *9*(4), e15482.

[3] M Aladhadh. A Review of Modern Methods for the Detection of Foodborne Pathogens. *Microorganisms*, **2023**, *11*(5), 1111.

[4] J Gana, N Gcebe, R Pierneef, R Moerane, AA Adesiyun. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Genotypes of *Listeria monocytogenes* Isolated from Farms, Abattoirs, and Retail in Gauteng Province, South Africa, *J Food Protect*, **2022,** *85*(9), 1249-1257.

[5] B Lakicevic, V Jankovic, A Pietzka, W Ruppitsch. Wholegenome sequencing as the gold standard approach for control of *Listeria monocytogenes* in the food chain, *J Food Protect*, **2023**, *86*(1), 100003.

[6] E Tirloni, G Centorotola, F Pomilio, M Torresi, C Bernardi, S Stella. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) delicatessen foods: Prevalence, genomic characterization of isolates and growth potential, *International J Food Microbiol*, **2024**, *30*,410:110515.

[7] N Andrews, E McCabe, P Wall, JF Buckley, S Fanning. Validating the Utility of Multilocus Variable Number Tandem-repeat Analysis (MLVA) as a subtyping strategy to monitor *Listeria monocytogenes* In-built Food Processing Environments, *J of Food Protect*, **2023**, *86*(10), 100147.

[8] R Pijnacker, M van den Beld, K van der Zwaluw, A Verbruggen, C Coipan, AH Segura, L Mughini-Gras, E Franz, T Bosch. Comparing Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analyses with Whole-Genome Sequencing as typing method for *Salmonella Enteritidis* surveillance in The Netherlands, January 2019 to March 2020, *Microbiol Spectr*, **2022**, *10*(5), e0137522.

[9] MI Gil, P Truchado, JA Tudela, A Allende. Environmental monitoring of three fresh-cut

processing facilities reveals harborage sites for *Listeria monocytogenes*, *Food Control*, **2024,** *155*, 110093.

[10] KE Sperry, S Kathariou, JS Edwards, LA Wolf. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis as a tool for subtyping *Listeria monocytogenes strains*, *J Clin Microbiol*, **2008**, *46*(4), 1435-1450.

[11] B Martín, S Bover-Cid, T Aymerich. MLVA subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates from meat products and meat processing plants, *Food Res Int,* **2018**, *106*:22.

AUMENTO DE RESISTENCIA DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM A AMINAS TERCIARIAS TRAS EXPOSICIÓN PROLONGADA

Alberto Fau, Jorge Andaluz-Arbe, Alejandro Cadarso, Diego Gómez, Rafael Pagán, Diego García-Gonzalo y Daniel Berdejo

1 Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón, Universidad de Zaragoza, CITA.

afau@unizar.es

Resumen / Abstract

Las toxiinfecciones tienen un importante impacto en la Salud Pública, siendo Salmonella enterica uno de los principales agentes causantes. La industria, entre otras medidas, aplica procedimientos de limpieza y desinfección en los que utiliza biocidas para inactivar las bacterias patógenas. Sin embargo, el uso de estos productos puede favorecer la aparición de variantes genéticas resistentes (VR), pudiendo comprometer la eficacia de la desinfección y, con ello, la inocuidad de los alimentos. Este trabajo pretende evaluar si la exposición continuada a una amina terciaria (APDPD) puede favorecer la aparición de VR de Salmonella Typhimurium. Para ello, se realizó un ensayo de evolución adaptativa (EEA)*, en 5 líneas paralelas, a dosis subinhibitorias durante 30 días, con el objetivo de aislar VR. Su caracterización fenotípica evidenció la aparición de VR tras los EEA, mostrando un aumento de hasta un 30% de la CMI con respecto a la cepa parental. Por otro lado, la caracterización genotípica identificó variaciones genéticas en corA, cheZ y cpxR, que serían las potenciales responsables del aumento de resistencia. No obstante, es necesario profundizar en el estudio de la aparición de estas resistencias, con objeto de determinar su posible impacto en la Salud Pública.*

Palabras clave:

Salmonella, biocidas, amina terciaria, resistencia, variantes resistentes.

1. Introducción

La EFSA (1) registró más de 5.500 brotes de origen alimentario en el año 2022, siendo las bacterias patógenas las principales responsables. En este sentido, *Salmonella* spp. fue la segunda toxiinfección más reportada, produciendo más de 65 000 casos, de los cuales casi el 40% requirieron de hospitalización. Los serovares más implicados fueron los de *S*. Enteritidis y Typhimurium.

La industria alimentaria aplica múltiples estrategias para asegurar la inocuidad alimentaria, como los métodos de conservación de los alimentos y los procedimientos de limpieza y desinfección. Estos procedimientos son capaces de reducir eficazmente el número de microorganismos en superficies y equipos en contacto con alimentos mediante el empleo de biocidas (2).

El uso generalizado de compuestos antimicrobianos a lo largo de la cadena alimentaria puede dar lugar a la aparición de bacterias resistentes, que pueden transmitirse mediante los alimentos hasta el consumidor final (3). Cabe señalar que las bacterias pueden adaptarse y desarrollar resistencia a los agentes biocidas (4, 5), a través de dos estrategias (6): a) aparición de mutaciones genéticas aleatorias inducidas por la exposición a un compuesto antimicrobiano y, b) adquisición de genes de resistencia. Los fenómenos de resistencias a los biocidas por mutaciones aleatorias se han observado en *S. enterica*. Los ensayos de evolución adaptativa (EEA) permiten profundizar en su estudio mediante su selección y aislamiento (7, 8).

2. Hipótesis y Objetivos

La hipótesis de este trabajo es que el uso de biocidas en los procedimientos de limpieza y desinfección en la industria agroalimentaria podría conducir a la aparición de variantes genéticas resistentes (VR) de bacterias patógenas, comprometiendo la eficacia de estos procedimientos. Por tanto, estos fenómenos de resistencia podrían afectar a la inocuidad de los alimentos. De este modo, el objetivo este estudio es determinar si la exposición a la amina terciaria N-(3-aminopropil)-N-dodecilpropano-1,3-diamina puede provocar la aparición de VR en *S.* Typhimurium.

3. Material y Métodos

Los experimentos se realizaron con la cepa *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2 como cepa parental (WT). Esta cepa fue adquirida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 722). El biocida seleccionado fue N-(3-aminopropil)-N-dodecilpropano-1,3-diamina (APDPD) con una pureza mayor o igual al 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

3.1. Determinación de la CMI

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se llevó a cabo según lo establecido por el Método M100-S24 del Clinical and Laboratory Standards Institute. (9).

El ensayo se realizó en caldo tripticasa-soja (Oxoid, United Kingdom) enriquecido con 0,6% (p/v) de extracto de levadura (Oxoid) (TSBEL). A partir del pocillo con la concentración más alta a evaluar, se realizaron diluciones seriadas, logrando en cada pocillo la mitad de la concentración anterior. Tras la incubación, se midió la densidad óptica (DO_{620}) a 620 nm (Multiskan EX, Thermo Labsystems, China), estableciendo la CMI como la menor concentración que redujo al menos un 90% la DO_{620} con respecto al control positivo (10).

Adicionalmente, para comparar aumentos de resistencia más pequeños se determinó nuevamente la CMI utilizando rangos de concentraciones más ajustados que los utilizados con el método del CLSI.

Los valores de CMI se determinaron con la moda de, al menos, tres réplicas independientes.

3.2. Ensayo de evolución adaptativa (EEA)

Según esta metodología, de acuerdo a trabajos previos del grupo de investigación (11), el ensayo se realizó a una

concentración subinhibitoria constante, la mitad de la CMI frente a APDPD.

La exposición de *S*. Typhimurium a APDPD consistía en una incubación de 24 h a 37 °C (≈ 10 generaciones), en agitación (160 rpm) y con TSBEL como medio de cultivo. Tras cada exposición de 24 h, se realizó una dilución 1:1.000 en TSBEL, hasta completar 30 exposiciones.

El ensayo se realizó con 5 líneas paralelas con el fin de estudiar la existencia de un patrón común en los cambios genéticos responsables de la resistencia bacteriana.

3.3. Aislamiento de cepas evolucionadas y caracterización fenotípica

Tras el ALE se determinó la CMI de las poblaciones evolucionadas, descartando aquellas que no lograron un aumento ≥ 10% de resistencia directa. Posteriormente se aislaron 5 cepas evolucionadas de cada una de las poblaciones resistentes.

Finalmente, se evaluó la resistencia de las cepas evolucionadas individuales mediante la determinación de la CMI.

3.4. Caracterización genotípica

Se realizó la extracción del DNA de las cepas evolucionadas con el DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen). A continuación, se estandarizaron las muestras a 20 ng/mL y se enviaron GeneWiz (Leipzig, Alemania) para la secuenciación completa del genoma mediante la tecnología Illumina.

Gracias al software Integrative Genomics Viewer (Universidad de San Diego, EEUU) y la herramienta de traducción Expasy (Swiss Institute of Bioinformatics, Suiza) se localizaron e identificaron los cambios genéticos en las VR.

4. Resultados y Discusión

4.1. Aislamiento de cepas evolucionadas y caracterización fenotípica

La CMI de la WT mediante el método del CLSI fue de 3.200 mg/L, por lo que los EEA se realizaron a 1.600 mg/L. Tras el EEA, 4 de las 5 líneas ensayadas mostraron un aumento de la resistencia directa frente a APDPD (1A, 2A, 4A y 5A). De cada línea se aislaron 5 cepas por lo que se obtuvieron 20 cepas.

La Tabla 1 muestra el valor de la CMI de la WT determinado con rangos de concentración más ajustados que los del CLSI, reduciéndose hasta 2.240 mg/L. Únicamente en dos líneas del EEA (4A y 5A) se observaron aumentos de resistencia. Concretamente las cepas aisladas 4A-2, 4A-4, 5A-2 y 5A-5 mostraron una CMI de 2.560 mg/L, mientras que la cepa 5A-4 mostró una CMI de 2.880 mg/L, siendo aumento del 15 y 30% de la resistencia directa, respectivamente.

Tabla 1: CMI de la WT y de las cepas aisladas de las líneas 4A y 5A tras la exposición a APDPD. En negrita, se indican las variantes resistentes (VR).

Línea 4A	CMI	Línea 5A	CMI
4A-1	2.240	5A-1	2.240
4A-2	**2.560**	**5A-2**	**2.560**
4A-3	2.240	5A-3	2.240
4A-4	**2.560**	**5A-4**	**2.880**
4A-5	2.240	**5A-5**	**2.560**
$CMI_{Ajustada}$ WT = 2 240 mg/L			

4.2. Caracterización genotípica

Se realizó la secuenciación del genoma completo de 2 VR aisladas en distintas líneas del EEA (4A-4 y 5A-4), con el fin de identificar los genes responsables en el

aumento de resistencia. En la Tabla 2 se recogen las mutaciones identificadas en las cepas secuenciadas.

Tabla 2: Variaciones genéticas detectadas mediante secuenciación del genoma completo de las VR . SNV: variación de un único nucleótido. *Posición con respecto a la sección codificante del gen.

4A-4				
Genes	*folA*	*cheZ*	*rfbJ*	*corA*
Locus Tag	STM0087	STM1915	STM2089	STM3952
Mutación*	SNV: A461G	SNV: G115A	SNV: T831A	SNV: A224G
Cambio	GLU154GLY	Codón de *Stop* (GLN39)	LEU277PHE	HIS75ARG

5A-4			
Genes	STM0884	*corA*	*cpxR*
Locus Tag	STM0884	STM3952	STM4059
Mutación*	SNV: G556A	SNV: A224G	SNV: C533T
Cambio	ALA186THR	HIS75ARG	ARG178HIS

Una misma mutación en el gen *corA* fue identificada en ambas VR. Esta proteína está implicada en la captación y en la homeostasis del magnesio, fundamental para el metabolismo y la virulencia de la bacteria (12). La mutación afectó al dominio topológico del citoplasma.

En la VR 4A-4 se detectaron 3 mutaciones exclusivas. Las mutaciones en *folA* y *rfbJ*, relacionadas con el metabolismo, no afectaron a sitios de interés, por lo que no parecen responsables de la resistencia. El otro gen afectado, *cheZ*, está implicado en la movilidad bacteriana como respuesta a la exposición a gradientes químicos (13), la mutación produce un codón de *stop* prematuro que conllevaría la pérdida de la funcionalidad de la proteína. Estudios previos indican que la pérdida de movilidad se asocia al aumento de la resistencia a los antimicrobianos, al utilizar la energía almacenada en hacer frente al biocida (14).

En la VR 5A-4 se detectaron 2 mutaciones exclusivas. La mutación en el gen con el locus tag STM0884 no afecta a ningún dominio de interés, por lo que no parece responsable del aumento de resistencia. El otro gen afectado es *cpxR*, un regulador de sistema de respuesta frente al estrés que, al sufrir mutaciones, puede producir resistencia a antibióticos (15). La mutación afecta al dominio de los reguladores de la familia OmpR/PhoB, relacionados con la traducción de proteínas.

5. Conclusiones

Los resultados evidenciaron que, una exposición prolongada a dosis subinhibitorias de APDPD, permitía el aislamiento de VR. Además, el estudio genético y fenotípico identificó a *corA*, *cheZ* y *cpxR*, como los potenciales responsables del aumento de resistencia. No obstante, se desconocen las interacciones sinérgicas o compensatorias entre los distintos genes mutados.

Por ello, es necesario un estudio más profundo para comprender la relación entre la exposición a biocidas y la aparición de resistencias, con objeto de determinar el posible impacto en la Salud Pública.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PID2021-123404NB-I00 financiado por MICIU/ AEI/10.13039/501100011033 y por "FEDER Una manera de hacer Europa", que incluye la Ayuda PRE2022-102372 financiada por MICIU/AEI /10.13039/501100011033 y por "FSE invierte en tu futuro".

Grupo A06_23R AESA, financiado por Gobierno de Aragón.

REFERENCIAS

[1] European Food Safety Authority (EFSA), *EFSA J.,* **2023**, *21*, pp. 30-65.

[2] J.Y. Maillard y M. Pascoe, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2024**, *22*, pp.4-17.

[3] E.A. Oniciuc, E. Likotrafiti, A. Alvarez-Molina, M. Prieto, M. López y A. Alvarez-Ordóñez, *Curr. Opin. Food Sci.*, **2019**, *30*, pp. 14.

[4] B.M.P. Pereira y X.K. Wang, I. Tagkopoulos, *Front. Microbiol*., **2021**, *12*, pp. 12.

[5] N. Nordholt, O. Kanaris, S.B.I. Schmidt y F. Schreiber, *Nat. Commun.*, **2021**, *12*, pp. 13.

[6] J.M. Munita y C.A. Arias, *Microbiol. Spectr.*, **2016**, *4*, pp. 37.

[7] R. Gadea, M.A. Fernandez Fuentes, R. Perez Pulido, A. Galvez y E. Ortega, *Food Res. Int.*, **2016**, *85*, pp. 143.

[8] M.A. Webber, R.N. Whitehead, M. Mount, N.J. Loman, M.J. Pallen y L.J. Piddock, *J Antimicrob. Chemother.*, **2015**, *70*, pp. 2241-2248.

[9] Clinical and Laboratory Standards Institute, **2015**, CLSI DOCUMENT M07-A10.

[10] M.A. Kohanski, M.A. DePristo y J.J. Collins, *Mol. Cell*, **2010**; *37*, pp. 311-320.

[11] D. Berdejo, E. Pagán, N. Merino, D. García-Gonzalo y R. Pagán, "Detection and Enumeration of Bacteria, Yeast, Viruses, and Protozoan in Foods and Freshwater". (New York, NY: Springer US, 2021)

[12] K.M. Papp-Wallace y M.E. Maguire, *J. Bacteriol.*, **2008**, *190*, pp. 6509-6516.

[13] S.C. Kuo y D.E. Koshland, *J. Bacteriol.*, **1987**, *169*, pp. 1307-1314.

[14] E. Pagan, N. Merino, D. Berdejo, R. Campillo, E. Gayan, D. García-Gonzalo y R. Pagan, *Appl Microbiol. Biotechnol*., **2024**, *108*, pp. 38.

[15] W. Jing, J. Liu, S. Wu, X. Li y Y. Liu, *Front. Microbiol*., **2021**, *12*, pp. 12.

LA COMBINACIÓN DE ACEITES ESENCIALES NANOEMULSIONADOS Y CALOR REDUCE NOTABLEMENTE LA RESISTENCIA TÉRMICA DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN LECHE DE SOJA

Pastor C. [1], Somrani M. [1], Palop A. [1]

1 Dpto. de Ingeniería Agronómica, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena.

carmen.pastor@edu.upct.es ,mariem.somrani@edu.upct.es, alfredo.palop@upct.es

Resumen / Abstract

Los tratamientos térmicos constituyen una de las tecnologías de conservación más comunes para inactivar patógenos en los alimentos. Sin embargo, las industrias alimentarias deben minimizar la intensidad de estos tratamientos para mantener los atributos nutricionales y sensoriales de los alimentos, garantizando así productos de calidad para los consumidores. Los aceites esenciales (AEs) son conocidos por sus propiedades antimicrobianas, pero en la industria alimentaria presentan desafíos debido a su inmiscibilidad en agua y fuerte sabor y aroma. Las nanoemulsiones (NE) ofrecen una solución a estos problemas. Este trabajo investiga el efecto combinado del calor con nanoemulsiones de limón (NEL), naranja (NEO) y canela (NEC) sobre la inactivación de Listeria monocytogenes en leche de soja. Las NE se prepararon mediante ultrasonicación. Se determinaron las cinéticas de inactivación térmica de L. monocytogenes CECT 4032 en leche de soja, añadiendo o no 0.2 ml de NEL, NEO o NEC, en un termorresistómetro Mastia a 58ºC. Los resultados se compararon con los obtenidos previamente en medio de laboratorio (caldo de triptona de Soja, TSB). Las tres NE mostraron un notable efecto antibacteriano en TSB comparado con el control. La NEC redujo la resistencia térmica a la mitad, mientras que NEL y NEO destacaron al reducir la resistencia térmica de L. monocytogenes en aproximadamente 50 veces. Un efecto interesante se observó también en la leche de soja. Estos hallazgos revelan el gran potencial de las NE combinados con calor. Esta estrategia no solo promete reducir la intensidad de los tratamientos térmicos actuales en el procesado de alimentos, sino que también optimiza el uso y la integración de los AEs en la fase acuosa de los alimentos mediante su uso en forma de nanoemulsiones.

Palabras clave / Key words
Tratamiento térmico, aceites esenciales, nanoemulsiones, Listeria monocytogenes,

La inactivación térmica es uno de los métodos de conservación más comunes para inactivar patógenos, ya que ofrece un alto valor de seguridad y es económico. Sin embargo, en muchos alimentos los tratamientos pueden ocasionar un cambio en las propiedades organolépticas o en el contenido nutricional. Por lo que, debido a la alta demanda de los consumidores de productos de alta calidad, la industria alimentaria debe explorar métodos adicionales para bajar la intensidad del tratamiento térmico y a su vez, inactivar los posibles patógenos [1].

Uno de los métodos es el uso de aceites esenciales nanoemulsionados, ya que poseen excelentes propiedades antimicrobianas. El hecho de que los aceites esenciales (AEs) sean nanoemulsionados se presenta como una solución potencial a varios problemas que surgen a la hora de aplicarse a los alimentos. Estos problemas incluyen su inmiscibilidad en agua, lo que puede provocar una distribución desigual o sedimentación en el producto, asi como un sabor y aroma intensos, que pueden reducir la aceptación del producto y causar alteración con otros componentes [2]. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto combinado del calor con las nanoemulsiones de limón (NEL), naranja (NEO) y canela (NEC) sobre L. monocytogenes.

Para preparar las NE, se mezclaron 10 ml de tween 80 con el AE, propilenglicol y agua destilada. El equipo utilizado para preparar la NE fue el sonicador, gracias al cual obtuvimos las nanoemulsiones homogéneas y estables.

Para determinar el efecto combinado del calor con las NE, de las cuales se utilizaron 0,2 mL por cada tratamiento, se realizó el experimento en el termorresistómetro Mastia [3] a 58ºC, con el objetivo de inactivar L. monocytogenes CECT 4032 en caldo de triptona de soja (TSB) y, posteriormente, en leche de soja. El equipo (Figura 1) tiene un pequeño vaso con capacidad de medio litro, al que se añade el medio de calentamiento junto con el microorganismo a inocular. Antes de la inoculación del microorganismo, se programa el tratamiento térmico deseado, pudiendo establecer diferentes curvas según se requiera.

Figura 1: Termoresistómetro Mastia.

Para el proceso de inactivación, se rellenó el vaso del termoresistómetro con 400 ml del medio correspondiente. Con respecto al TSB, se esterilizó a 130ºC durante 3 minutos. En cuanto a la leche de soja, se calentó durante 15 segundos a 72ºC para eliminar la posible carga microbiana presente en el producto. Después, se programó la temperatura de tratamiento a 58ºC. Cuando la temperatura se estabilizó, se procedió a inyectar la correspondiente nanoemulsión y posteriormente se inoculó el medio de calentamiento con L. monocytogenes. El cultivo había sido preparado el día anterior tomando una colonia aislada e inoculándola en tubos con 5 ml de TSB, incubados a 37ºC durante 24 horas para alcanzar la fase estacionaria y una concentración aproximada de 10^9 UFC/mL. Las muestras se tomaron en intervalos de tiempo predefinidos para analizar la supervivencia de L. monocytogenes, siendo para el control cada 3 minutos hasta 30 como mínimo, y para el resto de los tratamientos cada 3 segundos. Se llevaron a cabo tres repeticiones de cada NE probada en TSB y leche de soja. Para finalizar el análisis microbiológico, las muestras recolectadas se sembraron en

placas de agar de triptona de soja (TSA) y se incubaron a 37ºC durante 24 horas para el recuento de colonias.

Los resultados de los experimentos fueron bastante favorables con respecto al control utilizando TSB. En la Figura 2 se presenta un tratamiento de control a 58ºC, donde se obtuvo un valor D de 3,93 minutos.

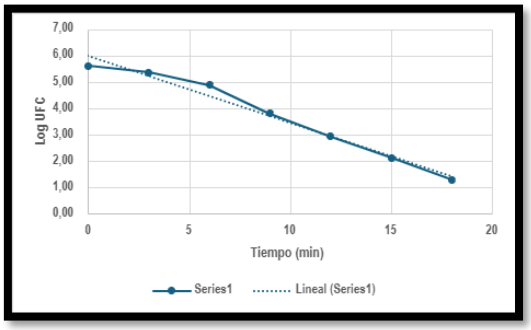


Figura 2: Curva de supervivencia de L. monocytogenes en el tratamiento control a 58ºC con TSB.

En la Figura 3 se observa un tratamiento térmico a 58ºC con la NEL, donde gracias al calor, se observó una reducción de L. monocytogenes, obteniéndose un valor D de 6 segundos.

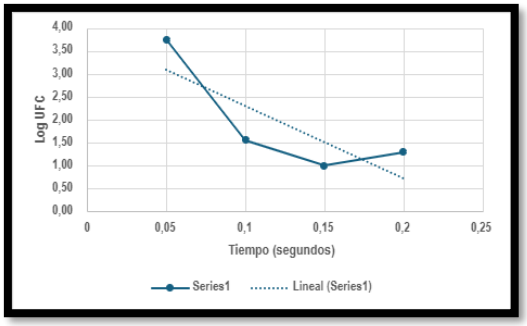


Figura 3: Curva de supervivencia de L. monocytogenes a 58ºC bajo el efecto del calor con NEL en TSB.

La adición de la NEL, NEO y NEC en los tratamientos mejoró significativamente la inactivación de L. monocytogenes en comparación con el tratamiento de control. Específicamente, las NEL y NEO mostraron el mayor efecto antimicrobiano, reduciendo la resistencia térmica de L. monocytogenes en aproximadamente 50 veces, mientras que con la adición de NEC logró una reducción de aproximadamente la mitad. Como resultado, la combinación de calor y de nanoemulsiones produjo un efecto sinérgico, resultando en una mayor inactivación de L. monocytogenes que el calor o las NE por separado.

Los tratamientos con leche de soja también mostraron un resultado interesante. En la Figura 4 se presenta un tratamiento control a 58ºC en leche de soja, con un valor D de 2,61 minutos, y un tratamiento térmico con NEC a 58ºC, donde se obtuvo un valor D de 1,95 minutos.

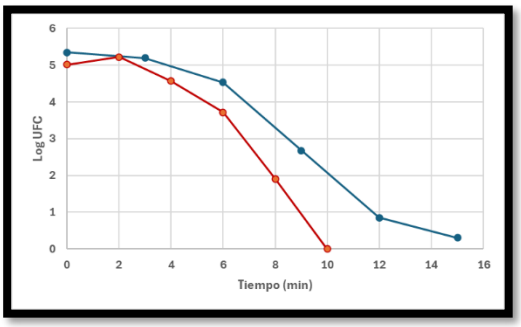


Figura 4: Curva de supervivencia de L. monocytogenes en el tratamiento de control (azul) y tratamiento con NEC (rojo) a 58ºC en leche de soja.

Hemos podido constatar que en leche de soja la reducción de L. monocytogenes no es tan efectiva como en TSB, sin embargo, se ha demostrado que el calor junto con las NE de AEs mejora la dispersión y disponibilidad de los compuestos microbianos, potenciando así la eficacia del tratamiento térmico, por lo que tendremos que seguir investigando más en detalle [4].

Como conclusión, la aplicación conjunta del calor y las NEL y NEO en los experimentos muestra un efecto antimicrobiano

significativo sobre el crecimiento de L. monocytogenes en TSB y leche de soja, aunque en menor medida, con la NEC. Estos resultados ofrecen una estrategia para que las empresas alimentarias puedan desarrollar productos de mayor calidad y seguridad, reduciendo la intensidad térmica de los tratamientos aplicados en la industria. Esto es especialmente relevante ya que cada vez más los consumidores prefieren productos con altas propiedades nutricionales y sensoriales de calidad.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Unidad de Microbiología y Seguridad Alimentaria de la Universidad Politécnica de Cartagena por la ayuda y por los equipos proporcionados durante la elaboración de mi máster.

REFERENCIAS

[1] D. Rodrigo, F. Sampedro, A. Silva, A. Palop & A. Martínez, British Food Journal, **2010**, Vol. 112, Nº 5, pp. 467-475.

[2] A. Garre, J.F. Espín, J.P. Huertas, P. M. Periago & A. Palop, Sci Rep**, 2020,** Vol.10, 3656.

[3] R.Conesa, S.Andreu, P.S. Fernández, A.Esnoz, & A. Palop, Journal of Applied Microbiology, **2009,** Vol.107, Nº2, pp. 506-513.

[4] I.M. Bodea, G.M. Catunescu, A. Palop, P.S. Fernández & A. Garré, LWT ciencia y tecnología de los alimentos, **2023**, Vol. 190, 115549.

¡LECHE CONTAMINADA! VALIDACIÓN DE UN MÉTODO INNOVADOR PARA DETECTAR Y EVALUAR EL POTENCIAL INFECCIOSO DEL VIRUS DE LA INFLUENZA A EN LECHE DE VACA

Puchades-Colera P.[1], Díaz-Reolid A.[1], Girón-Guzmán I.[1], Cuevas-Ferrando E.[1], Pérez-Cataluña A.[1], Sánchez G[1].

1. Virología Ambiental y Seguridad Alimentaria (VISAFELab), Departamento de Preservación y Tecnologías de Seguridad Alimentaria, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, IATA-CSIC, Av. Agustín Escardino 7, Paterna, 46980, Valencia, España

pablopc@iata.csic.es

Resumen

Los virus de la influenza A (IAV) representan una amenaza significativa para la salud humana y animal. Pese a las medidas de control, diferentes brotes continúan produciéndose con riesgo de transmisión zoonótica. Recientes brotes en vacas lecheras en EE. UU. de la variante H5N1 subrayan la necesidad de métodos efectivos de detección.
En este estudio, se evaluó el método de adsorción-precipitación por aluminio ($AlCl_3$) en diferentes tipos de leche (cruda, pasteurizada y UHT) para la detección de IAV. La extracción de ácidos nucleicos se realizó utilizando el equipo Maxwell® RSC con el kit Maxwell® RSC Pure Food GMO and Authentication (Promega) y la detección del ARN viral mediante RT-qPCR. Paralelamente, se optimizó un ensayo de viabilidad basado en agentes intercalantes (Propidio de monoazida (PMAxx), Cloruro de platino ($PtCl_4$) y Crosslinker (Promega)) en leche cruda y pasteurizada.
Las recuperaciones obtenidas con el método de adsorción-precipitación mostraron mayor variabilidad para el IAV en leche cruda que en leche pasteurizada. En cuanto al ensayo de viabilidad, el pretratamiento con Crosslinker redujo completamente la señal utilizando un fragmento de gen sintético, mientras que el $PtCl_4$ mostró los mejores resultados para el IAV (subtipo H3N2) en PBS y leche cruda. Además, se estableció el límite de detección ($LoD_{95\%}$) de IAV en leche cruda y pasteurizada, que fue de $2.3x10^5$ y $6.5x10^4$ copias genómicas (cg)/mL, respectivamente.
Como parte de futuras investigaciones, se optimizará el ensayo para evaluar el potencial infeccioso de las partículas virales (subtipo H5N1) en muestras de leche de vaca.

Palabras clave / Key words

Influenza A, leche cruda, leche pasteurizada, RT-qPCR, viabilidad

Los virus de la influenza A (IAV) representan una amenaza significativa para la salud humana y animal. Durante el último siglo, el IAV de alta patogenicidad ha causado, en las distintas olas de infección, la muerte de animales domésticos, aves salvajes y también mamíferos, indicando cambios en la dinámica de patogenicidad [1]. Dado su

potencial para saltar la barrera de especie y desencadenar epidemias, como la variante H5N1, su detección en la cadena alimentaria es crucial para garantizar la seguridad alimentaria y la salud pública. Pese a las medidas de control, diferentes brotes de IAV H5N1 continúan produciéndose a nivel global, con incremento en los eventos de recombinación y el riesgo de transmisión zoonótica. Recientes brotes en vacas lecheras en EE. UU. subrayan la necesidad de desarrollar métodos efectivos de detección en alimentos.

En este estudio, se evaluó el método de adsorción-precipitación por aluminio ($AlCl_3$) en diferentes tipos de leche (cruda, pasteurizada y UHT) inoculadas artificialmente con el subtipo de IAV H3N2 obtenida mediante cultivo celular en la línea MDCK. Además, también se inoculó y evaluó la recuperación del virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) y de mengovirus (MgV) en los diferentes tipos de leche. La extracción de ácidos nucleicos se realizó utilizando el equipo Maxwell® RSC con el kit Maxwell® RSC Pure Food GMO and Authentication (Promega). Además, se analizó el efecto de la adición de Plant RNA Isolation Aid (Thermofischer) en el protocolo de extracción. La detección del ARN viral se realizó mediante RT-qPCR utilizando el kit PrimeScript RT-PCR (Takara Bio Inc.) [2]. Paralelamente, se optimizó un ensayo de viabilidad para IAV basado en el uso de agentes intercalantes del ARN (Propidio de monoazida (PMAxx) [3], Cloruro de platino ($PtCl_4$) [4] y Crosslinker (Promega) [5]).

El $LoD_{95\%}$ de IAV en leche cruda y pasteurizada se evaluó inoculando diluciones seriadas (desde $1x10^7$ copias genómicas (cg)/mL hasta $1x10^4$ cg/mL) en 200 mL de leche. Cada experimento se realizó en triplicado y el límite de detección para cada una de las leches se calculó mediante el método descrito por Wilrich y Wilrich [6].

La adición de Plant RNA Isolation Aid no mejoró de forma significativa el proceso de extracción de ácidos nucleicos en ninguna leche evaluada. Las recuperaciones de IAV obtenidas con el método de adsorción-precipitación oscilaron entre 20,6 y 69,8%. Además, estas recuperaciones mostraron mayor variabilidad para IAV en leche cruda, con un coeficiente de variación (CV) de 37,2%, y menor en leche pasteurizada (CV de 18,7%). Las recuperaciones de PEDV fueron superiores en leche UHT (71,8%), mientras que en leche cruda fueron del 51% y la menor recuperación se observó en leche pasteurizada (41,5%). En cuanto a MgV, únicamente las recuperaciones en leche pasteurizada fueron superiores al 1% (1,20%) (Figura 1).

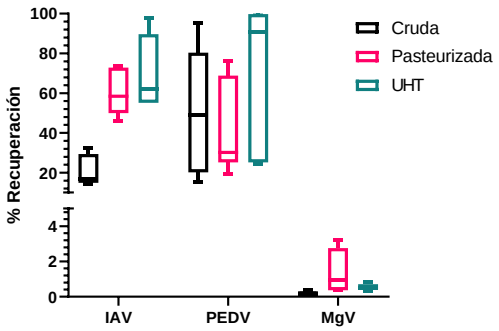


Figura 1: Porcentajes de recuperación de los diferentes virus analizados mediante el método adsorción-precipitación por $AlCl_3$ en leche cruda, pasteurizada y UHT (n=3). Abreviaturas: IAV, virus de la influenza A; PEDV, virus de la diarrea epidémica porcina; MgV, mengovirus.

En cuanto al ensayo de viabilidad en PBS, el pretratamiento con Crosslinker redujo completamente la señal utilizando el genoma sintético Twist Synthetic Influenza H1N1 RNA Control (Figura 2), mientras que

el $PtCl_4$ demostró los mejores resultados con la cepa de IAV (subtipo H3N2) (Figura 3).

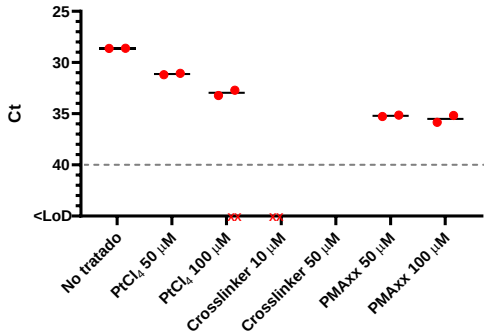


Figura 2: Resultados de RT-qPCR del Twist Synthetic Influenza H1N1 RNA Control tratado con distintos agentes intercarlantes. Abreviaturas: Ct, ciclo umbral; $PtCl_4$, cloruro de platino; PMAxx, propidio de monoazida.

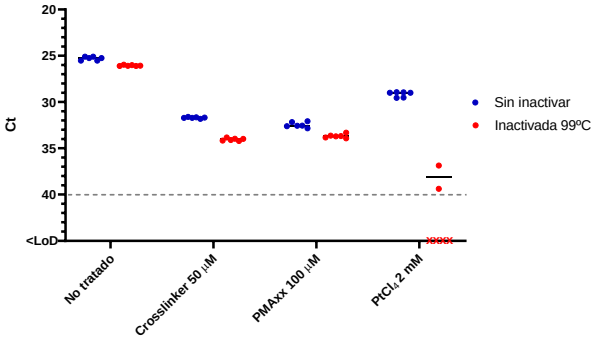


Figura 3: Resultados de RT-qPCR en PBS inoculado artificialmente con el subtipo de IAV H3N2 para cada uno de los agentes intercalantes analizados. Abreviaturas: Ct, ciclo umbral; $PtCl_4$, cloruro de platino; PMAxx, propidio de monoazida.

Además, tras comprobar el funcionamiento de los anteriores agentes intercalantes en leche sin diluir y leche diluida 1/5 y 1/10, donde el PMAxx no funcionó en ambos tipos de leche, se evaluó, finalmente, el agente intercalante $PtCl_4$ en leche pasteurizada y cruda sin diluir (Figura 4), mostrando que el pretratamiento en leche necesita ser optimizado.

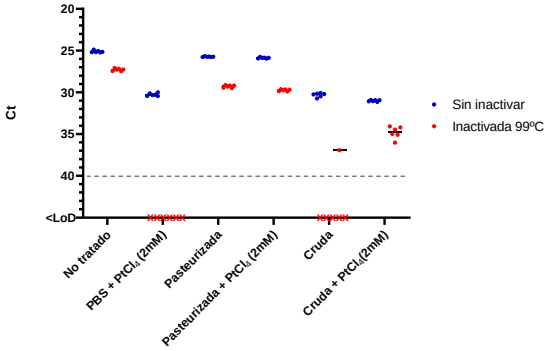


Figura 4: Resultados de RT-qPCR en PBS, leche cruda y pasteuritzada inoculada artificialmente con el subtipo IAV H3N2 para el agente intercalante $PtCl_4$. Abreviaturas: Ct, ciclo umbral; $PtCl_4$, cloruro de platino.

Por último, se calculó el límite de detección de IAV (subtipo H3N2) en leche cruda y pasteurizada, siendo de $2.3x10^5$ y $6.5x10^4$ cg/mL, respectivamente.

Este estudio demuestra la validez del método de adsorción-precipitación por $AlCl_3$ para la concentración y detección de IAV y otros virus en leche de vaca. Los resultados de los ensayos de viabilidad indican el potencial de estos tratamientos para evaluar la infectividad de IAV mediante métodos moleculares, aunque todavía necesitan optimizarse en matrices lácteas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece plenamente la Acreditación como Centro de Excelencia Severo Ochoa CEX2021-001189-S financiado por MICIU/AEI / 10.13039/501100011033. PP-C es beneficiario de una beca CEX2021-001189-S-20-9. IG-G es beneficiaria de un contrato predoctoral de la Generalitat Valenciana (ACIF/2021/181), EC-F es beneficiario de un contrato postdoctoral de la Convocatoria 2018 del MICINN (PRE2018-083753). AP-C es beneficiaria de la beca IJC2020-045382-I, financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033, y por la Unión Europea "NextGenerationEU/PRTR"

Los autores agradecen a Andrea López de Mota, Arianna Pérez Bruzco y Agustín Garrido Fernández por su soporte técnico.

REFERENCIAS

[1] Plaza PI, Gamarra-Toledo V, Euguí JR, Lambertucci SA. Recent Changes in Patterns of Mammal Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Virus Worldwide. *Emerg Infect Dis*. 2024;30(3):444-452. 10.3201/eid3003.231098

[2] Girón-Guzmán I, Cuevas-Ferrando E, Barranquero R, et al. Urban wastewater-based epidemiology for multi-viral pathogen surveillance in the Valencian region, Spain. *Water Res*. 2024;255:121463. doi:10.1016/j.watres.2024.121463

[3] Puchades-Colera P, Díaz-Reolid A, Girón-Guzmán I, Cuevas-Ferrando E, Pérez-Cataluña A, Sánchez G. Capsid Integrity Detection of Enteric Viruses in Reclaimed Waters. *Viruses*. 2024; 16(6):816. https://doi.org/10.3390/v16060816

[4] Cuevas-Ferrando E, Randazzo W, Pérez-Cataluña A, et al. Platinum chloride-based viability RT-qPCR for SARS-CoV-2 detection in complex samples. *Sci Rep*. 2021;11(1):18120. 10.1038/s41598-021-97700-x

[5] Wales SQ, Pandiscia A, Kulka M, Sanchez G, Randazzo W. Challenges for estimating human norovirus infectivity by viability RT-qPCR as compared to replication in human intestinal enteroids. *Int J Food Microbiol*. 2024;411:110507. 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110507

[6] Wilrich C, Wilrich PT. Estimation of the POD function and the LOD of a qualitative microbiological measurement method. *J AOAC Int*. 2009;92(6):1763-1772.

IMPACTO DEL TIPO DE PRODUCTO DE PANIFICACIÓN EN LA MICROBIOTA INTESTINAL

Luis Echevarría[1], Concepción Rodríguez-Jiménez[2], Luna Ballestero[2], Raquel Barbero[2], Esther Palacios[2], Mario Romero-Rivera[2], Natalia Bastón-Paz[2], Leónides Fernández[1], Ana Moreno Blanco[2,3], Rosa del Campo[2]

1 Departamento de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
2 Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, e IRYCIS, Madrid.
3 CIBERINFEC

rosacampo@yahoo.com

Resumen

La dieta es el principal modulador de la composición y el metabolismo de la microbiota intestinal, y por tanto, de la salud. Los productos de panificación continúan siendo una parte importante de la alimentación aunque cada vez aumenta más la población que rechaza el gluten por sus problemas de digestibilidad. La mayoría del pan que se consume actualmente no proviene de la fermentación de la masa madre tradicional, y por el momento se desconoce cómo afecta a la microbiota intestinal. Nuestra hipótesis es que las bacterias de la microbiota tienen un comportamiento diferencial entre un pan de masa madre o un pan con fermentación controlada (pan industrial). El objetivo fue determinar el comportamiento de bacterias comensales de la microbiota (Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterococcus faecium y Staphylococcus aureus), además de un patógeno como Clostridioides difficile, frente a diferentes productos panificables, incluyendo un pan con masa madre, un pan industrial, un pan sin gluten, un pan integral y un cruasán industrial. Se realizaron curvas de crecimiento de cada microorganismo en presencia de los productos panificables mediante microdilución, midiendo la densidad óptica a 600 nm cada 10 min durante 24 h. También se determinó la producción de ácidos grasos de cadena corta mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los microorganismos cultivados con los productos panificables durante 24 h. Los resultados mostraron diferencias en el crecimiento de las bacterias Gram negativas según el producto panificable, destacando el comportamiento de E. faecium, y el consumo de acético. La conclusión es que el proceso de panificación afecta considerablemente al crecimiento y metabolismo de la bacterias de la microbiota.

Abstract

*Diet is the main modulator of gut microbiota composition and metabolism, and thus of health. Bread products continue to be an important part of the diet, although more and more people are rejecting gluten because of digestibility problems. Most of the bread consumed today does not come from traditional sourdough fermentation, and how it affects the gut microbiota is currently unknown. We hypothesized that the microbiota bacteria behave differently between sourdough bread and bread with controlled fermentation (industrial bread). The aim was to determine the behavior of commensal microbiota bacteria (*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae,

Enterococcus faecium *and* Staphylococcus aureus*), as well as a pathogen such as* Clostridioides difficile*, against different bread products, including sourdough bread, industrial bread, gluten-free bread, wholemeal bread, and industrial croissant. Growth curves of each microorganism in the presence of the bread products were performed by microdilution, measuring the optical density at 600 nm every 10 min during 24 h. The production of short-chain fatty acids was also determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry of the microorganisms cultured with the bread products for 24 h. The results showed differences in the growth of Gram-negative bacteria according to the bread product. The results showed differences in the growth of Gram-negative bacteria according to the bread product, with E. faecium, and acetic acid consumption being the most important. The conclusion is that the baking process considerably affects the growth and metabolism of the microbiota bacteria.*

Palabras clave

Microbiota, Productos panificables, Ácidos grasos de cadena corta.

Keywords:

Microbiota, Bread products, Short-chain fatty acids.

Introducción

La microbiota intestinal es una comunidad compleja de microorganismos que incluye bacterias, hongos, arqueas y virus, que reside en simbiosis en el tracto intestinal. Desempeña un papel esencial en el metabolismo, la fisiología y el desarrollo del sistema inmunológico del huésped. Su composición se puede ver afectada por varios factores, entre los que destacan la genética del huésped, la edad, el uso de antibióticos y la dieta. Estos influyen directamente en la salud humana y en la potencial aparición de enfermedades (Gomaa, 2020).

Los cambios en la dieta alteran el metabolismo microbiano, favoreciendo a determinadas especies en función de los alimentos consumidos (Gentile & Weir, 2018). Los carbohidratos no digeribles de la dieta son fermentados por las bacterias de la microbiota intestinal mediante la fermentación sacarolítica, produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC). (Morrison & Preston, 2016). Los AGCC, como el acetato, el butirato y el propionato, desempeñan importantes funciones fisiológicas interviniendo en el metabolismo de lípidos y carbohidratos y la supresión de señales inflamatorias (Gentile & Weir, 2018).

Entre los alimentos más consumidos en la dieta destacan los productos panificables, que además tienen carbohidratos complejos. En España, el consumo anual per cápita de pan en 2022 fue de 27.94 kg, el de bollería y pastelería de 5,48 kg, y el de pan sin gluten de 0,62 kg (Ministerio de Agricultura, 2024).

Actualmente, la mayoría del pan actual no se elabora mediante la fermentación tradicional de masa madre, y su efecto sobre la microbiota intestinal no ha sido estudiado todavía en profundidad. Nuestra hipótesis es que las bacterias de la microbiota intestinal presentan un comportamiento distinto cuando se exponen a productos panificables obtenidos a partir de masa madre en comparación con aquellos producidos mediante fermentación controlada. Nuestro objetivo fue evaluar el crecimiento de bacterias comensales de la microbiota (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*) y la bacteria patógena *Clostridioides*

difficile, así como su producción de AGCC, en presencia de diferentes productos panificables.

Materiales y Métodos

Se seleccionaron cinco tipos de productos panificables para el estudio: cruasán, pan de masa madre, pan industrial, pan integral y pan sin gluten. El pan de masa madre fue producido y suministrado por la panadería "Marea Bread" (Madrid, España), y los demás productos panificables fueron adquiridos en supermercados. Para la preparación de los extractos, se mezclaron 10 g de cada producto con 80 mL de caldo Müller-Hinton, se homogeneizaron en un Stomacher (Stomacher®400 Circulator) y se alicuotaron. Las muestras se centrifugaron, utilizando únicamente el sobrenadante obtenido.

Cultivos bacterianos

Las especies utilizadas fueron cepas de origen clínico de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecium*, *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *C. difficile*. Se cultivaron en aerobiosis en medio agar sangre a 37ºC durante 24 h, excepto *Clostridioides difficile*, que se incubó en condiciones de anaerobiosis durante 48 h.

Cinética del crecimiento bacteriano

Las curvas de crecimiento de las bacterias comensales se realizaron mediante microdilución y el crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm cada 20 min durante 24 h (TECAN).

Producción de AGCC. Se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Las alícuotas se obtuvieron de los cultivos bacterianos crecidos con cada producto panificable durante 24 h en aerobiosis y en anaerobiosis para las bacterias comensales y durante 48 h en anaerobiosis para *C. difficile*. Se utilizó ácido butírico deuterado D7 como control interno y helio como gas portador. Los datos de GC-MS se adquirieron en modo de exploración SIM utilizando un cromatógrafo de gases TRACE 1600/1610 con un detector selectivo de masas ISQ7610 (Thermo Fisher Scientific) equipado con una columna para GC TG-WaxMS A (15 m × 0,32 mm × 0,25 µm, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania). Los datos se adquirieron y analizaron con el software Chromeleon 7.

Secuenciación

El ADN genómico de la masa madre se obtuvo mediante el kit de extracción de ADN (Qiagen), y se secuenció mediante técnica de shotgun en la plataforma MiSeq (Illumina). Los resultados se analizaron utilizando el software SqueezeMeta. Antes de cargar las secuencias, fueron sometidas a un control de calidad utilizando FastQC y los resultados fueron agrupados utilizando MultiQC. Para el filtrado de las lecturas generadas, se utilizó la herramienta FastP.

Resultados

La masa madre estaba compuesta por *Fructilactobacillus sanfranciscensis, Serratia grimesii*, *Pseudomonas protegens*, y *Saccharomyces cerevisiae*

Las curvas de crecimiento muestran que las bacterias Gram negativas (*E. coli* y *K. pneumoniae*) presentan un patrón de crecimiento similar con los diferentes productos panificables. Sin embargo, las bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *E. faecium*) crecen significativamente antes en presencia de todos los productos, destacando especialmente *E. faecium.* Además, el producto panificable potencia más el crecimiento bacteriano es el cruasán (Figura 1).

Los AGCC se detectaron en muy bajas proporciones excepto el ácido acético (Figura 2), existiendo también importantes diferencias según los cultivos tuvieran condiciones de aero o anaerobiosis. El pan industrial tenía muy poca cantidad de acético al inicio, pero los microorganismos lo pudieron fermentar, especialmente *C. difficile*, que fue

el microorganismo con mayor síntesis de acetato.

Discusión

F. sanfranciscensis es una bacteria ácido-láctica heterofermentativa predominante en las masas madre de centeno y trigo, lo que concuerda con los resultados obtenidos. Esta bacteria se caracteriza por una gran actividad proteolítica, lo que le permite una hidrólisis casi completa de las fracciones de gliadina del trigo, una proteína presente en el gluten e implicada en la enfermedad celíaca. Esto la convierte a *F. sanfranciscensis* en una opción para la producción de productos panificables aptos para celíacos y personas con intolerancia al gluten (Yazar & Tavman, 2012).

Las diferencias en la cinética de crecimiento de las bacterias Gram positivas y las Gram negativas en cada uno de los productos panificables ensayados pueden ser debidas a sus estructuras celulares distintas. La presencia de la membrana externa en las bacterias Gram negativas podría permitirles crecer uniformemente en los diferentes medios, aprovechando los nutrientes de manera eficiente sin verse afectados por los componentes específicos de cada producto panificable. En cambio, las bacterias Gram positivas, que presentan una capa gruesa de peptidoglicano y carecen de una membrana externa, podrían absorber mejor los nutrientes disponibles en los productos panificables (Silhavy *et al*., 2010). El mayor crecimiento en presencia de cruasán con las bacterias Gram positivas puede ser debido al elevado contenido de grasas y azúcares de este alimento, lo que puede proporcionar una fuente de energía rápida para estas bacterias.

La producción de AGCC por los microorganismos estudiados no es elevada, si bien en condiciones de anaerobiosis aumenta especialmente la de acetato. Las bacterias Gram positivas consumen acetato del medio de cultivo. *C. difficile* se postula como un potente sintetizador de acetato cuando está expuesto a todos los productos panificables ensayados.

Conclusiones

El tipo de producto panificable tiene un impacto en la microbiota, tanto por su contenido en grasa como en carbohidratos complejos, y este impacto es mayor en las bacterias Gram positivas, ya que retrasa su crecimiento. La producción de AGCC no ha sido destacable, excepto para *C. difficile* que mostró capacidad de producir acetato a partir de todos los productos ensayados. El resto de microorganismos, parecen no producir e incluso consumir, el acetato presente en el medio durante su crecimiento, especialmente los Gram positivos.

AGRADECIMIENTOS

A Marea Bread y Fernando Josa por cedernos la masa madre y los panes fermentados con ella, a Jorge Pastor por ser nuestro maestro.

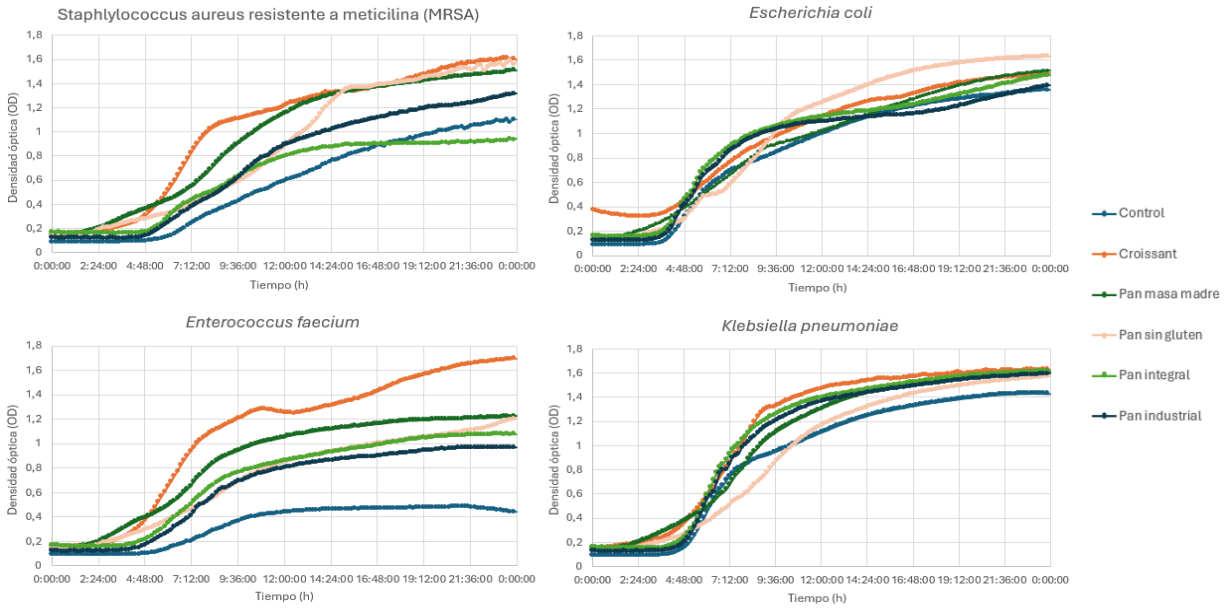


Figura 1. Curvas de crecimiento de los distintos microorganismos seleccionados como representativos de la microbiota intestinal en función de los diferentes productos panificables.

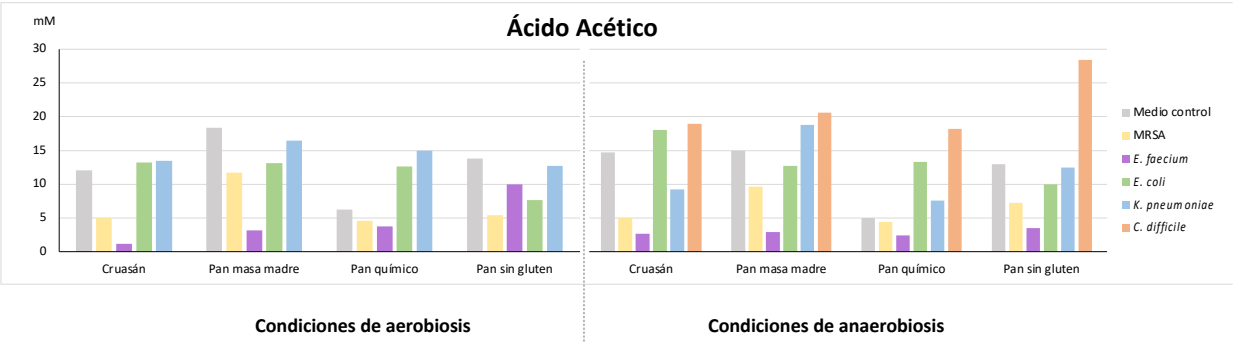


Figura 2. Niveles de ácido acético detectado en el cultivo de los diferentes microorganismos tras 24 h de cultivo y en condiciones de cultivo de aerobiosis y anaerobiosis.

REFERENCIAS

Gentile, C. L., & Weir, T. L. (2018). The gut microbiota at the intersection of diet and human health. Science, 362(6416), 776–780. https://doi.org/10.1126/science.aau5812.

Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, *113*(12), 2019–2040. https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7.

Ministerio de Agricultura, P. y A. (2024). *Informe del Consumo Alimentario en España 2023*.

Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, *7*(3), 189–200. https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082.

Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(5), a000414–a000414.https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414.

Yazar, G., & Tavman, Ş. (2012). Functional and Technological Aspects of Sourdough Fermentation

with Lactobacillus sanfranciscensis. *Food Engineering Reviews*, *4*(3), 171–190. https://doi.org/10.1007/s12393-012-9052-1

FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA DE SUEROS PROCEDENTES DE QUESERÍAS ASTURIANAS PARA LA BÚSQUEDA DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Felipe González González[1], Xenia Vázquez Sánchez[1], Carlos Sabater Sánchez[1], Abelardo Margolles Barros[1], Patricia Ruas Madiedo[1]

1 Grupo Funcionalidad y Ecología de Microorganismos Beneficiosos (MICROHEALTH). Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC).

ruas-madiedo@ipla.csic.es

Resumen / Abstract

La producción quesera es una de las más importantes actividades de la industria láctea y el suero es su principal subproducto. Aunque tradicionalmente era considerado un residuo, su rica composición en nutrientes, junto con las actuales tendencias de economía circular, lo convierten en un sustrato adecuado para su valorización. En este sentido, la búsqueda de bacterias con alto potencial biotecnológico para la generación de ingredientes funcionales a partir de suero lácteo puede favorecer el desarrollo de alimentos o suplementos alimentarios con beneficios para la salud. En este trabajo pretendemos caracterizar la microbiota presente en suero lácteo dulce, obtenido a partir de leche cruda de distintas procedencias y fermentado espontáneamente, para generar una colección de bacterias con el objetivo de identificar aquellas más proteolíticas y, previsiblemente, con mayor capacidad para la generación de péptidos bioactivos.

Palabras clave / Key words

Suero lácteo, bacterias lácticas, proteólisis, análisis metataxonómico / whey, lactic acid bacteria, proteolysis, metataxonomic analysis

Durante el desarrollo de este trabajo se visitaron 7 queserías artesanales, en dos épocas del año distantes, seleccionadas en función del tipo de leche (vaca, oveja y/o cabra) que utilizan y de su altitud. Para obtener el suero, la leche cruda se coaguló con cuajo y se separó de la cuajada cortada, recolectándose 26 muestra de suero (12 vaca, 10 cabra y 4 oveja). Tras la recogida de una muestra basal, el resto se fermentó espontáneamente a cuatro temperaturas (25, 32, 37 y 42°C), por lo que finalmente se generaron 130 muestras de suero. Se emplearon diferentes medios de cultivo para el recuento, aislamiento y generación de una colección de bacterias que se identificaron mediante secuenciación parcial del gen del ARN ribosomal 16S. De la colección de 420 aislados, se realizó un escrutinio para clasificar su capacidad proteolítica empleando como método cuantitativo el ensayo o-ftalaldehído (OPA). Sólo se analizaron las bacterias lácticas (BAL) y corinebacterias por su habitual presencia en quesos fermentados [1]. Por

otro lado, se procedió a la purificación del ADN de las muestras de suero para llevar a cabo un análisis metataxonómico, tras secuenciación del gen ARNr 16S y, al igual que con la colección de bacterias generada, se cuantificó el nivel de proteólisis por el método OPA. Se observaron diferencias en la composición de los sueros basales de los 3 rumiantes, con mayor presencia de BAL en las muestras de vaca y cabra y de coliformes en oveja, detectados por análisis metataxonómico (**Tabla 1**) y mediante el cultivo en medios selectivos. La fermentación espontánea a distintas temperaturas modificó las abundancias relativas, destacando el aumento de los géneros *Lactococcus* a 25 y 32° C y *Streptococcus*, *Lactobacillus* y coliformes a 37 y 42° C, aunque a estas temperaturas se aislaron más *Enterococcus* debido a la tolerancia de este género a las altas temperaturas [2].

Tabla 2. Abundancias relativas bacterianas (porcentajes) obtenidas mediante análisis metataxonómico. Se muestran los datos de las muestras basales y de las fermentaciones espontáneas a 25, 32, 37 y 42°C.

Cow	Abundancia relativa basal	Abundancia relativa 25°C	Abundancia relativa 32°C	Abundancia relativa 37°C	Abundancia relativa 42°C
Staphylococcus	15,80	3,91	3,97	4,84	4,50
Pseudomonas	24,72	1,99	1,93	0,32	0,15
Lactococcus	37,78	84,84	82,50	54,70	11,07
Streptococcus	18,53	5,69	5,82	20,54	54,40
Escherichia-Shigella	0,74	2,99	4,74	15,71	23,46
Enterococcus	2,42	0,58	1,04	3,90	6,42
Other	0	-1,2919E-15	0	2,58379E-15	2,58379E-15
Goat					
Staphylococcus	38,15	8,16	7,76	9,29	13,11
Pseudomonas	21,22	6,04	5,92	0,41	0,18
Lactococcus	37,75	73,02	73,51	35,10	11,22
Streptococcus	1,00	3,27	3,91	43,45	45,78
Escherichia-Shigella	0,73	8,94	8,41	11,02	24,28
Other	1,15	0,58	0,48	0,74	5,42
Sheep					
Staphylococcus	46,15	3,29	3,86	3,36	4,48
Pseudomonas	15,98	0,61	0,31	0,33	0,09
Other	1,67	0,11	0,30	0,19	0,42
Lactococcus	12,30	56,44	44,76	7,47	1,10
Escherichia-Shigella	23,24	36,97	42,99	52,81	48,31
Streptococcus	0,66	2,58	7,77	35,84	45,61

Tras la identificación de los 420 aislados, se analizó la actividad proteolítica de 162 BAL entre los que se encuentran (ordenados por mayor número de aislados obtenidos) *Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Lactobacillus* y *Leuconsotoc*, además de 2 corinebacterias. El método OPA de cuantificación de grupos amino permitió establecer una clasificación de los aislados ensayados en función de su nivel de proteólisis. La **Tabla 2** muestra los 10 aislados con mayor actividad proteolítica en leche.

Tabla 3. Aislados con mayor actividad proteolítica ordenados en orden decreciente. En negrita se muestran los datos de los controles utilizados.

STOCK	AISLADO	OPA (mM)
BC44	*Enterococcus faecalis*	62,56
BC42	*Corynebacterium glutamicum*	31,99
LCOC10 37°C	*Enterococcus sp.*	19,00
Tripsinizado leche	**Tripsinizado leche**	**18,59**
LCV36	*Streptococcus thermophilus*	8,18
SCV3	*Lactococcus lactis subsp. cremoris*	7,63
LCDCV2	*Lactococcus lactis*	6,81
LCDCC24	*Lactococcus lactis/L. lactis subsp. cremoris/L. lactis subsp. lactis*	5,81
LCOC16	*Lactiplantibacillus plantarum*	5,62
BC35	*Leuconostoc mesenteroides*	5,13
VCV49	*Lactobacillus paracasei/casei*	4,97
Tripsinizado suero 1,2%	**Tripsinizado suero 1,2%**	**2,99**
Leche	**Leche**	**0,78**

Enterococcus faecalis destacó como la especie más proteolítica [3], mientras que la actividad proteolítica de aislados de otras especies utilizadas habitualmente en cultivos iniciadores o adjuntos fue menor.

El análisis de la proteólisis de los sueros reveló que existe una correlación positiva entre los sueros fermentados que alcanzaron un pH más bajo y un mayor nivel de proteólisis cuantificado por el método OPA (**Figura 1).** Esto indicaría que las BAL responsables de la bajada del pH por la producción de ácido y capaces de sobrevivir en esas condiciones serían las responsables de la actividad proteolítica [4], algo que correlaciona perfectamente con los resultados mostrados en la **Tabla 2**.

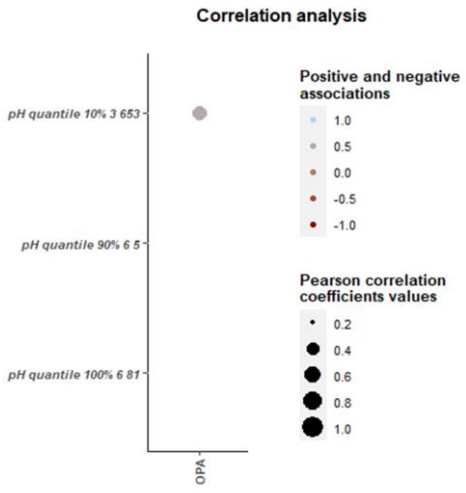


Figura 1: Resultados de análisis de correlación de Pearson representados como mapa de calor.

Como era de esperar, la fermentación espontánea de los sueros dulces favoreció la selección de las bacterias de la microbiota natural con mejor adaptación a la temperatura de fermentación. Entre las bacterias aisladas e identificadas de estas fermentaciones se han obtenido cepas con alta capacidad proteolítica, cuyos genomas se están secuenciando para analizar su potencial para generar péptidos del lactosuero con actividad biológica que favorezcan su revalorización.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto PID2021-127362OB-I00 (MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 y por "ERDF A way of making Europe"). F. González agradece su contrato predoctoral BP20-082 al Gobierno del Principado de Asturias. X. Vázquez agradece su contrato postdoctoral ITM-POSTDOC-23-05 al ISPA. C. Sabater agradece su contrato FJC2019-042125-I (MCIN/AEI). Agradecemos la colaboración desinteresada de los queseros y queseras de Asturias.

REFERENCIAS

[1] C Monnet, V Loux, P Bento, J F Gibrat, C Straub, P Bonnarme, S Landaud, F Irlinger, *J Bacteriol*, **2012**, 194(3), 738-739.

[2] S Delgado, C T C C Rachid, E Fernández, T Rychlik, A Alegría, R S Peixoto, B Mayo, *Food Microbiol*, **2013**, 36(1), 103–111.

[3] A Baran, H Nadaroğlu, H Önem, M Adıgüzel, *J Hellenic Vet Med Soc*, **2022**, *72 (4)*, 3391-3400.

[4] P Šipošová, M Koňuchová, Ľ Valík, A Medveďová, *Food Sci Technol Int*, **2021**, 27(6), 572–582.

ESTUDIO DE INACTIVACIÓN DE NOROVIRUS HUMANO EN PURÉ DE FRESAS MEDIANTE ENTEROIDES INTESTINALES HUMANOS Y MODELIZACIÓN PREDICTIVA

Annamaria Pandiscia[1,2], Irene Falcó[1,3], Valentina Terio[2], Antonio Martinez[1], Gloria Sanchez[1], Dolores Rodrigo[1], Walter Randazzo[1]

[1] Departamento de Tecnologías de Conservación y Seguridad Alimentaria, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los alimentos, IATA-CSIC, Avda. Catedrático Agustín Escardino 7, Valencia, Paterna 46980, España.
[2] Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad de Bari, Camino Provincial a Casamassima, Valenzano, 70010, Italia.
[3] Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de Valencia, Av. Dr. Moliner, 50, Burjassot, 46100, Valencia, España.

annamaria.pandiscia@uniba.it; wrandazzo@iata.csic.es.

RESUMEN

El consumo de fresas contaminadas por norovirus humano (HuNoV) ha sido asociado a brotes de gastroenteritis aguda. Los tratamientos no térmicos, como el procesado mediante altas presiones hidrostáticas (HPP), representan tecnologías capaces de inactivar microrganismos patógenos y, además, preservar las propiedades organolépticas de las fresas y de sus productos derivados. El estudio se ha centrado en evaluar el efecto de HPP modulando los parámetros operativos de presión (350-450 MPa) y tiempo (0-10 min) en puré de fresa inoculado con HuNoV genogrupo I (GI.3[P13]) y II (GII.4 Sydney [P16]), junto con norovirus murino (MNV) y el virus Tulane (TV) empleados como modelos cultivables. La inactivación viral se evaluó mediante (i) cultivo celular empleando el nuevo modelo de enteroides intestinales humanos (HIE) para HuNoV, y las líneas celulares RAW 264.7 y LCC-MK2 para los modelos cultivables; (ii) RT-qPCR y (iii) RT-qPCR de viabilidad con tres agentes intercalantes (CL, PMAxx y $PtCl_4$). Los resultados de infectividad mostraron que el TV es más resistente que el MNV a los tratamientos de HPP, como confirmó la modelización de la cinética de inactivación. Además, el HuNoV GI.3 [P13] resultó más resistente que el GII.4 Sydney [P16]. Por lo tanto, TV, pero no MNV, imita los patrones de inactivación de HuNoV GII.4 Sydney [P16]. Por lo tanto, el estudio ha demostrado que un tratamiento a presión de 450 MPa superior a 5 min es suficiente para controlar la contaminación vírica en puré de fresas. También, se demostró que la RT-qPCR de viabilidad es un método mejorado con respecto a la RT-qPCR para estimar la inactivación viral en condiciones extremas (450 MPa), pero no en los tratamientos a menor presión. Finalmente, se ha demostrado que el modelo HIE proporciona información robusta sobre la inactivación de patógenos víricos humanos como el HuNoV. El modelo HIE por lo tanto puede ser utilizado para validar la eficacia de los tratamientos de inactivación y así garantizar la protección de la salud pública.

Palabras clave:

Enteroides intestinales humanos; Cultivo celular; Seguridad alimentaria; Patógenos virales.

INTRODUCCIÓN

Las fresas frescas y congeladas han sido involucradas en varias ocasiones en brotes de gastroenteritis aguda causados por norovirus humano (HuNoV), representando una grave amenaza para la salud pública [1]. Los métodos de procesamiento térmico pueden prevenir riesgos microbianos, pero afectan significativamente la calidad nutricional y sensorial de los alimentos [2]. El procesado por alta presión hidrostática (HPP) representa una alternativa ya que no afecta significativamente las propiedades físicas, apariencia visual, aroma, color y aceptabilidad general por lo que podría aplicarse en fresas o productos derivados como el puré de fresa [3,4]. Varios estudios han demostrado la efectividad de HPP frente a bacterias patógenas en diferentes alimentos, aunque la eficacia frente a HuNoV infeccioso no se ha investigado debido a las dificultades que presenta su cultivo. Por ello, las aproximaciones disponibles hasta la fecha se basan en el uso de métodos moleculares (como la RT-qPCR) o modelos cultivables, como el norovirus murino (MNV) y el virus Tulane (TV)[5]. También, se han utilizado técnicas para estudiar la integridad de la cápside asociada al potencial infeccioso del patógeno (RT-qPCR de viabilidad) [6].

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la eficacia de HPP a diferentes combinaciones de presión (300, 400 y 450 MPa) y tiempo de exposición sobre la infectividad de MNV, TV y HuNoV en puré de fresas utilizando métodos de cultivo celular. En paralelo, se utilizaron técnicas basadas en RT-qPCR de viabilidad con tres agentes intercalantes (CL, PMAxx y $PtCl_4$). Además, el conjunto de datos resultante se utilizó para elaborar modelos matemáticos y definir las constantes cinéticas de inactivación para desarrollar procesos HPP adecuados para el control de la contaminación por HuNoV en puré de fresas.

MATERIALES Y METODOS

Los purés fueron obtenidos a partir de fresas frescas compradas en un supermercado local utilizando una batidora eléctrica.

Los tratamientos de HPP se realizaron en una unidad de escala piloto (EPSI NV, Bélgica) con una presión de funcionamiento de 600 MPa, un volumen de la cámara de 2,35 L, y una temperatura constante de 22±1 °C. El fluido de transmisión de presión era una mezcla de agua y etilenglicol (70:30, v:v). Después de completar los tratamientos, las muestras se conservaron a -80 °C. Se utilizó una suspensión de virus en PBS como control. La inactivación cinética de MNV, TV, HuNoV GI.3[P13] y GII.4 Sydney [P16] en PBS y puré de fresas se investigó a 350, 400, y 450 MPa para distintos tiempos de presurización. El MNV y TV se propagaron y ensayaron respectivamente en células RAW 264.7 y LLC-MK2 para determinar las concentraciones mediante el ensayo de dosis infecciosa de cultivo celular 50% ($TCID_{50}$). También, se determinó la inactivación de HuNoV GI.3 [P13] y GII.4 Sydney [P16] utilizando el modelo de enteroides intestinales humanos (HIE). Para ello, se determinó la concentración de RNA de HuNoV a 1 hora postinfección (hpi) y 48 hpi por RT-qPCR para evaluar la replicación viral. Para las RT-qPCR de viabilidad se utilizaron el PMAxx (Biotinum), el cloruro de platino (IV) ($PtCl_4$; Acros Organics) y el Kit Crosslinker (CL; Promega) como agentes intercalantes. Finalmente, se utilizaron los resultados obtenidos para MNV y TV en purés de fresas expuestos a HPP para hacer modelos predictivos de HuNoV GII.4 [P16]. Para ello, se evaluó el ajuste de la función de distribución de Weibull a los datos

experimentales transformados en log_{10} utilizando el software GInaFiT (Geeraerd, Valdramidis, & Van Impe, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cinética de inactivación del HuNoV infeccioso y los virus modelos expuestos a diferentes tratamientos de HPP mostraron que la matriz (PBS vs puré de fresa), presión (350, 400 o 450 MPa) y el tiempo de exposición fueron variables significativas para explicar las diferencias observadas en la inactivación de cada virus (Figura 1). El tratamiento con HPP a 450 MPa resultó en la inactivación completa del MNV en 1 min, y del TV y HuNoV GII.4 Sydney [P16] en 5 min, tanto en PBS como en puré de fresa. La única excepción se observó en puré de fresa inoculado con MNV, donde el virus se inactivó tras 2,5 min de tratamiento. Respecto a HuNoV GI.3 [P13], los datos de inactivación a 450 MPa resultaron discrepantes. Se observó un efecto baroprotectivo de la matriz de fresa, ya que los virus infecciosos se detectaron en el puré, pero no en PBS para varias combinaciones de exposición al tiempo y a la presión (Figura 1).

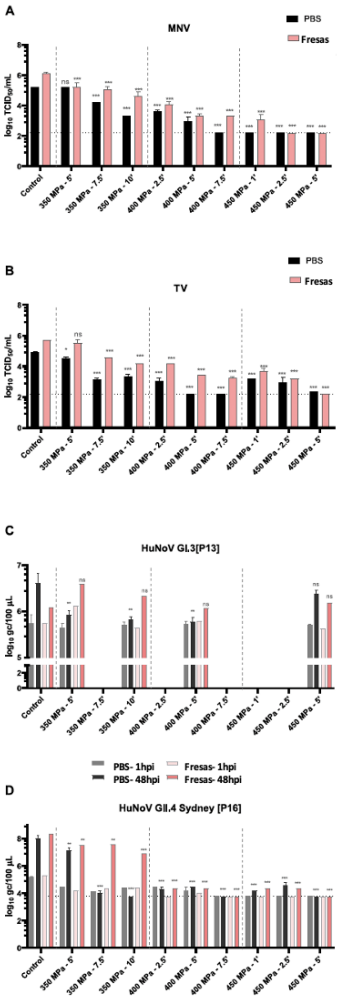


Figura 1: Inactivación del MNV (Panel A), TV (Panel B), HuNoV GI.3[P13] (Panel C) y HuNoV GII.4 Sydney [P16] (Panel D) por altas presiones en PBS y pure de fresa determinado por cultivo celular ($TCID_{50}$ para modelos o aumento de RNA viral en HIE para HuNoV). Las barras de error indican ETS. Asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los controles de PBS o de puré no tratados: ***p < 0,001; **p < 0,01; ns, diferencia no significativa; la línea discontinua indica el límite de cuantificación de los ensayos $TCID_{50}$ (MNV y TV) o HIE/RT-qPCR (HuNoV).

Los datos de infectividad de MNV y TV en purés de fresa fueron modelados.

Entre todos los modelos probados, la función de distribución de Weibull mostró el mejor ajuste para las curvas de supervivencia de MNV y TV a la presión probada.

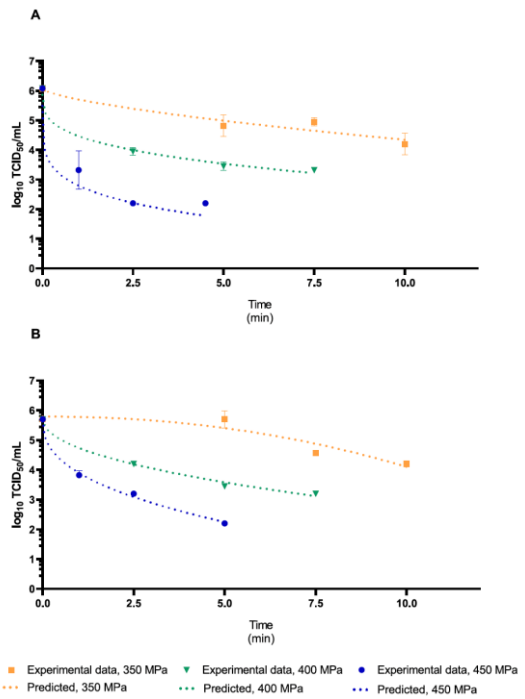


Figura 2: Inactivación del MNV (A) y TV (B) en puré de fresa tratado con HPP a 350, 400 y 450 MPa en comparación con la función de supervivencia de Weibull

Este estudio demuestra que el modelo HIE puede utilizarse para evaluar la eficacia de la HPP, frente a HuNoV en una matriz alimentaria compleja de alto riesgo (por ejemplo, puré de fresa). Anteriormente, se reportó la inactivación del HuNoV.4 GII Sydney infeccioso [P16] en suspensiones expuestas a HPP [7]. Nuestro estudio amplía el conocimiento sobre la reducción de la infectividad del HuNoV GI.3[P13], HuNoV.4 GII Sydney [P16], MNV y TV mediante el uso de HPP en varias condiciones de presión y tiempo de exposición, tanto en PBS como en puré de fresa. Asimismo, la estimación de la infectividad viral mediante RT-qPCR de viabilidad empleando los agentes intercalantes CL y PMAxx resultó útil para evaluar la inactivación en tratamientos de HPP extremos, pero no en condiciones subletales.

Los resultados de este estudio demuestran también que los modelos predictivos basados en la inactivación de MNV y TV y validación con datos experimentales de infectividad del HuNoV en el modelo HIE pueden utilizarse para definir combinaciones de presión/tiempo para el control del riesgo asociado al consumo de puré de fresas contaminado por HuNoV.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer al Prof. Javier Buesa (Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España) por facilitar muestras fecales positivas para norovirus humano.

REFERENCIAS

1. Bozkurt, H.; Phan-Thien, K.Y.; van Ogtrop, F.; Bell, T.; McConchie, R. Outbreaks, Occurrence, and Control of Norovirus and Hepatitis a Virus Contamination in Berries: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2021**, *61*, 116–138, doi:10.1080/10408398.2020.1719383.

2. Aadil, R.M.; Madni, G.M.; Roobab, U.; Rahman, U. ur; Zeng, X.-A. Quality Control in Beverage Production: An Overview. In *Quality Control in the Beverage Industry*; Elsevier, **2019;** pp. 1–38., doi:10.1016/B978-0-12-816681-9.00001-1

3. Huang, Y.; Ye, M.; Chen, H. Inactivation of Escherichia Coli O157:H7 and Salmonella Spp. in Strawberry Puree by High Hydrostatic Pressure with/without Subsequent Frozen Storage. *Int J Food Microbiol* **2013**, *160*, 337–343, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.008.

4. Huang, Y.; Ye, M.; Chen, H. Inactivation of Escherichia Coli O157:H7 and Salmonella Spp. in Strawberry Puree by High Hydrostatic Pressure with/without Subsequent Frozen Storage. *Int J Food Microbiol* **2013**, *160*, 337–343, doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2012.11.008.

5. Pandiscia, A.; Falcó, I.; Terio, V.; Martínez, A.; Sánchez, G.; Rodrigo, D.; Randazzo, W. Survival Modelling of Infectious Human Norovirus and Surrogates for High-Pressure Inactivation in Strawberry Puree. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2024**, *94*, 103702, doi:10.1016/j.ifset.2024.103702.

6. Chen, J.; Wu, X.; Sánchez, G.; Randazzo, W. Viability RT-QPCR to Detect Potentially Infectious

Enteric Viruses on Heat-Processed Berries. *Food Control* **2020**, *107*, 106818, doi:10.1016/j.foodcont.2019.106818.

7. Falcó, I.; Randazzo, W.; Pérez, A.; Martínez, A.; Rodrigo, D.; Sánchez, G. High Pressure Treatment and Green Tea Extract Synergistically Control Enteric Virus Contamination in Beverages. *Food Control* **2023**, *144*, 109384, doi:10.1016/J.FOODCONT.2022.109384.

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE ORIGEN VEGETAL Y UTILIZACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE HARINAS FERMENTADAS PREBIÓTICAS

Inés Calvete-Torre[1,2], Ana Isabel Díaz[1,2], Paula López[3], Carlos Sabater[1,2], Xenia Vázquez[1,2], Javier Moreno[3], Abelardo Margolles[1,2], Antonia Montilla[3], Lorena Ruiz[1,2]

1 Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300, Villaviciosa, Asturias, España.
2 Grupo de Funcionalidad y Ecología de Microorganismos Beneficiosos (MicroHealth), Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Asturias, España.
3 Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM) CEI (CSIC+UAM), Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, España.

ines.calvete@ipla.csic.es; p.lopez.revenga@csic.es; carlos.sabater@ipla.csic.es; anaisabel.diaz@ipla.csic.es; xenia.vazquez@ipla.csic.es; javier.moreno@csic.es; amargolles@ipla.csic.es; a.montilla@csic.es; mailto:lorena.ruiz@ipla.csic.es

Resumen / Abstract

Las hemicelulosas son polisacáridos abundantes en residuos vegetales, siendo fuente de (arabino)xilooligosacáridos a los que se atribuyen propiedades prebióticas. Sin embargo, aún no se han explorado estrategias de valorización económica y ambientalmente viables para aprovechar el potencial prebiótico de residuos ricos en material hemicelulósico. El objetivo de este trabajo fue diseñar procesos de bioconversión basados en fermentaciones microbianas, para obtener fracciones prebióticas a partir de subproductos ricos en hemicelulosas como el bagazo de cerveza y residuos de alcachofa. Para ello se llevó a cabo un genotipado de microorganismos originalmente aislados de las matrices de interés, así como un estudio in vitro e in silico de su capacidad para metabolizar sustratos hemicelulósicos. Después de realizar una selección de los aislados con capacidades fermentativas más prometedoras se realizaron fermentaciones dirigidas de los residuos vegetales y se evaluaron las modificaciones que producían en el material de partida. Los resultados obtenidos abren vías para diseñar consorcios para fermentar las matrices de forma dirigida.

Palabras clave / Key words:

prebióticos, hemicelulosas, AXOS, XOS, BAL, subproductos vegetales.

Las hemicelulosas son un grupo de polisacáridos abundantes en algunos residuos de cereales y plantas[1,2]. Son, a su vez, una fuente interesante para la obtención de (arabino)xilooligosacáridos (A(XOS)), compuestos a los que se atribuyen propiedades bioactivas, entre las que se incluye su uso como prebióticos en alimentación humana[1,3,4]. Sin embargo, aún no se han explorado en profundidad estrategias de valorización económica y ambientalmente viables para matrices ricas en hemicelulosa mediante la obtención de (A)XOS.

El objetivo de este trabajo fue diseñar procesos de bioconversión basados en fermentaciones microbianas, para obtener fracciones prebióticas a partir de subproductos del procesado de alimentos ricos en hemicelulosas como son el bagazo de cerveza (BSG) y residuos de alcachofa (AP).

Para ello, se partió de una colección de 121 bacterias ácido-lácticas de la colección del IPLA-CSIC que habían sido aisladas a partir de matrices vegetales. Se realizó genotipado mediante RAPD-PCR y se seleccionaron 18 de ellas para estudiar su capacidad para metabolizar celulosa, hemicelulosa, xilano o lignina (Tabla 1). Asimismo, se secuenció el genoma completo en las cepas seleccionadas. Con estos genomas y los de otras cepas de colección (*Lactiplantibacillus pentosus* DSM20314 y *Levilactobacillus brevis* DSM20056) descritas por su aptitud para fermentar matrices vegetales[5,6], se estudiaron *in silico* sus funciones CAZY (enzimas activas sobre carbohidratos) (Figura 1).

Aislado	CMC	Xil	Lig
Levilactobacillus brevis B1	-	-	+
Pediococcus pentosaceus B2	-	-	+
Lactobacillus paraplatarum B3	-	-	-
Lactobacillus paraplatarum B4	+	-	-
Lactobacillus kimchi B5	-	-	-
Weissella confusa B6	-	-	+
Leuconostoc citreum B7	-	+	+
Leuconostoc citreum B8	-	-	+
Leuconostoc citreum B9	-	-	-
Lactococcus lactis A1	+	+	+
Lactococcus lactis A2	+	+	+
Leuconostoc kimchi A3	-	-	-
Leuconostoc mesenteroides A4	-	-	+
Leuconostoc mesenteroides A5	-	-	+
Leuconostoc lactis A6	-	-	+
Leuconostoc pseudomesenteroides A7	-	-	+
Weissella confusa A8	-	-	-
Lactiplantibacillus plantarum 62	-	-	-
Lactiplantibacillus pentosus DSM20314	-	-	-
Levilactobacillus brevis DSM20256	-	-	-

Tabla1: Aislados seleccionados para la secuenciación del genoma completo y estudios de sus capacidades fermentativas en sustratos abundantes en materiales ricos en hemicelulosas. +, crecimiento; -, no crecimiento. CMC: carboximetilcelulosa; Xil: xilano; Lig: lignina.

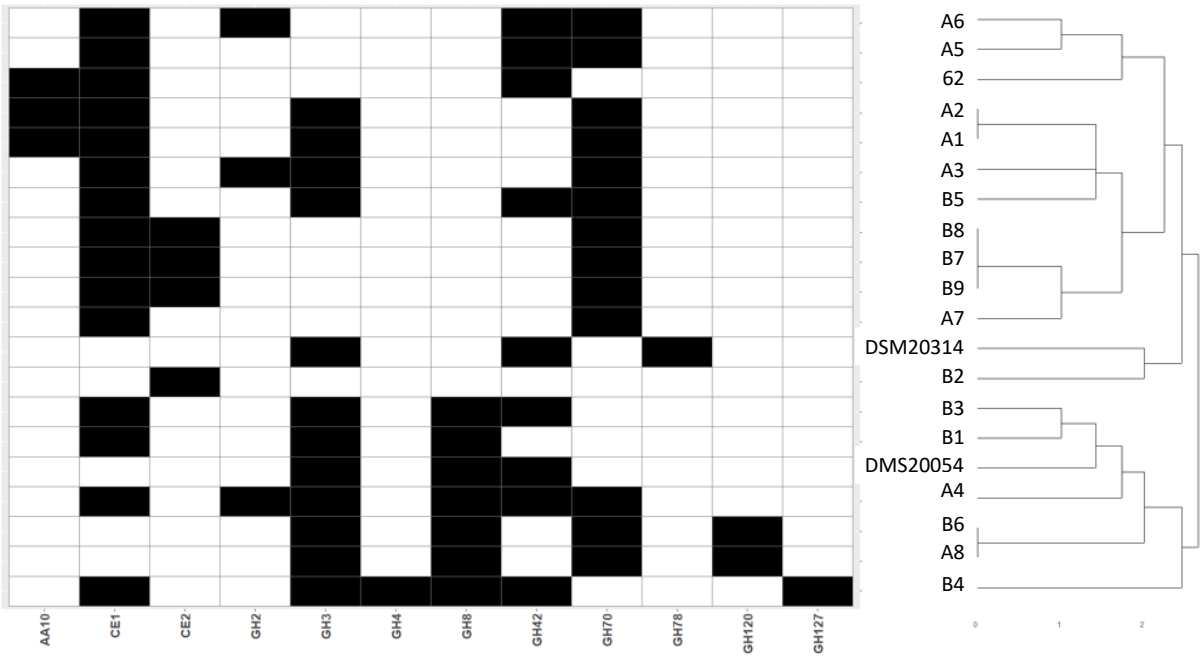


Figura 1: Funciones CAZY de los aislados de matrices vegetales. Xilan-monooxigenasa (AA10), Acetilxilan-esterasa (CE1), Acetil-esterasa (CE2), β-glucosidasa (GH2), β-galactosidasa (GH3), α-glucosidasa (GH4), chitosanasa (GH8), α-L-arabinopiranosidasa (GH42), dextransucrasa (GH70), α-L-ramnosidasa (GH78), xilan β-1,4-xilosidasa (GH120), β-L-arabinofuranosidasa (GH127).

Asimismo, se determinó *in vitro* su capacidad para fermentar AP y BSG. Las fermentaciones con AP se realizaron secando el material de partida para obtener una harina homogénea y posteriormente hidratándolo, mientras que las fermentaciones con BSG se llevaron a cabo con el material triturado en fresco. Todas las fermentaciones se realizaron añadiendo un inóculo de 10^7 unidades formadoras de colonia por gramo de fermentación a 25 °C durante 48 horas a 250 rpm. En todas las fermentaciones se observó una bajada de pH (entre 0,15 y 2,35 puntos), siendo la bajada más acusada en la fermentación realizada por *Lactobacillus plantarum* (62) en el caso del BSG y *Lactobacillus paraplatarum* (B4) en las fermentaciones de AP. Estos datos correlacionan con el crecimiento de los microorganismos (entre 1,8 y 3,8 unidades logarítmicas).

El análisis de carbohidratos mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) demostró que en las fermentaciones de AP con tres de los aislados (B5, A2 y B4) aumentaba el contenido en xilosa y arabinosa (entre 7,7 y 13,3 %). En las fermentaciones de BSG se observó un aumento de tri- y tetrasacáridos, arabinosa y maltooligosacáridos en las fermentaciones con los aislados B1, B4 y A1, si bien el contenido en arabinosa y xilosa sólo aumentó en la fermentación con la cepa B4.

En conclusión, mediante una selección *in vitro* de microorganismos aislados de matrices vegetales por medio de su genotipado y el crecimiento en matrices ricas en hemicelulosas, además del análisis *in silico* de los genomas, se han obtenido resultados que abren vías para diseñar condiciones de fermentación para cada

subproducto, utilizando consorcios de microorganismos seleccionados en base a sus capacidades metabólicas, que podrían permitir obtener fracciones prebióticas, enriquecidas en arabinosa y xilosa, a partir de materiales ricos en hemicelulosas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte del proyecto TED2021-131514B-I00, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la Unión Europea "NextGenerationEU"/PRTR». Este trabajo también ha sido apoyado por el proyecto PIE 202370E168 (CSIC). Ana Isabel Díaz agradece el contrato postdoctoral Juan de la Cierva JDC2022-049850-I, financiado por MICIU/AEI /10.13039/501100011033 y por el FSE+ y Xenia Vázquez agradece su *contrato postdoctoral IITM POSTDOC 23 05 financiado por el ISPA.*

REFERENCIAS

[1] Santibáñez, L., Henríquez, C., Corro-Tejeda, R., Bernal, S., Armijo, B., & Salazar, O. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review. Carbohydr Polym, 2021, 251, 117118.

[2] Ballesteros, I., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. J., Oliva, J. M., Sáez, F. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. J Biochem Eng, 2008, 42, 84-91.

[3] Gibson, G. R., Hutkins, R. W., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... & Reid, G. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14, 491-502.

[4] Amorim, C., Silvério, S. C., Prather, K. L., & Rodrigues, L. R. From lignocellulosic residues to market: production and commercial potential of xylooligosaccharides. Biotechnol. Adv., 2019, 37, 107397.

[5] Garde, A., Jonsson, G., Schmidt, A. S., & Ahring, B. K. Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. Bioresour. Technol., 2002, 81, 217-223.

[6] Moldes, A. B., Torrado, A., Converti, A., & Dominguez, J. M. Complete bioconversion of hemicellulosic sugars from agricultural residues into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. Appl Biochem Biotechnol, 2006, 135, 219-227.

PÓSTER

CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y FISICOQUÍMICA DEL AGUA DE LAVADO UTILIZADA EN EL PROCESADO INDUSTRIAL DE VEGETALES FRESCOS CORTADOS

Oliveira M.1, Crespo-Torbado V.1, Francés A.1, Álvarez-Ordóñez A1, González-Raurich M1, Truchado P.2, Gil M. I.2, Allende A.2, López M.1

[1]Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos e Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, León
[2]Departamento de Tecnología de los Alimentos, CEBAS-CSIC, Campus Universitario de Espinardo, Murcia

vcret@unileon.es

Resumen

El presente estudio evaluó la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua de proceso de una industria de vegetales frescos cortados a lo largo de una jornada laboral completa, con muestreos en cinco puntos temporales durante 12 horas. Se analizaron parámetros como la demanda química de oxígeno (DQO), sólidos disueltos y en suspensión totales, cloro libre, total y combinado, potencial de oxidación-reducción (ORP), conductividad eléctrica (CE), pH, así como la presencia de pesticidas y subproductos de desinfección (DBPs), y se realizó un análisis microbiológico del agua. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la existencia de grandes diferencias, tanto en la calidad fisicoquímica como en la microbiológica, entre el agua de los dos tanques de lavado, atribuibles en parte a diferencias en su contenido en materia orgánica, significativamente mayor en el tanque de pre-lavado. Además, se observó una correlación positiva entre las concentraciones de cloro y de subproductos de desinfección en el agua de lavado. A pesar de las variaciones en las concentraciones de cloro, todas las muestras analizadas mostraron recuentos de bacterias aerobias mesófilas en torno a 4,0 log ufc/100 mL. Sin embargo, no se detectó la presencia de Salmonella spp. ni L. monocytogenes en ninguna muestra, y los recuentos de E. coli y Listeria spp. estuvieron por debajo del límite de cuantificación. Por otra parte, la secuenciación metagenómica total de las muestras de agua reveló la presencia de genes de resistencia a antibióticos, destacándose los asociados con resistencia a beta-lactámicos, tetraciclinas y anfenicoles como los más comunes.

Palabras clave: *Agua de procesado de vegetales, calidad microbiológica, calidad físico-química, genes de resistencia a antimicrobianos*

Los procesadores de productos vegetales frescos cortados suelen utilizar desinfectantes en el agua de lavado para controlar la calidad microbiológica del agua de proceso, contribuyendo a prolongar la vida útil del producto final. El agua es una herramienta útil para reducir la posible contaminación del producto, pero también puede transmitir microorganismos patógenos [1]. La etapa de lavado resulta clave en el procesado de productos vegetales frescos, por lo que es esencial el

mantenimiento de la seguridad microbiológica y química del agua empleada [2]. En este estudio, se muestreó el agua de dos tanques de lavado de una línea de procesado comercial (un primer pre-lavado que recibe los exudados del producto cortado y un segundo lavado al que llega un producto más limpio) (**Figura 1**). Se tomaron muestras de agua de lavado de ambos tanques durante toda la jornada laboral en cinco momentos distintos, según se indica en la **Figura 1**. Se realizaron mediciones de cloro libre y total, pH, temperatura, potencial de oxidación-reducción (ORP), y conductividad eléctrica (CE), directamente en la línea de procesado. Para la enumeración de microorganismos y la cuantificación de subproductos de desinfección (DBPs), las muestras de agua fueron neutralizadas con tiosulfato sódico pentahidratado (**Figura 2**).

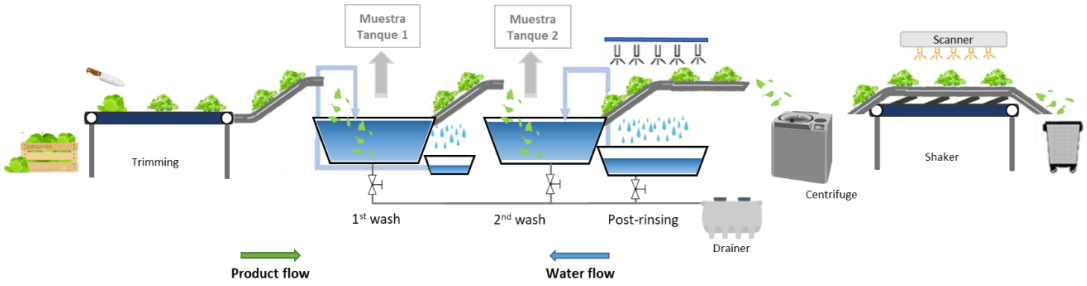


Figura 1: Diagrama de la operación de lavado en una línea comercial de procesado de productos frescos. Se indican los puntos de muestreo y las etapas del proceso, incluyendo la recepción, prelavado, lavado principal, aclarado y secado.

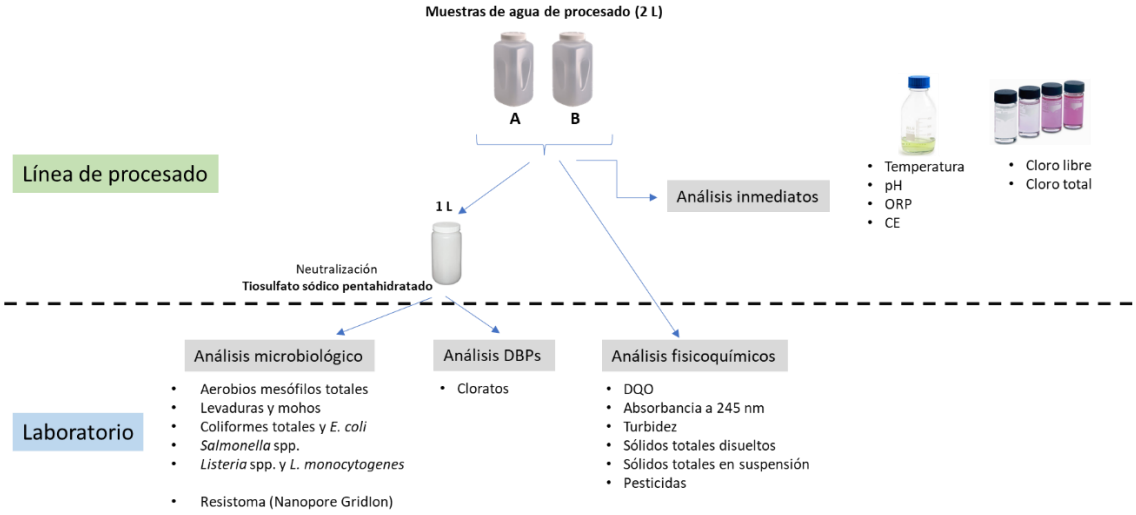


Figura 2: Representación esquemática del muestreo y de los diferentes análisis realizados en el agua de lavado.

Además, estas muestras fueron utilizadas para caracterizar el resistoma mediante secuenciación metagenómica total. Una vez en el laboratorio, las muestras de agua no neutralizadas se utilizaron para la evaluación de parámetros fisicoquímicos, incluyendo turbidez, demanda química de oxígeno (DQO), sólidos disueltos y en suspensión totales, absorbancia a 254 nm, y la detección de pesticidas (**Figura 2**).

Los resultados microbiológicos mostraron variaciones en los niveles de contaminación entre las diferentes muestras y tiempos de

muestreo (**Tabla 1**). Los recuentos de aerobios mesófilos totales oscilaron ligeramente durante el tiempo de muestreo, presentando alguna variación significativa dependiendo de la muestra y/o tanque analizado. La concentración más alta se observó en el cuarto punto de muestreo (M4) en el tanque de pre-lavado (T1), con una concentración de 5,47 log ufc/100 mL, mientras que la concentración más baja se encontró en el tercer punto de muestreo en ese mismo tanque, con una concentración de 3,80 log ufc/100 mL.

Tabla 1: Recuentos microbiológicos del agua de lavado en cada punto de muestreo (M) y tanque analizado (T). Los parámetros microbiológicos incluyen aerobios mesófilos totales, mohos y levaduras, y coliformes totales.

Muestra/Tanque		Producto lavado (Kg)	Tipo de producto	Aerobios mesófilos totales (log ufc/100 mL)	Mohos y Levaduras (log ufc/100 mL)	Coliformes totales (log ufc/100 mL)
M1	T1	600	Acelga, canónigos	4.37	4.05	<LC
	T2			4.15	3.78	<LC
M2	T1	1.777	Capriccio, Baby leaf roja, Baby leaf verde, Canónigos, Espinaca, Baby leaf espinaca	3.98	3.88	1.96
	T2			4.00	3.63	0.93
M3	T1	2.263	Espinaca, Baby leaf espinaca, Brotes tiernos, Baby leaf roja, Baby leaf verde, Baby leaf rúcula, Delicious, Canónigos	3.80	3.70	<LC
	T2			3.89	2.86	<LC
M4	T1	5.635	Mezclum, Frisee, Baby leaf roja, Radicchio, Baby leaf mizuna, Gourmet, Canónigos, Brotes tiernos, Baby leaf verde, Baby leaf espinaca	5.47	3.59	<LC
	T2			3.85	3.09	<LC
M5	T1	6.611	Brotes tiernos, Baby leaf roja, Baby leaf verde, Baby leaf espinaca, Mezclum, Frisee, Radicchio, Baby leaf mizuna	4.86	3.62	<LC
	T2			3.95	3.74	2.05

T1: tanque pre-lavado; T2: tanque lavado; LC: límite de cuantificación.

En general, los recuentos de mohos y levaduras, así como de coliformes totales, se mantuvieron dentro de los límites aceptables. La presencia de *E. coli* y *Listeria* spp. fue inferior al límite de cuantificación en todos los casos, indicando buenas prácticas de higiene en la industria estudiada. Además, no se detectó la presencia de *Salmonella* spp., ni de *L. monocytogenes,* en ninguna muestra. En general, no se observó una correlación directa entre el contenido en cloro libre y la calidad microbiológica del agua. Para el análisis metagenómico de las muestras de agua, solo se obtuvo suficiente concentración de ADN de la muestra M4 T1. Este análisis reveló la presencia de genes de resistencia a antibióticos, siendo los más comunes aquellos relacionados con la resistencia a beta-lactámicos, tetraciclinas y anfenicoles.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la existencia de diferencias en las propiedades fisicoquímicas del agua de los dos tanques de lavado, principalmente debido a las diferencias en su contenido de materia orgánica, el cual fue significativamente mayor en el tanque de pre-lavado. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la calidad microbiológica. En cuanto a los niveles de cloratos en las muestras de agua, se encontraron concentraciones superiores a los límites máximos permitidos para el agua potable (0.7 ppm) en las muestras M2 T1, M4 T1 y M5 T1, con valores de 0.93, 1.28 y 2.78 ppm, respectivamente. Además, se identificó una correlación positiva entre los niveles de cloratos y los de cloro presentes en el agua de lavado.

En algunas muestras de agua se detectó valores máximos de 0.65 µg/L de clorantraniliprole, 0.28 µg/L de propizamida y 1.4 µg/L y 0.49 µg/L de los fungicidas fludioxonil y ciprodinil, respectivamente. Estos compuestos químicos, ampliamente

utilizados en agricultura para proteger cultivos como frutas y hortalizas, presentan una baja toxicidad para los humanos y otros mamíferos. Sin embargo, es fundamental seguir las directrices de seguridad durante su manejo y aplicación para minimizar cualquier posible impacto ambiental negativo.

El estudio llevado a cabo proporciona una visión general de la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua de lavado de diferentes productos vegetales a lo largo de un día de procesamiento industrial, presentando información fundamental para garantizar la seguridad alimentaria y cumplir con la normativa vigente.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio está financiado por la Agencia Estatal de Investigación (MCIN, TED2021-131427B-C21 y TED2021-131427B-C22) del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia de la Unión Europea (NextGenerationEU).

REFERENCIAS

[1] M.I. Gil, M.V. Selma, F. López-Gálvez, A. Allende. *International Journal of Food Microbiology* **2009**, 134, 37–45.

[2] F. López-Gálvez, P. Truchado, J.A. Tudela, M.I. Gil, A. Allende. *Food Microbiology* **2020**, 88, 103409

SENSIBILIDAD UNIFORME A ANTIBIÓTICOS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Montiel R.[1], **Fernández D., López P., Ortiz S., Pérez-Boto D., Arqués J.L., Martinez-Suárez J.V.**

1 Dpto. Tecnología de Alimentos, Grupo de Seguridad Alimentaria. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC), Ctra. de La Coruña km 7, 28040 Madrid.

rakelm@inia.csic.es

Resumen / Abstract

Uno de los principales desafíos de salud pública del siglo XXI es la aparición y propagación de bacterias resistentes a antibióticos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad de 50 cepas de L. monocytogenes procedentes de industrias alimentarias utilizando el método de difusión en disco estandarizado de EUCAST frente a 11 antibióticos, 5 incluidos en el método para L. monocytogenes y 6 no incluidos.Todas las cepas fueron sensibles a 4 de los 5 antibióticos incluidos en el método EUCAST para L. monocytogenes y a los 6 antibióticos no incluidos. Una única cepa de las 50 de origen alimentario resultó resistente a bencilpenicilina.

Palabras clave / Key words *Listeria monocytogenes, resistencia, antibióticos, EUCAST*

Listeria monocytogenes es una bacteria que se aísla con frecuencia en el ambiente de las industrias agroalimentarias. Causa listeriosis, una toxiinfección alimentaria que registró una tasa de hospitalización del 96.0%, y de mortalidad del 18.1%, en la Unión Europea en 2022 [1]. Uno de los principales desafíos de salud pública del siglo XXI es la aparición y propagación de bacterias resistentes a antibióticos. *L. monocytogenes* muestra una escasa resistencia frente a los antibióticos utilizados para tratar los casos de listeriosis humana, aunque hay informes discrepantes sobre la importancia de dicha resistencia, debido en parte a la disparidad de los métodos utilizados. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ha propuesto recientemente un método estandarizado de susceptibilidad a antibióticos mediante difusión en disco con puntos de corte clínicos de las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) basados en la distribución epidemiológica de las MICs (epidemiological cut-off, ECOFF) de *L. monocytogenes* [2].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad a 11 antibióticos de uso clínico de 50 cepas de *L. monocytogenes* utilizando el método de difusión en disco estandarizado de EUCAST.

Para ello, se utilizó agar Mueller-Hinton con 5% de sangre de caballo desfibrinada y 20 mg/L de β-NAD (Mueller-Hinton Fastidious, MH-F) obtenido de Becton Dickinson, y discos de antibióticos obtenidos de Oxoid de los cinco antibióticos incluidos en el método estandarizado [ampicilina (2 µg), bencilpenicilina (1 U), eritromicina (15 µg), meropenem (10 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25-23,75 µg)], y de otros seis antibióticos no incluidos en dicho

método [ciprofloxacino (5 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), rifampicina (5 µg), tetraciclina (30 µg), y vancomicina (30 µg)]. Se seleccionaron un total de 50 cepas de *L. monocytogenes* de 50 subtipos diferentes obtenidos por electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE), que representan 347 aislados de industrias alimentarias [3]. Las zonas de inhibición se midieron en placas abiertas y con luz reflejada y se interpretaron según los criterios EUCAST para *L. monocytogenes* o, en su defecto, para *Staphylococcus* spp. Se utilizaron las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC29213 y *L. monocytogenes* ATCC BAA-679 como controles.

Todas las cepas fueron sensibles a 4 de los 5 antibióticos incluídos en el método EUCAST para *L. monocytogenes* y a los 6 antibióticos no incluídos, con los que se utilizaron los puntos de corte de *Staphylococcus* spp. (Tabla 1). Una única cepa de las 50 de origen alimentario resultó resistente a bencilpenicilina (Figura 1).

Tabla1: Sensibilidad a antibióticos de *L. monocytogenes* aisladas de industrias alimentarias.

Antibiótico	Nº sensibles (%)	Nº resistentes (%)
Ampicilina (2 µg)	50 (100%)	–
Bencilpenicilina (1 U)	49 (98%)	1 (2%)
Eritromicina (15 µg)	50 (100%)	–
Meropenem (10 µg)	50 (100%)	–
Trimetoprim-sulfametoxazol (1,25-23,75 µg)	50 (100%)	–
Ciprofloxacino (5 µg)	50 (100%)	–
Cloranfenicol (30µg)	50 (100%)	–
Gentamicina (10 µg)	50 (100%)	–
Rifampicina (5 µg)	50 (100%)	–
Tetraciclina (30 µg)	50 (100%)	–
Vancomicina (30 µg)	50 (100%)	–

A diferencia de otros trabajos publicados, pero no confirmados mediante el estudio posterior de las cepas resistentes, la resistencia adquirida a antibióticos en esta población que representa a 347 aislados de *L. monocytogenes* es muy baja. Especialmente destacable es la sensibilidad del 100% de las cepas a ampicilina y gentamicina, los antibióticos de elección para el tratamiento de la listeriosis diseminada, y también la sensibilidad uniforme a la combinación trimetoprim-sulfametoxazol, usada en casos de alergia a aminopenicilinas.

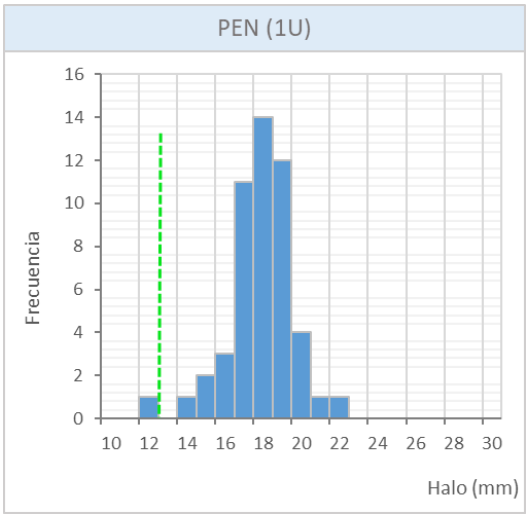


Figura 1: Distribución de los diámetros de inhibición para 50 cepas de *L. monocytogenes* frente a bencilpenicilina.

Estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio realizado por el

Instituto Pasteur en Francia [4] y apuntan a que la resistencia adquirida a antibióticos de determinadas poblaciones de *L. monocytogenes* sigue siendo muy baja y que el tratamiento de referencia frente al patógeno seguiría siendo efectivo. No obstante, la vigilancia de la resistencia de *L. monocytogenes* es necesaria, ya que puede desarrollarse en determinados ambientes o localizaciones en los que la presión antibiótica sea mayor, y mantenerse la sensibilidad uniforme en otros casos.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PID2022-142329OB-C32: La resistencia a antibióticos y su relación con los biocidas usados en la industria alimentaria: estrategias antibiofilm innovadoras para minimizar la resistencia cruzada en Listeria monocytogenes. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España.

REFERENCIAS

[1] European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). EFSA J., **2024**, 22(2), e8583.

[2] European Committee on antimicrobial susceptibility testing.

https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology. Accessed on 12 June 2024.

[3] V. López-Alonso, S. Ortiz, A. Corujo, J.V. Martínez-Suárez. JFP, **2020**, 83(3), 443-451.

[4] A. Moura, A. Leclercq, G. Vales, N. Tessaud-Rita, H. Bracq-Dieye, P. Thouvenot, Y. Madec, C. Charlier, M. Lecuit. Lancet Reg. Health Eur., **2024**, 37, 100800.

DETERMINACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PROLONGADA A DOSIS SUBINHIBITORIAS DE TERPENOS VEGETALES SOBRE LA RESISTENCIA A LA ENROFLOXACINA EN *SALMONELLA ENTERICA*

David Jiménez-De-Juan[1,2], Rosa Capita[1,2], Carlos Alonso-Calleja[1,2]

[1] Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n, 24071-León, España
[2] Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de León (ICTAL-León), Universidad de León. C/ La Serna, Nº 58, 24007-León, España

djimj@unileon.es; carlos.alonso.calleja@unileon.es; rosa.capita@unileon.es

Resumen / Abstract

Los terpenos vegetales derivados de aceites esenciales, como el timol , eugenol o cavracrol, poseen una gran capacidad antimicrobiana, considerándose una buena alternativa como desinfectantes frente a patógenos habituales como Salmonella enterica. Sin embargo, en numerosas situaciones, estos terpenos, al igual que los desinfectantes u otros biocidas, pueden aplicarse a dosis sub-inhibitorias, lo que podría provocar fenómenos de resistencia cruzada, como ya se ha visto con muchos biocidas de origen sintético. Por ello, en este trabajo se evaluó, utilizando técnicas de citometría de flujo, el efecto de la exposición repetida a dosis subinhibitorias de carvacrol y timol sobre la resistencia a enrofloxacina de una cepa de S. Typhimurium. Los resultados obtenidos evidenciaron que la exposición a los terpenos no indujo resistencia cruzada a dicho antibiótico en ninguno de los dos casos, abriendo la posibilidad del uso de estos compuestos por su menor impacto en las resistencias.

Palabras clave / Key words *Salmonella, terpenos vegetales, enrofloxacina, citometría de flujo, resistencia cruzada*

INTRODUCCIÓN

Salmonella enterica es el agente etiológico de la salmonelosis, una infección zoonósica de alta incidencia en todo el mundo, que está principalmente asociada al consumo de alimentos contaminados (especialmente productos cárnicos o huevos y ovoproductos) con cepas de diferentes serotipos de esta especie bacteriana (EFSA & ECDC, 2023). Al igual que ocurre con la mayoría de las infecciones, el tratamiento de la salmonelosis se basa en ocasiones en la administración de antibióticos, si bien el incremento de la resistencia a estos compuestos, que sigue creciendo año tras año, está potenciando el empleo de tratamientos antimicrobianos alternativos, como los terpenos vegetales (fitoquímicos). Estos compuestos tienen especial interés en el ámbito de la desinfección e higienización de superficies y equipos en la Industria Alimentaria. Sin embargo, como ocurre con otros biocidas, diversos factores, como el cálculo incorrecto de las concentraciones, la falta de limpieza o la dificultad de acceso a determinadas localizaciones, provocan que estos compuestos se apliquen a dosis subinhibitorias, existiendo el riesgo de que se generen fenómenos de resistencia cruzada con los antibióticos, como ha sido

previamente observado para diferentes biocidas sintéticos (Capita et al., 2019; Rodríguez-Melcón et al., 2023). Sin embargo, por lo que respecta a los compuestos vegetales, ya hay algunos trabajos que indican que los fitoquímicos podrían no generar estas resistencias cruzadas, o al menos, hacerlo en menor grado que los antibióticos (Cervantes et al., 2022), suponiendo además alternativas mucho menos corrosivas y más sostenibles que los biocidas sintéticos. En todo caso, no hay muchos estudios aún sobre el potencial inductor de resistencias cruzadas que podrían tener estos compuestos, especialmente frente a *Salmonella enterica*. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto de la exposición prolongada de *S. enterica* serotipo Typhimurium a dosis crecientes subinhibitorias de carvacrol y timol sobre la resistencia de este microorganismo a la enrofloxacina (ENR), evaluando dicho efecto mediante la técnica de citometría de flujo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ensayó una cepa *S. enterica* serotipo Typhimurium procedente de carne de ave, categorizada como altamente resistente a la enrofloxacina (ENR). El cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de carvacrol y timol, así como la exposición a dosis crecientes subinhibitorias de los diferentes compuestos, se realizaron mediante la técnica de microdilución en caldo acorde al método propuesto por Capita et al. (2019), con algunas modificaciones (Figura 1). Posteriormente, una vez definidas las MICs y adaptadas las cepas (S. Typhimurim en este caso) a la máxima concentración de terpeno a la que consiguieron crecer (Concentración MAX), se procedió a su mantenimiento en caldo TSB y/o en placa de TSA con la mitad de la concentración máxima (MAX/2), hasta el momento de evaluar los tratamientos con el antibiótico (ENR). Los tratamientos con ENR se llevaron a cabo en un rango de concentraciones (MIC, 10MIC y 100MIC), durante 24, 48 y 72 horas. Por último, se utilizó la técnica citometría de flujo para estudiar detalladamente los porcentajes de supervivencia bacteriana a la ENR de los cultivos no expuestos y previamente expuestos a los terpenos.

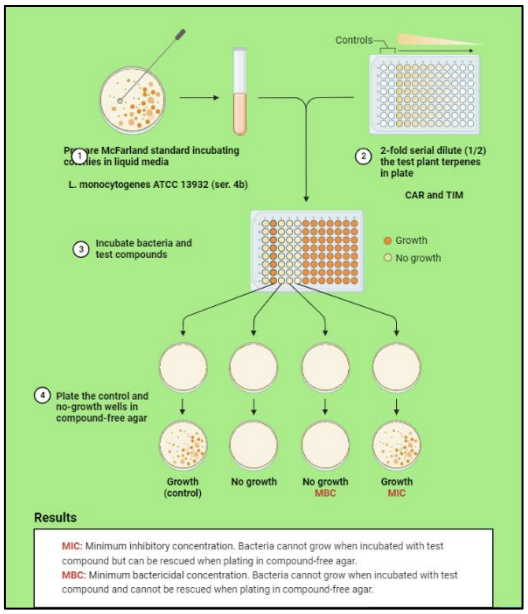


Figura 1: Detalle del método seguido para el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias

RESULTADOS

Sensibilidad y adaptación a los terpenos

La MIC fue de 500 ppm para el CAR y el TIM. La cepa de *S.* Typhimurium se adaptó en alto grado al TIM tras su exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias del compuesto, pero apenas se consiguió superar la MIC en el caso del CAR (Tabla 1). Respecto a los tratamientos con la ENR, se pudo comprobar que los cultivos previamente expuestos a dosis subinhibitorias crecientes de los terpenos no evidenciaron resistencia, e incluso mostraron una mayor susceptibilidad a los tratamientos con ENR (menores porcentajes de supervivencia) que los cultivos no expuestos (tratamiento control), especialmente, en el caso del CAR, donde los porcentajes de supervivencia fueron mucho menores (Figura 2).

Tabla 4: Valores MIC pre y post-exposición prolongada a dosis subinhibitorias de terpenos

***Salmonella enterica* serotipo Typhimurium**		
TERPENO	**MIC (ppm)**	**POST - ADAPTACIÓN MIC (ppm)**
Timol (TYM)	250	2847
Carvacrol (CAR)	500	561,5

Efectividad del tratamiento con ENR

En el caso de la cepa expuesta a TIM, los porcentajes de supervivencia se mantuvieron algo más altos que en la cepa control durante las primeras 24 y 48 h de tratamiento a la concentración más baja, indicando resistencia de la cepa durante estas primeras 48 h. Sin embargo, en los tratamientos con mayor concentración de ENR y tras 72 h de tratamiento, esa resistencia desaparece e incluso los porcentajes de supervivencia son menores que en la cepa control, mostrando ausencia de resistencia y una mayor susceptibilidad que la cepa no expuesta (Figura 2).

Para la cepa expuesta a CAR, los resultados mostraron una efectividad mayor de la ENR que en el caso de la cepa no expuesta y de la cepa expuesta a TIM. Así, tras la exposición a CAR, la cepa solo mostró una leve resistencia durante las primeras 24h de tratamiento y a dosis bajas, con porcentajes de supervivencia algo más altos que la cepa control. Sin embargo, esa resistencia desaparece con los tratamientos a mayor concentración y con periodos de 48 h y 72 h, pues esta mostró una sensibilidad mucho mayor, con porcentajes más bajos que el control y que la variante expuesta a TIM (Figura 2).

Trabajos previos han mostrado que la exposición previa y periódica a terpenos vegetales puede conllevar resistencia a los propios terpenos, y una resistencia cruzada a diferentes compuestos, tratamientos o factores de estrés, incluidos los antibióticos (Berdejo et al., 2019). Sin embargo, otro trabajo de Berdejo et al. (2020) evidenció que generalmente esa resistencia está mediada por cambios genéticos en diferentes zonas del genoma. En función de esos cambios genéticos se producirán cambios a nivel fenotípico que afecten en mayor o menor medida a su resistencia a antibióticos, u otro tipo de compuestos, generando mayor resistencia o bien no influyendo, en función de la ruta o gen afectados.

En nuestro caso, es probable que la exposición previa a dosis subinhibitorias de CAR haya inducido cambios genéticos y fenotípicos pero que no hayan afectado a la respuesta a la ENR, o bien que incluso la exposición periódica sí haya inducido resistencia cruzada, pero de forma temporal o durante ciertas horas, desapareciendo tras intervalos más largos de tratamiento (48 h y 72h). Estos resultados remarcan la importancia de mantener los tratamientos con antibiótico los tiempos y periodos estipulados, pues la bacteria podría mantener mecanismos de resistencia solo durante un periodo, y posteriormente desaparecer.

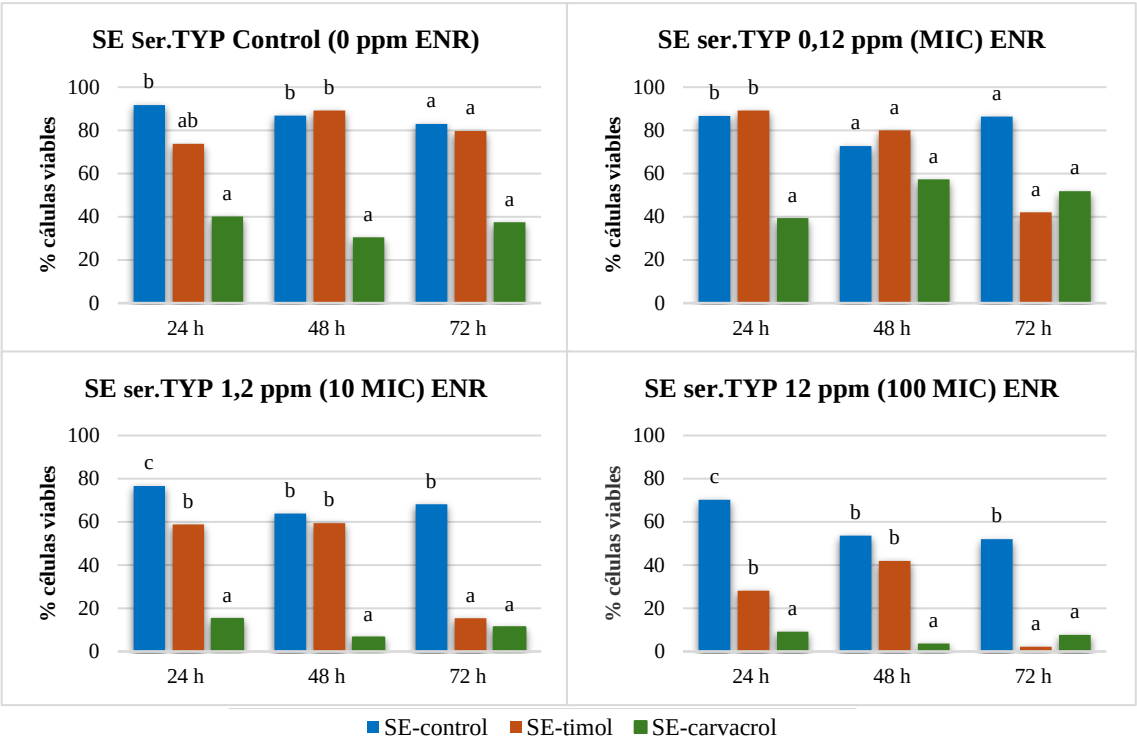


Figura 2: Porcentajes de supervivencia y diferencias entre grupos de la cepa S. Typhimurium tras los tratamientos con ENR a diferentes concentraciones y tiempos

CONCLUSIONES

La adaptación de *S. enterica* a los terpenos vegetales puede ser muy diferente en función del terpeno o la cepa ensayados. La exposición a dosis subinhibitorias de terpenos vegetales puede inducir resistencia o adaptación a estos propios compuestos, pero no tiene por qué implicar resistencia cruzada a antibióticos. Los terpenos vegetales pueden incluso potenciar la sensibilidad a los antibióticos de uso común, incluso con exposición a dosis subinhibitorias, como ha ocurrido en el presente estudio.

AGRADECIMIENTOS

Financiación: *Ministerio de Ciencia e Innovación (RTI2018-098267-R-C33 y PID2022-142329OB-C31) y Junta de Castilla y León (Consejería de Educación, LE018P20).*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] EFSA (European Food Safety Authority) & ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. EFSA Journal, 21(12), e8442. DOI: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442

[2] Capita, R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., & Alonso-Calleja, C. (2019). Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. Scientific Reports, 9(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51907-1

[3] Rodríguez-Melcón, C., Serrano-Galán, V., Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2023). Estimation by flow cytometry of percentages of survival of *Listeria monocytogenes* cells treated with tetracycline, with or without prior exposure to several biocides. Food Microbiology, 112 (November 2022). https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104210

[4] Berdejo, D.; Merino, N.; Pagán, E.; García-Gonzalo, D.; Pagán, R. (2020). Genetic variants and phenotypic characteristics of *Salmonella* Typhimurium-resistant mutants after exposure to carvacrol. Microorganisms,

8, 937. https://doi.org/10.3390/microorganisms8060937

[5] Berdejo, D., Chueca, B., Pagán, E., Renzoni, A., Kelley, W. L., Pagán, R., & Garcia-Gonzalo, D. (2019). Sub-Inhibitory doses of individual constituents of essential oils can select for staphylococcus aureus resistant mutants. Molecules, 24(1). https://doi.org/10.3390/molecules24010170

QUESOS MADURADOS COMO POTENCIALES PORTADORES DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Livia Balaguer[1], Laura Espina[1,2], Natalia Merino[1], Diego García-Gonzalo[1], Daniel Berdejo[1], Rafael Pagán[1].

[1] Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50013 Zaragoza, España.
[2] Fundación ARAID, Zaragoza, España.

espina@unizar.es, lbalaguer@unizar.es; merino@unizar.es; Diego.Garcia@unizar.es; berdejo@unizar.es; pagan@unizar.es

Resumen

La resistencia antimicrobiana (AMR, del inglés 'Antibiotic microbial resistance') es una amenaza global. Según la OMS, está causada por el uso excesivo de antibióticos en medicina y producción animal, y puede transmitirse a través de la cadena alimentaria. En el presente estudio, se evaluó la resistencia a antibióticos en bacterias ácido-lácticas (BAL) y enterococos de quesos madurados con leche cruda de vaca, cabra y oveja. Se analizó la microbiota presente mediante técnicas de cultivo clásicas, qPCR y metagenómica, encontrando variaciones según el tipo de queso. Los enterococos mostraron baja resistencia a estreptomicina y cloranfenicol, y alta resistencia a tetraciclina, eritromicina y ampicilina. Las BAL presentaron alta resistencia a todos los antibióticos testados, siendo eritromicina y ampicilina los antibióticos a los que mostraron mayor frecuencia de resistencia. También se identificaron genes de AMR, sugiriendo una correlación con la resistencia observada. Se concluye que los quesos de leche cruda pueden ser transmisores de AMR, por lo que es crucial investigar y limitar su presencia para mejorar la calidad y seguridad del producto.

Palabras clave: quesos, *AMR, microbiota, genes de resistencia, seguridad alimentaria*

Introducción

La Organización Mundial de la Salud considera las resistencias antimicrobianas (AMR, *del inglés 'Antibiotic microbial resistance'*) como una amenaza global, originada principalmente por el uso excesivo de antibióticos en medicina humana y en producción animal (1). Por ello, desde una perspectiva One Health, la cadena alimentaria es una vía potencial de transmisión de AMR procedente de materias primas de origen animal, representando riesgos graves para la salud (2).

El objectivo principal del estudio se centra en caracterizar la microbiota y las antibioresistencias en tres quesos madurados de la provincia de Huesca: curado de oveja (C015), curado de vaca (C025) y curado de cabra (C036).

Material y métodos

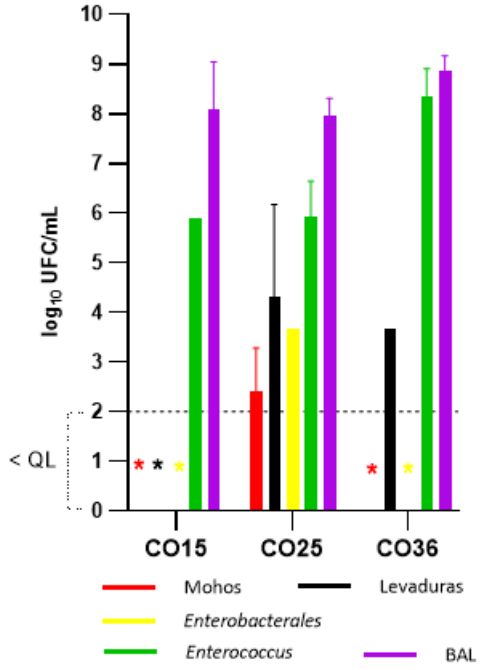
Técnicas de cultivo: Un homogeneizado en agua de peptona de cada queso se sembró en diferentes medios de crecimiento y se cultivó en condiciones específicas para cada grupo microbiano: PDA (Potato Dextrosa Agar) con cloranfenicol para mohos y levaduras; VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar) para enterobacterias; BEA (Agar bilis esculina) para enterococos, y MRS agar para BAL (bacterias ácido lácticas). Además, para obtener las frecuencias de resistencia mediante recuento en paso único, cada homogeneizado se sembró en MRS o BEA conteniendo el valor de corte de cada uno de los antibióticos testados delimitado por la EFSA para las BAL (3).

Técnicas moleculares: Se extrajo el ADN de cada homogeneizado con un kit comercial y se realizó la secuenciación metagenómica shotgun seguida de la caracterización taxonómica (Metaphlan 4.0.6) y el minado de ARGs (del inglés 'antibiotic resistent genes') (DeepARG 1.0.4). Además, se realizaron qPCR amplificando determinados genes de resistencia utilizando cebadores validados (4).

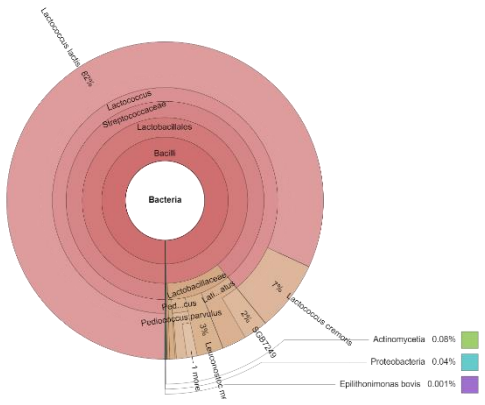
Resultados

Los resultados obtenidos en los recuentos generales indican que cada tipo de queso posee una microbiota única. Esta información, combinada con los análisis metagenómicos, permitió delinear un perfil taxonómico distintivo para cada variedad de queso (**Figura 1**).

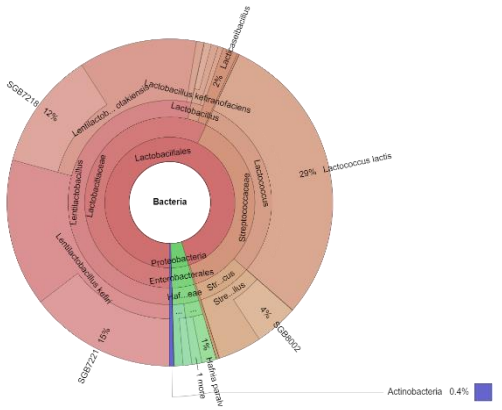
A)



B)



C)



D)

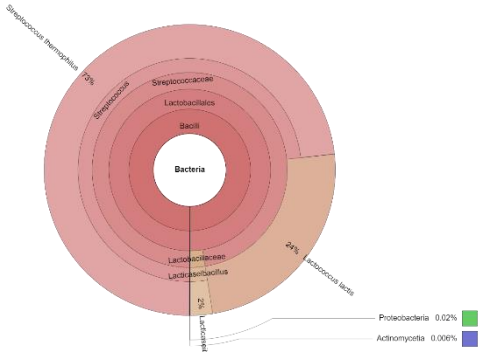
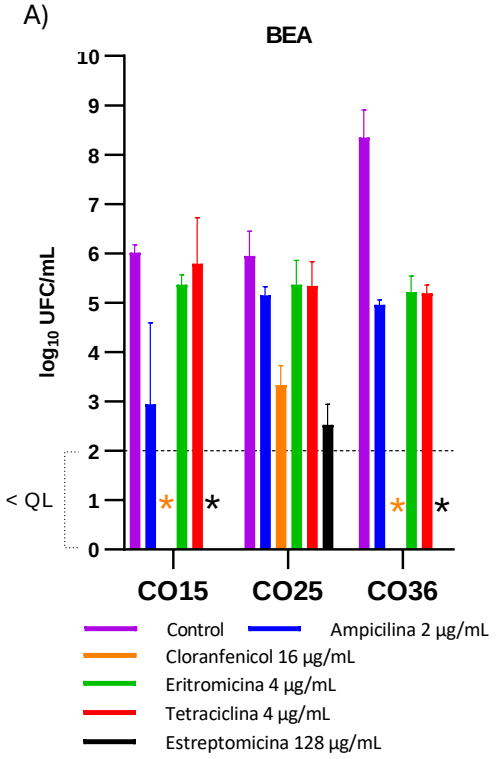


Figura 1. Recuentos microbianos generales y perfil taxonómico. *Recuentos generales obtenidos mediante técnicas dependientes de cultivo (A).*

En general, los enterococos mostraron bajas frecuencias de resistencia a estreptomicina ($<10^{-4}$) y cloranfenicol ($<10^{-3}$), y más altas en tetraciclina y eritromicina (10^{-1} para los quesos C015 y C025) (**Figura 2A**). En BAL las frecuencias fueron más altas que en enterococos frente a todos los antibióticos (**Figura 2B**).

Tal y como se puede observar en la **Figura 2**, las frecuencias de resistencia obtenidas fueron diferentes en función del queso analizado, siendo el C025 el queso con una mayor frecuencia de resistencia para todos los antibióticos y grupos microbianos testados.

A)



B)

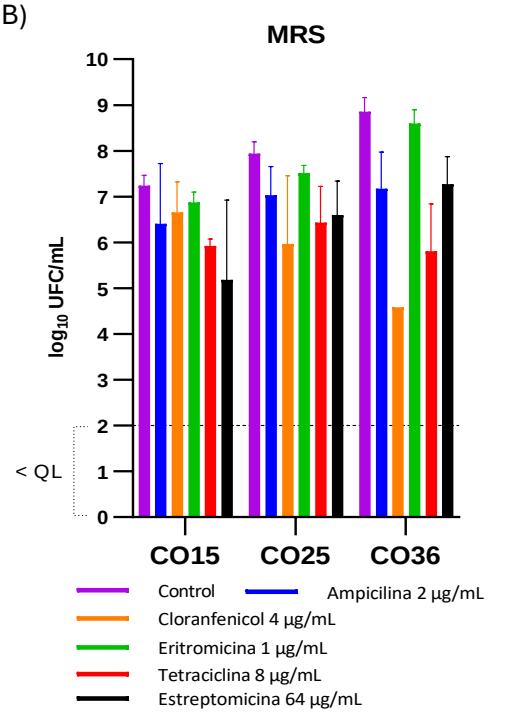


Figura 2. Frecuencias observadas a través de análisis mediante técnicas dependientes de cultivo. *Enterococos (A) y BAL (B)*

Los análisis de los genes de resistencia a partir de la secuenciación metagenómica muestran todos los ARGs encontrados en los quesos testados **(Tabla 1),** siendo el C025 el queso con mayor recuento de ARGs, coincidiendo así con los resultados obtenidos en los recuentos de la **Figura 2.** En el queso C015 se encontró un gran número de ARGs asociados a la resistencia frente a MLS (macrólidos, lincosamidas y estreptogramina), mientras que en el queso C036 se encontraron numerosos ARGs asociados a la resistencia frente a beta-lactámicos.

Tabla 5. ARGs detectados a través de los análisis metagenómicos de los quesos curados de oveja (CO15), vaca (CO25) y cabra (CO36). *La escala de colores (verde, amarillo, rojo) indica un aumento progresivo en los valores de los recuentos totales por tipo de ARG.*

Recuentos de ARGs normalizados según el número de copias del gen 16s rRNA			
Categoría ARG	**C015**	**C025**	**C036**
MLS	1,030859	0,800922	0,630192
Multifármaco	0,159934	0,590722	0,156377
betalactámico	0,003153	0,054925	0,221793
bacitracina	0,023991	0,111415	0,010086
fluoroquinolonas	0,001215	0,028226	0,006029
aminoglucósido	0,000728	0,024239	0,000305
tetraciclina	0,002197	0,006565	0,001623
fenicol	0,001985	0,001827	0,001183
aminoglucósido:aminocumarina	0,000126	0,010022	0,000081
péptido	0,013609	0,007493	0,000125
fosmidomicina	0,000180	0,014778	0,000030
nitroimidazol	0,000071	0,006965	0,000043
polimixina/péptido,polimixina	0,000087	0,003376	0,000066
pleuromutilina	0,000025	0,000712	0,000574
Glicopéptido	0,000036	0,000438	
fluoroquinolona, multifármaco		0,009623	0,000079
Sin clasificar	0,008258	0,087863	0,005474
Total	**1,238439**	**1,663453**	**1,028513**

Para una mayor precisión, algunos de estos genes fueron analizados a través de qPCR.

Los genes de resistencia seleccionados para el análisis fueron *ermB*, *ermC*, *msrC*, *mecA*, *aph(3'')-Ia*, *ant6-ia*, *tetA*, *tetM*, *tetO* y *cat,* obteniéndose una amplificación positiva para algunos de ellos. Tal y como se observa en la **Tabla 2**, el queso C025 es el que presenta más genes detectados, coincidiendo con los resultados obtenidos en la metagenómica y los recuentos descritos en la **Figura 2.**

Tabla 6. ARGs analizados mediante qPCR de los quesos curados de oveja (CO15), vaca (CO25) y cabra (CO36). *Gen no detectado por qPCR (-), gen detectado a partir del ciclo 25 de amplificación (+), gen detectado antes del ciclo 25 de amplificación (++).*

ARG-category	ARG	C015	C025	C036
MLS	*ermB*	+	++	-
MLS	*ErmC*	++	-	-
MLS	*msrC*	-	+	+
betalactámico	*mecA*	-	+	+
aminoglucósido	*ant(6)-Ia*	+	++	-
aminoglucósido	*aph(3')-IIIa*	-	-	-
tetraciclina	*tetA*	-	+	+
tetraciclina	*tetM*	+	++	-
tetraciclina	*tetO*	-	+	-
cloranfenicol	*cat*	-	-	-

Las tres técnicas empleadas en este estudio (microbiologia clásica, análisis metagenómico y qPCR) se complementan entre sí para describir de una forma completa el objetivo del estudio, proporcionando finalmente una "huella" microbiológica característica para cada queso.

Se podria concluir, por tanto, que los quesos elaborados con leche cruda podrían actuar como potencial portador de AMR, por lo que es crucial investigar el origen de la contaminación microbiana y la prevalencia de AMR. Desarrollar soluciones para limitar su presencia es fundamental para mejorar la calidad y seguridad del producto.

AGRADECIMIENTOS

El proyecto TESTACOS+ EFA042/01 ha sido cofinanciado en un 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Interreg V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2021-2027). El Departamento de Educación, Ciencia y Universidades del Gobierno de Aragón (España) (CUS/621/2023) ha concedido a Livia Balaguer una beca para llevar a cabo esta investigación.

REFERENCIAS

[1] Resistencia a los antimicrobianos. Available from: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance

[2] Una sola salud. Available from: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/one-health

[3] Rychen G, Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, Bastos M de L, Bories G, et al. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. EFSA J. 2018 Mar 1;16(3):e05206. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2018.5206

[4] Stedtfeld RD, Guo X, Stedtfeld TM, Sheng H, Williams MR, Hauschild K, et al. Primer set 2.0 for highly parallel qPCR array targeting antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. FEMS Microbiol Ecol. 2018. Available from: https://github.com/rdpstaff/EcoFunPrimer

STAPHYLOCOCCUS SPP. EN UNA INDUSTRIA DE EMBUTIDOS: DIVERSIDAD DE ESPECIES Y SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Pérez-Boto, D., Montiel, R., López, P., Ortiz, S., Martínez-Suárez, J.V., y Arqués, J.L.

Dpto. de Tecnología de Alimentos. Grupo de Seguridad Microbiológica. (INIA-CSIC). Carretera de la Coruña Km 7,5 C.P. 28040. Madrid

perez.boto@inia.csic.es

Resumen / Abstract

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena presente en la industria alimentaria, donde pueden aislarse cepas resistentes a antimicrobianos. Otros estafilococos, aunque no patógenos, podrían actuar como reservorios de genes de resistencia. Se investigó la presencia de Staphylococcus spp. en una empresa de embutidos y jamón curado loncheado, identificándose a nivel de especie mediante secuenciación de los genes 16S y rpoB. Se evaluó la sensibilidad a 15 antimicrobianos mediante la técnica de Kirby-Bauer y valores de CMI en las resistentes. De 128 muestras, se obtuvieron 19 aislados que fueron identificados como Staphylococcus/Mammaliicoccus, identificándose posteriormente 8 especies diferentes. La mayoría de aislados (10/19) fueron sensibles a todos los antimicrobianos; no obstante, se encontraron resistencias -y los genes asociados a estas- frente a penicilina/ampicilina (9/19 blaZ) y tetraciclina (5/19 tetK), y en menor medida a macrólidos (3/19 ermA, msrA, mphC), lincosamidas (1/19 ermA) y cefoxitina/oxacilina (3/19 mecA). La presencia de S. aureus fue baja y la identificación de especies fue menos ambigua con el gen rpoB. Es destacable que especies no patógenas poseen genes de resistencia, potencialmente transmisibles, bien a S. aureus o a otras bacterias presentes en alimentos.

Palabras clave / Keywords *Staphylococcus*, *S. aureus*, 16S, *rpo*B, antimicrobianos, *Mammaliicoccus*

Staphylococcus aureus es una bacteria que puede ocasionar brotes alimentarios, a través de alimentos de diferentes orígenes, como productos lácteos, postres, ensaladas, etc., en general por una deficiente higiene en su manipulación o preparación. Debido a las condiciones de resistencia a rangos de pH (4.5 hasta 9.0) y a su tolerancia a altas concentraciones de sal (hasta un 9%), puede ser aislado de productos cárnicos curados, como embutidos y jamón curado [1].

Existen otras especies pertenecientes al género *Staphylocccus*, que difieren de *S. aureus* por su incapacidad de producir coagulasa (*Staphylococcus* coagulasa negativo –CoNS-). Estas especies pueden

aparecer en ambientes de producción de embutidos por su tolerancia a la sal y su participación en procesos fermentativos de la carne.

Las especies CoNS están cobrando importancia por su asociación con diferentes procesos patológicos, en general, como patógenos oportunistas, por ejemplo, *S. xylosus*, *S. shinii*,*S. saprophyticus*, [2]

La resistencia a antibióticos es uno de los principales desafíos en salud pública. *S. aureus* puede portar diferentes resistencias, destacando la preocupación por cepas resistentes a meticilina multiresistentes (MRSA). Las especies CoNS son objeto de estudio por la posible presencia de genes de resistencia, potencialmente transmisibles a diferentes especies [3].

Los objetivos de este estudio fueron i) aislar y caracterizar el perfil de resistencia de los aislados de *S. aureus* en una industria de elaboración de embutidos y jamón curado loncheado y ii) aislar, e identificar otras especies del género *Staphylococcus*, con sus perfiles de resistencia y posibles mecanismos implicados.

Se realizaron cuatro muestreos diferentes en una industria de elaboración de embutidos y jamón curado loncheado, dos en la etapa de producción y dos después de la limpieza y desinfección de maquinaria y equipamiento. En total se procesaron 128 muestras, que se sembraron en medio selectivo Baird-Parker (Condalab).

Las colonias compatibles con el fenotipo típico de *S. aureus* en este medio (colonias negras, brillantes, con halo más o menos evidente Fig.1), se procesaron e identificaron.

Para la identificación de especies se usó una mPCR específica de *S. aureus* [4] y en aquellas negativas, se amplificó y secuenció en primer lugar el gen 16S rRNA y, posteriormente, el *rpo*B.

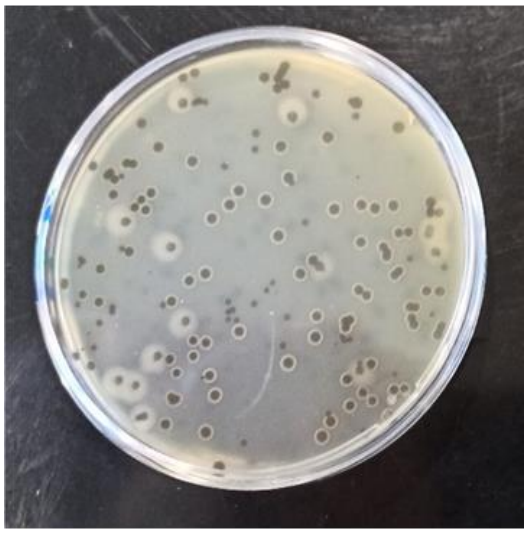


Figura 1: Imagen de una de las placas con colonias de diferentes fenotipos en medio Baird – Parker.

Para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos se realizó la técnica de Kirby-Bauer frente a los siguientes antibióticos en disco: penicilina, ampicilina, amoxicilina+acido clavulánico, cefoxitina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, ciprofloxacino, cloranfenicol, vancomicina, rifampicina, tetraciclina, clindamicina, eritromicina y trimetoprim+sulfametoxazol (Oxoid). En aquellas cepas resistentes se investigó la CMI (Conc. Mínima inhibitoria) mediante microdilución en placa, siguiendo las recomendaciones del CLSI [5]. Se buscaron los principales genes implicados en la resistencia mediante PCR y secuenciación de productos de PCR.

De las 128 muestras procesadas se detectaron 23 que poseían colonias compatibles con *Staphylococcus* en medio Baird-Parker, seleccionando un total de 34

colonias diferentes. De ellas, tras la realización de la mPCR, se identificaron dos aislados como *S. aureus*. La secuenciación del gen 16S identificó 19 aislados del género *Staphylococcus*/*Mammaliicoccus*. Sin embargo, en 8 de ellas no pudo discriminar a nivel de especie. Para solventar este problema se usó el gen *rpo*B, identificando, finalmente, 8 especies diferentes, además de las dos de *S. aureus* ya identificadas: *S. shinii* (5/19)*S. pasteuri (1/19)*, *S. equorum (3/19)*, *S. saprophyticus (1/19)*, *S. epidermidis (2/19)*,*S. pettenkoferi* (1/19), *S. simulans* (1/19)y *M. vitulinus* (3/19). Excepto *S. simulans*, todas se aislaron durante la etapa de producción.

La mayoría de muestras identificadas como *Staphylococcus*/*Mammaliicoccus*(10/19) fueron sensibles a todos los antimicrobianos. Sin embargo, destacamos la presencia de resistencia a betalactámicos (9/19), en las todas las cepas de *S. aureus*, *S. shinii* y *S. epidermidis*, detectando el gen *bla*Z en todas. Se observó resistencia a tetraciclina en 5 de 19 cepas, por presencia del gen*tet*K. Una cepa de *S. aureus* presentaba fenotipo MLS (resistencia a clindamicina y eritromicina) debido al gen *erm*A. Una cepa de *S. pasteuri* y otra de *S. epidermidis* eran resistentes a eritromicina por presencia de genes modificadores de antibiótico: *msr*A y *mph*C. Destacamos la presencia de tres cepas resistentes a oxacilina/cefoxitina, detectando el gen *mec*A en una de ellas, sin que podamos dilucidar por ahora el mecanismo de las otras dos (*mec*A-, *mec*C-)

En conclusión, este estudio ha encontrado una presencia baja de *S. aureus* en la industria muestreada, aunque estas cepas presentan resistencias: macrólidos, lincosamidas y betalactámicos. El gen *rpo*B se mostró más eficaz a la hora de identificar las especies del género *Staphylococcus*, eliminando la ambigüedad encontrada con el 16S. Algunas de las especies CoNS identificadas son potencialmente patógenas (*S. shinii, S. epidermidis, S. saprophycticus*) y aunque presentan, en general, baja resistencia, algunas poseen genes que podrían potencialmente, movilizarse a otras especies patógenas como *S. aureus*, por lo que su papel como reservorio de genes de resistencia no puede ser descartado.

Tabla1: Genes y fenotipos de resistencia encontrados en el estudio. (MLS: Macrolide-Lincosamide-Streptogramine resistance)

Cepa	Especie	Genes	Fenotipo
EE3	*S. shinii*	*bla*Z	PenR
EE5	*S. aureus*	*bla*Z, *erm*A	PenR, MLS
EE14	*S. aureus*	*bla*Z	PenR
EE20	*S. shinii*	*bla*Z, *tet*K	PenR, TetR
EE33A	*S. pasteuri*	*msr*A	EryR
EE33B	*S. shinii*	*bla*Z	PenR
EE54A	*S. epidermidis*	*bla*Z	PenR
EE57A	*S. shinii*	*bla*Z, *tet*K	PenR, TetR
EE61A	*S. shinii*	*bla*Z, *tet*K	PenR, TetR
EE62	*S. epidermidis*	*bla*Z, *mec*A, *msr*A/*mph*C, *tet*K	PenR, OxaR, EryR, TetR

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PID2022-142329OB-C32: La resistencia a antibióticos y su relación con los biocidas usados en la industria alimentaria: estrategias antibiofilm innovadoras para minimizar la resistencia cruzada en Listeria monocytogenes. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España.
A Raúl Duprá por su asistencia técnica.

REFERENCIAS

[1] Beneke B, Klees S, Stührenberg B, Fetsch A, Kraushaar B, Tenhagen BA. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a fresh meat pork production chain. J Food Prot. 2011 Jan;74(1):126-9.

[2] Argemi X, Hansmann Y, Prola K, Prévost G. Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. Int J Mol Sci. 2019 Mar 11;20(5):1215.

[3] Schoenfelder SM, Dong Y, Feßler AT, Schwarz S, Schoen C, Köck R, Ziebuhr W. Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. Vet Microbiol. 2017 Feb;200:79-87.

[4] Community Reference Laboratory for antimicrobial resistance & (CRL-AR). (2009). Report of the 1st External Quality Assurance System on Isolation, Identification and Typing of Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) from Dust Samples, year 2009. Natural Food Institute. *https://www.food.dtu.dk/publikationer/antibiotikaresistens*

[5] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 29th Edition. Supplement M100. In CLSI Supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2019.

MUTANTES DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM INDUCIDOS POR EXPOSICIÓN A KANAMICINA MUESTRAN RESISTENCIA CRUZADA AL CARVACROL

Ivo García-Penas, Carlota Lahuerta, Raúl Campillo, Diego García-Gonzalo, Rafael Pagán.

Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50013 Zaragoza, España.

igpenas@unizar.es

Resumen

En la actualidad, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) supone un importante reto para la salud pública. Salmonella spp., el principal patógeno implicado en los brotes de origen alimentario, ha mostrado RAM a antibióticos empleados tanto en medicina humana como veterinaria, entre ellos la kanamicina (KAN). El impacto de estas RAM emergentes sobre la eficacia de los métodos de conservación de alimentos, como el uso de aceites esenciales y sus constituyentes individuales como el carvacrol (CAR), sigue siendo incierto.

El objetivo de este estudio es aislar variantes resistentes (VR) de Salmonella Typhimurium LT2 (SeT_WT) frente a KAN, y evaluar su resistencia cruzada frente a CAR. Para ello, se realizaron ensayos de evolución adaptativa en presencia de concentraciones crecientes de KAN durante 10 días, incrementando 1,85 veces su concentración diariamente. Para identificar las VR, se evaluó la resistencia directa adquirida mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a KAN de los aislados. Los VRs identificados se expusieron a tratamientos letales con CAR (200 µL/L, 30 min). Así se aislaron cinco VRs de Salmonella Typhimurium, que mostraron aumentos en sus CMIs contra KAN de 8-16 veces (32-64 µg/mL) respecto a la cepa SeT_WT (4 µg/mL). Todas las VRs mostraron aumentos de resistencia frente a CAR, implicando aumentos en el riesgo de supervivencia de entre 100 y 1000 veces respecto a la SeT_WT.

Así, los ensayos de evolución adaptativa permitieron aislar VRs a KAN de Salmonella Typhimurium LT2 con incrementos de resistencia a KAN de hasta 16 veces. Asimismo, se detectó resistencia cruzada frente a tratamientos CAR en todas las VRs a KAN. La comparación del genoma de las VRs con el de la cepa SeT_WT ayudará a identificar vías específicas relacionadas con la resistencia a KAN y CAR, contribuyendo a entender el mecanismo de resistencia bacteriana frente a estos antimicrobianos.

Palabras clave *Resistencia cruzada, Salmonella Typhimurium, Kanamicina, Carvacrol, Evolución adaptativa.*

1-Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa uno de los desafíos más apremiantes para la salud pública mundial. Esta problemática ha adquirido una relevancia particular en el contexto de las infecciones transmitidas por alimentos,

donde *Salmonella* spp. emerge como el principal patógeno involucrado en los brotes (1). *Salmonella* Typhimurium destaca por su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos utilizados tanto en medicina humana como veterinaria, incluyendo la kanamicina (KAN) entre otros (2). La aparición de estas resistencias no solo complica el tratamiento de infecciones en humanos y animales, sino que también plantea interrogantes sobre la eficacia de los métodos de conservación de alimentos. Los aceites esenciales y sus componentes individuales, como el carvacrol (CAR), han sido investigados como alternativas naturales para la conservación de los alimentos debido a sus propiedades antimicrobianas (3). No obstante, el impacto de las resistencias emergentes a antibióticos sobre la efectividad de estos compuestos naturales sigue siendo incierto.

En este contexto, el presente estudio se propone aislar variantes resistentes (VRs) de *Salmonella* Typhimurium LT2 a KAN y evaluar su resistencia cruzada frente a CAR. Mediante ensayos de evolución adaptativa en presencia de concentraciones crecientes de KAN, se buscó inducir y aislar cepas con mayor resistencia al antibiótico. Posteriormente, se evaluó la resistencia cruzada de estas cepas a tratamientos con CAR.

2-Material y Métodos

2.1-Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa utilizada en este estudio fue *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium LT2 (SeT_WT). Las bacterias se cultivaron en caldo Mueller-Hinton (MHB) a 37°C con agitación a 150 rpm para asegurar un crecimiento uniforme y continuo.

2.2-Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de SeT_WT frente a KAN se determinó utilizando el método de microdilución en caldo. Se realizaron diluciones seriadas de KAN en caldo MHB y se inocularon con las cepas aisladas. La CMI se definió siguiendo los criterios del CLSI (4).

2.3-Evolución adaptativa

Para seleccionar VRs a kanamicina (KAN), se realizaron ensayos de evolución adaptativa. 5 líneas de SeT_WT fueron sometidas a un régimen de 11 exposiciones diarias a concentraciones crecientes de KAN. La concentración inicial de KAN se incrementó en 1,85 veces cada exposición, comenzando desde una concentración subinhibitoria de 0,085 veces el valor de CMI.

Tras la evolución, se determinó la CMI de las VRs obtenidas para evaluar su aumento de resistencia directa.

2.4-Evaluación de resistencia cruzada a carvacrol

Para evaluar la resistencia cruzada a CAR, SeT_WT y las VRs obtenidas se sometieron a tratamientos letales con CAR. Se prepararon suspensiones bacterianas en caldo MHB (37 °C/24h) y se trataron con 200 µL/L de CAR durante 30 minutos. La supervivencia de las bacterias se evaluó mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias.

2.5-Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando GraphPad Prism® versión 7.00 y Microsoft Excel 16. Para este propósito, se calcularon media y desviación estándar de los resultados obtenidos. La presencia de diferencias significativas se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con la prueba post hoc de Tukey, considerando una diferencia significativa cuando $p<0.05$. La CMI fue determinada por la moda.

3-Resultados y Discusión

3.1-Aislamiento de variantes resistentes a kanamicina

A lo largo del experimento de evolución adaptativa se lograron aislar cinco VRs de *Salmonella* Typhimurium LT2, una de cada línea evolucionada. Durante las 11 exposiciones a concentraciones crecientes de KAN, las cepas SeT_WT evolucionaron mostrando una resistencia notablemente aumentada. Los ensayos permitieron aislar VRs entre las exposiciones 7 y 9 (Figura 1).

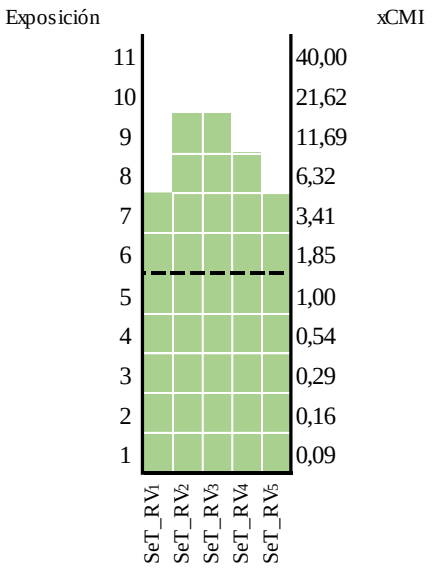


Figura 1: Ensayo de evolución adaptativa a dosis crecientes de la cepa parental *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2 frente a kanamicina en 5 líneas paralelas. Los cuadros verdes indican la mayor exposición de la que fueron aislados VRs y su respectivo aumento de concentración. La línea de puntos indica la exposición superen la que se alcanza la CMI de SeT_WT.

Los valores de CMI para estas VRs frente a KAN oscilaron entre 32 y 64 µg/mL, lo que representa un incremento de 8 a 16 veces en comparación con la CMI de SeT_WT, que se situó en 4 µg/mL. Así, todas las VRs superaron el criterio de sensibilidad del CLSI, que clasifica como resistencia intermedia valores de CMI de 32 µg/mL y resistentes aquellos iguales o superiores a 64 µg/mL (4).

Otros estudios de adaptación realizados en condiciones similares permitieron el aislamiento de VRs de *E. coli* en la octava exposición, lo que implicó aumentos de hasta 6 veces la CMI frente a estreptomicina, otro antibiótico de la familia de los aminoglucósidos (5). El mayor aumento de resistencia de *S.* Typhimurium en este estudio (entre 8 y 16 veces) podría indicar una mayor capacidad adaptativa de esta cepa. Estos resultados evidencian que el protocolo de evolución adaptativa fue eficaz para seleccionar bacterias con una resistencia a KAN aumentada.

3.2-Evaluación de la resistencia cruzada a carvacrol

Para investigar la posible resistencia cruzada entre KAN y CAR, se sometieron las VRs aisladas a tratamientos letales con CAR (200 µL/L) durante 30 minutos (Figura 2). Todas las VRs mostraron un incremento significativo en la tolerancia a CAR en comparación con la cepa SeT_WT. En términos cuantitativos, la supervivencia de

las VRs fue muy similar entre ellas, siendo entre 100 y 1000 veces superior a la de la cepa SeT_WT.

Otros estudios han descrito fenómenos parecidos en VRs de *Listeria monocytogenes* resistentes al carvacrol, que presentaron aumentos significativos en su resistencia frente a ampicilina (6). Estudios similares llevados a cabo en *Salmonella* Typhimurium permitieron apreciar una relación positiva entre el aumento de resistencia al carvacrol y el aumento de resistencia a varios grupos de antibióticos, como la kanamicina (7, 8).

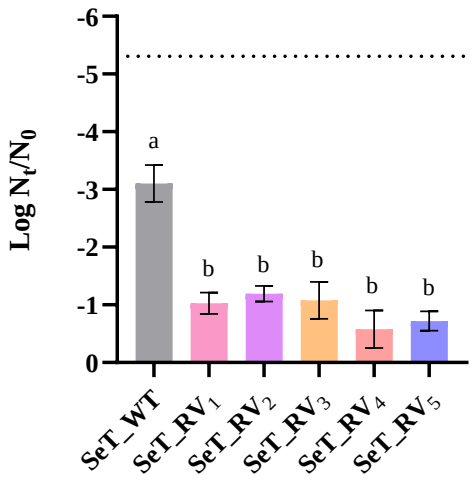


Figura 2: Ciclos logarítmicos de inactivación de la cepa parental *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium LT2 (SeT_WT) y sus VRs a la kanamicina (SeT_RV_1, SeT_RV_2, SeT_RV_3, SeT_RV_4, SeT_RV_5) tras un tratamiento con 200 µL/L de carvacrol, 25 °C, 30 min en TSB. La línea de puntos describe el límite de detección.

Este hallazgo sugiere que los mecanismos de resistencia a KAN adquiridos durante el proceso de evolución adaptativa también confieren una resistencia aumentada a CAR, similar a la obtenida por esta cepa de forma directa al mismo compuesto.

Conclusiones

Los resultados obtenidos no solo contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia bacteriana, sino que también pueden orientar estrategias más efectivas para el control de *Salmonella* spp. en la cadena alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto PID2021-123404NB-I00, financiado por MICIU/ AEI /10.13039/501100011033 y por "FEDER Una manera de hacer Europa".

REFERENCIAS

[1] European Food Safety Authority (2023). "The European Union One Health 2022 Zoonoses Report European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control". *EFSA Journal*, 20(12).

[2] Wang, X., Biswas, S., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Fang, W. and Yue, M. (2019). "Antibiotic Resistance in *Salmonella* Typhimurium Isolates Recovered From the Food Chain Through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996 and 2016". *Frontiers in Microbiology*, 10.

[3] Wang, L., Yuan, M., Sun, E., Wu, J., Anboyuan Lv, Zhang, X., Guo, J., Zhu, Y., Guo, H., Li, X. and Wang, K. (2023). "Antibacterial food packaging capable of sustained and unidirectional release carvacrol/thymol nanoemulsions for pork preservation". *Food hydrocolloids*, 145, pp.109169–109169.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute (2023). CLSI supplement M100. Wayne, PA. CLSI. Available at: http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED33:2023&scope=user

[5] Lopatkin, A. J., Bening, S. C., Manson, A. L., Stokes, J. M., Kohanski, M. A., Badran, A. H., Earl, A. M., Cheney, N. J., Yang, J. H. & Collins, J. J. (2021). "Clinically relevant mutations in core metabolic genes confer antibiotic resistance". *Science*, 371(6531), pp.

[6] Berdejo, D., Gayán, E., Pagán, E., Merino, N., Campillo, R., Pagán, R. and García-Gonzalo, D. (2022). "Carvacrol Selective Pressure Allows the Occurrence of Genetic Resistant Variants of Listeria monocytogenes EGD-e". *Foods*, 11(20), pp.3282–3282.

[7] Berdejo, D., Merino, N., Pagán, E., García-Gonzalo, D. & Pagán, R. (2020). "Genetic Variants and Phenotypic Characteristics of *Salmonella* Typhimurium Resistant Mutants after Exposure to Carvacrol". *Microorganisms* [Online], 8.

[8] Pagán, E., Merino, N., Berdejo, D., Campillo, R., Gayán, E., García-Gonzalo, D. and Pagán, R. (2024). "Adaptive evolution of Salmonella Typhimurium LT2 exposed to carvacrol lacks a uniform pattern". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), pp.1–14.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CARVACROL Y TIMOL INMOVILIZADOS EN PARTÍCULAS DE SÍLICE FRENTE A CRONOBACTER SAKAZAKII EN FÓRMULAS INFANTILES

Rivas A.[1], Moumane, O.[1], Pérez-Esteve, E.[1], Barat, J.M.[1]

1 Universitat Politècnica de València, Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos FoodUPV, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España

alriso@tal.upv.es

Resumen / Abstract

Numerosos estudios epidemiológicos han implicado al Cronobacter sakazakii como un contaminante ocasional de fórmulas infantiles en polvo, induciendo sepsis, meningitis neonatal, enterocolitis necrotizante, meningoencefalitis e incluso la muerte de neonatos. Debido a la gravedad de la enfermedad, es importante gestionar y controlar estos riesgos durante la producción (contaminación inicial), la reconstitución (especialmente la recontaminación) y después de la reconstitución para evitar la multiplicación (temperatura y tiempo de mantenimiento después de la reconstitución).

El objetivo del presente estudio es evaluar la capacidad antimicrobiana de carvacrol y timol inmovilizados covalentemente sobre partículas de sílice frente C. sakazakii (CECT 858) a dos temperaturas diferentes (45º y 50ºC). Para lograr este objetivo, la inmovilización de timol y carvacrol sobre la superficie de micropartículas de SiO_2 (5 – 15 µm) se realizó mediante la reacción de Mannich. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada CAE libre contra C. sakazakii mediante el método de la resazurina. Posteriormente, se determinó el efecto de la adición de cantidades equivalentes de los CAE inmovilizados sobre SiO_2 en la supervivencia de C. sakazakii en fórmulas infantiles a diferentes temperaturas de incubación. Los resultados muestran la actividad antimicrobiana de las partículas funcionalizadas, dependiendo su actividad de la temperatura de incubación. Mientras a 45ºC, las partículas funcionalizadas tienen un efecto bacteriostático, a 50ºC tienen un efecto bactericida. El uso de partículas funcionalizadas con timol o carvacrol permitiría el uso de temperaturas más bajas en el tratamiento térmico de las fórmulas infantiles.

Palabras clave / Key words: *Cronobacter sakazakii, fórmula infantil reconstituida, timol, carvacrol, inmovilización covalente.*

Cronobacter sakazakii es una bacteria Gram negativa, aerobia facultativa, no formadora de esporas y con forma de bacilo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, género *Cronobacter* spp. Es un patógeno oportunista emergente especialmente agresivo en bebés neonatos (<28 días), siendo los bebés prematuros (< 2500g) e inmunodeprimidos los que presentan un mayor riesgo de infección (1,2). La infección es poco frecuente pero la tasa de mortalidad es elevada (40-80%). La enfermedad en neonatos está asociada con el consumo de fórmula infantil

reconstituida (FIR) contaminada con el patógeno o durante su reconstitución y manipulación, tanto en el ámbito familiar como hospitalario (3,4). Recientemente, en 2022, se retiraron varios lotes de diferentes marcas a nivel mundial de fórmula infantil por estar relacionados con el fallecimiento de dos niños a causa de una infección producida por *C. sakazakii* (5).

Actualmente, el control de la contaminación en FIR se basa en estrategias de buenas prácticas de fabricación en las industrias y de buenas prácticas de manipulación en los recintos hospitalarios. Sin embargo, estas estrategias no aseguran plenamente la inocuidad de la fórmula reconstituida. El uso de tratamientos de conservación tradicionales (pasteurización, esterilización) o alternativos (altas presiones hidrostáticas, ultrasonidos, …) producen una pérdida de calidad nutricional, no deseable en este tipo de producto.

Los componentes de aceites esenciales (CAE) comprenden una amplia gama de agentes antimicrobianos que se encuentran en extractos naturales de plantas. Su incorporación directa a alimentos presenta ciertos desafíos, como su escasa solubilidad en medios acuosos, su alta volatilidad y su capacidad para modificar los atributos sensoriales de los alimentos.

Una de las estrategias para mejorar su aplicabilidad en alimentos es la inmovilización covalente de estos compuestos en soportes aptos para uso alimentario. La inmovilización covalente consiste en anclar el compuesto en la superficie del soporte mediante un enlace estable en el tiempo, de manera que preserven sus propiedades antimicrobianas, evitando la modificación de las propiedades organolépticas del alimento.

El objetivo del presente estudio es evaluar la capacidad antimicrobiana de carvacrol y timol inmovilizados covalentemente sobre partículas de sílice frente *C. sakazakii* (CECT 858) a dos temperaturas diferentes (45º y 50ºC) en fórmula infantil reconstituida.

En primer lugar, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diferentes CAE frente a *C. sakazakii* por el método de la resazurina. La resazurina es un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las bacterias por la conversión de una tinción no fluorescente (azul) a un color altamente fluorescente (rojo) en respuesta a una reducción química del medio de cultivo resultado del crecimiento bacteriano (figura 1).

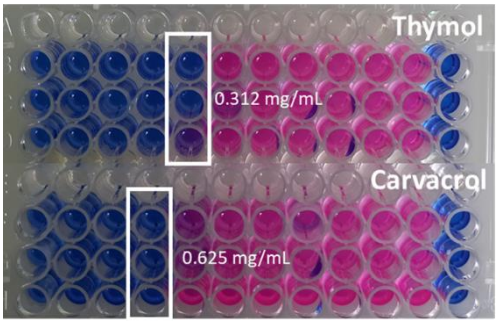


Figura 1. Ensayo de la resazurina para la determinación de la CMI para el timol y el carvacrol

La tabla 1 muestra los resultados de la CMI. Se observa que el *C. sakazakii* es más sensible a timol y carvacrol. Por tanto, el carvacrol y el timol se inmovilizarán en las micropartículas de sílice.

Tabla 1: MIC de CAEs libres frente a *C. sakazakii*.

CAE	CMI (mg/mL)
Timol	0,312
Carvacrol	0,625
Cianamaldehido	1,25
Vainillina	2,5
Geraniol	5
Eugenol	5

En la inmovilización de carvacrol y timol en micropartículas de SiO2 (5 – 15 µm) se siguió un procedimiento sintético de dos pasos para preparar los dispositivos antimicrobianos (Figura 2). En el primer paso, el APTES se ancla a la superficie de la partícula de óxido de sílice. En un segundo paso, el carvacrol y el timol reaccionan con el APTES anclado en el soporte mediante la reacción de Mannich.

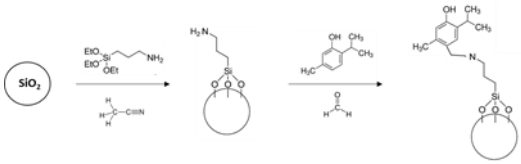


Figura 2: Síntesis de micropartículas de sílice funcionalizada con timol

Las partículas funcionalizadas se caracterizaron químicamente mediante análisis elemental (tabla 2). Los resultados del análisis elemental confirmaron la presencia de materia orgánica en las partículas funcionalizadas, validando así el anclaje del componente de aceite esencial (CAE).

Tabla 2: Resultados del análisis elemental y grado de funcionalización de las micropartículas de sílice

CAE	Masa (%)			mg CAE/ g SiO_2
	N	C	H	
Timol	1,03	3,73	1,02	67,51
Carvacrol	0,70	2,53	0,78	45,70

La actividad antimicrobiana del carvacrol y el timol inmovilizado se ensayó frente a *C. sakazakii* en FIR variando la temperatura de incubación. A partir de los resultados del grado de inmovilización, se adicionaron partículas funcionalizadas en cantidades equivalentes a la CMI y 2xCMI de timol y carvacrol libres.

Las figuras 3 y 4 muestran los resultados de la actividad de los soportes funcionalizados frente al patógeno a 45 y 50ºC respectivamente. Las partículas funcionalizadas han mostrado que tienen una actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii*. Mientras que, a 45ºC, las partículas tienen un efecto bacteriostático, a 50ºC de incubación, las partículas tienen un efecto bactericida.

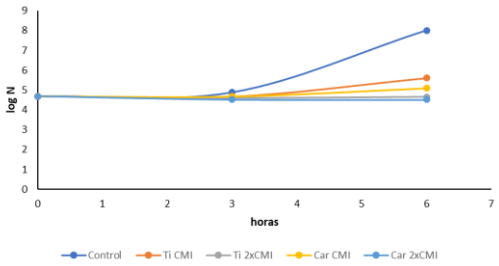


Figura 3: Recuento de *C. sakazakii* en FIR en presencia de CAE inmovilizada a 45ºC

Se observa un efecto sinérgico entre la temperatura de incubación y las partículas funcionalizadas. Un aumento de 5ºC implica un incremento de la actividad antimicrobiana de las partículas,

alcanzándose inactivaciones de 2 ciclos logarítmicos cuando se usa timol inmovilizado y de 3 ciclos al usar carvacrol inmovilizado.

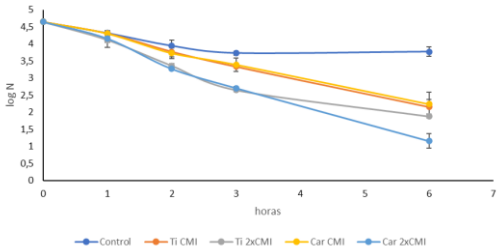


Figura 4: Recuento de C. sakazakii en FIR en presencia de CAE inmovilizada a 50ºC

Del presente estudio se puede concluir que (1) el timol y el carvacrol inmovilizado tienen una destacable actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii* en un alimento complejo como son las FIR; (2) Se observa un efecto sinérgico en la inactivación del *C. sakazakii* al combinar temperaturas suaves no letales y las partículas funcionalizadas; (3) La temperatura es un parámetro a tener en cuenta cuando se usa este tipo de estrategia de pasteurización en fórmulas infantiles reconstituidas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del proyecto PID2021-128141OB-C21 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por "FEDER Una manera de hacer Europa" y financiado con Ayudas para Primeros Proyectos de Investigación (PAID-06-23), Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV)

REFERENCIAS

[1] Fanning, S. and Forsythe, S., *Enterobacter sakazakii* (eds J.M. Farber, S.J. Forsythe and M.P. Doyle, 2007).

[2] Hunter CJ, Bean JF, *J Perinatol,* **2013**, 33(8): 581-5.

[3] FAO/WHO, *Enterobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) in powdered follow-up formula: meeting report (2008).

[4] Kalyantanda, G., Shumyak, L., and Archibald, L. K., *Front Pediatr.,* **2015***, Jul 2*, 3:56.

[5] US Food and Drugs administration. https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/investigacion-de-la-fda-sobre-quejas-por-cronobacter-formula-infantil-en-polvo-febrero-de-2022. Acceso: 27/06/2024

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SUBPRODUCTOS VEGETALES SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Pierric Louis Désiré Chuppa[1,2], Alfredo Palop[1], Alberto Garre[1], Enriqueta García Gutiérrez[1], Paula M. Periago Bayona[1].

[1] Departamento de Ingeniería Agronómica, Instituto de Biotecnología Vegetal, ETSIA-Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, España
[2] IUT de Saint-Pierre, Université de La Réunion,

enriqueta.garcia@upct.es

Resumen

Staphylococcus aureus *es un patógeno alimentario que representa un grave riesgo para los consumidores, ya que puede inducir infecciones gastrointestinales. En consecuencia, es crucial desarrollar protocolos destinados a reducir y, en última instancia, eliminar este microorganismo en los productos alimenticios. Los subproductos vegetales, como los aceites esenciales, pueden representar una buena alternativa alternativa para el control microbiológico en alimentos. En este estudio, desarrollamos nanoemulsiones a diferentes concentraciones utilizando aceites esenciales de dos subproductos vegetales para investigar su efecto potencial sobre* S. aureus*. Las curvas de crecimiento se generaron utilizando un Bioscreen C y los datos se analizaron posteriormente utilizando paquetes de R. Nuestros resultados muestran que diferentes concentraciones de ambos aceites esenciales indujeron comportamientos diferentes en el crecimiento de* S. aureus *durante periodos de 48 horas, lo que sugiere efectos tanto bactericidas como bacteriostáticos y, por lo tanto, diferentes aplicaciones para el control de patógenos en la industria alimentaria.*

Palabras clave Staphylococcus aureus*, aceites esenciales, subproductos vegetales, nanoemulsión, antimicrobianos naturales*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva que se puede encontrar en numerosos hábitats, incluyendo mucosas de los humanos y otros animales. Sin embargo, puede causar una variedad de infecciones, desde leves hasta potencialmente mortales, cuando se introduce en el cuerpo a través de heridas o el consumo de alimentos contaminados.

Su control en la industria alimentaria es importante ya que *S. aureus* produce enterotoxinas que pueden causar intoxicaciones alimentarias. Los síntomas incluyen náuseas, vómitos, calambres abdominales y diarrea, que pueden aparecer rápidamente después de consumir alimentos contaminados. Esta bacteria puede encontrarse en una amplia variedad de alimentos, incluyendo carnes, productos lácteos y preparados listos para el consumo. Las condiciones de manipulación y almacenamiento inadecuadas pueden

facilitar su crecimiento y producción de toxinas. Además, los brotes de intoxicación alimentaria causados por *S. aureus* pueden llevar a retiros de productos, pérdidas económicas significativas y daño a la reputación de las empresas alimentarias.

Por ello, es crucial implementar medidas de control y prevención en todas las etapas de la cadena de producción alimentaria. Esto incluye buenas prácticas de higiene, control de temperatura y el uso de conservantes y aditivos que inhiban el crecimiento bacteriano, así como la investigación y desarrollo de nuevas estrategias, como el uso de aceites esenciales y otros compuestos naturales con propiedades antimicrobianas.

En este trabajo se ha evaluado la capacidad para limitar el crecimiento bacteriano de dos aceites esenciales en forma de aceites esenciales que se prepararon mediante ultrasonicación.

Figura 1: Preparación de nanoemulsión por ultrasonido desde un método modificado [1].

Se evaluaron las curvas de cremiento de S. aureus cuando estuvo expuesto a tres concentraciones de cada aceite esencial.

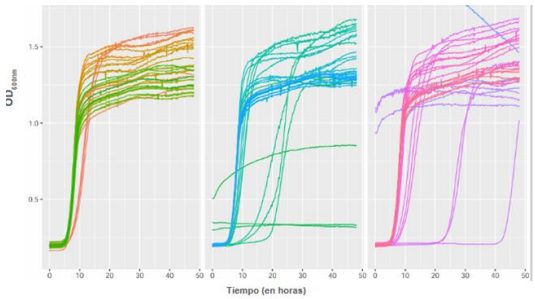


Figura 2: Curvas de crecimiento de *S. aureus* frente a tres concentraciones de nanoemulsión del aceite esencial 1 durante 48 horas a 37°C en condiciones aeróbicas.

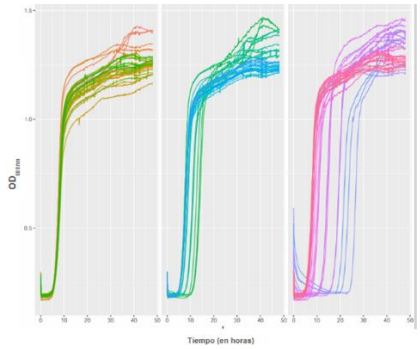


Figura 3: Curvas de crecimiento de *S. aureus* frente a tres concentraciones de nanoemulsión del aceite esencial 2 durante 48 horas a 37°C en condiciones aeróbicas.

Nuestros resultados muestran que la concentración 3 del aceite esencial 1 inhibe crecimiento de *S. aureus*, mientras que las concentraciones 1 y 2 de la nanoemulsión del aceite esencial 1 alargan la fase de latencia, pero no impide el crecimiento microbiano a lo largo del tiempo. Por el contrario, las tres concentraciones de la nanoemulsión 2 alarga la fase de latencia sin impedir el crecimiento microbiano. Por lo tanto, concluimos que la nanoemulsión de aceite esencial 2 es un buen candidato para investigar sus efectos bactericidas y bacteriostáticos contra *S. aureus*.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada en parte con el proyecto PID2020-116318RB-C32 por el

Ministerio de Ciencia de España, MCIN/AEI/10.13039/501100011033, así como por el programa AGROALNEXT. AG está financiado con el programa Ramón y Cajal (RYC-2021-034612-I). EGG está financiada con el programa Beatriz Galindo del Ministerio de Universidades de España (BG22/00060).

REFERENCIAS

[1] Z. Zhang, F. Vriesekoop, Q. Yuan, and H. Liang. Food Chemistry 2014, 150, 307-12. doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.160.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS NATURALES EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS Y GRAM-NEGATIVAS DE ORIGEN ALIMENTARIO

Rodríguez-Melcón, Cristina[1,2,3]; Sánchez-Hernández, Eva[3]; Buzón-Durán, Laura[3]; Martín-Ramos, Pablo[3]; Martín-Gil, Jesús[3]; Capita, Rosa[1,2]; Alonso-Calleja, Carlos[1,2]

1 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, 24071-León, España.
2 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León, Calle La Serna, nº 58, 24007-León, España.
3 Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, E.T.S. de Ingenierías Agrarias, Universidad de Valladolid, Campus de Palencia, Avda. de Madrid s/n, 34004-Palencia, España.

crodm@unileon.es; rosa.capita@unileon.es; carlos.alonso.calleja@unileon.es

Resumen / Abstract

Los compuestos de origen natural se han establecido como alternativas prometedoras al uso de sustancias químicas antimicrobianas. El objetivo de este estudio fue determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs) y las Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMBs) de tres sustancias naturales (ácido cafeico, ácido p-cumárico y quitosano) en cepas de bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes*) *y Gram-negativas* (*Salmonella enterica*)*. Las CMIs de las cepas Gram-positivas para los ácidos ensayados oscilaron entre 2.000 ppm y 3.000 ppm, y fueron de 800 ppm para el quitosano. En el caso de las bacterias Gram-negativas, las CMIs fueron de 3.000 ppm para los tres compuestos antimicrobianos estudiados. Las CMBs fueron iguales en todos los casos a los valores de las CMIs. Los resultados de este trabajo aportan información sobre las concentraciones de compuestos naturales que inhiben o inactivan determinados grupos de bacterias patógenas y que siempre deberían superarse al ser aplicados, tanto en la industria alimentaria como en el sistema sanitario.*

Palabras clave / Key words: *Compuestos naturales, antimicrobianos, MIC, MBC*

Los compuestos de origen natural se han establecido como alternativas prometedoras a los agentes antimicrobianos utilizados actualmente como aditivos o coadyuvantes alimentarios, como biocidas en la limpieza y desinfección de superficies y equipos de las industrias alimentarias, o como agentes con carácter antibiótico en la lucha contra las infecciones bacterianas (Winkelströter *et al.*, 2022).

Listeria monocytogenes es una bacteria zoonósica muy extendida responsable de la listeriosis (Rodríguez-Melcón *et al*., 2023), una infección que afecta especialmente a determinados grupos de riesgo, conocidos como YOPIs (niños, ancianos, mujeres embarazadas y personas inmunocomprometidas). En el año 2022 se notificaron en la Unión Europea 2738 casos de listeriosis invasiva humana y 286 muertes asociadas. Por su parte, la salmonelosis es la zoonosis vinculada al mayor número de casos en la Unión Europea, después de la campilobacteriosis, con un total de 65208 casos confirmados y un total de 81 muertes asociadas en el año 2022. Se trata, asimismo, de la bacteria responsable del mayor número de brotes de origen alimentario (EFSA y ECDC, 2023).

El objetivo de este estudio fue determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs) y las Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMBs) de varias sustancias naturales en bacterias Gram positivas, como *Listeria monocytogenes* serotipos 4b (LM 30) y 1/2b (LM 31) y Gram-negativas, como *Salmonella enterica* serotipos Typhimurium (ST 175) y Enteritidis (SE 122). Además, se llevó a cabo la evaluación del potencial antimicrobiano del etanol (EtOH) y del metanol (MetOH), candidatos como solventes de los compuestos indicados.

Los compuestos naturales con propiedades antimicrobianas ensayados fueron el ácido p-cumárico (PC; CAS 501-98-4, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), el ácido cafeico (C; CAS 331-39-5, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y el quitosano de alto peso molecular (COS; CAS 9012-76-4; 310.000-375.000 Da, Hangzhou Simit Chemical Technology Co., Ltd., Hangzhou, China).

Las CMIs se establecieron utilizando el método de microdilución en caldo en placas de microtítulo (CLSI), definiéndose como las concentraciones de biocidas mínimas necesarias para impedir el crecimiento bacteriano después de 48 horas de incubación a 37 °C. Para determinar las CMBs se sembraron 100 microlitros de los pocillos sin crecimiento observado en placas con agar triptona de soja (TSA), fijándose la CMB como la concentración más baja en la que no se observó el crecimiento de colonias.

Por lo que respecta al EtOH, se estudió un rango de concentraciones (de 10.000 ppm a 100.000 ppm), determinándose la densidad óptica ($DO_{420\text{-}580nm}$) a lo largo del tiempo y estableciéndose la CMI en 40.000 ppm para las cepas de *S. enterica* y en 60.000 ppm para las cepas de *L. monocytogenes*. En cuanto a los resultados obtenidos en el caso del MetOH, los valores de CMI ($DO_{420\text{-}580nm}$) estuvieron por encima de 100.000 ppm (Figura 1).

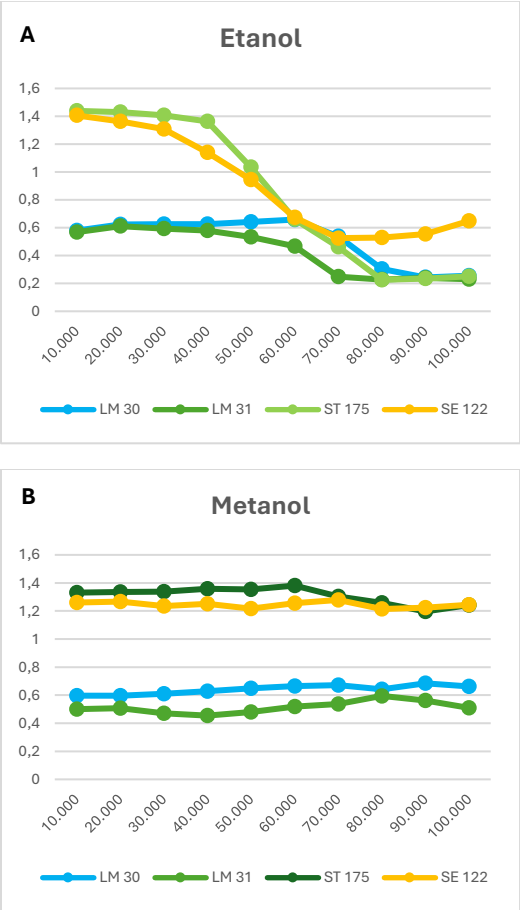


Figura 1. Datos medios de densidad óptica a las 48 horas de incubación ($DO_{420\text{-}580\ nm}$) obtenidos tras la exposición de los microorganismos seleccionados a diferentes concentraciones de etanol (A) y metanol (B).

En el caso de las bacterias Gram-positivas, las CMIs para el ácido cafeico y el ácido p-cumárico oscilaron entre 2.000 ppm y 3.000 ppm, y fueron de 800 ppm para el quitosano. Las CMIs en las

cepas de bacterias Gram-negativas fueron de 3.000 ppm para los tres compuestos antimicrobianos estudiados. Las CMBs fueron iguales en todos los casos a los valores de CMI obtenidos. En la Figura 2 se muestran los datos de CMI y CMB de los diferentes compuestos ensayados.

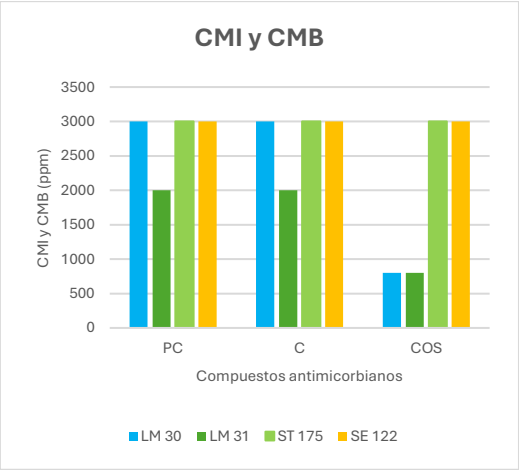


Figura 2. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) y concentraciones mínimas bactericidas (CMBs) de los 3 compuestos antimicrobianos en cepas de *L. monocytogenes* y *S. enterica*. PC, ácido p-cumárico; C, ácido cafeico; COS, quitosano.

Los resultados de este trabajo aportan información sobre las concentraciones de compuestos naturales que inhiben o inactivan determinados grupos de bacterias patógenas y que siempre deberían superarse al ser aplicados, tanto en la industria alimentaria como en el sistema sanitario.

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Ciencia e Innovación (RTI2018-098267-R-C33 y PID2022-142329OB-C31) y Junta de Castilla y León (Consejería de Educación, LE018P20). Cristina Rodríguez-Melcón es beneficiaria de una Ayuda postdoctoral para la recualificación del sistema universitario español en la modalidad Margarita Salas.

REFERENCIAS

[1] EFSA y ECDC. (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal* **21**(12), e8442. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442

[2] Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2023). Effect of low doses of biocides on the susceptibility of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* enterica to various antibiotics of clinical importance. *Food Control* **149**, 109602. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109602

[3] Winkelströter, L. K., Bezirtzoglou, E., Tulini, F. L. (2022). Editorial: Natural compounds and novel sources of antimicrobial agents for food preservation and biofilm control. *Frontiers in Microbiology* **13**, 856858. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.856858

DESARROLLO DE SUPERFICIES FUNCIONALIZADAS CON ANTIMICROBIANOS NATURALES PARA EVITAR LA ADHERENCIA DE BACTERIAS PRESENTES EN REDES DE CONDUCCIÓN DE AGUAS DE USO PÚBLICO

Pérez-Esteve E.[1*], González A. [1], Fornés A.[2], Moumaime O.[1], Barat J.M.[1], Moreno Y[2].

1 Universitat Politècnica de València. Instituto de Ingeniería de Alimentos FoodUPV. C/ Camí de Vera s/n.
2 Universitat Politècnica de València. Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente. C/ Camí de Vera s/n.

*edpees@upv.es

Resumen / Abstract

Los microorganismos patógenos pueden adherirse a las superficies de los sistemas de conducción de agua, lo que finalmente resulta en estructuras de biopelículas. Considerando la importancia de la capacidad de adhesión de las células y la formación de biopelículas en estas superficies, su inhibición mediante el uso de compuestos antimicrobianos de origen natural puede ser una alternativa potencial o un complemento a la cloración del agua. El presente trabajo tiene como objetivo reducir la formación de biopelículas mediante la funcionalización de superficies en contacto con el agua con diversos componentes de aceites esenciales. En primer lugar, se evaluó la capacidad de formación de biopelículas de 15cepas bacterianas aisladas de aguas de la red pública secundaria, seleccionando las seis con mayor capacidad. Paralelamente, se cuantificó la capacidad de adhesión de estas cepas en presencia de cinamaldehído y timol. Tras comprobar que la capacidad de adhesión celular se reducía en presencia de estos antimicrobianos naturales, se procedió a inmovilizar covalentemente los dos compuestos de aceites esenciales sobre placas de acero inoxidable y se evaluó la capacidad de las placas funcionalizadas para reducir la formación de biopelículas. Los resultados demuestran que la funcionalización con componentes de aceites esenciales ha sido efectiva para evitar la formación de biopelículas en aceros inoxidables, uno de los materiales presentes en las rejillas de desbaste incluidas en la red pública de conducción de agua de uso público.

Palabras clave / Key words: *Biopelículas, redes conducción de agua, cinamaldehído, timol.*

1. Introducción

La potabilización de aguas de uso público, empleadas para riego de jardines y fuentes en diversas ciudades, es una estrategia reciente para reducir la presencia de bacterias ambientales. A pesar de los tratamientos suaves de cloración utilizados para mejorar la calidad microbiológica en esta red secundaria sin afectar el crecimiento de plantas y árboles, aún pueden persistir poblaciones bacterianas que se adhieren a las superficies de los sistemas de conducción de agua, formando biopelículas que dificultan su eliminación. Numerosos estudios han demostrado que el crecimiento y la presencia de biopelículas

en las tuberías de agua conducen a un deterioro en la calidad del agua suministrada, aceleran los procesos de corrosión y rotura de tuberías, y, por lo tanto, aumentan los costes de mantenimiento [1].

En la búsqueda de purificar el agua para consumo humano utilizando componentes de aceites esenciales (CAE) como el cinamaldehído (Cin) o timol (Tim), asegurando al mismo tiempo que no se altere el olor, sabor o toxicidad del agua, la inmovilización de estos compuestos sobre partículas de óxido de silicio se ha mostrado como un método pionero y eficaz [2]. Sin embargo, hasta donde sabemos, no se han realizado estudios para investigar la capacidad antiadherente o la formación de biopelículas en superficies de acero inoxidable funcionalizadas con compuestos antimicrobianos de origen natural. Por lo tanto, el principal propósito de este trabajo fue estudiar la capacidad antiadherente de las superficies de acero inoxidable funcionalizadas con dos componentes de aceites esenciales contra bacterias formadoras de biopelículas aisladas de una red de agua real de baja presión.

2. Materiales y métodos

Las superficies de acero inoxidable (316L) fueron pretratadas mediante lijado y/o pulido por ambas caras, utilizando un disco de pulido y una suspensión de diamante. Posteriormente se lavaron sucesivamente con ultrasonidos durante 15 minutos en hexano, 10 minutos en agua destilada y 20 minutos en acetona. Este proceso se llevó a cabo por triplicado. Los soportes limpios se activaron sumergiéndolos en ácido peroximonosulfúrico durante 15 minutos, se retiró esta solución y se añadieron otros 5 mL de la misma solución inicial durante 5 min, para producir una superficie enriquecida con hidroxilo. Finalmente, los soportes se sumergieron en agua destilada durante 18 horas y se secaron a temperatura ambiente antes de ser funcionalizados con Cin obtenido siguiendo el procedimiento descrito por Ruiz-Rico *et al*. [2] o con Tim siguiendo la reacción de Mannich [3].

A continuación, se determinó el efecto de los dos CAEs sobre la capacidad de inhibición de las siete cepas bacterianas con mayor capacidad de adhesión. Para ello se utilizó el método descrito por Orhan-Yanikan et al. [4], con algunos cambios.

Una vez determinada la capacidad de formación de biopelícula de dichas cepas, se seleccionó una cepa (*Kocuria rhizophila*) para el estudio de crecimiento sobre las placas de acero inoxidable funcionalizadas y no funcionalizadas. Para este estudio se transfirieron 300 µL del inóculo a tubos de 15 mL con medio de cultivo estéril, que contenían superficies de acero inoxidable funcionalizadas o no funcionalizadas, y se incubaron durante 4 días a 37°C. Después de la incubación, las superficies se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril por triplicado. A continuación, se utilizaron 10 mL de cristal violeta (0,1%, p/v) para teñir las células adheridas a las superficies en estudio. Después de un contacto de 10 minutos, el exceso de tinte se eliminó añadiendo agua estéril. Finalmente, el tinte presente en las células adheridas se disolvió con 10 mL de una solución de ácido acético (33%) y se midió la absorbancia a 492 nm con un lector de microplacas (VANTAstar).

3. Resultados

La Tabla 1 muestra los resultados de la prueba de formación de biopelículas de

cada una de las cepas objeto de estudio sobre una superficie de poliestireno, como un indicador in vitro de producción de biopelículas. Los resultados revelaron que las cepas podían dividirse en cuatro grupos de acuerdo a esta capacidad de formación de biopelículas.

Tabla1: Capacidad de formación de biopelículas de cepas aisladas de aguas de baja presión.

Baja	Media
-Massilia aurea *-Aminobacter sp.* *-Cellulosimicrobium cellulans* *-Microbacterium oxydans*	*-Brevundimonas vesicularis* *-Ensifer adhaerens* *-Paenarthrobacter nitroguajacolicus* *-Priestia endophytica*
Alta	**Muy alta**
-Brevundimonas nasdae *-Acintobacter ligi* *-Bacillus tequilensis* *-Pseudomonas Koreensis*	*-Kocuria rhizophila* *-Staphylococcus nepalensis* *-Staphylococcus lentus*

Una vez determinada la capacidad de formación de biopelículas, para la segunda parte del estudio se seleccionaron las 6/8 cepas con mayor capacidad de formación de biopelículas.

A modo de ejemplo, la **Fig. 1** muestra la influencia de los EOCs en la capacidad de formación de biopelículas de *Kocuria rhizophila* en placas multipocillo poliestireno. Como puede observarse, en ausencia de Cin o Tim, la bacteria es capaz de formar una biopelícula fuerte que absorbe la rodamina, que posteriormente es cuantificada mediante un fluorímetro. Sin embargo, añadiendo cantidades de los dos CAE similares a la concentración mínima inhibitoria, la capacidad de formación de biopelícula se reduce significativamente hasta niveles imperceptibles. Resultados similares se han obtenido para el resto de cepas probadas en esta parte del estudio. Resultados similares se obtuvieron para el resto de las cepas, demostrando que los dos CAE utilizados poseen una buena capacidad de inhibición de la capacidad de adhesión sobre las superficies.

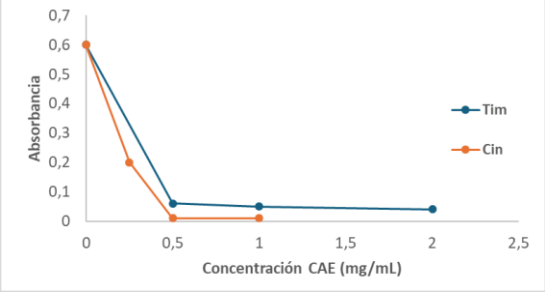


Figura 1: Efecto de la concentración de Timol (Tim) o Cinamaldehído (Cin) sobre la formación de biopelícula de *Kocuria rhizophila*

Una vez comprobada la acción de los dosCAE libres para inhibir la formación de biopelículas de forma libre, se probó la capacidad de los mismos para inhibir la adhesión una vez inmovilizados sobre placas de acero inoxidable. A modo de ejemplo, la **Fig. 2** muestra la capacidad de adhesión de *Kocuria rhizophila* sobre placas de acero inoxidable antes y después de la funcionalización con Tim o Cin.

Como puede apreciarse, aún después de la inmovilización, los dos antimicrobianos mantuvieron su capacidad para la formación de biopelícula.

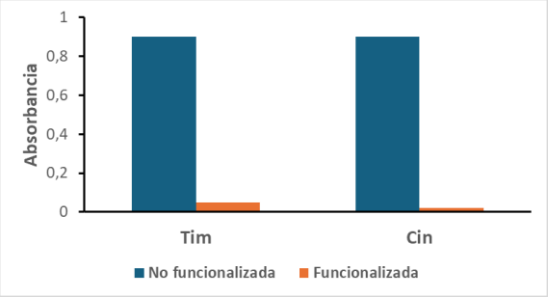


Figura 2: Capacidad antiadhesiva *in vitro* de superficies de acero inoxidable no funcionalizadas y funcionalidas con Timol (Tim) o Cinamaldehído (Cin) frente a *Kocuria rhizophila.*

4. Conclusiones

Los resultados muestran que la funcionalización con componentes de aceites esenciales ha sido efectiva para evitar la formación de biopelículas en aceros inoxidables, uno de los materiales presentes en las rejillas de desbaste incluidas en la red pública de conducción de agua de uso público. Este efecto fue especialmente notable en las biopelículas formadas por *Kocuria rhizophila*, una de las cepas que forman biopelículas más fuertes. Estos resultados subrayan la importancia de incorporar tratamientos combinados para mejorar la calidad microbiológica de las aguas de uso público sin utilizar excesos de cloro que podrían afectar al crecimiento de las plantas y árboles regados con las mismas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Agencia Valenciana de la Innovación a través del proyecto INNEST/2022/211.

REFERENCIAS

[1] A. Farkas, D. Ciataras, B. Bocos, (2012). Water Treatment and Reuse. Biofilms Impact on Drinking Water Quality (Dr Voudouris, 2012).

[2] M. Ruiz-Rico, É. Pérez-Esteve, É., A. Bernardos, … J.M. Barat, Food chem., **2017**, 233, 228-236.

[3] C.R. Sahoo, S.K. Paidesetty, R.N. Padhy, Drug Dev. Res., **2021**, 82(8), 1079–1095.

[4] E. Orhan-Yanıkan, S. da Silva-Janeiro, S., M. Ruiz-Rico, A.I. Jiménez-Belenguer, K. Ayhan, J.M. Barat, *Food Control*, **2019**, 101, 29-38.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *POLIOMINTHA LONGIFLORA* GRAY FRACCIONADO FRENTE A *LISTERIA MONOCYTOGENES* A TRAVÉS DEL DESARROLLO DE MODELOS PREDICTIVOS

Mariana Pimentel-González[1,2*], Sandra Castillo[2], José Rodríguez[3], Aricia Possas[1], Antonio Valero[1].

1 Universidad de Córdoba/ Campus Rabanales/ Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos/ UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes (ENZOEM), CeiA3, 14014 Córdoba, España.
2 Universidad Autónoma de Nuevo León/ Departamento de Ciencia de los Alimentos/ Facultad de Ciencias Biológicas/ Unidad B. S/N Cd. Universitaria, 66455, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
3 Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey/ Escuela de Ingeniería y Ciencias, Av. Eugenio Garza Sada 2501 Sur, Tecnológico, 64849, Monterrey, Nuevo León.

*maferpimentel@outlook.es

Resumen / Abstract

La presencia de Listeria monocytogenes *en alimentos listos para el consumo (RTE) ha llevado a la búsqueda de alternativas para reducir el riesgo asociado a este patógeno. La destilación fraccionada del aceite esencial de orégano (AEO) ha permitido extraer compuestos de interés, como el timol y el carvacrol, y minimizar el impacto de otros elementos del aceite puro que podrían interferir con sus actividades biológicas. El desarrollo de modelos de microbiología predictiva permite cuantificar el efecto de concentraciones subletales de antimicrobianos naturales de forma aislada o combinados con parámetros como pH, sales y/o tratamientos térmicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento y la inactivación de* L. monocytogenes *al añadir AEO Poliomintha longiflora, puro (OP) y fraccionado por destilación a 140°C (FIV), simulando condiciones generalmente encontradas en el procesamiento de alimentos RTE en un medio líquido. La cinética de crecimiento de* L. monocytogenes *se evaluó en microplacas utilizando AEO (0, 0.01, 0.05 y 1% v/v) con distintos niveles de pH (5.5 y 6.5) y NaCl (0 y 3.5% m/v). La inactivación se evaluó a 52, 54, 57.5 y 63°C añadiendo AEO al 0.06%. Los resultados mostraron una reducción significativa de la tasa máxima de crecimiento y un aumento del tiempo de detección de* L. monocytogenes *a concentraciones de FIV de 0.05%, mientras el pH y NaCl no afectaron el crecimiento. El modelo de inactivación Weibull-Mafart presentó el mejor ajuste a los datos observados (RMSE<0.50). FIV mostró reducir significativamente el valor D (min) de* L. monocytogenes *a 54 y 57.5°C en comparación del control y el OP. Se concluye que la actividad de FIV puede resultar prometedora contra* L. monocytogenes*, y su aplicación podría ser viable en la formulación de alimentos RTE.*

Palabras clave / Key words: *Inactivación térmica, valor D, cinética de crecimiento, antimicrobianos naturales, patógenos alimentarios.*

La prevalencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo o Ready-to-Eat (RTE) sigue siendo de gran preocupación al ocurrir brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) a pesar de la aplicación de medidas preventivas para la mitigación del riesgo [1]. El consumo de alimentos contaminados con este patógeno puede provocar desde leves dolores gastrointestinales, hasta problemas cerebrales, abortos y/o la muerte en personas inmunosuprimidas [2]. La microbiologia predictiva es una herramienta que ayuda a comprender, mediante modelos matemáticos, el comportamiento de microorganismos patógenos en la procesos de la industria alimentaria [2,3]. Estos modelos permiten predecir el crecimiento o la inactivación de patógenos bajo condiciones ambientales específicas como la temperatura, la acidez, la actividad de agua, el uso de aditivos, entre otros parámetros, que cuantifican el comportamiento microbiano asegurando la inocuidad de los productos [4]. La composición química de los aceites esenciales (AE) contiene moléculas con grupos funcionales hidroxilo que actuan modificando la permeabilidad de la membrana celular [5]; siendo sustancias generalmente reconocidas como seguras para el consumo. Se han aprovechado para ser utilizados como aditivos de origen natural [6] y entre los métodos para su obtención, el fraccionamiento del aceite essencial de orégano (AEO) ha permitido obtener mayor concentración de compuestos de interés y disminuir el efecto de compuestos con menor actividad [7]. Este estudio tuvo como objetivo, evaluar el efecto de concentraciones subletales de aceite esencial de orégano de la especie mexicana *Poliomintha longiflora*, en su estado puro (OP), obtenido mediante destilación por arrastre de vapor y, aceite esencial de orégano fraccionado (FIV) obtenido a partir del OP por destilación fraccionada a 140 °C (Figura 1). Los dos compuestos mayoritarios en el OP fueron carvacrol (34.09%) y o-cimeno (21.51%), y en la aceite fraccionado (FIV) fueron carvacrol (60.23%) y timol (21.17%).

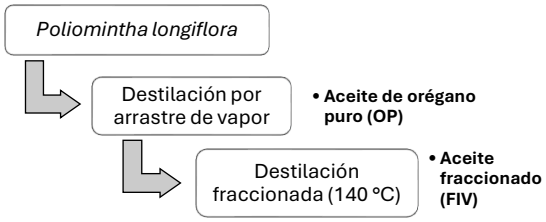


Figura 1. Diagrama de la obtención de AEO puro (OP) y fraccionado (FIV).

A partir de la concentración subletal obtenida anteriormente para OP = 0.13% y para FIV = 0.09%, se implementaron en ensayos de crecimiento e inactivación de *L. monocytogenes* de la siguiente forma: se preparó por separado una solución de tween 80 al 1% v/v con agua destilada y se esterilizó. Se diluyó el AEO en el Tween 80 al 2% para lograr las concentraciones subletales. Posteriormente se agitaron en vórtex durante 2 min para asegurar la disolución del aceite [8].

Inicialmente se realizaron cinéticas de crecimiento utilizando una cepa *L. monocytogenes* previamente adaptada a condiciones utilizadas en la producción de productos cárnicos RTE: adición de nitrato de sodio y cloruro de sodio. Se evaluó la adición de OP y FIV a 0, 0.05 y 1.0 %, así como la modificación del pH (5.5 y 6.5) y la adición de NaCl (0 y 3.5%). Los ensayos se realizaron en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) en microplacas de 100 pocillos, con dos repeticiones por duplicado. El crecimiento se midió en Bioscreen C a una absorbancia de 600 nm a

25°C realizando lecturas cada 30 minutos durante 72 h. A partir de la fase exponencial de las curvas de crecimiento se obtuvieron dos parámetros: tasa màxima de crecimiento (Figura 2) y tiempo de detección (Td) (Figura 3).

Los resultados se analizaron utilizando el software estadístico R Studio mediante un ANOVA paramétrico y una prueba postHoc ajustada al método bonferroni ($p<0.05$). Los análisis demostraron que no se encontraron diferencias significativas en los resultados tras la adición de NaCl. El pH si presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) en donde los tratamientos con pH = 5.5 motraron reduir la tasa máxima de crecimiento y prolongar el tiempo de detección.

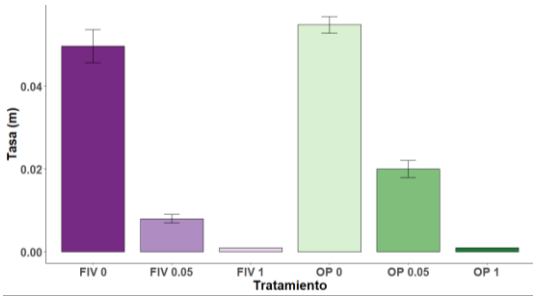


Figura 2: Tasa máxima de crecimiento de *L. monocytogenes* con la aplicación de AEO puro (OP) y fraccionado (FIV) a 0, 0.05 y 1.0% (25°C).

La Figura 2 demuestra que al añadir OP y FIV desde 0.05 %, la tasa de crecimiento disminuye significativamente, siendo menor el crecimiento con FIV que con la adición de OP. En la Figura 3 se observa que el tiempo de detección se prolongó al añadir 0.05 % de FIV, mientras que en el caso de OP no tuvo diferencias significativas con el tratamiento al que no se le añadió AEO. En ambos casos, el AEO al 1%, inhibió completamente el crecimiento de *L. monocytogenes*.

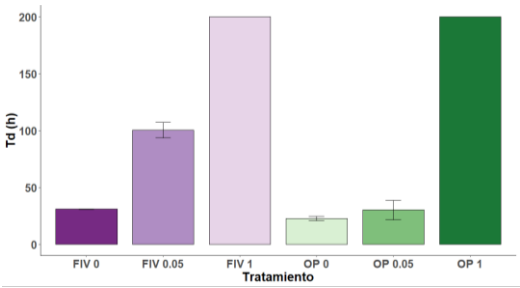


Figura 3: Tiempo de detección (h) de *L. monocytogenes* con la aplicación de AEO puro (OP) y fraccionado (FIV) a 0, 0.05 y 1.0% (25°C).

Los ensayos de inactivación a 52, 54, 57.5 y 63°C se realizaron en tubos de ensayo con caldo BHI modificado con la adición de glucosa (18% m/v) y extracto de levadura (3% m/v) [8]. A los tubos con medio simulado se les añadió 0.06% de OP y FIV de forma independiente, contemplando un control al que solo se le añadió Tween 80 al 1 %. Los tubos se llevaron a precalentar a un baño de agua hasta alcanzar la temperatura de tratamiento térmico y posteriormente, se añadió un inoculo activo previamente de *L. monocytogenes* para alcanzar una concentración inicial de $1x10^8$ UFC/mL y se inicio el tratamiento térmico de 0-30 min, dependiendo la temperatura aplicada. Se tomaron muestras a intervalos regulares de tiempo y se trasladaron a un baño de hielo para detener la inactivación. Se realizaron diluciones seriadas para, posteriormente, sembrar los tratamientos en placas petri con agar Oxford estéril. Se incubaron a 37°C durante 24 h y se realizó el recuento de las colonias viables utilizando un contador de colonias automático Flash & Go (Interscience®). Los resultados se interpretaron en Log UFC/mL en función del tiempo (Figura 4). Los resultados para OP, FIV y el control se ajustaron al modelo primario Weibull-Mafart (RMSE <0.50) utilizando el software Bioinactivation4 para obtener el valor D (min) (tabla 1).

Se realizó una comparación de medias t-student en el software estadístico OpenStat de los valores D (min) de cada temperatura para los tres tratamientos.

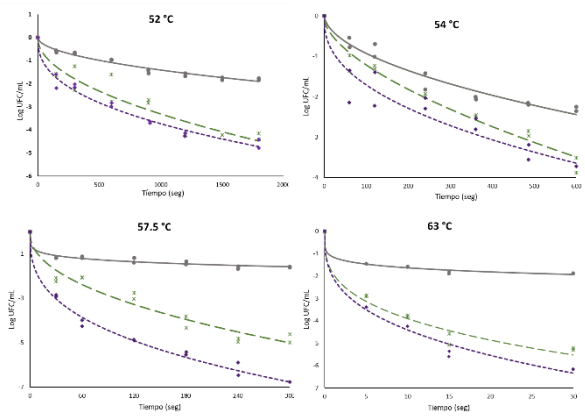


Figura 4: Curvas de inactivación de *L. monocytogenes* a 52, 54, 57.5 y 63°C con y sin la adición de AEO. Control (línea contínua); AE orégano puro OP (línea discontínua) y AE orégano fraccionado (línea punteada).

La adición de AEO redujó significativamente el valor D desde la aplicación de tratamientos térmicos a 52°C en comparación de los tratamientos sin aceite essencial ($p < 0.05$). A 54 y 57.5°C fue donde se observó una diferencia significativa entre los aceites esenciales ($p<0.05$), siendo menor el valor D al utilizar FIV ($D_{54°C}$= 0.54 ± 0.35 min y $D_{57.5°C}$= 0.02 ± 0.01 min), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre OP y el control ($p>0.05$).

Tabla 1: Valor D (min) de *L. monocytogenes*. $D_{52°C}$, $D_{54°C}$, $D_{57.5°C}$ y $D_{63°C}$ de los tratamientos con AEO: puro (OP) y fraccionado (FIV) y sin AEO (control).

	Valor D (min)		
T (°C)	**Control**	**OP**	**FIV**
52	8.47 ± 1.51	1.75 ± 1.05	0.64 ± 0.24
54	1.80 ± 0.50	1.35 ± 0.35	0.54 ± 0.35
57.5	0.33 ± 0.17	0.17 ± 0.09	0.02 ± 0.01
63	0.01 ± 0.00	2.00×10^{-3} ± 1.00×10^{-3}	2.00×10^{-3} ± 1.00×10^{-3}

Los resultados del modelo primario para 52, 54, 57.5 y 63°C se ajustaron al modelo secundario de un paso Weibull-Mafart para obtener el valor Z (°C), tomando como referencia la temperatura de 57.5°C (Figura 5). Además del RMSE < 0.50, se considero el valor del Criterio de Información de Akaike (AIC), del cual se obtuvieron los siguientes resultados: 31.07 (control), 67.24 (OP) y 73.07 (FIV). Los valores Z obtenidos fueron 5.75, 5.20 y 5.00 °C para el control, OP y FIV, respectivamente.

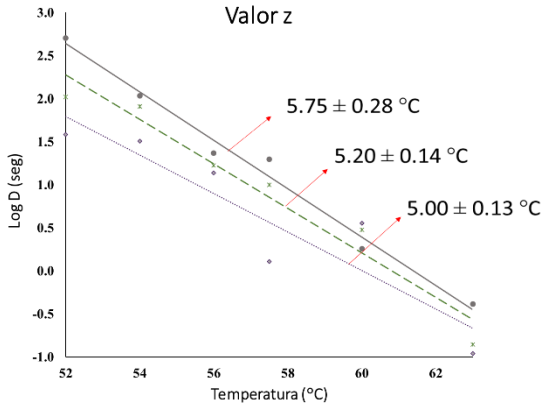


Figura 5: valor Z (°C) de *L. monocytogenes.* Control (línea contínua); AE orégano puro OP (línea

discontínua) y AE orégano fraccionado (línea punteada).

De esta forma, el estudio permite concluir que el fraccionamiento de aceites esenciales, en este caso el aceite essencial de orégano a su concentración subletal, es favorable para prolongar y reducir el desarrollo de *L. monocytogenes* a temperatura ambiente utilizando pH de 5.5 e inactivar este patógeno con poco tiempo de exposición a temperaturas medias desde 52°C. Esto demuestra que su aplicación podria ser viable en alimentos RTE.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), no. Becario: 1184786; a la Universidad Autónoma de Nuevo León; a la Fundación UANL; al Tecnológico de Monterrey y a la Universidad de Córdoba.

REFERENCIAS

[1] A. Ricci, A. Allende, D. Bolton, M. Chemaly, R. Davies, P. S. Fernández, R. Girones, L. Herman, K. Koutsoumanis, B. Norrung, L. Robertson, G. Ru, M. Sanaa, M. Simmons, P. Skandamis, E. Snary, N. Speybroeck, B. Ter, J. Threlfall, R. Lindqvist, EFSA Journal, **2021**, 16, 1764-1776.

[2] CDC. 2023. *Listeria* Outbreak Linked to Deli Meat and Cheese. https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/deli-11-22/index.html. Accessed: 20/06/2024.

[3] A. Possas, O. Bonilla-Luque, A. Valero, A. Gonzales-Barron, V. Cadavez, Foods, **2021**, 10, 355.

[4] A. Soni, P. Bremer, G. Brightwell, Foods **2022**, 11, 4117.

[5] I. Bautista-Hernández, C. N. Aguilar, G. C. G. Martínez-ávila, C. Torres-León, A. Ilina, A. C. Flores-Gallegos, D. Kumar Verma, M. L. Chávez-González, Molecules, **2021**, 26, 5156.

[6] W. Messens, S. Bover-Cid, M. Hempen, R. Lindqvist, M. Nauta, P. N. Skandamis, P. Stella, K. Koutsoumanis, International Journal of Food Microbiology, **2023**, 403, 110302.

[7] B. Silva, B., V. Cadavez, J. A. Teixeira, U Gonzales-Barron, Foods, **2020**, 9, 11101.

[8] M. Rostro-Alanis, J. Baéz-González, C. Torres-Alvarez, R. Parra-Saldívar, J. Rodríguez-Rodríguez, S. Castillo, Molecules, **2019**, 24, 1904.

[9] A. Possas, F. Pérez-Rodríguez, A. Valero, F. Ricnón, R. M. García-Gimeno, Innovative Food Science and Emerging Technologies, **2019**, 47, 271-278.

OPTIMIZATION OF MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN OREGANO AND LOVAGE ETHANOLIC EXTRACTS

Ioana M. Bodea[1,2], Giorgiana M. Cătunescu[2], Adriana P. David[2], Roxana Vidican[2], Carmen R. Pop[3], Andreea Stănilă[3], Ancuța M. Rotar[3], Alfredo Palop Gómez[1]

1 Departamento de Ingeniería Agronómica, Instituto de Biotecnología Vegetal, ETSIA-Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, Spain
2 Faculty of Agriculture, University of Agricultural Science and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Romania.
3 Faculty of Food Science and Technology, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Romania.

ioana.bodea@upct.es

Resumen / Abstract

Oregano and lovage contain a wide variety of bioactive compounds therefore, the extraction method and recovery of these compounds represent a great challenge. The aim of this study was to optimize the microwave assisted extraction (MAE) parameters, by employing the response surface methodology (RSM), to obtain ethanolic extracts from oregano and lovage, with maximum bioactivity. Therefore, the optimized extracts were assessed for their total phenolic content (TPC), antioxidant activity (AA), radical scavenging activity (I%) and antibacterial efficiency against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Three independent variables were assessed: ethanolic concentration, microwave power and extaction repetitions, to determine the target response variables: TPC, AA and I% for both oregano and lovage extracts. The obtained models were validated with new experimental values, and confirmed for all three response variables. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to identify and quantify the main phenolic compounds in both oregano and lovage optimum extracts.

Palabras clave / Key words antibacterial activity; antioxidant activity; total phenolic content; response surface methodology; microwave-assisted extraction

Introduction

Plants produce an amazing diversity of secondary metabolites, being a valuable resource of natural bioactive compounds (Spréa, Fernandes et al. 2020). Oregano is commercially used in the pharmaceutical, food and cosmetic industries and is known for its antioxidant, antibacterial and medical use (Kosakowska, Weglarz et al. 2021), while Lovage is usually used as a condiment but is also described to have medicinal properties (Spréa, Fernandes et al. 2020). Both lovage and oregano are described as being a valuable source of phenolic compounds, phenolic acids and flavonoids, which are responsible for their antibacterial and antioxidant activity (Kosakowska, Weglarz et al. 2021).

The extraction process is a crucial step for the research and acquirement of plant bioactive compounds. Recent trends focused on finding efficient and innovative

procedures, which could minimize extraction time, solvent consumption and maximize yield recovery (Simić, Rajković et al. 2016, Alara, Abdurahman et al. 2018). Microwave assisted extraction (MAE) generally meets these requirements, compared to other techniques, and, it showed superior benefits: it is relatively low cost, requires lower extraction time and could be labeled as ‘‘green” technology, according to the environmental standards (Simić, Rajković et al. 2016).

This study aimed to find and validate the optimal combination of MAE parameters to obtain the maximum yield of total polyphenols and antioxidant activity. The utilized optimization procedure was Response Surface Methodology (RSM) mathematical modelling. Additionally, the antibacterial effect of the two ethanolic extracts was assessed against *E. coli* and *S. aureus*, together with the identification and quantification of the major chemical compounds.

Materials and methods

Dry lovage and oregano were used for the extraction, and 5 g of each plant was grinded and extracted in 40 mL solvent of different ethanol concentrations (40% v/v, 60% v/v, 80% v/v). The mixture was extracted using different microwave powers (160 W, 480 W, and 800 W) for different periods of time. The solution was later repeatedly extracted between 1 and 10 times. After filtration, the volume of extract solution was adjusted to 40 mL with the same ethanol concentration as the extract.

A Box-Behnken experimental design (BBD) was used to optimize the extraction procedure for maximum bioactivity yield of both herbal extracts. Thus, the TPC, AA and I% were set as response variables and three independent variables were considered at 3 levels: ethanol concentration: 40% v/v, 60% v/v, 80% v/v; microwave power: 160 W, 480 W and 800 W; and extraction repetition between 1 and 10 times. The BBD generated 15 experimental runs for the RSM and three replicates were set at the center of the design for the estimation of the pure error sum of squares.

Afterwards, the TPC in both ethanolic extracts was assessed using the Folin-Ciocalteu method. Then, A modified version of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method was used to assess the AA and the antibacterial activity of the two extracts was determined by broth microdilution susceptibility testing (MIC) against of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus.*

Finally, the major phenolic compounds of both extracts were identified and quantified by HPLC analysis.

Results and discussion

Both lovage and oregano extracts had significantly different TPC ($p < 0.0001$) according to ethanolic concentration, microwave power and extraction repetition. TPC of oregano varied significantly from 19878.3±825.6 mg 11480.0±987.6 mg GAE/100 g DW. In the case of lovage extracts, the highest TPC recorded was 15750.0±250.0 mg GAE/100 g DW and 15880.0±766.9 mg GAE/100 g DW, while, the lowest TPOC displayed only half of the maximum TPC (6918.3±517.8 mg GAE/100 g DW). Additionally, the TPC was positively correlated with the antioxidant activity parameters AA and I% in both tested herbs ($r=0.745$; $p<0.0001$ and $r=0.809$; $p<0.0001$, respectively). Thus, a

higher phenolic content in the extracts increases their antioxidant activity.

Overall, the results of AA followed a similar trend to TPC and are significantly different ($p < 0.0001$) for the 2 studied plants, with oregano having up to 4 times higher AA than lovage. When comparing the AA and I% among oregano samples, a significant difference ($p < 0.0001$) was observed varying from 140.23±4.56 mM TE/100 g DW; 36% to less than half 65.63±2.94 mM TE/100 g DW; 17%. For lovage, there was also a significant difference among tested samples ($p < 0.0001$), as it ranged from 33.62.23±3.15 mM TE/100 g DW; 17% to 15.86±2.96 mM TE/100 g DW; 8%.

The results of MIC showed that both oregano and lovage extracts had significantly inhibitory activity on both *E. coli* ($p = 0.009$) and *S. aureus* ($p = 0.0001$) with oregano having significantly higher activity against both tested bacteria. It was observed also observed that the extracts with same extraction parameters displayed the highest antibacterial activity against both tested bacteria (60% ethanol, 160W power, extracted once).

The optimization procedure was run against the RSM model taken as a system of equations. The goal was to identify the values of the 3 independent variables (ethanol concentration, microwave power and extraction repetition) that jointly maximized the fitted dependent variables: TPC; AA; I%. Thus, the system of equations has with only one possible solution, the optimal extraction conditions. After computing the optimization, our model suggested that the optimum conditions for oregano extraction were 49% ethanolic concentration, 160 W microwave power and 10 extraction repetitions. These parameters generated a composite desirability of 0.97 because the oregano extracts had the highest TPC, AA and I% values. The optimization procedure was run again with herb type fixed on “lovage” to obtain the optimal extraction conditions for lovage ethanolic extract. The optimal conditions were 53% ethanol concentration, a microwave power of 800 W, and an extraction repetition of 10. The obtained models were validated with new experimental values, and confirmed for all tested parameters.

HPLC results showed that from the optimum oregano ethanolic extract, 23 major phenolic metabolites were identified and the total amount of identified phenolic compounds varied significantly ($p < 0.0001$) with Rosmarinic acid, Quercetin-glucoside and Homovanilic acid being the major compounds, with significant different content. From the lovage extract, a total of 15 phenolic compounds were identified and the amount of identified compounds varied significantly ($p < 0.0001$) with 5-Caffeoylquinic acid, Vaginol-glucoside and Quercetin-rutinoside being the majour compounds.

Conclusion

By setting the optimization goals in line with the requirements of extracting the highest bioactive compounds yield, we obtained and validated the following values for the extraction parameters: an ethanolic concentration of 49%, a microwave power of 160 and 10 extraction repetitions for oregano and an ethanolic concentration of 53%, a microwave power of 800 W and 10 extraction repetitions for lovage. The obtained models were validated and confirmed with new experimental values, for all 3 response characteristics (TPC, AA and I%). Additionally, MIC results showed

that overall, oregano had higher antibacterial efficiency against both *E. coli* and *S. aureus.* Furthermore, HPLC revealed 23 and 15 major phenolic compounds in oregano and lovage optimum extracts, respectively.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Ioana Bodea was funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Sklodowska-Curie Individual Fellowship grant No. 101154490 (WASTEtoSAFETY).

REFERENCIAS

[1] Alara, O. R., N. H. Abdurahman and O. A. Olalere (2018). "Ethanolic extraction of bioactive compounds from Vernonia amygdalina leaf using response surface methodology as an optimization tool." Journal of Food Measurement and Characterization 12(2): 1107-1122.

[2] Bodea, I. M., G. M. Catunescu, C. R. Pop, N. I. Fit, A. P. David, M. C. Dudescu, A. Stanila, A. M. Rotar and F. I. Beteg (2022). "Antimicrobial Properties of Bacterial Cellulose Films Enriched with Bioactive Herbal Extracts Obtained by Microwave-Assisted Extraction." Polymers (Basel) 14(7).

[3] Dahmoune, F., B. Nayak, K. Moussi, H. Remini and K. Madani (2015). "Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Myrtus communis L. leaves." Food Chem 166: 585-595.

[4] Kosakowska, O., Z. Weglarz, E. Pioro-Jabrucka, J. L. Przybyl, K. Krasniewska, M. Gniewosz and K. Baczek (2021). "Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oils and Hydroethanolic Extracts of Greek Oregano (O. vulgare L. subsp. hirtum (Link) Ietswaart) and Common Oregano (O. vulgare L. subsp. vulgare)." Molecules 26(4).

[5] Nabet, N., B. Gilbert-López, K. Madani, M. Herrero, E. Ibáñez and J. A. Mendiola (2019). "Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from Origanum glandulosum and Thymus fontanesii." Industrial Crops and Products 129: 395-404.

[6] Rodsamran, P. and R. Sothornvit (2019). "Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions." Food Bioscience 28: 66-73.

[7] Silva, C., C. L. Gomes, L. J. A. Danda, A. E. M. Roberto, A. M. R. Carvalho, E. Ximenes, R. Silva, M. A. Angelos, L. A. Rolim and P. J. Rolim Neto (2021). "Optimized microwave-assisted extraction of polyphenols and tannins from Syzygium cumini (L.) Skeels leaves through an experimental design coupled to a desirability approach." An Acad Bras Cienc 93(2): e20190632.

[8] Simić, V. M., K. M. Rajković, S. S. Stojičević, D. T. Veličković, N. Č. Nikolić, M. L. Lazić and I. T. Karabegović (2016). "Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network." Separation and Purification Technology 160: 89-97.

[9] Spréa, R. M., Â. Fernandes, T. C. Finimundy, C. Pereira, M. J. Alves, R. C. Calhelha, C. Canan, L. Barros, J. S. Amaral and I. C. F. R. Ferreira (2020). "Lovage (Levisticum officinale W.D.J. Koch) Roots: A Source of Bioactive Compounds towards a Circular Economy." Resources 9(7): 81.

EFFECTS OF PULSED ELECTRIC FIELDS ON THE DEVELOPMENT OF A NEW FERMENTED WHEAT-BASED BEVERAGE

Weilan Gao[1], Miriam Arilla Narcue[1], Elpida Sikalia-Trakou[1], Amelie Stauss[1], Juan Manuel Castagnini[1], Francisco J. Barba[1], Pedro V. Martínez-Culebras[1*]

1 Innovative Technologies for Sustainable Food (ALISOST), Preventive Medicine and Public Health, Food Science, Toxicology and Forensic Medicine Department, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicent André's Estelles, s/n, 46100, Burjassot Valencia, Spain.

pedro.martinez@uv.es

Abstract:

The aim of this study was the production of a novel plant-based dairy alternative by fermentation of malted wheat prepared beverages with probiotic strains. The development of starter cultures tailored to different plant-based materials plays a crucial role in achieving better fermented plant-based dairy alternatives. Therefore, the isolation and study of new plant-based lactic acid bacteria (LAB) strains is essential. In the present study 6 different species were isolated from grains wheat samples and identified by 16S ribosomal DNA sequencing: Enterococcus durans, Enterococcus faecium, Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus casei, Pediococcus acidilactici and Pediococcus pentosaceus. On the other hand, pulsed electric field (PEF) is a promising non-thermal food processing technology, which is used due to its benefits such as increasing the extraction of bioactive substances and shortening the fermentation time. This study also aimed to determine the effect of PEF pretreatment on the extraction of active ingredients such as sugars, proteins, and polyphenols, thus improving the yield and quality of fermented wheat beverages. For this purpose, PEF with 3 kV cm^{-1} of field strength was used as a pretreatment for the preparation of a malted fermented beverage. The effect of PEF pretreatment on the fermentation of two selected LAB species (P. acidilactici and P. pentosaceus) and Lactobacillus plantarum CECT 748 was studied at an incubation temperature of 37 ºC 24 h. The results showed that PEF treatment was able to promote the fermentation rate and reduce the acidity, which all improve the quality of wheat fermented beverages. The analysis of phenolic compounds indicated that both fermentation and specially PEF affected the presence of phenolic compounds in wheat beverages. Some phenolic compounds present in the fermented beverages has potential in the fields of pharmaceuticals, nutraceuticals and food additives. Although more studies with new experimental designs should be carried out, preliminary results indicated that the use of PEF might have a potential for fermented products such as wheat beverages.

Key words: *Isolation, Wheat beverage, Pulsed electric field ,LAB, Fermentation*

Wheat (*Triticum spp.*) is one of the most important cereal crops globally and has high nutritional value[1]. The major nutrients in wheat include carbohydrates, mainly in the

form of starch, protein and essential vitamins, and minerals such as iron, zinc, magnesium and selenium[2]. In addition to these macronutrients and micronutrients, wheat provides dietary fibre and bioactive components, which have been linked to potential health benefits, including reduced risk of chronic diseases such as cancer, cardiovascular disease and diabetes[3].

Pulsed Electric Field (PEF) is a non-thermal treatment technology that treats food and beverages, which not only has important applications in food sterilisation and preservation, but also shows significant advantages in the extraction of active substances. For wheat and its derivatives, PEF treatment can effectively improve the efficiency and quality of active substance extraction.

Currently, research on the potential application of wheat and its derivatives in the preparation of functional beverages is still limited. Therefore, the use of fermenters from different plant raw materials plays a crucial role in the production of improved non-dairy fermentation products[4]. In this study, lactic acid bacteria (LAB) were isolated and identified from wheats, oat and soy, and used in the fermentation of wheat beverages. In addition, an innovative technique - PEF, was introduced to prepare novel wheat fermented beverages, which provided a theoretical basis for the development of wheat products.

In order to isolate novel microorganisms for food fermentation production, lactic acid bacteria (LAB) have been isolated from samples of cereals (oat and wheat) and soya. The isolation and identification process of lactic acid bacteria is shown in **Figure 1**. A total of 120 LAB colonies, 20 from each sample, were isolated on MRS agar media.

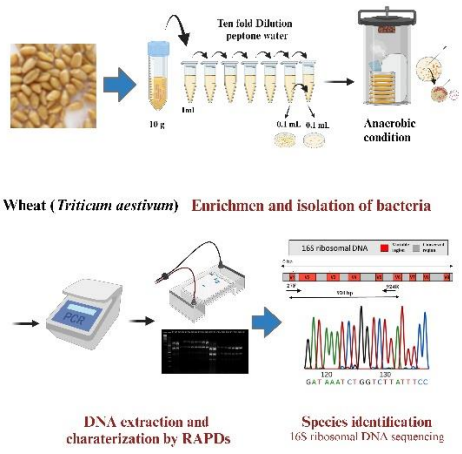


Figure 1: Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB)

After that, isolates were characterized below the species level using RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA). RAPD-PCR reactions were performed using MCV (AGT CAG CCAC) primer. Molecular characterization using RAPDs resulted in different molecular patterns. One strain of each molecular pattern was selected for species identification by 16S ribosomal DNA sequencing. PCR amplification and sequencing were performed using the primers 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) and, 924R (CTT GTG CGG GCC CCC GTC AATTC). Finally, DNA sequence homology search within the GenBank database was performed using BLAST. Figure 2 showed the phylogenetic relationships of isolated lactic acid bacteria. The sequence analysis allowed the identification of 6 different species: *Enterococcus durans* (2), *Enterococcus faecium* (5), *Lactobacillus coryniformis* (1), *Lactobacillus casei* (1), *Pediococcus acidilactici* (1) and *Pediococcus pentosaceus* (2).

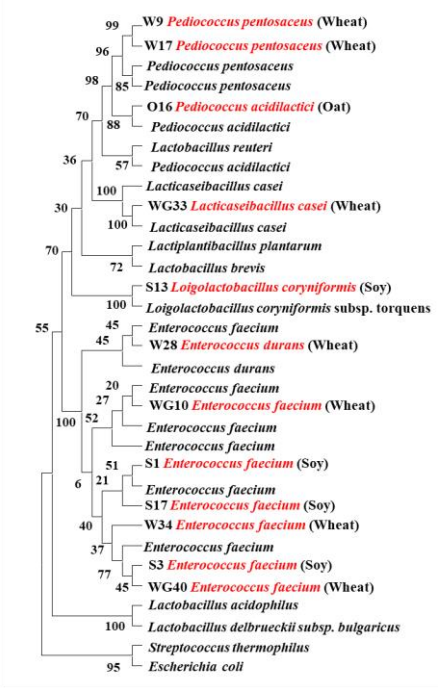


Figure 2: Phylogenetic relationships of LAB isolates

One strain from each of the isolated LAB was selected for comparison with *Lactobacillus plantarum* CECT 748. L. *plantarum* is a probiotic microorganism that has been designated as generally recognized as safe (GRAS). The prepared wheat beverage was used as a medium for incubation and OD_{600} was measured every 15 min to obtain the growth curve as shown in **Figure 3**. The results showed that all strains grew well, with better growth of *L. plantarum*, *P. pentosaceus* and *P. acidilactici*, which were selected to fermentation studies.

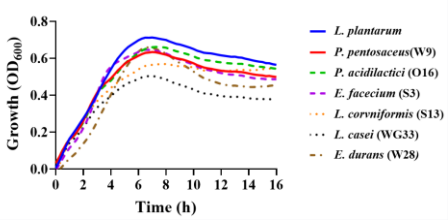


Figure 3: Growth curves of isolated strains in beverages

Electric Pulsed Field (PEF) with 3 kV cm^{-1} of field strength was used as a pretreatment for the preparation of a malted fermented beverage. The results showed in **Figure 4,** PEF treatment was able to increase the fermentation rate, lowering the pH and reaching CFU levels between 10^{-8} and 10^{-9} CFU/mL.

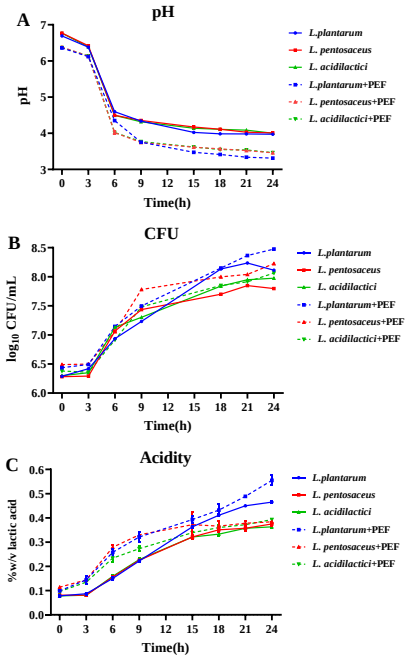


Figure 4: Effect of PEF on the fermentation of wheat beverages by LAB

Principal component analysis (PCA) was performed on the phenolic compounds of wheat beverage fermented with LAB and the results are shown in **Figure 5**. The score of PCA1 was 42.76%, suggesting that PEF pretreatment had a great effect on the composition of phenolic compounds in wheat fermented beverage. The score of PCA2 was 11.75%, suggesting that fermentation with different strains also had an effect on the composition of phenolic compounds, but the effect was smaller than the PEF.

The composition of phenolic compounds of fermented wheat beverages is shown in **Figure 6**. The results showed that sinapoyl glucose had a high percentage of phenolic compounds in all wheat beverages, ranging

from 17% to 54%. Sinapoyl glucose has antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial effects, which have a wide range of potential applications in overall health promotion and chronic disease prevention[5]. After PEF treatment, the contents of coumaric acid, 4-vinylphenol, apigenin and carvacrol were elevated, with a more significant increase in the wheat beverage fermented with *L. plantarum*. In addition, there were significant differences in the phenolic content of different LAB fermented wheat beverages. The wheat beverages fermented by *L. plantarum* contained more dimethoxybenzoic acid, which has potential in the fields of pharmaceuticals, nutraceuticals and food additives. Overall, both the pulsed electric field and the fermentation of different strains affected the phenolic compounds of wheat beverages.

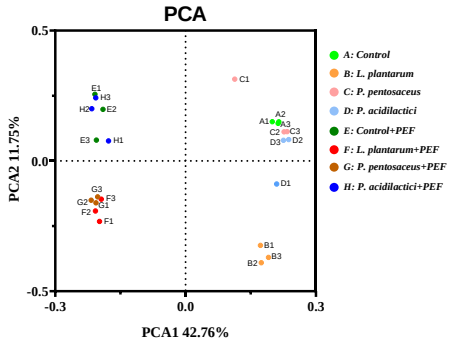


Figure 5: PCA analysis of phenolic compounds in wheat beverages fermented with lactic acid bacteria

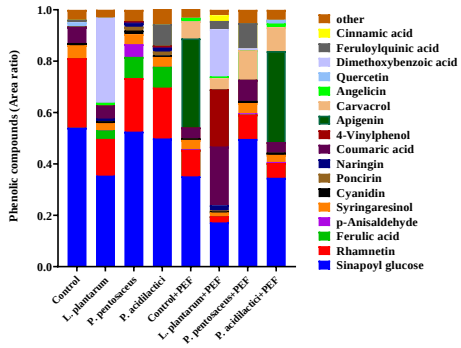


Figure 6: Composition of phenolic compounds in LAB fermented wheat beverages

Although more studies with new experimental designs should be done, preliminary results suggest that the use of PEF may have potential for the development of fermented products such as plant-based beverages.

AGRADECIMIENTOS

This study is part of the WHEATBIOME project "Unravelling the potential of the wheatbiome for the development of healthier, more sustainable, and resilient wheat-derived food and feed products" - Horizon-CL6-2022-FARM2FORK 01-09: Microbiomes in Food Production Sustems.

REFERENCIAS

[1] Gebre, T. S., Emire, S. A., Chelliah, R., et al. Isolation, functional activity, and safety of probiotics from Ethiopian traditional cereal-based fermented beverage, “Borde”. LWT, **2023**,184, 1-10.

[2] Aung, T., Kim, B. R., et al. Comparative volatiles, amino acids, and phenolic compounds and characteristics of roasted germinated wheat (Triticum aestivum L.) during beverage preparation. LWT, **2023**,173, 114412.

[3] Garrido, G.S., Asensio, G. A., Calvo, L. J., et al. The potential of fermentation on nutritional and technological improvement of cereal and legume flours: A review. Food Research International, **2021**, 145, 110398.

[4] Guo, Q., Chen, P., Chen, X. Bioactive peptides derived from fermented foods: Preparation and biological activities. Journal of Functional Foods, **2023**, 101, 105422.

[5] Ayyash, M. In vitro investigation of bioactivities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat using Lactobacillus spp. Food Chemistry. **2019**, 275, 50–58.

COMPOSICIÓN BACTERIANA DE FERMENTACIONES DE SUBPRODUCTOS PARA ECONOMÍA CIRCULAR

Caridad Soto Sánchez[1], Almudena Valverde Sanmartín[1], Claudio Alba[2], Arjan Narbad[3], Silvia Martínez-Llorens[4], David Sánchez Peñaranda[4], Paula M. Periago Bayona[1], Enriqueta García Gutiérrez[1]

[1] Departamento de Ingeniería Agronómica, Instituto de Biotecnología Vegetal, ETSIA-Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, España
[2] Departmento de Nutrición y Ciencias de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España
[3] Gut Health and Microbiome Institute Strategic Programme, Quadram Institute Bioscience, Norwich, Reino Unido
[4] Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA), Grupo de Acuicultura y Biodiversidad, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera 14, 46071 València, España

enriqueta.garcia@upct.es

Resumen

La economía circular es un modelo que busca reducir el desperdicio y maximizar el uso eficiente de los recursos. Promueve el reciclaje, la reutilización y la renovación de productos y materiales, extendiendo su ciclo de vida. Este enfoque sostenible contrasta con la economía lineal tradicional, impulsando prácticas que benefician tanto al medio ambiente como a la economía. La fermentación es un proceso biológico que transforma los alimentos y puede mejorar su valor nutricional y prolongar su vida útil, por lo que se puede considerar un elemento clave en el desarrollo de estrategias dentro del contexto de la economía circular. Basándonos en esta premisa, en este estudio utilizamos cinco tipos de harinas diferentes como sustrato para diferentes fermentaciones. Este estudio se centra en identificar y analizar las distintas bacterias que se desarrollan durante la fermentación de cada tipo de harina, con el objetivo de comprender mejor sus propiedades y potenciales beneficios. Al entender la diversidad bacteriana, se pueden desarrollar nuevos productos fermentados que sean saludables y que contribuyan a una economía más circular y sostenible. Los resultados pueden aportar información valiosa para la producción sostenible de alimentos, optimizando el uso de subproductos agrícolas y reduciendo el desperdicio.

Palabras clave: *Fermentación, harinas, economía circular, subproductos agrícolas*

Las fermentaciones juegan un papel crucial en la economía circular, ofreciendo soluciones sostenibles y eficientes para la obtención de nuevos productos. Este proceso biológico convierte residuos orgánicos en productos con valor añadido, reduciendo la dependencia de recursos no renovables y minimizando el desperdicio. En la industria alimentaria, la fermentación mejora la conservación de alimentos y añade valor nutricional, contribuyendo a la seguridad alimentaria e integran los principios de la economía circular al transformar desechos en recursos útiles,

promoviendo la sostenibilidad y la innovación en diversos sectores industriales [1].

Aunque las fermentaciones de residuos pueden llevarse a cabo añadiendo bacterias y hongos concretos, la forma más eficiente sería la fermentación espontánea a temperatura ambiente, ya que ello permitiría una reducción del gasto en energía.

En este trabajo, hemos realizado fermentaciones espontáneas a 22 ºC y 37 ºC de cinco harinas obtenidas de subproductos de varias industrias y hemos aislado microorganismos a 24, 48 y 168 horas con el fin de identificar qué tipo de bacterias han crecido durante todo el proceso.

Tras el aislamiento, se procedió a la extracción del ADN utilizando un robot Maxwell RSC con un kit de extracción de Culture Cells. Tras ello, se procedió a secuenciación del genoma completo (Whole Genome Sequencing). Con ello, identificamos los aislados obtenidos tras las fermentaciones.

Las principales especies identificadas fueron: *Serratia marescens* (23), *Klebsiella sp* CTHL.F3a (20), *Enterococcus faecium* (15), *Enterobacter hormaechei* (9), *Cronobacter sakazakii* (3), *Klebsiella oxytoca* (1) y *Klebsiella pneumoniae* (1).

Figura 1: Robot de extracción Maxwell RSC.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada en parte con el proyecto PID2020-116318RB-C32 por el Ministerio de Ciencia de España, MCIN/AEI/10.13039/501100011033, así como por el programa AGROALNEXT. EGG está financiada con el programa Beatriz Galindo del Ministerio de Universidades de España (BG22/00060).

REFERENCIAS

[1] Hadj Saadoun J, Bertani G, Levante A, Vezzosi F, Ricci A, Bernini V, Lazzi C. Fermentation of Agri-Food Waste: A Promising Route for the Production of Aroma Compounds. Foods. 2021 Mar 26;10(4):707. doi: 10.3390/foods10040707. PMID: 33810435; PMCID: PMC8066995.

EVALUATION OF THE CHEMICAL AND ORGANOLEPTIC PROFILES OF WINES INOCULATED WITH DIFFERENT *PIED DE CUVE*

Katherine Bedoya[1], Nicolas Rozès[1], Albert Mas[1], Carla Jara[2], Albert Bordons[1], M. Carmen Portillo[1]

1 Universitat Rovira i Virgili / Facultat d'Enologia / Departament de Bioquímica i Biotecnologia. C. Marcel·lí Domingo 1. 43007 Tarragona, Spain.
2 Universidad de Chile / Facultad de Ciencias Agronómicas / Departamento de Agroindustria y Enología. Av. Santa Rosa 11315, La Pintana, Santiago, Chile.

carmen.portillo@urv.cat

Abstract

The technique known as pied de cuve *(PdC) serves as an inoculation starter and improves the microbial footprint of each wine region. The PdC methodology, which translates as "bottom of the deposit" in French, serves as a method to initiate alcoholic fermentation (AF). PdC involves using a small volume of already fermenting must to start the AF when added to fresh must. There is a lack of information about the chemical and sensory impact of the final wines inoculated with PdC. In this study, we compared the sensory and chemical impact of the PdC technique in three different harvests using Muscat of Alexandria Must (Spain, harvests 2022 and 2023) and Sauvignon Blanc (Chile, harvest 2023). Each PdC was prepared using different stressors (sulphur dioxide, ethanol, and temperature). Our results showed that wines elaborated with PdC had similar fermentation kinetics and resulted in a lower yield of acetic acid compared to both the inoculation of commercial strains and wine produced by spontaneous fermentation. Additionally, wines made by PdC technique had similar global quality scores in the sensory profiles to wines produced by inoculation of commercial strains for both harvests from 2023. However, wines elaborated with PdC showed an additional significant tropical attribute in the case of Spanish 2022 and Chilean 2023 harvests when compared to wine produced by the inoculation of a commercial yeast.*

Key words: *Pied de cuve / alcoholic fermentation / wine / sensory evaluation*

The use of commercial yeast, such as the Dry Wine Yeast (DWY), is a widely adopted inoculation strategy by wineries. However, the alcoholic fermentations (AFs) driven by DWY could lead to the uniformization of aromatic profiles in wines [1]. Some strategies for maintaining microbial diversity in winemaking include spontaneous fermentation, selection of autochthonous strains or the *pied de cuve* (PdC) method. One modality of PdC uses small vats already fermenting spontaneously, either in the cellar or the vineyard. These vats are analysed organoleptically and or physicochemically to select the PdC with the best characteristics and absence of off-flavours to be inoculated into a new batch of must [2,3]. Although PdC is still used by some wineries, the impact of PdC on yeast populations and the sensory aspect of wine is not well-studied.

Previously we evaluated the impact on yeast populations and fermentation kinetics by using combinations of stressors (sulphur dioxide (SO_2), temperature, and ethanol) [4]. Results showed that all the PdC served as robust AF starters, leading to higher total yeast populations than the DWY inoculated fermentation. They also showed significant differences in the abundance of non-*Saccharomyces* species, particularly at the initial fermentation stages. Furthermore, Interdelta analysis indicated significantly higher diversity indexes in AFs inoculated with the PdC compared with DWY.

In the present study, we evaluate if the PdC inoculated AFs result in wines with unique organic compound profiles and favourable organoleptic characteristics. The three vintages included were: i) 2022 harvest using Muscat of Alexandria must in Spain (M2), ii) 2023 harvest using Sauvignon Blanc must in Chile(S3) and iii) 2023 harvest using Muscat of Alexandria in Spain (M3). The nomenclature and conditions of each PdC and AF are described at Table 1.

The physicochemical parameters of the wines produced under each treatment were measured using HPLC (high-performance liquid chromatography) and the organoleptic evaluation of each wine was assessed through a sensory analysis.

Our findings have corroborated that the application of selected stressors over PdC can effectively ensure the AF process. We obtained similar results in yeast population growth and fermentation kinetics for the grape varieties Muscat of Alexandria and Sauvignon Blanc harvested at three different campaigns.

Table 1: Codes and conditions of PdC and AF during the three vintages.

Harvest	Spontaneous Fermentation for PdC		AF at 18 ºC and no stress	
	Code	*Parameters*	*Code*	*Inoculation modality*
M2	M2-26	26 ºC and no stress	P-M2-26	Inoculated with M2-26
	M2-18	18 ºC and no stress	P-M2-18	Inoculated with M2-18
	M2-26SE	26 ºC with SO_2 and Ethanol	P-M2-26SE	Inoculated with M2-26SE
	M2-18SE	18 ºC with SO_2 and Ethanol	P-M2-18SE	Inoculated with M2-18SE
	Null		C-M2	Control inoculated with Sce QA23
S3	S3-26SE	26 ºC with SO_2 and Ethanol	P-S3-26SE	Inoculated with S3-26SE
	S3-18SE	18 ºC with SO_2 and Ethanol	P-S3-18SE	Inoculated with S3-18SE
	Null		C-S3	Inoculated with Sce 1118
M3	M3-18SE	18 ºC with SO_2 and Ethanol	P-M3-18SE	Inoculated with M3-18SE
	Null		C-M3	Control inoculated with Sce QA23
	Null		SF-M3	Control spontaneous Fermentation

Those results were comparable to those of the DWY-inoculated control. Additionally, the stressors applied during the preparation of the PdC, particularly the temperature, can change considerably the performance of the PdC and the selected yeast that will drive the different AFs (results not shown).

The main organic acids, ethanol, glycerol, and residual sugars of resulting wines were determined by HPLC for each triplicate of AF (Table 2). The PdC-inoculated fermentations produced wines with significative differences when compared with the wines from spontaneous and DWY-inoculated fermentations (Table 2). Differences were observed in certain chemical parameters as consistently higher sugar consumption values for DWY-inoculated fermentations, while lower values correspond to AFs inoculated with PdCs prepared at 18ºC.

Table 2: Chemical analysis of the final wines at each AF modality during the three vintages. Sugar consumption and yields of ethanol, glycerol, succinic acid, and acetic acid production for 100 g of sugars consumed are presented as the mean of biological triplicates.

HARVEST	AF MODALITY	SUGAR CONSUMPTION (G/L)	ETHANOL YIELD (G/100G)	GLYCEROL YIELD (G/100G)	SUCCINIC ACID YIELD (G/100)	ACETIC ACID YIELD (G/100G)
M2	P-M2-26	186.79 ^{a}	47.93 ^{a}	2.36 ^{a}	0.56 ^{a}	0.20 ^{a}
	P-M2-18	176.61 ^{b}	46.45 ^{a}	2.21 ^{abc}	0.67 ^{a}	0.20 ^{a}
	P-M2-26SE	182.85 ^{c}	49.01 ^{a}	2.22 ^{ab}	0.54 ^{a}	0.19 ^{a}
	P-M2-18SE	175.39 ^{b}	50.52 ^{a}	1.77 ^{c}	0.57 ^{a}	0.20 ^{a}
	C-M2	189.35 ^{a}	44.25 ^{a}	1.87 ^{bc}	0.56 ^{a}	0.18 ^{a}
S3	P-S3-26SE	178.91 ^{ab}	51.77 ^{a}	2.96 ^{ab}	N.D.	0.39 ^{a}
	P-S3-18SE	177.19 ^{b}	51.55 ^{a}	2.98 ^{a}	N.D.	0.27 ^{b}
	C-S3	181.50 ^{a}	51.14 ^{a}	2.85 ^{b}	N.D.	0.42 ^{a}
M3	P-M3-18SE	216.13 ^{a}	44.23 ^{a}	2.36 ^{a}	0.54 ^{a}	0.21 ^{a}
	C-M3	215.33 ^{a}	44.20 ^{a}	2.94 ^{b}	0.59 ^{ab}	0.32 ^{b}
	SF-M3	215.83 ^{a}	44.20 ^{a}	2.91 ^{b}	0.64 ^{b}	0.40 ^{c}

N.D. means not determined. Different letters indicate values significantly different within the same harvest (p-value < 0.05). All data express the average of three biological replicates.

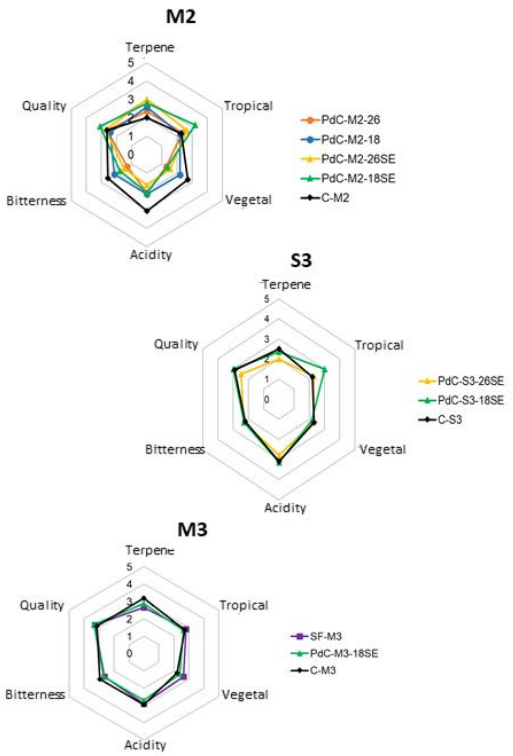


Figure 1: Spider web diagrams for the descriptors of harvests M2 (A), S3 (B) and M3 (C). Assessors for each sensory session: 14

Interestingly, the sugar consumption was not significantly different for AFs inoculated with commercial strains (C-M2 and C-S3) and AFs inoculated with PdC prepared with stressors at higher temperature (P-M2-26SE and P-S3-26SE). Additionally, PdC-inoculated fermentations presented a lower acetic acid yield than the DWY-inoculated AF and wine produced by SF (Table 2).

The PdC methodology also influenced the wines at the organoleptically level (Figure 1). In general, panellists differentiated wines produced by PdC-inoculation versus the controls. The exceptions were P-M2-26SE vs. AF-C-M2 (results not shown). The quality scores of the PdC-inoculated wines were comparable or higher in some cases to the respective controls at each harvest (Figure 1).

Additionally, the wines elaborated with PdC showed significantly higher tropical attributes in the case of Spanish 2022 and Chilean 2023 harvests (M2 and M3, respectively) when compared to wine produced by the inoculation of a commercial yeast.

In conclusion, our study reports similar results in yeast population growth and fermentation kinetics for the grape varieties Muscat of Alexandria and Sauvignon Blanc harvested at three different vintages. Those results were comparable to those of the DWY-inoculated control. Additionally, the stressors applied during the preparation of the PdC can change considerably the performance of the PdC and the selected yeast that will drive the different AFs. The PdC-inoculated fermentations produced wines that differed in certain chemical parameters and also at the organoleptically level. The quality score of the PdC-

inoculated wines were comparable or higher to the respective controls at each harvest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was supported by the Ministry of Science, Innovation and Universities, Spain (PID2019-108722RB-C33). K.B. was financially supported by a Martí Franquès Fellowship from the Universitat Rovira i Virgili (URV) (2020PMF-PIPF-49). K.B. stage in Universidad de Chile was supported by the vWISE Project (UE).

REFERENCES

[1] Molinet, J., Cubillos, F.A. 2020. *Front. Genet., 2*:11:589350.

[2] Mas, A., Portillo, M.C., 2022. *Int. J. Food Microbiol. 367*,109592.

[3] Börlin, M., Miot-Sertier, C., Vinsonneau, E., Becquet, S., Salin, F., Bely, M., Lucas, P., Albertin, W., Legras, J. L., Masneuf-Pomarède, I. 2020. *Oeno One, 54*, 435-442.

[4] Bedoya, K., Buetas, L., Rozès, N., Mas, A., Portillo, M.C. 2024. *Food Microbiol, 123*, 104571.

EFFECT OF LOW-PRESSURE COLD PLASMA ON *B. CEREUS* SPORES AND VEGETATIVE CELLS INACTIVATION USING DIFFERENT MATRICES.

María Inés Valdez-Narváez[1], María Teresa Fernández-Felipe[1], Antonio Martinez[1], Dolores Rodrigo[1]

1 Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Paterna, 46980 Valencia, Spain.

lolesra@iata.csic.es

Abstract

This study investigated the effects of low-pressure cold plasma on the inactivation of Bacillus cereus vegetative cells and spores. Oxygen was used as ionization gas and its impact on both inert and low water activity food matrices, specifically rice, were evaluated by mathematical modelling. Greater reductions in B. cereus counts were observed in vegetative cells than spores. Both the power of the plasma treatment and the matrix proved to be determining factors in the inactivation of both spores and vegetative cells of B. cereus. To characterize the inactivation of B. cereus, the experimental data were accurately fitted to Weibull model. A significant decrease in parameter "a", representing resistance to treatment, was confirmed with treatment intensification. Furthermore, significant differences in the "a" value were observed between spores in inert and food matrices, suggesting the additional protective role of the food matrix for B. cereus spores. These results demonstrate the importance of considering matrix effects in plasma treatment to ensure the effective inactivation of pathogenic microorganisms, particularly in foods with low water activity such as rice. This approach contributes to mitigating the impact of foodborne illnesses caused by pathogenic microorganisms.

Key words: *Low-pressure cold plasma, B. cereus, spores, Rice, Weibull model*

Introduction

Rice is one of the most widely consumed foods in the world. It can be contaminated with *Bacillus cereus*, a spore forming bacterium that can survive traditional cooking and pose health risks if not stored properly (1,2). Cold plasma (CP) technology, a non-thermal disinfection method, holds promise for industrial food applications by reducing the microbial load (3,4). In this context, the aim of this study was to evaluate the impact of low-pressure cold plasma on *B. cereus* vegetative cells and spores in different matrices.

Materials and Methods

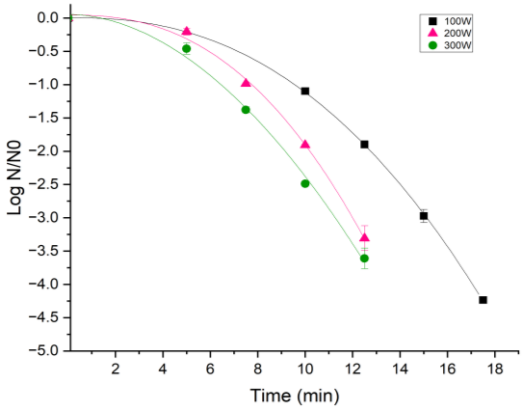
The study was carried out on food matrix (rice grains) and on an inert matrix (borosilicate glass slide), the samples were inoculated with vegetative cells and spores of *B. cereus* (CECT 148). Low-pressure cold plasma (CP) equipment, model Pico-AR-200-PCCE7 was used and oxygen was used as ionization gas. Different treatment times

between 0-60 minutes and different powers (100, 200, 300 W) were tested, while the survival curves obtained were fitted to mathematical models.

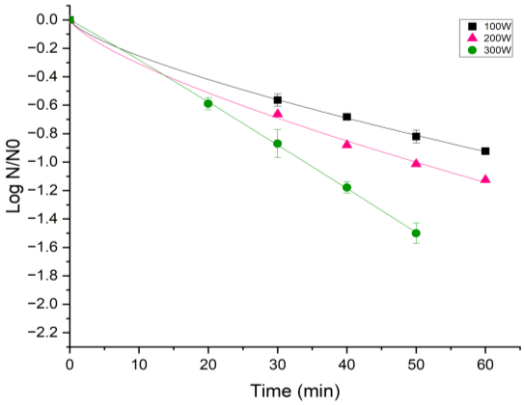
Results

In Figure 1 (A, B, C) it can be seen that as increasing the potency and treatment time, the inactivation of vegetative cells and *B. cereus* spores in all matrices tested improves.

(A)



(B)



(C)

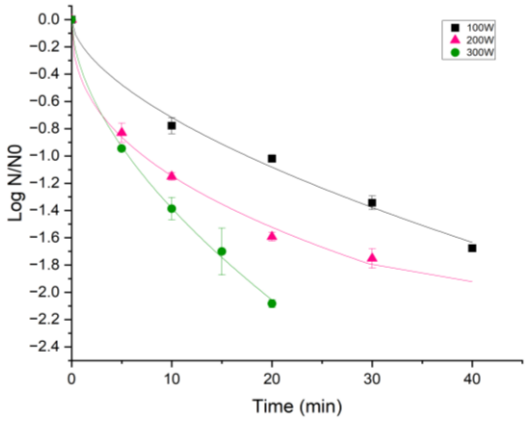


Figure 1: Weibull distribution function fit for *B. Cereus* vegetative cells (A) and *B. cereus* spores (B) within rice matrix and *B. cereus* spores (C) within an inert matrix (borosilicate glass slides). Inactivation as a function of power (100W, 200W, 300W). The icons show the experimental values and the line the predictions obtained by the model.

In this study, the Weibull model was used to characterize inactivation parameters based on experimental data from both vegetative cells and spores of *B. cereus* treated with low-pressure cold plasma sterilization. In table 1, a significant difference in the "a" parameter values indicate that *B. cereus* spores are more resistant on rice than on an inert surface. Additionally, with higher treatment power, the "a" parameter decreases significantly, as it can corroborate with another studies (5–7).

Table 1. Weibull survival function parameters obtained by fitting experimental mean data.

	100W			
	a	*b*	R^2_{adj}	MSE
RV	9.54 ± 0.26 $^{*, a}$	2.39 ± 0.10	0.9997	0.0008
RS	68.17 ± 0.04 $^{*, A, a}$	0.71 ± 0.07	0.9994	0.0001
MS	17.72 ± 0.10 $^{B, a}$	0.60 ± 0.02	0.9870	0.0053
	200W			
	a	*b*	R^2_{adj}	MSE
RV	7.59 ± 0.10 $^{*, b}$	2.43 ± 0.13	0.9951	0.0091
RS	49.69 ± 0.04 $^{*, A, b}$	0.73 ± 0.03	0.9950	0.0010
MS	7.57 ± 0.07 $^{B, b}$	0.41 ± 0.02	0.9917	0.0040
	300W			
	a	*b*	R^2_{adj}	MSE
RV	6.28 ± 0.20 $^{*, c}$	1.91 ± 0.15	0.9914	0.0188

RS	34.05 ± 1.50 [*, A, c]	1.04 ± 0.04	0.9995	0.0002
MS	5.90 ± 0.90 [B, c]	0.58 ± 0.02	0.9978	0.0014

RV: Rice and vegetative cells RS: Rice and spores BS: Borosilicate slide glass and spores. The asterisk (*) denotes statistically significant differences between vegetative cells and spores of *B. cereus* within a rice matrix. While capital letters (A and B) denote statistically significant differences between *B. cereus* spores within distinct matrices. Lowercase letters (a, b, and c) denote statistically significant differences between the various study groups for each power level. ANOVA ($p<0.05$)

These data provide information on the effects of cold plasma on *B. cereus* in various environments. Modelling inactivation kinetics is key to predicting microbial changes, optimising industrial disinfection, validating food preservation, designing contamination controls and meeting food safety standards.

Conclusions

These results demonstrate the importance of considering matrix effects in plasma treatment to ensure the effective inactivation of *B. cereus*, especially in foods with low water activity such as rice. This non-thermal technology offers a viable alternative for food disinfection, helping to reduce the impact of foodborne diseases caused by pathogenic microorganisms.

Acknowledgements

We would like to thank the Project PID2020-116318RB-C31 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by the funds "FEDER A way of making Europe". María Inés Valdez-Narváez thanks the Predoctoral grant ACIF/2021/424 of the Generalitat Valenciana. The Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATACSIC) is an accredited Center of Excellence Severo Ochoa [CEX2021-001189-S] funded by MCIU/AEI /10.13039/501100011033.

References

[1]. Jiang N, Yan J, Liang Y, Shi Y, He Z, Wu Y, et al. Resistance Genes and their Interactions with Bacterial Blight/Leaf Streak Pathogens (*Xanthomonas oryzae*) in Rice (*Oryza sativa* L.)—an Updated Review. Rice. 2020 Dec;13(1):3.

[2]. Wei X, Huang X. Origin, taxonomy, and phylogenetics of rice. In: Rice [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2023 Mar 12]. p. 1–29. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128115084000010

[3]. Bourke P, Ziuzina D, Boehm D, Cullen PJ, Keener K. The Potential of Cold Plasma for Safe and Sustainable Food Production. Trends Biotechnol. 2018 Jun;36(6):615–26.

[4]. Laroque DA, Seó ST, Valencia GA, Laurindo JB, Carciofi BAM. Cold plasma in food processing: Design, mechanisms, and application. J Food Eng. 2022 Jan;312:110748.

[5]. Lee KH, Woo KS, Yong HI, Jo C, Lee SK, Lee BW, et al. Assessment of microbial safety and quality changes of brown and white cooked rice treated with atmospheric pressure plasma. Food Sci Biotechnol. 2018 Jun;27(3):661–7.

[6]. Liao X, Muhammad AI, Chen S, Hu Y, Ye X, Liu D, et al. Bacterial spore inactivation induced by cold plasma. Crit Rev Food Sci Nutr. 2019 Sep 8;59(16):2562–72.

[7]. Muhammad AI, Lv R, Liao X, Chen W, Liu D, Ye X, et al. Modelling the Inactivation of *Bacillus cereus i*n Tiger Nut Milk Treated with Cold Atmospheric Pressure Plasma. J Food Prot. 2019 Nov;82(11):1828–36.

DOSIS SUB-LETALES DE PLASMA FRÍO COMO ESTRATEGIA EN LA REDUCCIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE LISTERIA MONOCYTOGENES

Laura Eced Gutiérrez[1], Consuelo Esteve[1], Carla Palacios-Gorba[2], Juan José Quereda[2], Maria Consuelo Pina-Pérez[1*]

1 Universitat de València/Facultad Ciencias Biológicas/Departamento Microbiología y Ecología/C/Dr. Moliner, 50, 46 100 Burjassot (Valencia)
2 Universidad Cardenal Herrera-CEU/ Facultad de Veterinaria/ Departamento Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos/Grupo de investigación Listeria: Biología e Infección/ C/ Santiago Ramón y Cajal, s/n, 46115 Alfara del Patriarca, Valencia

*maria.c.pina@uv.es

Resumen / Abstract

Listeria monocytogenes es uno de los patógenos de mayor relevancia en alimentos a nivel internacional, con graves consecuencias en salud pública. Cepas aisladas a partir de carnes, vegetales y productos lácteos, muestran una resistencia incrementada a antibióticos. La búsqueda de tecnologías efectivas en la inactivación de este patógeno, que preserven además, la calidad nutricional del alimento, concentra en la actualidad importantes esfuerzos en investigación. La tecnología de plasma frío (PF), emerge como una novedosa estrategia en la inactivación de patógenos alimentarios a temperatura ambiente en pocos minutos, siendo también prometedora en la reducción de virulencia y patogenicidad asociada a las células subletalmente dañadas supervivientes. El presente estudio pretende evaluar el efecto de la tecnología de PF, aplicada bajo intensidades subletales de tratamiento, en la resistencia a antibióticos de L. monocytogenes, y relacionar el posible efecto subletal del plasma frío, con la afectación de otros parámetros de virulencia asociados a esta bacteria, como el potencial hemolítico. Para ello, distintas cepas de Listeria monocytogenes fueron sometidas a tratamiento por PF. Los ensayos se realizaron utilizando un equipo de PF a vacío, bajo condiciones de 100, 200 y 300 W, 5 min, utilizando O_2 como carrier gas. Las células, pre y post-tratamiento, se recuperaron en caldo de cultivo y se determinó el perfil de resistencia antibiótica para cada una de las cepas en estudio utilizando el método de Kirby-Bauer. Los resultados revelan que el PF, aplicado bajo condiciones subletales, reduce la resistencia antibiótica de todas las cepas testadas (p-value < 0.05). Específicamente, tratamientos a 300W-5 min, incrementaron significativamente la sensibilidad de todas las cepas frente a amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), ampicilina (AMP) y estreptomicina (S). Las células subletalmente dañadas que manifestaron dicho incremento de sensibilidad a antibióticos, post-tratamiento, revelan también una reducción en potencial hemolítico estudiado en agar sangre. Los resultados obtenidos en el presente estudio, son prometedores en cuanto a consolidar la posible implementación futura de la tecnología PF en la higienización de ambientes productivos (en granja o industria), y en producto acabado, reduciendo la selección y adaptación de cepas resistentes a antibióticos, y su virulencia.

Palabras clave / Key words

Listeria monocytogenes, plasma frío, resistencia antibiótica, potencial hemolítico, virulencia, tratamiento sub-letal.

Listeria monocytogenes, es una bacteria grampositiva, anaerobia facultativa, y no esporulada, que se adapta fácilmente a condiciones de estrés ambiental. Este microorganismo, es agente causal de listeriosis, con graves consecuencias a nivel de salud pública, derivadas del consumo de alimentos contaminados. Listeria ha sido aislada de alimentos en concentraciones que van de 10 UFC/g o superior en productos lácteos, y hasta niveles de 10^3 UFC/g en alimentos listos para el consumo [1].

En España, desde 2015, es una enfermedad de declaración obligatoria, siendo un patógeno relevante para la industria alimentaria [2]. Aunque las estrategias más efectivas en el control de Listeria spp. han sido las buenas prácticas en ganadería y matadero, así como la desinfección industrial, la adición de conservantes o el tratamiento térmico, actualmente, la I+D+I se enfoca en desarrollar tecnologías de procesado para garantizar la inocuidad de los alimentos, preservando su calidad sensorial y nutricional. El PLASMA FRÍO (PF) se presenta como estrategia innovadora en la inactivación de microorganismos patógenos (ver figura 1), tanto aplicado directamente sobre el alimento, como en el tratamiento de superfícies en entornos Industriales [3].

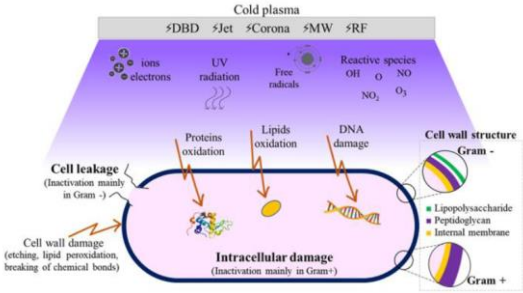


Figura 1: Principales dianas, a nivel celular, del efecto del plasma frío en la inactivación bacteriana [4].

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente estudio se utilizó un equipo de descarga en barrera dielèctrica (DBD) generador de plasma, aplicando potencias de tratamiento entre 100 y 300 W, y tiempos de tratamiento entre 1 y 10 min. Se utilizaron cepas proporcionadas por el grupo del Prof. Quereda Torres, Dpto. Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos (PASAPTA) Universidad CEU Cardenal Herrera (Moncada-Alfara, Valencia): *L. innocua* (ST599), origen heces de vaca [5], *L. monocytogenes*, Linaje 1, complejo clonal 1 (CC1), origen heces de oveja, y *L. monocytogenes*, Linaje 2, complejo clonal 9 (CC9).

Tras el tratamiento de las células por PF, se determinaron los valores de inactivación y generación de daño subletal (%) (en medio de cultivo suplementada al 3% con NaCl). Aquellos tratamientos generadores de mayor porcentaje de daño (> 2ciclos $\log_{10}$ daño subletal), fueron seleccionados para continuar con el estudio.

Las células dañadas, recuperadas post-tratamiento, fueron sometidas a antibiograma (método Kirby-Bauer). Se utilizaron en el estudio, 12 antibióticos pertenecientes a los grupos, penicilinas, beta-lactámicos, macrólidos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, lincosamidas y glucopéptidos. El mismo ensayo, se realizó sobre células no tratadas por PF (células control).

Con el objetivo de validar el impacto de la tecnologia sobre otros factores de virulencia en Listeria spp., se evaluó también el potencial hemolítico de células control y tratadas. Para ello se utilizó agar Brain Heart Infusion (BHIA, Panreac), suplementado con sangre desfibrinada de cordero (3 % (v/v)) (TebuBio S.L.). Las diferencias en potencial hemolítico, se determinaron como diferencias en diametro de halo de hmeólisis, de acuerdo a los estudios previos de Hwang & Park, 2015 [6].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio revela niveles de inactivación por PF de entre 1 y 4 ciclos $\log_{10}$ para las cepas estudiadas. Para condiciones subletales de tratamiento (100- 5 min), se aprecian diferencias significativas en la inactivación alcanzada para *L. monocytogenes* Linaje 1 (reducciones próximas a 1 ciclo $\log_{10}$), complejo clonal 1 (CC1), y *L. monocytogenes*, Linaje 2, complejo clonal 9 (CC9) (reducción de 2 ciclos $\log_{10}$). Los niveles de daño subletal oscilan entre el 40 y el 90 % para todas las cepas, dependiendo de las condiciones de tratamiento aplicadas.

Los resultados del antibiograma revelan que el PF, aplicado bajo condiciones subletales, reduce la resistencia antibiótica de todas las cepas testadas (p-value < 0.05). Específicamente, tratamientos a 300W-5 min, incrementaron significativamente la sensibilidad de todas las cepas frente a amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), ampicilina (AMP) y estreptomicina (S). La cepa más sensible resultó ser *L. monocytogenes* Linaje 1 (CC1), con sensibilidad incrementada frente a todos los antibióticos testados (penicilinas, beta-lactámicos, macrólidos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, lincosamidas y glucopéptidos) (ver tabla 1).

Tabla1: Tabla resumen de la resistencia antibiótica observada para células sub-letalmente dañadas por plasma frío (PF), respecto a células control (no tratadas) (halos de inhibición, cm)

Familia	Antibiótico	Control	100 W - 5 min	200 W - 5 min	300 W - 5 min
Betalactámicos	*Ampicilina*	3.9±0.14	3.5±0.56	3.85±0.07	4.45±0.07
	Penicilina	3.75±0.21	3.75±0.35	3.95±0.07	4.45±0.07
Polipéptidos	*Bacitracina*	1.9±0.14	2.45±0.07	2.7±0.42	2.75±0.35
Quinolonas	*Ciprofloxacino*	3.025±0.14	3.5±0.14	3.25±0.07	4.15±0.21
Lincosamidas	*Clindamicina*	2.65±0.07	2.3±0.14	2.2±0.28	3.65±0.49
Aminoglucosidos	*Estreptomicina*	2.25±0.35	1.95±0.07	2.2±0.28	2.75±0.35
	Gentamicina	3.25±0.35	2.7±0.28	3.05±0.07	3.75±0.35

Los estudios de hemólisis revelan que todas las cepas estudiadas producen listeriolisina y, tienen capacidad hemolítica, evidenciada por la producción de gamma hemolisis en agar sangre. Sin embargo, para células recuperadas post-tratamiento, expuestas a condiciones sub-letales de PF, se observa una reducción del tamaño de los halos de hemólisis (ver figura 2).

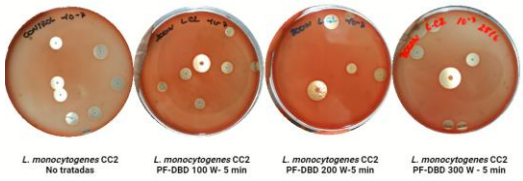


Figura 2: Actividad hemolítica diferencial (diámetro halos hemólisis) entre células tratadas y no tratadas por PF bajo condiciones sub-letales de tratamiento (100-300 W, 5 min).

CONCLUSIONES

La alta diversidad genotípica y fenotípica de aislados de *L. monocytogenes* en distintos ambientes (clínico, animal, industrial, entre otros) destacan como factor clave en la dificultad para estudiar, desarrollar estrategias de control, y manejar este patógeno. Sin embargo, en el presente estudio, el plasma frío ha demostrado ser un proceso eficaz garantizando la respuesta de aislados diversos frente a tratamientos generadores de daño sub-letal, resultando en sensibilidad incrementada a antibióticos y reducción del potencial hemolítico de los aislados en estudio. Estos resultados contribuyen a generar conocimiento en un ambiente de urgente necesidad, el tratamiento de listeria tanto en entornos Industriales, como en el procesado directo de alimentos.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio es parte del proyecto PID2020-116318RA-C33 financiado por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033.

REFERENCIAS

[1] European Food Safety Authority (EFSA) EFSA Journal, ***2018***, 16(1), , 1764–1776.

[2] K. Wiktorczyk-Kapischke, K. Skowron, Grudlewska-Buda, et al., *Front Microbiol*, **2021**, 12, 1-18.

[3] M.C. Pina-Pérez, D. Martinet, C. Palacios-Gorba, C. Ellert, M. Beyrer, *Food Res. Int*. **2020**, 130, 1-10.

[4] D.A. Laroque, S.T. Seó, G.A. Valencia, et al. *J Food Eng,* **2022**, 312, 1-24.

[5] C. P. Gorba, A. Moura, J. Gomis, et al. *Environ Microbiol*., **2021**, 23,

[6] J. Y. Hwang, J. H. Park, *J. Dairy. Sci*, **2015**, 98, 1652-1660.

INACTIVACIÓN DE OOQUISTES DE *TOXOPLASMA GONDII* MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE: ESTUDIO EXPLORATORIO

Abad, V.[1], Berdejo, D.[2], Martínez, J.M.[1], Garcia, J.L.[3], Álvarez, I.[1], Cebrián, G.[1], Bayarri, S.[2]

[1] Universidad de Zaragoza/Facultad de Veterinaria/ Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Tecnología de alimentos/Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2). C. de Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza
[2] Universidad de Zaragoza/Facultad de Veterinaria/ Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/ Nutrición y Bromatología/Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2). C. de Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza
[3] Universidade Estadual de Londrina/ Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva/ Protozoology Laboratory/ Postal Box 6001, 86050-970 Londrina, PR, Brasil

vabad@unizar.es; guiceb@unizar.es

Resumen

Toxoplasma gondii es el parásito causante de la toxoplasmosis, enfermedad zoonótica de gran interés por ser la tercera zoonosis parasitaria con mayor incidencia en Europa. En este estudio se ha investigado por primera vez la eficacia de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF) para inactivar ooquistes de T. gondii en solución salina. El efecto de diferentes dosis PEF en la viabilidad de Toxoplasma se evaluó mediante dos metodologías: bioensayo en ratón y cultivos celulares. Los resultados mostraron una disminución de la infectividad de los ooquistes tratados con PEF en comparación con los controles. Estos hallazgos sugieren que los PEF podrían ser una tecnología prometedora para la inactivación de T. gondii.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii, Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje, bioensayo en ratón, cultivo celular.*

Introducción

Toxoplasma gondii es el parásito protozoario causante de la toxoplasmosis, enfermedad zoonótica que tiene gran importancia en personas inmunodeprimidas, mujeres embarazadas, debido al riesgo de transmisión al feto, y recién nacidos infectados congénitamente [1]. La toxoplasmosis es la tercera zoonosis parasitaria con mayor incidencia en Europa contribuyendo en un 17,6 % de la carga total de las enfermedades transmitidas por alimentos en la Unión Europea [2]. Los humanos pueden infectarse por el consumo de carne cruda o poco cocinada que contenga bradizoitos de *T. gondii* o por el consumo de frutas y verduras que hayan sido regadas con agua contaminada con ooquistes, entre otras vías [1]. Hasta la fecha la tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF, del inglés, *Pulsed Electric Fields*), que se caracteriza por producir la

inactivación de células vegetativas de microorganismos gracias al fenómeno de la electroporación [3], nunca ha sido testada para la inactivación de ninguna de las formas de *T. gondii.*

Por ello, el objetivo de este trabajo fue explorar la eficacia letal de los PEF para inactivar ooquistes de *T. gondii* en una solución salina.

Metodología

Los ooquistes de *T. gondii* (ME-49) ($2{,}2*10^5$ ooq/ml) se sometieron a un tratamiento PEF (15 kV/cm; 50 kJ/kg; 3 µs) en una solución salina de 1 mS/cm. El efecto del tratamiento en la viabilidad de *T. gondii* se evaluó mediante dos metodologías: bioensayo en ratón y cultivos celulares. Para el análisis por bioensayo en ratón, se inocularon dosis de 250, 125, 60 y 30 ooquistes por ratón (2 réplicas, inoculación de 4 ratones por dosis, 2 machos y 2 hembras) y los resultados obtenidos se modelizaron mediante regresión logística simple utilizando el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, E.E.U.U.). La infectividad se determinó mediante la prueba serológica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y posterior análisis de cerebro mediante qPCR. En paralelo, las mismas muestras se inocularon en placas de 24 pocillos tapizadas con fibroblastos (dosis de inoculación: 4000, 2000, 400, 40 y 4 ooquistes) que se incubaron durante 7 días a 37 °C. Trascurrido este tiempo la concentración de células de *Toxoplasma* se determinó también mediante qPCR. En ambos casos, se inocularon ooquistes sin tratamiento como control positivo y ooquistes tratados térmicamente (100 °C, 15 minutos) como control negativo.

Resultados

En la Figura 1 se puede observar el porcentaje de positividad en qPCR para las distintas dosis de inoculación de ooquistes control y PEF en ratón, a excepción de la dosis de 250 ooquistes, se observa una disminución en la positividad de las muestras PEF.

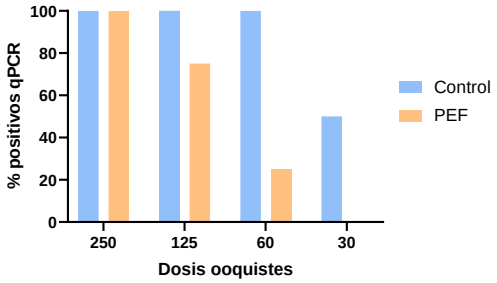


Figura 1. Influencia de la dosis de ooquistes de *T. gondii* inoculada en ratón en la tasa de positivos determinada por qPCR de muestras de cerebro de ratón para muestras control y PEF (15 kV/cm; 50 kJ/kg; 3 µs).

Estos resultados tuvieron una correlación del 100 % con los obtenidos mediante IFI.

En base a los datos mostrados y mediante modelos probabilísticos, se pudo establecer una relación entre la dosis y la probabilidad de infección (Figura 2). Como se muestra, el tratamiento PEF aplicado supondría un incremento en la dosis infectiva 50 de 30 ooquistes a 78 ooquistes según las estimaciones realizadas.

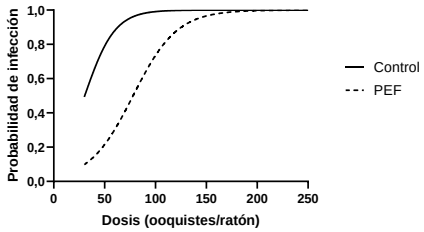


Figura 2. Probabilidad de infección en ratón según la dosis de ooquistes control y PEF (15 kV/cm; 50 kJ/kg; 3 µs) inoculada.

Por otra parte, como se observa en la Figura 3 los resultados obtenidos en cultivos celulares coinciden con los anteriores y también sugieren que el porcentaje de inactivación de los ooquistes tras el tratamiento de PEF se encontraría en torno al 50 % para dosis por debajo de 40 ooquistes.

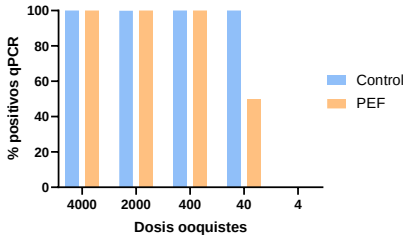


Figura 3. Influencia de la dosis de ooquistes de *T. gondii* inoculada en cultivo celular en la tasa de positivos en qPCR tras 7 días en cultivo celular para muestras control y PEF (15 kV/cm; 50 kJ/kg; 3 µs).

Conclusiones

Estos resultados indican que la tecnología de los PEF podría ser una prometedora alternativa para la inactivación de ooquistes de *T. gondii*. No obstante, resulta necesario hacer más investigaciones en un rango más amplio de condiciones PEF.

AGRADECIMIENTOS

Al Gobierno de Aragón (ParaFree LMP170_21, A03_23R y contrato de Abad. V.). A la Cátedra SAMCA de Desarrollo Tecnológico de Aragón y a la Cátedra AgroBank-UdL.

REFERENCIAS

[1] ELIKA.

https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/toxoplasma-gondii/. Accessed: 21/06/2024

[2] European Food Safety Authority (EFSA)." Public health risks associated with food-borne parasites". ***EFSA J***., 2018, 18 (12), 5495.

[3] J. Raso, V. Heinz, I. Álvarez, y S. Toepfl. "Pulsed electric fields technology for the food industry" (Springer, 2022).

EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS POR ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA (APH) EN LA CARGA MICROBIANA DE ALIMENTOS PASTEURIZADOS *SOUS-VIDE* CON REDUCIDO TRATAMIENTO TÉRMICO

Pérez Alcalá D.[1], Pérez Pulido R.[1], Lucas López R.[1], Grande Burgos M.J.[1], Rodríguez López J. [1], Gálvez A.[1]

1 Universidad de Jaén/Facultad de Ciencias Experimentales/Departamento de Ciencias de la Salud/Área de Microbiología. Campus Las Lagunillas s/n, 23071-Jaén.

agalvez@ujaen.es

Resumen / Abstract

La cocción sous vide o cocción al vacío es un tipo de tratamiento térmico suave que consigue una mejor conservación de las propiedades organolépticas del alimento. La combinación de cocción sous vide con altas presiones (APH) está siendo objeto de numerosos estudios en los últimos años. En el presente trabajo se escogieron dos tipos de alimentos: judías verdes troceadas, y pierna de cordero deshuesada y troceada. Ambos alimentos fueron cocinados a vacío y posteriormente sometidos a diferentes tratamientos por APH. Se realizó un análisis microbiológico de las muestras durante 60 días de almacenamiento en refrigeración. Las muestras de judías verdes, incluyendo las muestras control y las tratadas por APH no mostraron crecimiento bacteriano en ninguno de los medios ensayados, presumiblemente debido a la mayor intensidad del tratamiento de cocción (90°C durante 1h 45 min.). En las muestras control de cordero (cocinadas a 67,5°C durante 8 h) se detectó crecimiento de aerobios mesófilos totales a partir del día 45 de almacenamiento, rozando el valor critico de 5 log UFC/g al día 60. Las muestras de cordero tratadas por APH (500 MPa, 8 min.) no mostraron crecimiento microbiano alguno en ninguno de los medios ensayados, durante todo el almacenamiento. Estos resultados sugieren que el tratamiento combinado podría ser de utilidad para prolongar la vida útil de este producto.

Palabras clave / Key words: *Cocción sous vide; altas presiones*

La cocción *sous vide* o cocción al vacío es un tipo de tratamiento térmico mediante el cual los alimentos crudos (o combinaciones de alimentos crudos y preelaborados) se someten a unas condiciones controladas de temperatura y tiempo, en el interior de bolsas de plástico termoestables de las que se ha extraído el aire [1]. Dado que esta técnica aplica temperaturas suaves o moderadas, resulta primordial que el alimento posea una reducida carga microbiana al iniciar su cocción; ello se traduce en el uso de mercancías muy frescas, y en una máxima higiene en la manipulación de la materia prima [2]. La vida útil de los alimentos preparados mediante cocción *sous vide* podría extenderse mediante la inclusión de una etapa de procesado por alta presión hidrostática (APH). El procesado por APH es una técnica de conservación de uso cada vez más frecuente debido a su bajo impacto

en las propiedades del alimento, y puede ser aplicada directamente en el envase tras el cocinado *sous vide* [3,4].

En el presente trabajo se escogieron dos tipos de alimentos: judías verdes troceadas, y pierna de cordero deshuesada y troceada. Para las judías verdes se utilizó como complemento de cocción un sofrito de cebolla con picadillo de jamón serrano. Para la carne de cordero se utilizó como líquido de gobierno un jugo de cordero preparado de forma tradicional. La muestras fueron mantenidas en refrigeración hasta su envasado a vacío y posterior cocinado en un baño tradicional de cocina (90°C durante 1h 45 min. para las judías, 67,5°C durante 8 h para el cordero). Seguidamente, las muestras fueron enfriadas y sometidas a tratamientos por APH (8 min.) directamente en el envase. Las muestras de judías verdes fueron tratadas a presiones de 300 y 600 megapascales (MPa) a 55°C. Las muestras de cordero fueron tratadas a 500 MPa a temperatura ambiente así como a 50°C. Las muestras (con o sin tratamiento por APH) fueron almacenadas bajo refrigeración durante 60 días, realizando recuentos en diferentes medios (aerobios mesófilos totales, enterobacterias, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*).

Las muestras de judías verdes, incluyendo las muestras control y las tratadas por APH no mostraron crecimiento bacteriano en ninguno de los medios ensayados. Debido al alto contenido en celulosa de la materia prima, es necesario aplicar un tratamiento de cocción a alta temperatura a este tipo de productos, que aparentemente resulta en una completa inactivación de los microorganismos. Por otra parte, las muestras fueron sometidas a un lavado con agua clorada antes de su preparación. Todo ello hace que sea innecesario aplicar tratamientos por APH para mejorar la conservación de este tipo de producto.

Para las muestras control de cordero, no se detectó crecimiento microbiano en ninguno de los medios ensayados durante los primeros 30 días de almacenamiento. No obstante, a partir del día 45 se detectó crecimiento de aerobios mesófilos totales, rozando el valor crítico de 5 log UFC/g al día 60 (Fig. 1). Para el resto de medios de cultivo empleados no se detectó crecimiento en ninguna de las muestras.

La aplicación de tratamientos por APH mejoró considerablemente la conservación de las muestras de cordero, ya que no se detectó crecimiento microbiano alguno durante los 60 días de almacenamiento. Los resultados fueron idénticos con independencia de la temperatura del tratamiento por APH. Los tratamientos aplicados tampoco provocaron cambios significativos en los valores de pH con respecto a las muestras control.

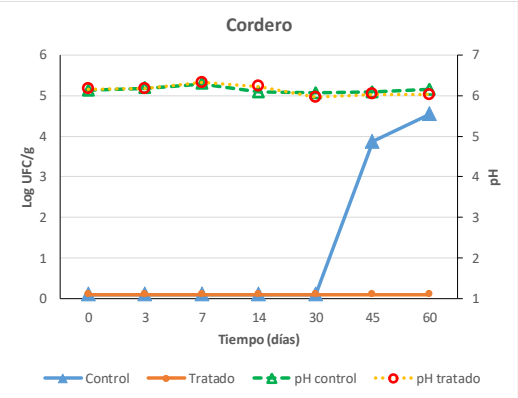


Figura 1: Cambios en los recuentos de aerobios mesófilos totales y en los valores de pH para las muestras de cordero sometidas a cocción *sous vide* (control) o tratadas mediante cocción más presurización (500 MPa, 8 min.).

La aplicación de los tratamientos por APH no provocó cambios visuales apreciables en el aspecto de las muestras (Fig. 2, Fig. 3).

Figura 2: Aspecto de las muestras de judías verdes sometidas a tratamientos por APH.

Figura 3: Aspecto de las muestras de cordero sometidas a tratamientos por APH.

En el análisis sensorial realizado con las muestras de judías verdes tratadas a 300 MPa (Fig. 4), las comparaciones SV (*sous vide*) vs HHP (=APH) realizadas arrojaron un promedio total de similitud entre muestras de 3.90, siendo la textura el atributo más afectado (3.77), y el sabor el atributo de mayor grado de coincidencia (4.00). En las pruebas comparativas ≠ HHP, el promedio total resultó muy semejante (3.94); percibiéndose en este caso el olor y la textura como los atributos de máxima similitud (4.00), y el resto levemente afectados (3.89)

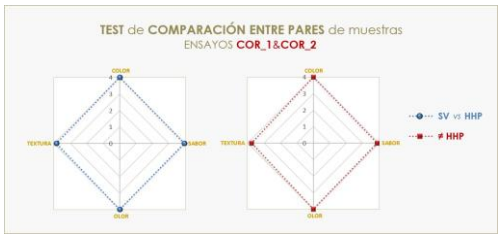


Figura 4: Análisis sensorial de las muestras de judías verdes sometidas a tratamientos por APH.

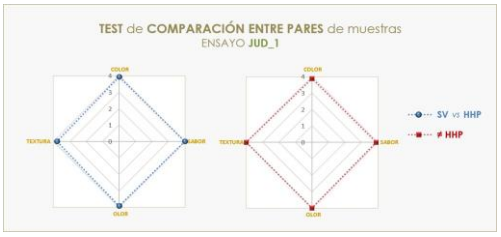


Figura 5: Análisis sensorial de las muestras de cordero sometidas a tratamientos por APH.

Para las muestras de cordero (Fig. 5), el valor para la comparativa SV vs HHP fue 3.94, siendo color y olor los atributos de mayor semejanza (4.00), mientras que la textura se percibió como el más divergente (3.85). En los test de presurizados (≠ HHP) el grado de similitud promedió en 3.91; repitiendo color y olor como atributos menos alterados (4.00), y textura como el más transformado (3.75)

Dada la similitud en los valores obtenidos, podemos concluir que los tratamientos por APH no tuvieron efectos significativos en el color, textura o características organolépticas de las muestras. En el caso de las judías verdes, dada la mayor intensidad del tratamiento empleado durante la cocción *sous vide*, no se considera necesario aplicar un tratamiento adicional por APH. En el caso de la cocción *sous vide* de los vegetales, no se aplican temperaturas inferiores a 80 °C; los tratamientos térmicos que se emplean deben garantizar la completa gelificación de los almidones, así como de pectinas y otras fibras solubles, al objeto de alcanzar la textura óptima [5,6]. Así mismo, dado que la mayor parte de los vegetales permiten una prehigienización mediante inmersión en dilución clorada, junto a la considerable intensidad de los tratamientos térmicos que se aplican, presentan, en general, un elevado grado de seguridad [7]. En cambio, en el caso de la pierna de cordero, los resultados obtenidos indicaron la presencia de crecimiento bacteriano durante un almacenamiento prolongado, y los tratamientos por APH aplicados a

temperatura ambiente permitieron prolongar la vida útil del producto.

La temperatura a la que se aplican los tratamientos por APH puede influir notablemente tanto en los efectos del tratamiento sobre el producto como en la eficacia del mismo. De acuerdo con estudios previos, la eficacia de los tratamientos por APH mejora a temperaturas en torno a 50°C, ya que se alcanza una mayor desestabilización de la membrana celular bacteriana [8]. Sin embargo, en el caso del cordero sometido a cocción *sous vide* no fue necesario aumentar la temperatura del tratamiento por APH, posiblemente debido a la baja carga microbiana inicial del producto.

En su conjunto, los resultados obtenidos sugieren que los tratamientos por APH podrían ser utilizados como barrera adicional para prolongar la vida útil de determinados alimentos sometidos a cocción *sous vide* como la pierna de cordero. Debido a su pH próximo a neutralidad y a la ausencia de otras barreras y la baja temperatura de cocción aplicada, la vida útil de este tipo de productos depende en gran medida de la calidad de la materia prima. El incremento de la vida útil mediante tratamientos combinados con APH podría servir para ampliar la cadena de distribución de los alimentos *sous vide*.

AGRADECIMIENTOS

Universidad de Jaén. Grupo de investigación AGR230.

REFERENCIAS

[1] M. Schellekens, *Trends Food Sci. Technol*. **1996**, 7, 256–262.

[2] J. Roca, S. Brugués, La cocina al vacío (Montagud Editores, **2003**).

[3] J.S. Chacha, L. Zhang, C.E. Ofoedu, R.A. Suleiman, J.M. Dotto, U. Roobab, A.O. Agunbiade, H.T. Duguma, B.T. Mkojera, S.M. Hossaini, et al., *Foods* **2021**, 10, 1430.

[4] R. Janardhanan, P. Virseda, N. Huerta-Leidenz, M.J. Beriain, *Meat Sci.* **2022**, 188, Article 108772

[5] C. Iborra-Bernad, A. Tárrega, P. García-Segovia, J. Martínez-Monzó, *Food Anal. Meth.* **2014,** 7(2), 400-408.

[6] G. Kosewski, I. Górna, I. Bolesławska, M. Kowalówka, B. Więckowska, A.K. Główka, J. Przysławski, *J. Food Chem.* **2018**, 240, 1092–1096.

[7] S. Zavadlav, et al., *Foods* **2020,** 9, 1537.

[8] E. Rendueles, M.K. Omer, O. Alvseike, C. Alonso-Calleja, R. Capita, M. Prieto, *LWT - Food Sci. Technol.* **2011,** 44(5), 1251-1260.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE UN EXTRACTO DE BONIATO NARANJA OBTENIDO POR PULSOS ELÉCTRICOS

Ana Florencia Alanis[1], Juan Manuel Castagnini[1], Francisco José Barba Orellana[1], Jose V. Gil Ponce[2,3], Patricia Roig Montoya[1].

[1] Grupo de investigación en Tecnologías Innovadoras para una Alimentación Sostenible (ALISOST), Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España,
[2] Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación , Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España,
[3] Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Avda Catedrático Agustín Escardino 7, 46980, Paterna, Valencia, España,

ana.f.alanis@uv.es; juan.castagnini@uv.es; francisco.barba@uv.es; patricia.roig@uv.es; j.vicente.gil@uv.es, jvgil@iata.csic.es

Resumen / Abstract

En los últimos años ha aumentado el interés en los compuestos bioactivos extraídos de alimentos, principalmente por sus efectos positivos sobre la salud humana. Entre los compuestos más importantes podemos destacar los polifenoles, carotenoides, flavonoides, alcaloides, entre otros. En este trabajo hemos evaluado la capacidad antioxidante de un extracto de boniato naranja obtenido utilizando pulsos eléctricos, como tecnología no térmica. Para ello, hemos realizado un estudio de la capacidad antioxidante in vitro e in vivo en células de la levadura Saccharomyces cerevisiae BY4741, como modelo de célula eucariota, para extrapolar los resultados obtenidos y conocer los mecanismos moleculares de la respuesta antioxidante en humanos.

Palabras clave / Key words: *Boniato, capacidad antioxidante, polifenoles, Saccharomyces cerevisiae*.

El consumo creciente de boniatos naranja se atribuye sobre todo a sus beneficios para la salud, debido a su alta concentración de compuestos antioxidantes, principalmente polifenoles y carotenoides (Kurabachew, 2015; Neela, et al, 2019). Por otra parte, el reglamento de la UE (CE) 1924/2006 establece normas para declaraciones nutricionales y saludables en alimentos, exigiendo una base científica sólida para respaldar estas afirmaciones. Esto se basa en la estrategia FUFOSE promovida por la Comisión Europea, que establece la necesidad de evidencia científica experimental sobre declaraciones

saludables de ingredientes o alimentos funcionales.

En el presente estudio, se analizó la capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* de un extracto de boniato naranja obtenido mediante maceración asistida por pulsos eléctricos (PE). En primer lugar, se cuantificó su contenido en compuestos fenólicos totales (TPC) utilizando el método de Folin-Ciocalteau (218,5 mg GAE/g producto), y se determinó su capacidad antioxidante *in vitro* mediante el método ABTS (1,5 µmol eq. Trolox/g producto). Por otro lado, se realizaron estudios para determinar la capacidad de inducir repuesta antioxidante *in vivo* utilizando células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 en placa multipocillo, siguiendo el método descrito por Peláez-Soto et al., 2017.

De esta forma, se evaluó la capacidad protectora de diferentes concentraciones del extracto (0.1, 1, 10 y 20 mg GAE/mL) al exponer a las células a dos concentraciones diferentes de H_2O_2 (0.5 y 4 mM) para provocar un estrés oxidativo subletal.

Se construyeron las curvas de "tasa de crecimiento" (Figuras 1 y 2) teniendo en cuenta el crecimiento de las células de levadura en presencia de diferentes concentraciones del extracto a probar y en diferentes condiciones de estrés oxidativo. Para ello, calculamos la relación entre la curva de crecimiento del cultivo de levadura obtenida después de 1 h de exposición al oxidante, dividida por la curva de crecimiento obtenida en ausencia del oxidante, para cada una de las concentraciones de extracto estudiadas. A su vez utilizamos un control (-) sin extracto y un control (+) con ácido ascórbico a una concentración de 5 mM.

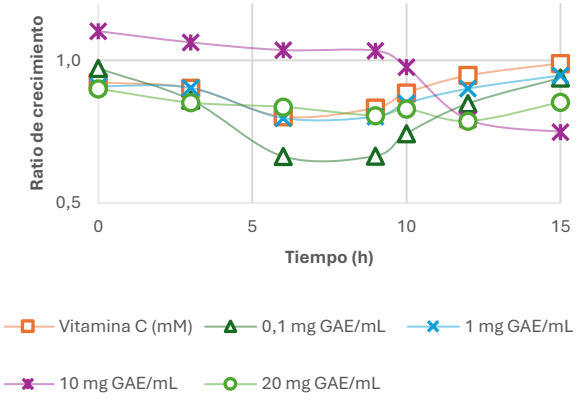


Figura 1: Curvas de "tasa de crecimiento" de *Saccharomyces cerevisiae BY4741* expuesta a un estrés oxidativo de 0,5 mM de H_2O_2 con diferentes concentraciones del extracto.

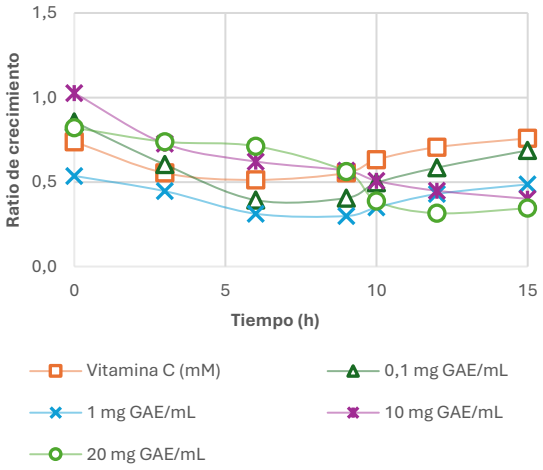


Figura 2: Curvas de "tasa de crecimiento" de *Saccharomyces cerevisiae BY4741* expuesta a un estrés oxidativo de 4 mM de H_2O_2 con diferentes concentraciones del extracto.

En la Figura 1 podemos observar un mayor crecimiento cuando *Saccharomyces cerevisiae* está en un medio suplementado con el extracto a una concentración de 10 mg GAE/mL, en cambio en la Figura 2 se observa un crecimiento similar en las concentraciones más altas del extracto probado.

A partir de estas gráficas se pudo representar las "Curvas de efecto" las cuales se calcularon dividiendo las curvas de "tasa de crecimiento" de cada uno de los cultivos crecidos en presencia de una concentración de extracto entre la curva de "tasa de crecimiento" del cultivo control (-) sin ingrediente, ambas a la misma dosis de oxidante (Figuras 3 y 4).

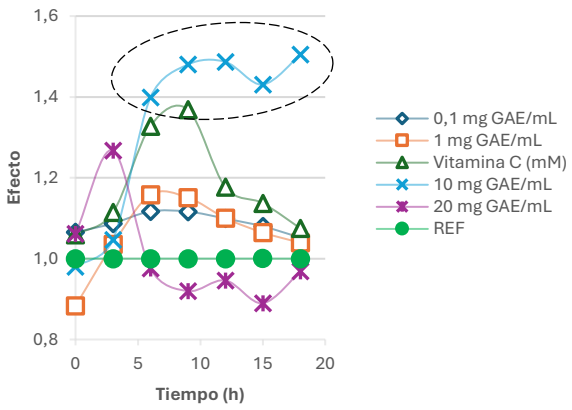


Figura 3: "Curvas de efecto" de *Saccharomyces cerevisiae BY4741* expuesta a un estrés oxidativo de 0,5 mM de H_2O_2 con diferentes concentraciones extracto. Se representan los valores medios ± desviación estándar entre los ensayos. Los puntos dentro de la línea discontinua indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control sin ingrediente a P <0,05.

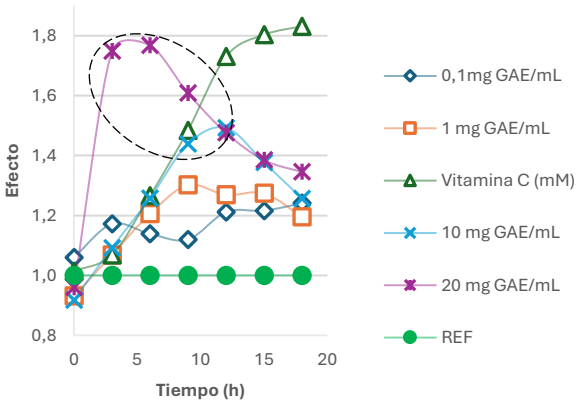


Figura 4: "Curvas de efecto" de *Saccharomyces cerevisiae BY4741* expuesta a un estrés oxidativo de 4 mM de H_2O_2 con diferentes concentraciones del extracto. Se representan los valores medios ± desviación estándar entre los ensayos. Los puntos dentro de la línea discontinua indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control sin ingrediente a P <0,05.

Podemos observar que cuando se utilizó la concentración de 0.5 mM de H_2O_2 (Figura 3) se observó una protección antioxidante estadísticamente significativa a una concentración de extracto de 10 mg GAE/mL. Cuando se indujo el estrés oxidativo con 4 mM de H_2O_2 (Figura 4) se observó la máxima protección a la concentración de 20 mg GAE/mL.

Estos resultados muestran la capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del boniato naranja. El uso del modelo de la levadura permitirá indagar en los mecanismos moleculares de la respuesta y la posibilidad de establecer conexiones con la respuesta antioxidante en humanos, lo que resulta imprescindible como primer paso para su aplicabilidad como ingrediente funcional en la industria alimentaria, en consonancia con las regulaciones de la UE y la creciente demanda de alimentos saludables y nutritivos.

AGRADECIMIENTOS

Ana Florencia Alanis es beneficiaria de la subvención del programa Santiago Grisolía (CIGRIS/2022/162) de la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana. Juan Manuel Castagnini es beneficiario de la ayuda (ZA21-028) para la recualificación del sistema universitario español del Ministerio de Universidades del Gobierno de España, modalidad "Maria Zambrano", financiada por la Unión Europea, NextGeneration EU a través del proyecto "Extracción de compuestos

bioactivos de matrices alimentarias mediante tecnologías innovadoras y sostenibles (EXTRABIO)". Este estudio es parte del proyecto PID2021-123628OB-C42 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/FEDER, UE.

REFERENCIAS

- Kurabachew, H. (2015). The role of Orange fleshed sweet potato (Ipomea batatas) for combating vitamin a deficiency in Ethiopia. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, *5*(3), 141-146.

- Neela, S., & Fanta, S. W. (2019). Review on nutritional composition of orange-fleshed sweet potato and its role in management of vitamin A deficiency. *Food science & nutrition*, *7*(6), 1920-1945.

- Peláez-Soto, A., Fernández-Espinar, M. T., Roig, P., & Gil, J. V. (2017). Evaluation of the ability of polyphenol extracts of cocoa and red grape to promote the antioxidant response in yeast using a rapid multiwell assay. *Journal of food science*, *82*(2), 324-332.

- Reglamento (CE) No 1924/2006 del parlamento europeo y del consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.

INVESTIGACIÓN EN TÉCNICAS RÁPIDAS PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS FRESCOS (SAFEFOOD)

Sonia Porta[1], Genoveva Arques[1], José Belenguer[1]

1 AINIA, Avda. Benjamín Franklin 5-11, Parque Tecnológico de Valencia, E-46890 Paterna (Valencia), España.

jbelenguer@ainia.es

Resumen / Abstract

La calidad microbiológica de los alimentos afecta directamente a su vida útil y aceptación por parte de los consumidores. Los métodos analíticos tradicionales son limitados, complejos y lentos, lo que retrasa la producción y reduce la vida útil de productos perecederos como cárnicos y vegetales. Por ello, hay una demanda de sistemas que mejoren el control de calidad microbiológica y aceleren los resultados. En este proyecto, con el objetivo de proteger la salud de los consumidores, se ha trabajado en el desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas para las empresas agroalimentarias, concretamente, en el control online de productos cárnicos usando visión hiperespectral y en el control offline de productos vegetales frescos usando biosensores acústicos para detectar Listeria monocytogenes.

Palabras clave / Key words: *Control microbiológico, visión hiperespectral, biosensor, tecnologías*

Introducción

Debido a que los métodos habituales para las determinaciones de parámetros microbiológicos en productos frescos son limitados, lentos y complejos, existe una gran demanda de sistemas de detección de parámetros de calidad microbiológica que permitan, por un lado, controlar un porcentaje mayor de la producción y, por otro, acortar los tiempos de obtención de los resultados, evitando una disminución crítica de la vida útil en productos perecederos como los cárnicos y los vegetales. Los biosensores y la tecnología de visión hiperespectral se han mostrado en los últimos años como potenciales herramientas de detección que podrían abordar esta problemática.

Materiales y métodos

En este proyecto se ha trabajado con nuevas herramientas tecnológicas que puedan ayudar a las empresas del sector agroalimentario a reforzar sus programas de autocontrol en materia de inocuidad alimentaria.

Por un lado, se ha trabajado en reforzar el control *online* de la inocuidad alimentaria mediante el desarrollo de un sistema basado en la tecnología de visión hiperespectral (Fig. 1) para la

monitorización de indicadores de la calidad microbiológica de productos cárnicos.

Figura 2. Equipo de visión hiperespectral.

Por otro lado, se ha trabajado en reforzar el control *offline* de la inocuidad alimentaria mediante el desarrollo de un sistema basado en la tecnología de biosensores acústicos (Fig. 2) para la detección de *Listeria monocytogenes* en productos vegetales frescos.

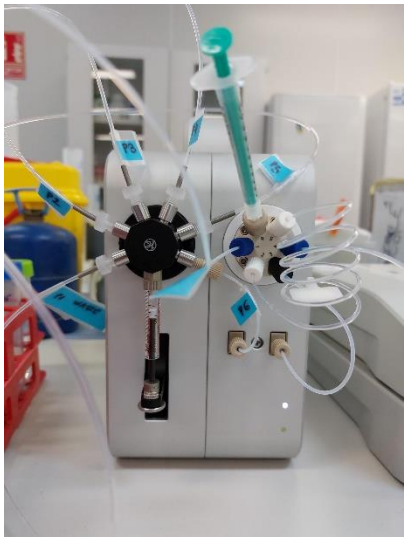


Figura 3. Equipo del biosensor acústico.

Resultados

Con la tecnología de visión hiperespectral se trató de estimar la concentración de una bacteria acidoláctica, *Lactobacillus brevis*, en tres niveles: <1E+02, 1E+02-1E+06 y >1E+06 ufc/g. Se comprobó que la capacidad de clasificación del modelo se ve influenciada por el origen de la contaminación, natural o artificial (Fig. 3).

Con la tecnología de biosensores acústicos se detectan variaciones en frecuencia asociados a niveles de entre 1E+03 y 1E+06 ufc/ml de *L. monocytogenes* en productos frescos vegetales contaminados. También se ha trabajado en la regeneración de los sensores mediante la aplicación de productos como el HCl y el NaOH, lo que permite aumentar la capacidad de reutilización de cada sensor (Fig. 4).

Conclusiones

En este proyecto se han desarrollado y evaluado dos prototipos para el control microbiológico de alimentos frescos cárnicos y vegetales. Se ha evidenciado la necesidad de seguir profundizando en ambas tecnologías con la finalidad de transformar los prototipos en herramientas tecnológicas que permitan a las empresas, por un lado, monitorizar microorganismos naturalmente presentes en los productos cárnicos que originan el deterioro organoléptico de los mismos a lo largo de su vida útil y, por otro lado, la detección rápida de patógenos como Listeria monocytogenes en productos vegetales utilizando un biosensor acústico

AGRADECIMIENTOS

El proyecto "Investigación en tecnologías para el control de la calidad microbiológica de alimentos frescos (SAFEFOOD)" ha contado con el apoyo del Instituto Valenciano de Competitividad Empresarial (IVACE) y ha sido cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

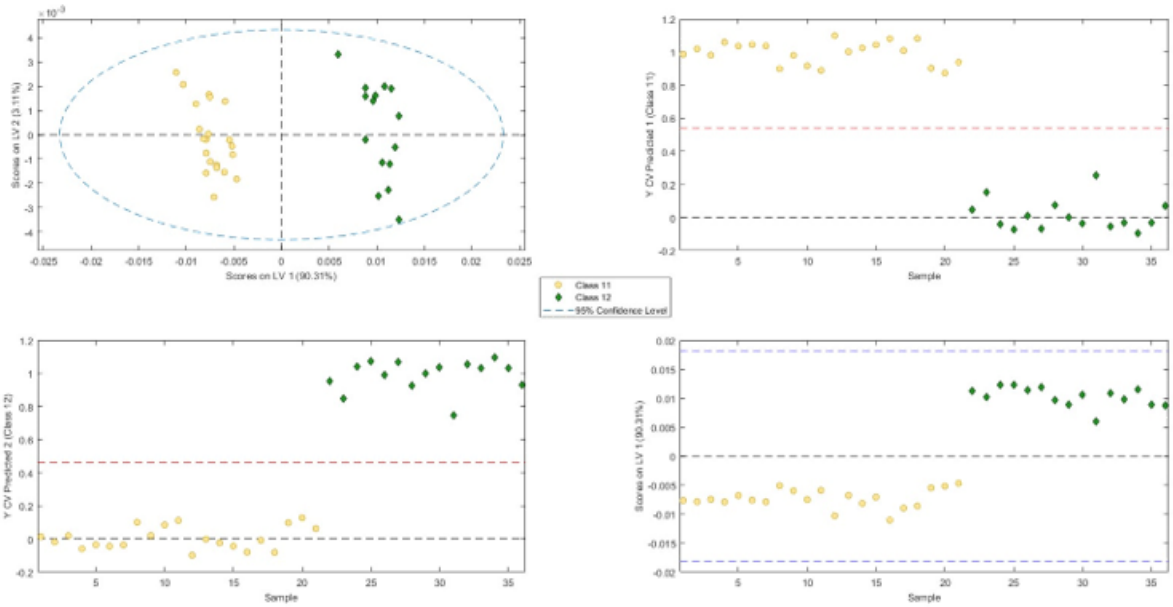


Figura 3. Resultados del modelo de clasificación de las muestras contaminadas con una bacteria acidoláctica a partir de las medidas hiperespectrales.

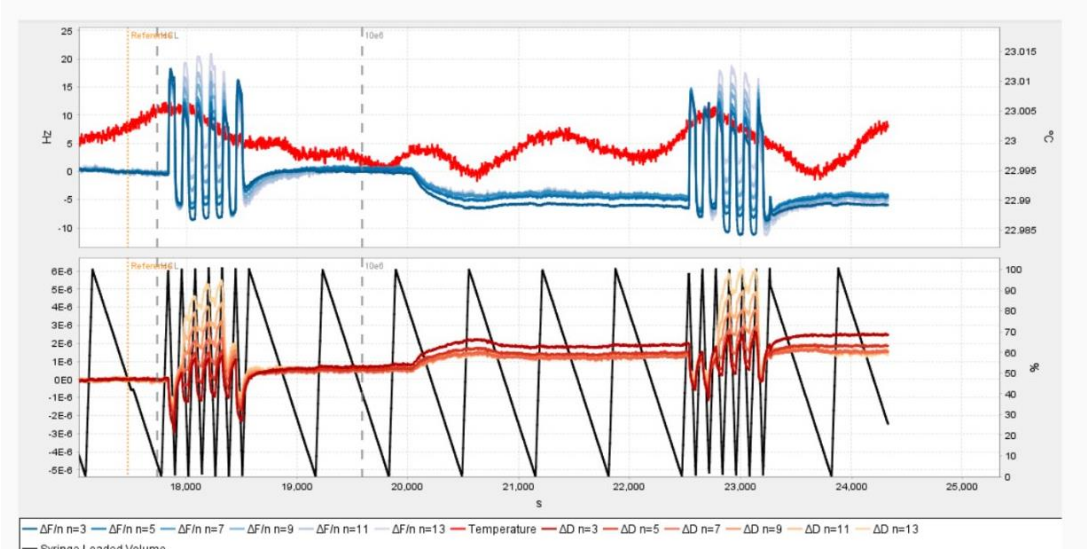


Figura 4. Resultados obtenidos de la regeneración de los sensores con HCl, mediante el software de análisis del biosensor acústico.

REFERENCIAS

[1] González Rumayor, V., García Iglesias, E., Ruiz Galán, O., & Gago Cabezas, L. Informe de vigilancia tecnológica: Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. CEIM, Dirección General de Universidades e Investigación (2005).

[2] Feng, C-H., Makino, Y., Oshita, S., García Martín, J. F. Hyperspectral imaging and multispectral imaging as the novel techniques for detecting defects in raw and processed meat products: Current state-of-the-art research advances. Food Control 84 (2018) 165 - 176.

USO DE COMPONENTES DE ACEITES ESENCIALES INMOVILIZADOS EN PARTÍCULAS DE SÍLICE COMO MÉTODO DE PASTEURIZACIÓN FRÍA DE ZUMO DE MANZANA

Rivas A.[1], Gómez-Llorente H.[1], Moumane, O.[1], Pérez-Esteve, E.[1], Barat, J.M.[1]

1 Universitat Politècnica de València, Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos FoodUPV, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España

alriso@tal.upv.es

Resumen / Abstract

Los componentes de aceites esenciales (CAE) comprenden una amplia gama de agentes antimicrobianos que se encuentran en extractos naturales de plantas. Su incorporación directa a alimentos puede modificar los atributos sensoriales de los alimentos. Una de las estrategias para mejorar su aplicabilidad en alimentos es la inmovilización covalente de estos compuestos en soportes aptos para uso alimentario, de manera que preserven sus propiedades antimicrobianas, evitando la modificación de las propiedades organolépticas del alimento.
El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia antibacteriana del carvacrol y timol inmovilizados en partículas de sílice mediante la reacción de Mannich contra patógenos comunes transmitidos por los alimentos (Escherichia coli, Salmonella enterica, Staphylococcus aureus y *Listeria monocytogenes) en zumo de manzana fresco. Para ello, se llevó a cabo la inmovilización covalente de los CAE en la superficie de micropartículas de SiO_2 mediante la reacción de Mannich. El análisis elemental reveló la presencia de materia orgánica en las partículas funcionalizadas, confirmando así el anclaje del compuesto antimicrobiano. A partir de la determinación de concentración mínima inhibitoria de los CAE libre y con los resultados del análisis elemental, se determinó la cantidad equivalente de partículas, y se evaluó el efecto antimicrobiano de su adición sobre microorganismos patógenos. Los resultados muestran una excelente capacidad antimicrobiana de las partículas frente a los patógenos, obteniéndose reducciones superiores a 4 ciclos logarítmicos con las partículas de timol. De esta manera se puede concluir que la adición de CAEs inmovilizados es una estrategia válida de pasteurización fría de zumo de manzana.*

Palabras clave / Key words: *Patógenos alimentarios, zumo de manzana, timol, carvacrol, inmovilización covalente.*

Los zumos de frutas son una opción popular entre los consumidores debido a sus cualidades naturales inherentes, los beneficios percibidos para la salud y su importante contribución a una dieta equilibrada. Tradicionalmente, la mayoría de los zumos ácidos conservados (pH igual o inferior a 4,5) se procesan térmicamente. Durante este proceso se transfiere una gran cantidad de energía al alimento, desarrollándose en algunos casos reacciones indeseables que pueden producir un impacto excesivo e incluso la formación de subproductos. Las preferencias de los consumidores han obligado al mundo científico y empresarial a desarrollar tecnologías de conservación de alimentos que preserven en gran medida su calidad organoléptica y nutricional. Estas tecnologías se engloban en el concepto de pasteurización en frío. Este concepto hace referencia a los procedimientos de

procesado de alimentos que no implican calor directo [1]. Dentro de las metodologías químicas, destaca el uso de compuestos antimicrobianos de origen natural (componentes de aceites esenciales (CAEs)), bacteriocinas, polisacáridos, ácidos orgánicos, …) para garantizar alimentos microbiológicamente seguros[2]. Si bien estos antimicrobianos han demostrado su eficacia en matrices no alimentarias, su incorporación directa en productos alimenticios presenta ciertos desafíos, como su baja solubilidad en medios acuosos, su alta volatilidad y su capacidad para modificar los atributos sensoriales de los alimentos [3,4]

Una de las estrategias para mejorar su aplicabilidad en alimentos es la inmovilización covalente de estos compuestos en soportes de grado alimenticio. La inmovilización covalente consiste en anclar el compuesto activo sobre la superficie del soporte a través de un enlace covalente, evitando su lixiviación a la matriz alimentaria [1]. Esta tecnología permite conservar las propiedades antimicrobianas propias del compuesto antimicrobiano evitando la modificación de las propiedades organolépticas del alimento [5].

El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia antibacteriana del carvacrol y el timol inmovilizados en partículas de sílice a través de la reacción de Mannich contra patógenos comunes transmitidos por alimentos (*Escherichia coli* (CECT 5947), *Salmonella entérica* (CECT 443), *Staphylococcus aureus* (CECT 976) *y Listeria monocytogenes* (CECT 935) en zumo de manzana fresco.

Los microorganismos usados en este estudio se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Valencia, España). Las cepas se reconstituyeron siguiendo las instrucciones de la CECT y el stock bacteriano se almacenó a 4 °C en PCA antes de su uso.

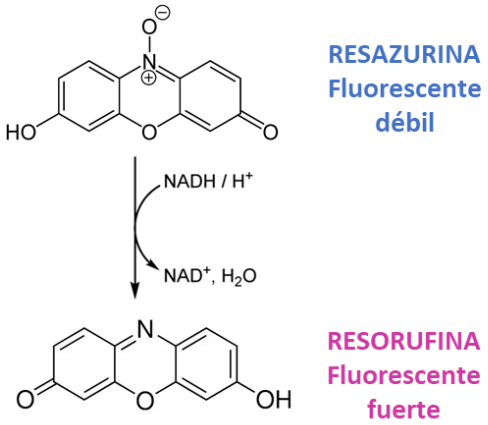


Figura 1: Conversión de resazurina a resorufina por parte de bacterias metabólicamente activas

En primer lugar, se determinó, mediante el método de la resazurina, la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de CAEs con comprobada actividad antimicrobiana (**tabla 1**) frente a los patógenos. La resazurina es un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las bacterias por la conversión de una tinción no fluorescente (azul) a un color altamente fluorescente (rojo) en respuesta a una reducción química del medio de cultivo resultado del crecimiento bacteriano (**figura 1**).

Tabla 1. CMI y CMB (mg/mL) de los CAE frente a patógenos alimentarios.

	Carvacrol		Timol	
	MIC	MBC	MIC	MBC
E. coli	0,625	1,25	0,625	1,25
S. enterica	0,312	0,625	0,312	0,625
S. aureus	0,625	1,25	0,625	1,25
L. monocytogenes	1,25	2,5	1,25	2,5

La **tabla 1** muestra los resultados de la CMI y la CMB. Los CAE libres mostraron actividad antibacteriana contra los microorganismos evaluados, pero en diferentes grados. El carvacrol y el timol tienen valores de CMI y CMB similares contra las bacterias exhibiendo un amplio rango de actividad antibacteriana con valores de CMI y CMB más altos contra *L. monocytogenes* (1,25 y 2,5 mg/mL, respectivamente) y valores más bajos contra *S. enterica* (0,3125 y 0,625 mg/mL, respectivamente).

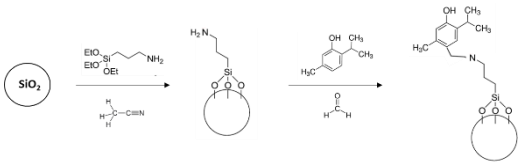


Figura 2. Síntesis de micropartículas de sílice funcionalizada con timol

En la inmovilización de carvacrol y timol en micropartículas de SiO_2 (5 – 15 µm) se siguió un procedimiento sintético de dos pasos para preparar los dispositivos antimicrobianos (Figura 2). En primer lugar, el APTES se ancla a la superficie de la partícula de óxido de sílice. A continuación, el carvacrol y el timol reaccionan con el APTES anclado en el soporte mediante la reacción de Mannich.

Tabla 2. Resultados del análisis elemental y grado de funcionalización de las micropartículas de sílice

CAE	Masa (%)			mg CAE/ g SiO_2
	N	C	H	
Timol	1,03	3,73	1,02	67,51
Carvacrol	0,70	2,53	0,78	45,70

Las partículas funcionalizadas se caracterizaron químicamente mediante análisis elemental (tabla 2). Los resultados del análisis elemental confirmaron la presencia de materia orgánica en las partículas funcionalizadas, validando así el anclaje del componente de aceite esencial (CAE).

La actividad antimicrobiana del carvacrol y el timol inmovilizado se ensayó frente a los patógenos en zumo de manzana a 37ºC. A partir de los resultados del grado de inmovilización, se adicionaron partículas funcionalizadas en cantidades equivalentes a la CMI y la CMB de los CAEs libres.

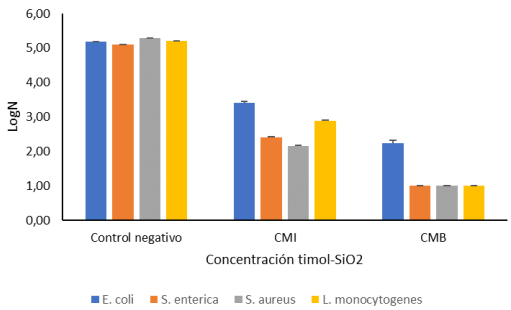


Figura 3. Recuentos de patógenos tras 24 horas de incubación a 37ºC en presencia de timol inmovilizado

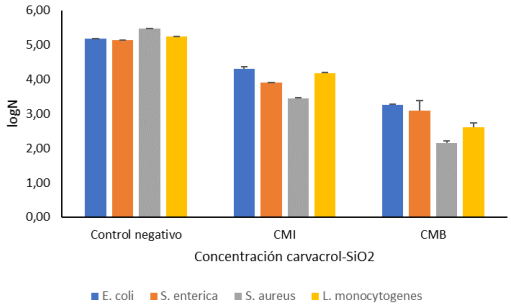


Figura 4. Recuentos de patógenos tras 24 horas de incubación a 37ºC en presencia de carvacrol inmovilizado

Las figuras 3 y 4 muestran los recuentos de los patógenos tras 24 horas de incubación a 37ºC en presencia de timol y carvacrol inmovilizados. Se observa que las partículas funcionalizadas, en las concentraciones evaluadas, tienen una significativa actividad antimicrobiana frente a las bacterias estudiadas, siendo más efectivas las partículas de timol.

La efectividad de las partículas inmovilizadas depende del microorganismo. Las partículas de timol son más efectivas contra *S. enterica, S. aureus y L. monocytogenes*, alcanzándose inactivaciones superiores a 4 ciclos logarítmicos. Sin embargo, es menos efectiva frente a *E. coli*. En cambio, las partículas de carvacrol son más efectivas contra *S. aureus*, alcanzando una inactivación superior a 3 ciclos logarítmicos.

Del presente estudio se puede concluir que (1) el timol y el carvacrol inmovilizado tienen una destacable actividad antimicrobiana frente a los patógenos en zumo de manzana; (2) La actividad antimicrobiana de la partícula funcionalizada depende del CAE, siendo la partícula timol-SiO_2 la más efectiva; (3) Su efectividad depende también del microorganismo objetivo; (4) Los sistemas antimicrobianos desarrollados, basados en la combinación de una molécula de grado alimentario como el timol o el carvacrol y soportes biocompatibles como las micropartículas de sílice, pueden emplearse en la industria alimentaria como estrategia de pasteurización de zumo de manzana.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del proyecto PID2021-128141OB-C21 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por "FEDER Una manera de hacer Europa".

REFERENCIAS

[1] Gómez-Llorente, H., Fernández-Segovia, I., Pérez-Esteve, É., Ribes, S., Rivas, A., Ruiz-Rico, M., Barat, J.M, *Foods*, **2023**, 12, 2060.

[2] Quinto E.J., Caro I., Villalobos-Delgado L.H., Mateo J., De-Mateo-silleras B., Redondo-Del-río M.P., *Antibiotics*, **2019**, 8, 208.

[3] Beristain-Bauza, S., Martinez-Nino, A., Ramirez-Gonzalez, A.P., Avila-Sosa, R., Ruiz-Espinosa, H., Ruiz-Lopez, I.I., Ochoa-Velasco, C.E., *Food Control*, **2018**, 92, 312–318.

[4] Mitropoulou, G., Nikolaou, A., Santarmaki, V., Sgouros G., Kourkoutas Y., *Foods*, **2020**, 9, 577.

[5] Silva, R.R.; Avelino, K.Y., Ribeiro, K.L., Franco, O.L., Oliveira, M.D., Andrade, C.A., *Front. Biosci. Sch.*, **2016**, 8, 129–142.

PERCEPCIÓN DEL CONSUMIDOR SOBRE EL USO DE NANOTECNOLOGÍA PARA ALARGAR LA VIDA ÚTIL DE LOS ALIMENTOS

Pérez-Esteve E.[1*], Fernández-Segovia I.[1], Barat J.M.[1]

1 Universitat Politècnica de València. Instituto de Ingeniería de Alimentos FoodUPV. C/ Camí de Vera s/n.

*edpees@upv.es

Resumen / Abstract

El objetivo de este trabajo fue determinar la percepción de los consumidores españoles sobre la aplicación de la nanotecnología al procesado y envasado de alimentos. Para ello, se seleccionaron diferentes aplicaciones en los que la nanotecnología se podría utilizar para crear nuevos aditivos, coadyuvantes tecnológicos o envases antimicrobianos. El estudio se llevó a cabo a través de una encuesta on-line en donde se evaluaba la percepción e intención de compra de los productos. En el cuestionario también se incluyó una sección para evaluar el nivel de neofobia frente a nuevas tecnologías alimentarias. Todas las aplicaciones evaluadas obtuvieron valoraciones positivas y los consumidores mostraron su disposición a comprar dichos productos, siendo mejor valorados aquellos en donde la nanotecnología no formaba parte del alimento (aplicaciones "nano-outside"). En general, la población encuestada exhibía un nivel de neofobia medio, pudiéndose identificar grupos con diferentes niveles de neofobia. Estas diferencias se correlacionaron con las evaluaciones de los productos, mostrando los grupos menos neofóbicos mejor valoración de todos los productos y mayor predisposición a comprarlos. Además, el nivel de neofobia se pudo correlacionar con la edad de los participantes y el nivel de conocimiento sobre nanotecnología. Este estudio pone de manifiesto que el uso de nanotecnología en alimentos para alargar la vida útil de los alimentos no tiene una mala imagen en la población española.

Palabras clave / Key words: *Antimicrobianos, encuestas, envasado.*

1. Introducción

La nanotecnología, que implica el diseño, fabricación y aplicación de materiales que tienen escalas de longitud críticas que se encuentran dentro del rango nanométrico (normalmente considerado entre 1 y 100 nm) [1], es una de las tecnologías novedosas que podrían contribuir a resolver muchos de los problemas asociados con el uso de plástico en los envases de alimentos.

Gracias al uso de esta novedosa tecnología, es posible obtener aplicaciones capaces de alargar la vida útil de los alimentos.

No obstante, para el éxito comercial de aquellos productos alimenticios en los que se emplea la nanotecnología para alargar la vida útil de los productos, es necesario, en primer lugar, garantizar que los consumidores acepten esta tecnología y, en

segundo lugar, que perciban un beneficio de su uso y ningún riesgo posible.

Teniendo en mente esta premisa se evaluó la percepción de los consumidores sobre el empleo de determinadas aplicaciones para alargar la vida útil de los alimentos, en los que la incorporación de nanotecnología podría suponer una mejora en sus propiedades al hacerlos más sostenibles, funcionales, así como inteligentes y/o activos, para aplicaciones alimentarias.

2. Materiales y métodos

Se diseñó una encuesta online en tres partes con Google Forms. En la primera parte se consultó sobre datos demográficos. A continuación, se pasó un test validado sobre neofobia. Finalmente se mostró a los consumidores imágenes recreadas de cuatro tipos diferentes de aplicaciones de la nanotecnología para alargar la vida útil de los alimentos (Fig. 1).

Para analizar los datos se utilizaron diferentes tests estadísticos (Alfa de Cronbach, Análisis Jerárquico de Conglomerados, Kruskal-Wallis...) utilizando el programa estadístico XLSTAT 2020.3.1.

3. Resultados

La muestra estuvo compuesta por 713 consumidores españoles (casos válidos) reclutados mediante un método de muestreo aleatorio simple. Se obtuvo un error estimado de ± 3,75% después de considerar un intervalo de confianza del 95% con p y q iguales a 0,5.

Los valores de la escala global de neofobia (después de considerar las respuestas de los 13 ítems) podía oscilar entre 13 y 91. Cuanto mayor es el valor global, mayor es el nivel de neofobia. En el presente trabajo, este valor fue 51,10, que fue ligeramente inferior al valor central de 52 (posición neutral), con un valor mínimo de 18 y máximo de 90. Estos resultados muestran un nivel medio de neofobia a las nuevas tecnologías alimentarias para la población española y una amplia variabilidad en el rango de respuestas, lo que podría indicar grupos de consumidores con diferentes niveles de neofobia.

Los consumidores más jóvenes y los más informados, fueron los que menor neofobia presentaron y mayores puntuaciones otorgaron a los productos.

Como se muestra en la Fig. 2 todas las solicitudes fueron altamente valoradas con puntuaciones superiores a 4, que es la media de la escala.

Fig 1: Representación de aplicaciones seleccionadas de nanotecnología para crear envases con propiedades mejoradas (IP), envases activos (AP) y envases inteligentes (SP).

El producto mejor evaluado fue el salmón en un empaque con un nanosensor indicador de frescura (SP2), que reacciona a los cambios en la composición del pescado por pérdida de frescura modificando el color de la etiqueta. Esta aplicación obtuvo los mejores resultados para los ítems sobre novedad y beneficios de nutrición/seguridad alimentaria/calidad de los alimentos. Fue el que más gustaría a los encuestados, y el mejor valorado en términos de intención de compra.

En las dos últimas posiciones quedaron: carne de pollo envasada con una película que contiene quitosano nanoestructurado y aceites esenciales, que aportan propiedades antimicrobianas; plátanos envasados con una película con nanoarcillas que eliminan el etileno (AP3), que fue la aplicación peor valorada.

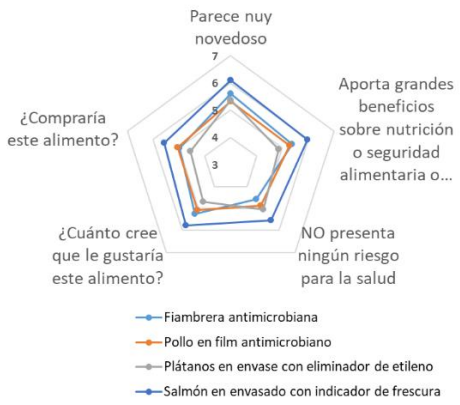


Fig 2: Puntuaciones medias (escala de 7 puntos) otorgadas por los consumidores a los ítems de evaluación de las cuatro aplicaciones de la nanotecnología para alargar la vida útil de los alimentos.

4. Conclusiones

La opinión de los consumidores sobre todos los productos que incluyen nanotecnología para alargar la vida útil de los alimentos fue en general positiva. Las aplicaciones mejor valoradas fueron aquellas en las que la nanotecnología proporciona información sobre la calidad/seguridad del producto, en concreto el indicador de tiempo-temperatura. Por el contrario, las aplicaciones que peor valoraron los consumidores fueron aquellas cuyos nanomateriales interactúan con los propios alimentos, como es el caso de los envases activos antimicrobianos estudiados o secuestradores de etileno. Estos resultados deberían animar a investigadores y fabricantes aplicaciones para alargar la vida útil de los alimentos a seguir invirtiendo en el desarrollo de una nueva generación de envases que contribuya a mejorar la sostenibilidad, la calidad y la seguridad de los alimentos mediante la nanotecnología.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del proyecto PID2021-128141OB-C21 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por “FEDER Una forma de hacer Europa”.

REFERENCIAS

[1] D.J. McClements, *ACS Omega*, **2020**, 5 (46) (2020), 29623-29630.

TRATAMIENTO NO TÉRMICO DE ALIMENTOS LÍQUIDOS BASADO EN EL USO DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS NATURALES INMOVILIZADOS SOBRE SOPORTES APTOS PARA CONSUMO ALIMENTARIO

Pérez-Esteve E.[1*], Gómez-Llorente. H [1], Fernández-Segovia I.[1], Barat J.M.[1]

1 Universitat Politècnica de València. Instituto de Ingeniería de Alimentos FoodUPV. C/ Camí de Vera s/n.

edpees@upv.es

Resumen / Abstract

La búsqueda de nuevas tecnologías para preservar alimentos líquidos mientras se minimiza el impacto del procesado en sus propiedades sensoriales, nutricionales y funcionales, y se reduce la huella de carbono del procesamiento térmico, representa un desafío crucial para la industria alimentaria actual. Una solución innovadora podría ser la inmovilización de antimicrobianos naturales en soportes aptos para consumo alimentario. Esta técnica, especialmente mediante la inmovilización de componentes de aceites esenciales (CAE) sobre partículas de sílice, ha demostrado ser una estrategia eficaz para crear conservantes de alimentos (uso directo) o coadyuvantes de procesamiento (uso indirecto) que mejoran la calidad microbiológica y extienden la vida útil de los alimentos derivados de frutas, sin alterar sus propiedades nutricionales, funcionales y sensoriales. El objetivo de este trabajo es determinar la actividad antimicrobiana de diferentes CAEs inmovilizados sobre partículas de óxido de silicio frente a bacterias alterantes y virus y analizar las ventajas que ofrece frente a los tratamientos térmicos habituales.

Palabras clave / Key words

Carvacrol, eugenol, timol, vainillina, bacterias alterantes, virus gástricos

1. Introducción

Los componentes de aceites esenciales (CAEs) han resultado ser efectivos frente a una gran variedad de microrganismos. No obstante, la aplicación directa de estos componentes plantea desafíos debido a su baja solubilidad y a la alteración de las propiedades organolépticas de los alimentos. En respuesta a estas limitaciones, la búsqueda de nuevas formas de dosificación de estos agentes tan prometedores es vital para favorecer su uso en la industria alimentaria.

En este sentido, el uso de antimicrobianos naturales inmovilizados para conservar o extender la vida útil de alimentos líquidos ha aumentado en los últimos años debido a su marcada eficacia antimicrobiana y a su buena capacidad para amortiguar el impacto sensorial y de estabilidad en los alimentos después de la inmovilización [1].

Pese a ello, todavía quedan muchas vías por explorar como son la inhibición de bacterias termorresistentes y alterantes, como por ejemplo *Alicyclobacillus acidoterrestris* o virus gástricos. En este sentido, el objetivo fue determinar la capacidad de Carvacrol (Car), Eugenol (Eu), Timol (Ti) y Vainillina (Va) inmovilizados en partículas de óxido de silicio para inhibir el crecimiento de *A. acidoterrestris*, así como la producción de guayacol, y de reducir la infectividad del virus Tulane.

2. Materiales y métodos

Las partículas comerciales de sílice (SiO_2) (Merck, Madrid, España), empleadas como soporte inerte, fueron funcionalizadas con los cuatro CAEs objeto de estudio según el método propuesto por Ruiz-Rico et al. (2017) [2].

Para el estudio del efecto sobre *A. acidoterrestris*, se incubaron 10 mL de zumo de naranja inoculado con diferentes cepas de *A. acidoterrestris* (5 log_{10}) a diferentes concentraciones de SiO_2-EOCs (5-25 µm) a 46 °C durante 24 horas con agitación (1000 g) para asegurar una dispersión uniforme de las partículas en la solución. El recuento de células viables de células de *A. acidoterrestris* después de los tratamientos se realizó mediante la técnica de recuento en placa en agar BAT tras 96 horas de incubación a 46 °C. El efecto de cada tratamiento sobre la formación de guayacol por el microorganismo en el zumo de naranja se estudió después de 96 horas de incubación a 46 °C. Para este propósito, se empleó el método HPLC descrito por Savaş Bahçeci *et al*. con cambios menores [3].

Para el estudio sobre el virus Tulane, se utilizó la cepa, proporcionada por T. Farkas (Universidad Estatal de Luisiana en Baton Rouge, LA, EE. UU.). El virus se cultivó en células LLC-MK2 (ATCC CCL-7) a 37 °C y 5 % CO_2 en medio de crecimiento (10 % de FBS y 1 % de Penicilina Estreptomicina). Muestras de virus Tulane en PBS se trataron con SiO_2 y SiO_2-EOCs a 37 °C durante 2 horas con agitación (1,000 g) para mantener una dispersión uniforme de partículas dentro de la solución. Después de la incubación, todas las muestras se filtraron utilizando un filtro de nylon de 0.45 µm para separar las partículas de sílice. El TuV infeccioso se cuantificó mediante el procedimiento $TCID_{50}$ utilizando placas de 96 pocillos sembradas con 10^4 células LLC-MK2 por pocillo siguiendo el método de Spearman-Karber [Ramakrishnan, 2016]. Para ello, se añadieron 50 µL de diluciones seriadas (1:10) de las muestras de virus a cuatro pocillos. Las células se incubaron a 37 °C durante 2 horas en 5 % CO2. Posteriormente, se añadió 150 µL de medio de mantenimiento (2 % de FBS y 1 % de Penicilina Estreptomicina) y el daño celular (CPE) se leyó después de 5 días usando un microscopio óptico invertido. El título del virus se muestra como cantidad de virus necesaria para producir efecto citopático en el 50 % de los cultivos celulares infectados ($TCID_{50}$).

3. Resultados.

En primer lugar, se ha evaluado la aplicación de los CAEs frente al crecimiento y producción de guayacol por parte de un microorganismo alterante y termorresistente como es *Alyciclobacillus acidoterrestris* en zumo de naranja. A modo de ejemplo, la **Figura 1** muestra cómo la aplicación de partículas funcionalizadas con Eugenol a modo de aditivo provocan la reducción microbiana.

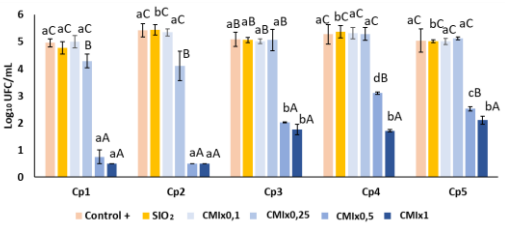


Fig 1: Efecto partículas de SiO_2-Eu a diferentes concentraciones frente a cinco cepas de *A. acidoterrestris*. Valor medio ± DE (n=3). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en los recuentos de *A. acidoterrestris* entre las cepas; letras mayúsculas diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de A. acidoterrestris entre tratamientos (p<0.05).

La **Tabla 1** muestra a su vez cómo el tratamiento de los zumos con una concentración de CMIx0,5 de las partículas SiO_2-Eu reduce la formación de guayacol hasta concentraciones indetectables. Este hecho es de gran interés, ya que la inmovilización evita el problema de alteración organoléptica del producto, derivado de la aplicación de estos antimicrobianos en forma libre.

Tabla1: Efecto del tratamiento con SiO_2 y SiO_2-Eu sobre la producción de guayacol a una concentración equivalente a CMIx0,5. Los resultados se expresan como mg/L de guayacol. Valores medios (3) ± DE.

Cepa	Control	SiO_2	SiO_2.Eu
Cp1	77,43±6,37^{bB}	76,93±3,62^{bB}	n.d^{aA}
Cp2	60,14±7,19^{bB}	59,31±2,64^{bB}	n.d^{aA}
Cp3	91,87±3,04^{bB}	90,99±2,93^{bB}	n.d^{aA}
Cp4	81,05±6,43^{bB}	79,34±5,79^{bB}	n.d^{aA}
Cp5	92,66±5,11^{bB}	92,12±1,65^{bB}	n.d^{aA}

*Diferentes letras minúsculas en una misma columna indican diferencias significativas en la concentración de guaiacol entre cepas; diferentes letras mayúsculas en una misma fila denotan diferencias estadísticamente significativas en la concentración de guaiacol entre tratamientos (p<0,001).

Respecto a la segunda aplicación, la **Tabla 2** muestra cómo la aplicación de partículas de SiO_2 funcionalizadas con CAEs reduce la infectividad del virus Tulane hasta alcanzar niveles no detectables (reducción superior a 4,5 log_{10}). Por otro lado, se ha demostrado que el mecanismo antiviral está basado en la capacidad de los antimicrobianos inmovilizados de modificar o destruir la cápside viral, que es la responsable de otorgar al virus las propiedades infectivas. Además, se determinó que los CAEs inmovilizados no son citotóxicos a las concentraciones antivirales efectivas.

Tabla2: Partículas infecciosas de TuV después de la incubación con partículas de sílice desnudas y funcionalizadas con componentes de aceites esenciales inmovilizados (65 mg/mL). Valores medios ± DE (n = 9).

Tratamiento	Media log_{10} $TCID_{50}$/mL	
	Título ± DE	Reducción
Ninguno (Control)	6,42 ± 0,20 ^{a}	
SiO_2	6,02 ± 0,12 ^{a}	0,40
SiO_2-Car	1,96 ± 0,65 ^{bA}	4,46
SiO_2-Eu	1,05 ± 0,02 ^{c}	5,37
SiO_2-Thy	1,57 ± 0,35 ^{bA}	4,85
SiO_2-Va	1,01± 0,01 ^{c}	5,41

La principal ventaja de este enfoque alternativo al tratamiento térmico tradicional es que se considera una tecnología ecológica. Evitando el uso de calor, podría mejorar la descarbonización y la eficiencia energética del agroalimentario. También proporciona soluciones basadas en la naturaleza mediante el uso de biomoléculas antimicrobianas naturales. Dado que la mayoría de estos antimicrobianos se obtienen de subproductos vegetales y animales, su valorización se alinea con los principios de la bioeconomía al reducir el desperdicio y generar valor agregado para el sector agroalimentario. Finalmente, esta tecnología podría ser utilizada para

conservar alimentos líquidos en países en desarrollo donde el acceso a tecnologías complejas, costosas o que requieren electricidad es limitado.

4. Conclusiones

La búsqueda de nuevas tecnologías capaces de preservar los alimentos derivados de frutas y minimizar el impacto del procesamiento en las propiedades sensoriales, nutricionales y funcionales de los alimentos derivados de frutas, al tiempo que reducen la huella de carbono del procesamiento térmico, son desafíos importantes para la industria alimentaria actual. Con tales tareas, la solución podría venir de un nuevo enfoque en la aplicación de antimicrobianos naturales: su inmovilización sobre soportes de calidad alimentaria. La inmovilización de diferentes antimicrobianos naturales (principalmente COEs) sobre partículas de sílice es una excelente estrategia probada para crear conservantes alimentarios (uso directo) o coadyuvantes de procesamiento (uso indirecto) eficaces en extender su vida útil, pero sin alterar las propiedades nutricionales, funcionales y sensoriales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del proyecto PID2021-128141OB-C21 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por "FEDER Una forma de hacer Europa".

REFERENCIAS

[1] H. Gómez-Llorente, I. Fernández-Segovia, É. Pérez-Esteve, É. …, J.M. Barat, *Foods* **2023**, *12*, 2060.

[2] M. Ruiz-Rico, É. Pérez-Esteve, É., A. Bernardos, … J.M. Barat, Food Chem., **2017**, 233, 228-236.

[3] K. Savaş Bahçeci, V. Gökmen, J. Acar, *Eur. Food Res. Technol.*, **2005**, *220*, 196-199.

[4] M. Ramakrishnan, *World J. Virol.*, **2016**, *5*(2), 85.

DESCONTAMINACIÓN DE TOMATES CHERRY INOCULADOS CON *ESCHERICHIA COLI* MEDIANTE LA ADICIÓN DE UNA NANOEMULSIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ROMERO AL AGUA DE LAVADO

Rosique A., Luciano, A., Bodea, I., Palop, A.

Universidad Politécnica de Cartagena / Instituto de Biología Vegetal / Departamento de Ingeniería Agroalimentaria. Paseo Alfonso XIII, 48 30203 Cartagena

Resumen

El objetivo de esta investigación fue estudiar la influencia de la temperatura y del tiempo de contacto en el efecto descontaminante de una nanoemulsión de aceite esencial de romero aplicada al agua de lavado de tomates cherry previamente contaminados con Escherichia coli *O157:H7. Se observó una reducción progresiva de la carga microbiana de los tomates conforme avanzaba el tiempo de contacto. El aumento de la temperatura de lavado tuvo un efecto más notable en la carga microbiana de los tomates cherry. Estos resultados muestran que la adición de una nanoemulsión de aceite esencial de romero al agua de lavado de los vegetales puede constituir una alternativa a los desinfectantes a base de cloro, de gran interés para la industria alimentaria.*

Palabras clave: *Escherichia coli, descontaminación, antimicrobianos, nanoemulsiones*

Introducción

Tradicionalmente la industria alimentaria ha utilizado compuestos clorados para la descontaminación de los vegetales, tales como el hipoclorito de sodio (NaOCl), el dióxido de cloro (ClO_2) o el cloro gas (Cl_2). Sin embargo, se ha demostrado que, en presencia de materia orgánica, estos compuestos pueden generar trihalometanos y cloraminas, con efectos carcinogénicos [1]. En este sentido, cabe destacar que en algunos países europeos, como Bélgica, Dinamarca, Alemania y Países Bajos, el uso del cloro como desinfectante de vegetales está prohibido [2] y en España su uso se ha limitado recientemente a raíz de la publicación del Real Decreto 773/2023 por el que se regulan los coadyuvantes tecnológicos utilizados en los procesos de elaboración y obtención de alimentos [3]. En respuesta a esta problemática se están buscando alternativas seguras y sostenibles que permitan descontaminar los vegetales de forma eficaz.

Los aceites esenciales son compuestos volátiles extraídos de las plantas y a lo largo de la historia se han utilizado para la cosmética, la industria farmacéutica y para conservar alimentos. La mayoría de ellos han sido reconocidos como sustancias seguras (GRAS), y destacan por su gran actividad antimicrobiana [4]. La aplicación de aceites esenciales mediante nanoemulsiones favorece el contacto entre estos compuestos y la superficie de los

productos hortofrutícolas, lo cual hace que el efecto biocida de los aceites esenciales incremente [5].

Escherichia coli O157:H7 es una bacteria Gram negativa catalogada como uno de los principales patógenos alimentarios, pues es causante de numerosos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, que han resultado mortales en algunos casos. Esto es por su capacidad para formar la toxina Shiga [6]. Tal es su importancia, que se han determinado normativas y límites microbiológicos para esta bacteria en el ámbito de la seguridad alimentaria [7].

El objetivo de esta investigación fue estudiar la influencia de la temperatura y del tiempo de contacto en el efecto descontaminante de una nanoemulsión de aceite esencial de romero aplicada al agua de lavado de tomates cherry previamente contaminados con *Escherichia coli* O157:H7.

Materiales y métodos

Se utilizó la cepa CECT 5947 de *Escherichia coli* 0157:H7 (Colección Española de Cultivos Tipo – CECT, Valencia, España), a la que previamente se había eliminado el gen responsable de la codificación del factor de virulencia. El microorganismo se sembró en 500 mL de caldo LB (Scharlau, Barcelona, España) y se incubó a 37ºC durante 18 h en agitación. Este cultivo se utilizó posteriormente para inocular los tomates cherry, por inmersión en el cultivo durante 30 minutos.

Se aplicó una nanoemulsión de aceite esencial de romero (Marnys, Cartagena, España), con una concentración final del 1,11%, como solución de lavado de tomates cherry inoculados con *E. coli* O157:H7. La nanoemulsión se preparó mezclando por separado los ingredientes de la fase oleosa (6 mL de aceite esencial de romero y 3,6 mL de Tween 80 (Panreac, Barcelona, España)) y los de la fase acuosa (8,25 mL de propilenglicol (Guinama, Valencia, España) y 12,5 mL de agua destilada). Ambas fases se juntaban y se preparaba la nanoemulsión por homogeneización con ultrasonidos (Hielscher UP400St, Teltow, Alemania).

Los tiempos de estudio para el lavado de los tomates fueron de 20 s, 40 s, 1, 2, 5, 10 y 15 minutos. También se estudiaron distintas temperaturas de lavado: 25, 30, 35, 40, 45 y 50°C.

Tras el lavado, se realizaron las diluciones decimales pertinentes en agua de peptona (Scharlau), que se sembraron en agar LB (Scharlau) y se incubaron a 37°C durante 24 h para el posterior recuento.

Resultados

Se observó una reducción progresiva de la carga microbiana de los tomates conforme avanzaba el tiempo de contacto, encontrándose un óptimo de prácticamente 2 ciclos logarítmicos de reducción tras 1 minuto de lavado a temperatura ambiente (figura 1).

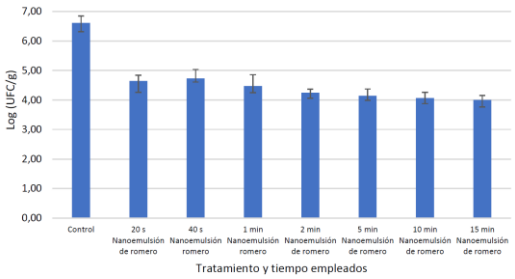


Figura 1: Efecto de la nanoemulsión de aceite esencial de Romero como solución de lavado de tomates cherry previamente contaminados con *E. coli.* Media de los logaritmos de los recuentos ± desviación estándar.

La prolongación del tiempo de contacto condujo a reducciones adicionales de la

carga microbiana, pero de menor magnitud (figura 1).

Sin embargo, el aumento de la temperatura de lavado tuvo un efecto más notable en la carga microbiana de los tomates cherry, alcanzándose hasta 4 ciclos logarítmicos de reducción tras 1 minuto a 50°C (tabla 1). El aumento de la temperatura de la solución de lavado hasta 50°C no afectó de manera apreciable al aspecto de los tomates cherry ni a su resistencia al pelado.

Tabla 1: Valores medios de los logaritmos de los recuentos y desviación estándar obtenidas tras los tratamientos con nanoemulsión de aceite esencial de romero para distintas temperaturas.

Temperatura de lavado	Log UFC/mL ± desv estándar
Tomate sin lavar	6,67 ± 0,24 [a]
25°C	4,72 ± 0,24 [b]
30°C	3,55 ± 0,54 [d]
35°C	4,15 ± 0,25 [c]
40°C	3,46 ± 0,75 [cde]
45°C	3,02 ± 0,22 [e]
50°C	2,67 ± 0,62 [e]

[a-e] Las medias con letras distintas indican diferencias significativas.

Estos resultados, que son muy similares a los que se obtienen al añadir hipoclorito de sodio al agua de lavado [8], muestran que la adición de una nanoemulsión de aceite esencial de romero al agua de lavado de los vegetales puede constituir una alternativa a los desinfectantes a base de cloro, de gran interés para la industria alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICIN) y por la Agencia Estatal de Investigación (AEI) a través del proyecto PID2020-116318RB-C32. También forma parte del Programa AGROALNEXT que ha sido financiado por MICIN con fondos NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) y por la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia a través de la Fundación Séneca - Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia.

REFERENCIAS

[1] AF Artés, PA Gómez, E Aguayo, V Escalona, F Artés-Hernández. *Postharvest Biol Technol,* **2009,** *51,* 287-296.

[2] J Gutierrez, P Bourke, J Lonchamp, C Barry-Ryan. *Innov Food Sci Emerging Technol,* **2009,** *10,* 195-202.

[3] A Meireles, E Giaouris, M Simoes. *Food Res Int,* **2016,** *82,* 71-85.

[4] Real Decreto 773/2023, *BOE,* **2023***, 237* de 04/10/2023.

[5] M Jia, W Bai, J Deng, W Li, Q Lin, F Zhong, F Luo, *Int J Pharma,* **2024,** *651,* 123726.

[6] A Rani, VB Ravindran, A Surapaneni, N Mantri, AS Ball, *Int J Food Microbiol,* **2021,** *349,* 109233.

[7] A Barlaam, A Parisi, E Spinelli, M Caruso, PD Taranto, G Normanno, *J Food Prot,* **2019**, *82*, 1440-1448.

[8] IM Bodea, GM Catunescu, A Palop, PS Fernández, A Garre, *LWT,* **2023,** *190,* 115549.

PAPEL DE SIGB EN LA ACLIMATACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* A TRATAMIENTOS TÉRMICOS DINÁMICOS

Guillén S.[1,2], Fernández P.S.[1], O'Byrne C.[3] y Garre A.[1]
1 Dpto. de Ingeniería Agronómica e Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, Murcia, España.
2 Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 - (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, España.
3 Bacterial Stress Response Group, Microbiology, School of Biological and Chemical Sciences, National University of Ireland, Galway, Ireland.

silvia.guillen@upct.es

Resumen

Aunque se han descrito las respuestas generales de Listeria monocytogenes al estrés térmico, es necesario seguir investigando para determinar los mecanismos específicos desencadenados para hacer frente a este estrés. Estas respuestas incluyen la capacidad de las células microbianas para iniciar una respuesta fisiológica cuando se exponen a temperaturas subletales, lo que resulta en una mayor resistencia a tratamientos posteriores. Se ha observado que este fenómeno, conocido como aclimatación al estrés, puede desarrollarse durante tratamientos dinámicos, con un alcance que aumenta a medida que disminuye la velocidad de calentamiento.
En este estudio, se estudió la resistencia al calor de células en fase exponencial de tres cepas de L. monocytogenes EGD-e, la cepa parental y dos cepas mutantes (ΔsigB y rsbR1 T241A). Se aplicaron tratamientos tanto en condiciones isotermas (55 a 60 °C) como en condiciones dinámicas (de 30 °C a 58 °C y manteniendo esta temperatura) a velocidades de calentamiento entre 2 y 14 °C/min). Los datos se analizaron con el modelo no lineal de Geeraerd bajo condiciones isotérmicas y dinámicas. Las velocidades de calentamiento inferiores a 14 °C/min indujeron una aclimatación dinámica al estrés, incluso en las cepas mutantes. Se cuantificó la aclimatación al estrés concluyéndose que este fenómeno podía inducir un aumento de más 2 veces en el valor D con respecto al observado en condiciones isotérmicas.

Palabras clave: *Listeria, sigB, aclimatación al estrés, tratamientos térmicos dinámicos*

A pesar de que se ha estudiado ampliamente la respuesta general al estrés térmico de *Listeria monocytogenes*, es necesario seguir investigando para determinar los mecanismos específicos implicados en esta respuesta. Una importante laguna de conocimiento es la capacidad de *L. monocytogenes* para desencadenar una respuesta fisiológica cuando se expone a temperaturas subletales, resultando en una mayor resistencia a tratamientos posteriores. Este fenómeno, es conocido como aclimatación al estrés, es de gran relevancia para el diseño de procesos térmicos, ya que se ha observado durante tratamientos dinámicos a velocidades bajas de calentamiento (<14 °C/min).

Este estudio se centra en el análisis de la aclimatación al estrés térmico de células en fase exponencial de *L. monocytogenes* EGD-e: la cepa salvaje y varias cepas mutantes (ΔsigB y rsbR1 T241A).

Para ello, se crecieron las diferentes cepas en caldo BHI a 37 °C y en agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,4. Se realizaron tratamientos térmicos en condiciones isotérmicas a tres temperaturas diferentes (55, 58 y 60 °C), así como en condiciones dinámicas (de 30 °C hasta alcanzar los 58,0 °C y mantenerlos) con velocidades de calentamiento entre 2 y 14 °C/min en un termorresistómetro Mastia [1]. Debido a las desviaciones observadas en las curvas de supervivencia los datos se analizaron utilizando un modelo de inactivación no lineal (modelo de Geeraerd) bajo condiciones isotermas [2] y bajo condiciones dinámicas [3].

En las figuras 1 y 2 se muestran las curvas de inactivación obtenidas en condiciones dinámicas, con velocidades de calentamiento de 2 y 14 °C/min respectivamente. En los datos obtenidos a la velocidad más baja de calentamiento (2 °C/min) se observó el fenómeno de aclimatación al estrés. El modelo ajustado a partir de los datos obtenidos en condiciones isotermas no fue capaz de predecir la respuesta microbiana, sin embargo, el modelo bajo condiciones dinámicas sí que fue capaz de predecir esta respuesta microbiana en todas las cepas.

Por el contrario, a velocidades de calentamiento mayores (14 °C/min) el modelo basado en las predicciones isotermas fue capaz de predecir la respuesta microbiana bajo las condiciones dinámicas y en todas las cepas estudiadas.

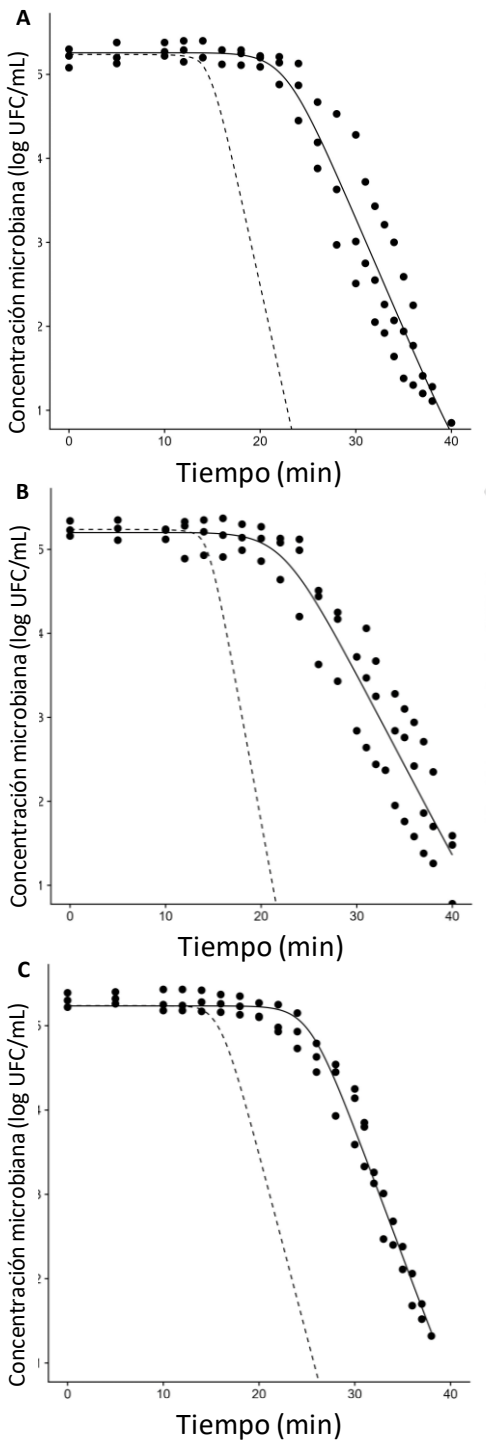


Figura 1: Curvas de inactivación de *Listeria monocytogenes EGD-e* obtenidas tras un tratamiento térmico en condiciones dinámicas (velocidad de calentamiento de 2 °C/min entre 30 y 58 °C y mantenida a esta temperatura).). A: cepa parental; B: EGD-e ΔsigB; C: EGD-e rsbR1 T241A La línea discontinua muestra la predicción del modelo de Geeraerd a partir de los datos isotermos y la línea continua a partir del modelo bajo condiciones dinámicas.

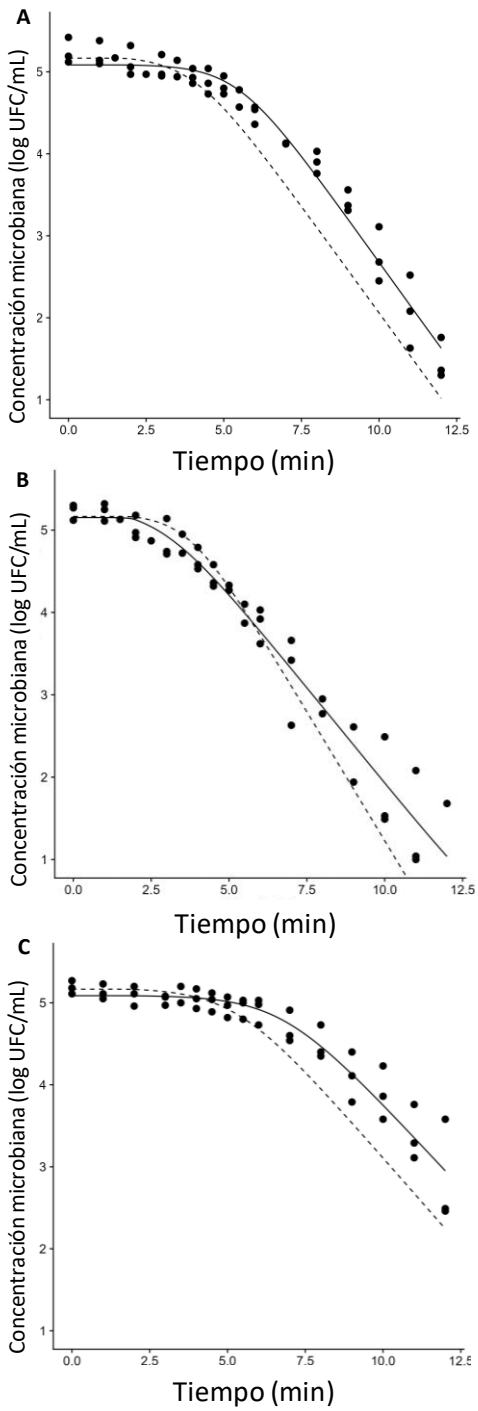


Figura 2: Curvas de inactivación de *Listeria monocytogenes EGD-e* obtenidas tras un tratamiento térmico en condiciones dinámicas (velocidad de calentamiento de 14 °C/min entre 30 y 58 °C y mantenida a esta temperatura). A: cepa parental; B: EGD-e ΔsigB; C: EGD-e rsbR1 T241A La línea discontinua muestra la predicción del modelo de Geeraerd a partir de los datos isotermos y la línea continua a partir del modelo bajo condiciones dinámicas.

Por tanto, las velocidades de calentamiento inferiores a 14 °C/min indujeron una aclimatación dinámica al estrés, incluso en las cepas mutantes. La aclimatación al estrés se cuantificó dividiendo el valor *D* estimado bajo condiciones dinámicas entre el valor *D* obtenido en condiciones isotermas, concluyéndose que este fenómeno podía inducir un aumento de más 2 veces en el valor *D* con respecto al observado en condiciones isotérmicas (Figura 3).

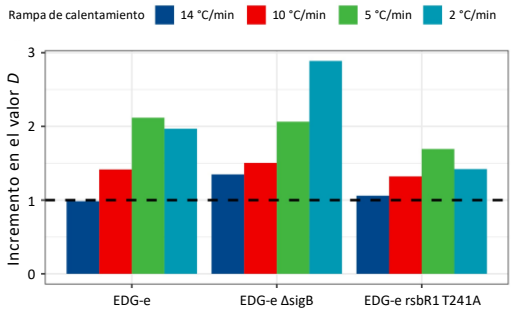


Figura 3: Cuantificación de la aclimatación al estrés de las cepas de *Listeria monocytogenes EGD-e* en condiciones dinámicas a las diferentes velocidades de calentamiento.

Esto es de gran importancia para la industria, ya que los modelos basados en condiciones isotérmicas podrían subestimar las concentraciones microbianas durante tratamientos con perfiles complejos. A partir de los modelos ajustados, podría construirse un diagrama bidimensional que permitiera diseñar tratamientos de inactivación teniendo en cuenta la aclimatación al estrés. El diagrama también facilitaría la comparación entre las tres cepas, enfatizando el papel de SigB y el estressosoma en la aclimatación dinámica al estrés.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido parcialmente financiada con el proyecto PID2020-116318RB-C32 del Ministerio de Ciencia e Investigación, MCIN/AEI/10.13039/501100011033. Alberto Garre agradece haber sido financiado por una Beca María Zambrano y por una Beca Ramón y Cajal (RYC-2021-034612-I). Silvia Guillén agradece el contrato postdoctoral Margarita Salas concedido por la Universidad de Zaragoza y financiado por NextGenerationEU. COB is supported by the Science Foundation Ireland Frontiers for the Future Programme (21/FFP-P/10078). Los autores desean dar las gracias al Gobierno español (Ministerio de Ciencia e Innovación, proyecto de investigación PID2019-108420RB-C31-ASEQURA).

REFERENCIAS

[1] R. Conesa, S. Andreu, P.S. Fernández, A. Esnoz, A. Palop, *J. Applied Microbiol.,* **2009**, *107 (2),* 506-513.

[2] A.H. Geeraerd, C.H. Herremans, J.F. Van Impe, *Int. J. Food Microbiol*. **2000**, *59*, 185–209.

[3] V.P. Valdramidis, A.H. Geeraerd, K. Bernaerts, J.F.M. Van Impe, *Int. J. Food Microbiol*. **2008**, 128, 146–152.

RESISTENCIA AL CALOR DE LARVAS L3 DE *ANISAKIS*

Adrián Ruiz[1], Vanesa Abad[1], Guillermo Cebrián[1], Ignacio Álvarez[1]

1 Universidad de Zaragoza/Facultad Veterinaria/Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Unidad Tecnología de los Alimentos/Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2). C/ Miguel Servet 177. 50013. Zaragoza

nacho.alvarez@unizar.es

Resumen / Abstract

Si bien hasta la fecha se recomienda aplicar un cocinado del pescado de al menos 60°C durante 1 minuto en el centro térmico de la pieza para inactivar el posible Anisakis que pueda contener, en los nuevos cocinados sous-vide del pescado se puede realizar a menor temperatura que la indicada. Es por ello que con el fin de saber si estos nuevos cocinados aseguran la destrucción del parásito, se requiere conocer su termorresistencia. Sin embargo, son pocos los datos publicados a este respecto y menos a temperaturas inferiores a los 60°C. Es por ello que, en este trabajo, se han determinado los parámetros Dt y z con el fin de caracterizar dicha resistencia al calor en un rango amplio de temperaturas.

Palabras clave / Key words: *Anisakis, supervivencia, resistencia al calor, riesgo sanitario*

Introducción

En los últimos años, posiblemente con el auge del cocinado en base a la técnica *sous-vide*, se están planteando temperaturas (42-55 °C) de cocinado de la merluza inferiores a los indicados por la legislación para evitar la transmisión de *Anisakis* por el consumo de alimentos (> 60 ^{o}C/1'). Si bien ante esta circunstancia sería necesario que estos pescados se congelaran previamente a su cocinado, podría haber usuarios que considerando que el pescado *sous-vide* se cocina, el tratamiento térmico aplicado fuera suficiente para inactivar a *Anisakis* y no congelasen previamente el producto incrementando el riesgo de anisakiasis. Sorprendentemente, no hay apenas estudios sistemáticos sobre la termorresistencia de larvas L3 de *Anisakis* y menos en los rangos de las temperaturas que se están utilizando en esos cocinados *sous-vide*, por lo que es difícil de determinar cuál será la probabilidad de supervivencia de *Anisakis* a estos cocinados.

Es por ello que el objetivo de este trabajo es caracterizar la termorresistencia de larvas L3 de *Anisakis* en un rango amplio de temperaturas y tiempos de tratamiento.

Metodología

Larvas L3 de *Anisakis* extraídas de merluza se sumergieron en soluciones salinas (0,85% NaCl) atemperadas a distintas temperaturas (40-52,5 °C) en un baño termostatizado y, a intervalos regulares de tiempo, se evaluó su supervivencia mediante el test de movilidad descrito por la EFSA [1]. A partir de estos resultados, se construyeron las gráficas de supervivencia y termorresistencia para obtener los valores D_T y z considerando la cinética de inactivación la descrita en Termobacteriología por Bigelow y Esty [2] según la Ecuación 1:

$$\mathrm{Log}_{10}\, S_t = -\left(\frac{t}{D_T}\right)$$

Resultados

La Figura 1 muestra las gráficas de supervivencia de *Anisakis* tratadas en solución salina al 0,85% en el rango de temperaturas investigadas. La inactivación de *Anisakis* siguió una cinética exponencial lo que permitió obtener gráficas de supervivencia como las presentadas y a partir de ellas los correspondientes valores D_T para cada una de las temperaturas (Tabla 1). Salvo a las temperaturas más bajas (40 y 43 °C) a las que apenas se alcanzó 0,5 ciclos de inactivación, los ajustes de la cinética exponencial fueron adecuados (R^2>0,910).

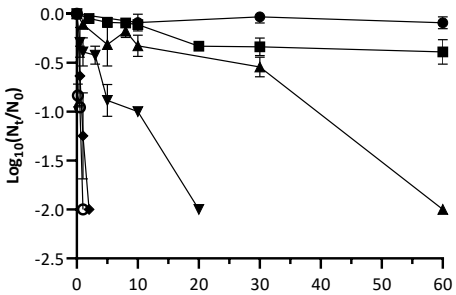


Figura 1: Gráficas de supervivencia de *Anisakis* obtenidas en solución salina al 0,85% de NaCl a diferentes temperaturas: (●) 40, (■) 43, (▲) 45, (▼) 47,5, (♦) 50 y (○) 52,5°C.

La representación del logaritmo de estos valores D_T frente a la temperatura permitió obtener la gráfica de termodestrucción (Figura 2) de *Anisakis* (R^2 = 0,976), y a partir de ella, un valor *Z* = 3,79 ± 0,32 °C. Este valor *Z* es similar (*Z* = 3,6 °C) al obtenido recientemente por Guan *et al.* [3], pero en el que entre otros modelos para describir la cinética de muerte por calor de *Anisakis* asumían el de Weibull observando hombros en las gráficas de supervivencia, posiblemente debido a que la velocidad de calentamiento de los *Anisakis* en esos estudios que indicaban como isotermos era lenta requiriendo un cierto tiempo para alcanzar la temperatura objeto de estudio repercutiendo en la cinética de inactivación. Por otro lado, este valor *Z* es inferior (*Z* = 4,5 °C) al que se desprende de los estudios de Bier [4] en los que trabajaban a punto final, es decir, el tiempo para conseguir inactivar el número de *Anisakis* que habían contemplado en el estudio.

Tª (°C)	D_T (min)	R^2
40	968,8 ± 230,3	0,112
43	112,2 ± 22,1	0,793
45	32,5 ± 2,9	0,928
47,5	9,65 ± 1,01	0,943
50	0,946 ± 0,093	0,911
52,5	0,487 ± 0,012	0,935

Tabla 1. Valores D_T obtenidos para *Anisakis* spp. a diferentes temperaturas.

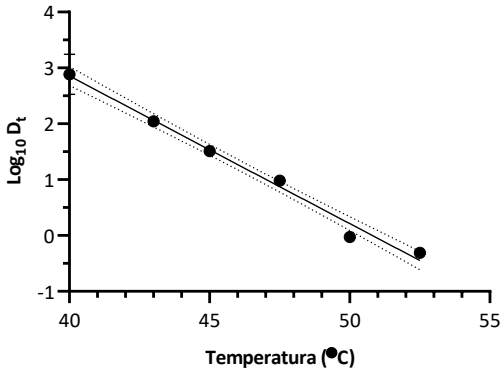


Figura 2. Gráfica de termodestrucción de Anisakis obtenida en soluciones salinas al 0,85% de NaCl.

Considerando los valores D_T y Z obtenidos en este trabajo y sustituyéndolos en la Ecuación 1, se pudo obtener la ecuación siguiente que permite determinar la supervivencia de *Anisakis* spp tras un tratamiento térmico a una determinada temperatura y tiempo de tratamiento considerando una temperatura de referencia de 50 °C y un $D_{50°C}$ = 0,946 min:

$$\boldsymbol{Log_{10}S(t) = -\left(\frac{t}{0,946 \cdot 10^{\left(\frac{50-T}{3,79}\right)}}\right)}$$

Conclusiones

El presente trabajo ha permitido definir la termorresistencia de *Anisakis* a diferentes temperaturas, en condiciones isotérmicas, en base a una cinética de inactivación exponencial, determinada por un $D_{50°C}$ = 0,95 min (se ha tomado como temperatura de referencia 50 °C) y un Z = 3,79 °C, siendo básicos estos datos para evaluar su supervivencia en cocinados a baja temperatura como el tipo *sous-vide*.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha contado con el apoyo del Dpto. Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento y del Fondo Social Europeo-Gobierno de Aragón (ParaFree LMP170_21, A03_23R). Abad, V. agradece el apoyo financiero del Gobierno de Aragón y Ruiz, A. al MEFPD.

Los autores agradecen a la Cátedra SAMCA de Desarrollo Tecnológico de Aragón y a la Cátedra AgroBank-UdL "Calidad e Innovación en el Sector Agroalimentario" la concesión de una Ayuda económica para la realización de este Trabajo.

REFERENCIAS

[1] EFSA. Panel on Biological Hazards. "Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products". *EFSA Journal,* **2010**, 8(4). DOI: 10.2903/J.EFSA.2010.1543

[2] W. D. Bigelow, J. R. Esty. "The Thermal Death Point in Relation to Time of Typical Thermophilic Organisms". J. Infec. Dis. **1920**, 27 (6), 602-617. DOI: 10.1093/infdis/27.6.602

[3] A. Guan, M. Usieto, I. Sánchez-Alonso, S. C. Arcos, M. Careche, L. Otero. "Modeling survival curves of *Anisakis* L3 after isothermal heat treatments at lethal temperatures". Food Control, **2023**, 154, 109975. DOI: 10.1016/j.foodcont.2023.109975

[4] J. W. Bier. "Experimental Anisakiasis: Cultivation and Temperature Tolerance Determinations". J. Food Prot., **1976**, 39(2), 132-137. DOI: 10.4315/0022-2747-39.2.132

ESTIMACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE LARVAS L3 DE *ANISAKIS* A COCINADOS *SOUS-VIDE*

Adrián Ruiz[1], Vanesa Abad[1], María Gutierrez[1], Guillermo Cebrián[1], Ignacio Álvarez[1]

[1] Universidad de Zaragoza/Facultad Veterinaria/Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Unidad Tecnología de los Alimentos/Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2). C/ Miguel Servet 177. 50013. Zaragoza

nacho.alvarez@unizar.es

Resumen / Abstract

En este trabajo se estudia la supervivencia de Anisakis a distintos tratamientos sous-vide por debajo de los 60°C, temperatura recomendada por las autoridades sanitarias para destruir al posible Anisakis presente en la merluza. Para ello, se ha desarrollado una ecuación matemática basada en el modelo de Ball y Olson para describir el calentamiento de piezas de merluza de un tamaño determinado que, combinado con los datos de termorresistencia de Anisakis disponibles, permite estimar la posible supervivencia del parásito tras distintas recetas de cocinado de la merluza. Los resultados muestran que sería necesario congelar en muchos casos la merluza antes de cocinarla con determinadas recetas sous-vide, lo que podría afectar a la calidad del plato preparado.

Palabras clave / Key words: *Anisakis, supervivencia, cocinado sous-vide, riesgo sanitario*

Introducción

Con el fin de ofrecer un producto de máxima calidad organoléptica, el cocinado *sous-vide* es una técnica culinaria cada vez más extendida. En el caso del pescado, se están aplicando recetas (por ejemplo 44 °C/35', 50 °C/7') a temperaturas muy inferiores a las recomendadas por la legislación para evitar la transmisión de *Anisakis* por el consumo de alimentos (> 60 ºC/1'). Esto podría incrementar el riesgo de anisakiasis al consumir estos productos en caso de no congelar previamente dichos pescados, proceso que afectaría negativamente a la calidad del producto. Disponer de datos de termorresistencia de *Anisakis*, así como de la velocidad de penetración del calor en las piezas de pescado cocinadas permitirían determinar la probabilidad de supervivencia de este parásito cuando el pescado se somete a estos tratamientos culinarios.

Es por ello que el objetivo de este trabajo ha sido determinar la probabilidad de supervivencia de larvas L3 de *Anisakis* presentes de piezas de merluza parasitadas tras distintos tiempos de cocinado *sous-vide*.

Metodología

Se obtuvieron curvas de penetración de calor en trozos de merluza (4 x 4 x 2 cm) envasadas a vacío e inmersas en agua a temperaturas de 40-60 °C que se describieron con la ecuación de Ball y Olson [1]. En base a los datos obtenidos para los parámetros de dicha ecuación (f_h y j) y a la termorresistencia definida por nuestro grupo de investigación para *Anisakis* ($D_{50°C}$=0,94' y z=3,79 °C), se desarrolló una ecuación matemática siendo la base de un sistema de toma de decisiones (DSS, *Decission Support System*) que permitía determinar la probabilidad de

supervivencia de las larvas L3 de *Anisakis* tras distintos tiempos y temperaturas de cocinado que fueron validadas a 3 temperaturas (43, 46 y 55 °C) utilizando trozos de merluza de 4 x 4 x 2 cm parasitados artificialmente. Tras los tratamientos, la viabilidad de las larvas se determinó mediante el test de movilidad descrito por la EFSA [2].

Resultados

La Figura 1 muestra las curvas de penetración de calor a 40, 50 y 60 °C para piezas de pescado incluyendo todas las réplicas realizadas (entre 4 y 6), así como el ajuste (líneas continuas) obtenido con el modelo de Ball y Olson, que permitió obtener los parámetros cinéticos de este modelo.

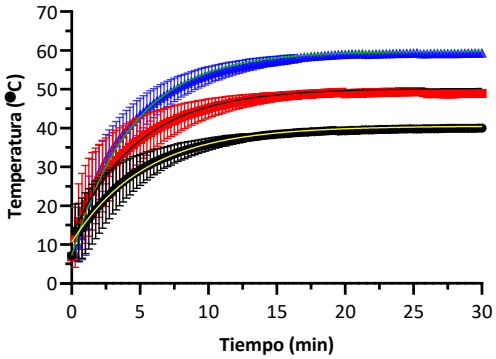


Figura 1. Curvas de penetración de calor en piezas de merluza a (●) 40, (●) 50 y (●) 60 °C.

Si bien f_h varió ligeramente con la temperatura, al igual que en el trabajo de Condón-Abanto [3], al utilizar piezas similares en tamaño y peso, y con el fin de simplificar las ecuaciones finales, se consideraron constantes tanto f_h como j: f_h= 11,62 ± 1,99 y j= 0,966 ± 0,126. Con estos parámetros, se obtuvo la Ecuación 1 con la que predecir la temperatura del interior de las piezas de merluza en cada instante del cocinado *sous-vide*:

$$T_{pescad} == T_{régimen} - \frac{(T_{régimen} - T_{inicial})}{10^{\left(\left(\frac{1}{11,62}\cdot t\right)-\log_{10} 0,966\right)}}$$

La combinación de esta ecuación y la desarrollada (Ecuación 2) en base a los datos de termorresistencia de *Anisakis* obtenidos por el grupo de investigación y que se muestran en la comunicación "Resistencia al calor de larvas L3 de *Anisakis*" permitió determinar su probabilidad de supervivencia a cualquier temperatura y tiempo de cocinado desde 40 a 60 °C.

$$\boldsymbol{Log_{10}S(t)} = -\left(\frac{t}{0,946\cdot 10^{\left(\frac{50-T}{3,79}\right)}}\right) \quad \text{(Ecuación2)}$$

A modo de ejemplo de un tratamiento de cocinado *sous-vide* a baja temperatura se muestra la Figura 2 en la que se ha simulado la inactivación de *Anisakis* que se conseguiría con un cocinado a 44 °C de una pieza de merluza de 4 x 4 x 2 cm. Como se observa, con 35 minutos de cocinado, se conseguiría reducir entre 0,5 y 0,8 Log_{10} la población de *Anisakis* presente, lo que supone una supervivencia del 32 al 16%. La Tabla 1 muestra los ciclos logarítmicos de inactivación y la probabilidad de supervivencia a distintas recetas para el cocinado *sous-vide* encontradas en distintas páginas webs sobre cocinado *sous-vide*.

Conclusiones

Se ha desarrollado una ecuación y sistema DSS que permite predecir el calentamiento a baja temperatura simulando un cocinado *sous-vide* que se ha combinado con la termorresistencia de *Anisakis* en condiciones isotérmicas, permitiendo predecir la supervivencia del parásito a distintos tiempos y temperaturas de cocinado.

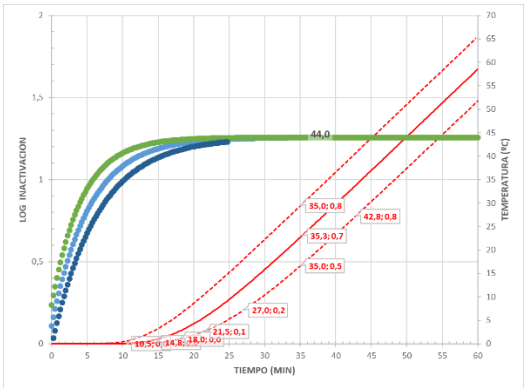


Figura 2. Simulación de un cocinado a 44 °C de piezas de merluza de 4 x 4 x 2 cm estimadas en base a la Ecuación 1 y las correspondientes predicciones de inactivación de *Anisakis* según la Ecuación 1 para cada una de las curvas de calentamiento estimadas con el DSS creado.

Tª Tiempo	Ciclos inactivación	% supervivencia
44°C/35’	0,64 ± 0,20	23
46°C/40’	> 0,99	0
50°C/7’	0	100
50°C/25’	> 0,99	0
60°C/5’	0,06	87
60°C/12’	> 0,99	0

Tabla 1. Recetas para el cocinado *sous-vide* de merluza y la estimación de la inactivación y % de supervivencia de *Anisakis* con el DSS creado.

AGRADECIMIENTOS

Al Gobierno de Aragón (ParaFree LMP170_21, A03_23R y contrato de Abad. V.). Ruiz, A. al MEFPD. A la Cátedra SAMCA de Desarrollo Tecnológico de Aragón y a la Cátedra AgroBank-UdL.

REFERENCIAS

[1] C.O. Ball, F.C. Olson. “Esterilización en la tecnología de los alimentos—Teoría, práctica y cálculos”. **1957**. Nueva York, NY: McGraw-Hill.

[2] EFSA. Panel on Biological Hazards. “Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products”. *EFSA Journal,* **2010**, 8(4).

[3] S. Condón-Abanto, J. Raso, C. Arroyo, J. Lyng, I. Álvarez. "Quality-Based Thermokinetic Optimization of Ready-to-Eat Whole Edible Crab (*Cancer pagurus*) Pasteurisation Treatments". Food Bio Technol, **2019**, 12(3), 436-446.

ANÁLISIS GENÓMICO DE CEPAS BACTERIANAS DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Lozano Escobar E. D.[1,2], Redrejo Rodríguez M.[1,3], Ávila Arribas M.[2], Garde López-Brea S.[2], Rodríguez Mínguez E.[2], Picón Gálvez A. M.[2]

[1] Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid.
[2] Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid
[3] Instituto de Investigaciones Biomédicas Sols-Morreale (IIBM) - (CSIC-UAM), Madrid

apicon@inia.csic.es

Resumen / Abstract

Las bacterias lácticas tienen un gran interés industrial porque se emplean como cultivos iniciadores en la elaboración de alimentos fermentados, contribuyendo a su calidad y seguridad. Algunas cepas presentan potencial probiótico y resultan atractivas en el diseño de alimentos funcionales, ya que pueden aportar beneficios para la salud. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria estableció en 2021 la necesidad de analizar genómicamente aquellos microorganismos que vayan a ser usados intencionadamente en la cadena alimentaria para garantizar su seguridad. Por ello, el objetivo general de este trabajo fue realizar un análisis genómico exhaustivo de nueve cepas de bacterias potencialmente probióticas mediante la utilización de diferentes herramientas bioinformáticas.

Las cepas estudiadas pertenecen a la colección de microorganismos del INIA (CSIC) y son de origen lácteo (Lactococcus lactis INIA C25, INIA C156 e INIA ESI515, Leuconostoc mesenteroides INIA C124, Clostridium beijerinckii INIA 63 y C. tyrobutyricum INIA 68) y de heces de bebés lactantes (Lacticaseibacillus paracasei INIA P495 e INIA P708 y Bifidobacterium breve INIA P366). Los ensamblajes obtenidos mostraron métricas similares o mejores a las de otros microorganismos secuenciados a mayor profundidad de cobertura, y se logró reconstruir un número variable de plásmidos o bacteriófagos. Todas las cepas pertenecen a las especies previamente determinadas por métodos moleculares y presentan genes implicados en la síntesis de vitaminas y en la degradación de aminas biógenas, entre otras propiedades beneficiosas. Además, como resultado de su análisis genético algunas cepas podrían ser introducidas en la cadena alimentaria sin riesgos. Entre ellas L. mesenteroides INIA C124 y las tres cepas de origen humano, carecen de genes de virulencia y de plásmidos con genes de resistencia a antibióticos. C. beijerinckii INIA 63 resultó interesante por el número y variedad de clústeres de biosíntesis de metabolitos secundarios, como ulbactinas y circularina A.

Palabras clave / Key words

Bacterias lácticas, clostridios, análisis genómico, elementos genéticos móviles, CRISPR/Cas, resistoma

Lactic acid bacteria, clostridia, genomic analysis, mobile genetic elements, CRISPR/Cas, resistome

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos con un gran interés industrial, al emplearse como cultivos iniciadores en alimentos fermentados, contribuyendo a su calidad y seguridad. Algunas cepas, con potencial probiótico, se utilizan en alimentos debido a sus efectos beneficiosos para la salud. Además, ciertas cepas de clostridios también poseen un potencial probiótico [1, 2]. La EFSA estableció en 2021 que los microorganismos utilizados intencionadamente en la cadena alimentaria deben ser seguros [3]. El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis genómico exhaustivo de 9 cepas de bacterias potencialmente probióticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas. Todas pertenecen a la colección de microorganismos del INIA (CSIC) y son de origen lácteo (*L. lactis* INIA C25, INIA C156 e INIA ESI515, *L. mesenteroides* INIA C124, *C. beijerinckii* INIA 63 y *C. tyrobutyricum* INIA 68) o humano (*L. paracasei* INIA P495 e INIA P708 y *B. breve* INIA P366).

Secuenciación del genoma y análisis bioinformático. El DNA se obtuvo con el kit GenElute Bacterial Genomic DNA (Merck KGaA, Alemania), y se secuenció mediante tecnología Illumina MiSeq (UCM) o Illumina NextSeq 500 (INIA 68, Quadram Institute), generando bibliotecas pareadas de 150 pb (2 × 150 pb). El flujo de trabajo y los programas bioinformáticos empleados [4-32] se reflejan en la figura 1.

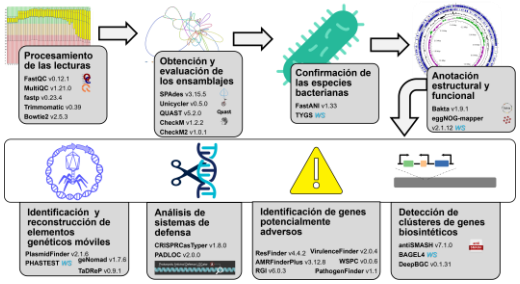


Figura 1: Flujo de trabajo y programas bioinformáticos utilizados en este trabajo.

RESULTADOS

Ensamblajes. Todas las cepas fueron confirmadas como las especies previamente determinadas por métodos moleculares, y los ensamblajes obtenidos presentaron altos porcentajes de integridad y bajos de contaminación. Las cepas de origen lácteo y humano presentaron tamaños genómicos y contenido GC similares a los ya descritos [33-37]. En cambio, el número de contigs o el N50, variaron con la tecnología de secuenciación y la profundidad de cobertura empleadas. En el caso de *B. breve*, se observaron menos contigs y un mayor N50 a los descritos [37]. También destacó la gran diferencia de tamaño genómico de las cepas de clostridios.

Anotación estructural y funcional. Las cepas de las mismas especies presentaron un número similar de elementos anotados al de otras cepas de la literatura [33-40]. La anotación funcional mostró resultados similares en el conjunto de las cepas analizadas, siendo la categoría funcional COG (*Clusters of Orthologous Groups of proteins*) mayoritaria la de los genes relacionados con el metabolismo. Las cepas de clostridios presentaron muchos más mecanismos de transducción de señales y motilidad celular que el resto de cepas.

Detección de elementos genéticos móviles (MGE). Todas las cepas presentaron una gran variedad de MGE, a excepción de *B. breve* INIA P366, en la que no se identificó ninguno. En *L. lactis* INIA C156 se halló un pseudoplásmido con genes relacionados con la lactococina A; en *L. lactis* INIA C25, otro con transportadores de oligopéptidos y de metales pesados; y en *L. paracasei* INIA P495 genes para la utilización de lactosa. En las tres cepas de lactococos se identificaron secuencias de bacteriófagos. En *L. paracasei* INIA P708 se logró reconstruir, a partir de 18 contigs, el fago P2.4 de *Lacticaseibacillus*, con un 60,1% de cobertura, gracias a la clasificación por red neuronal de geNomad.

Sistemas CRISPR/Cas. Ninguna cepa de lactococos o *L. mesenteroides* INIA C124 presentó estos sistemas. *C. tyrobutyricum* INIA 68 presentó al menos uno del subtipo I-B. En cambio, todas las cepas de origen humano presentaron al menos uno completo. Ambas cepas de *L. paracasei* presentaron uno del subtipo II-A. En *B. breve* INIA P366 se encontró un sistema completo y varios clústeres CRISPR cuyos espaciadores alineaban con secuencias de fagos de la clase Caudoviricetes. La identificación de otros sistemas de defensa en esta cepa podría explicar por qué no se identificaron secuencias de plásmidos o bacteriófagos en ella.

Resistoma, virulencia y patogenicidad. Se encontraron genes de resistencia a compuestos antimicrobianos en todas las cepas, aunque no localizados en plásmidos. Las cepas de clostridios presentaron genes de resistencia a varios tipos de antibióticos, algunos próximos a transposasas, lo que podría facilitar su transferencia horizontal. También se encontraron algunos genes relacionados con virulencia (el de la UDP-galactopiranosa mutasa en *L. lactis* INIA C25 o el de la chaperonina GroEL en ambas cepas de clostridios). Las cepas de origen humano no presentaron factores de virulencia. Además, ninguna de las cepas analizadas fue clasificada como patogénica.

Clústeres de genes biosintéticos. La mayoría de ellos estaban relacionados con la síntesis de sacáridos o de RiPP (*Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides*). El clúster de la nisina se encontró en *L. lactis* INIA C25 e INIA ESI515. *C. beijerinckii* INIA 63 presentó la mayor diversidad y número de estos elementos, entre ellos clústeres relacionados con la síntesis de circularina A, una bacteriocina activa contra Gram-positivas [41], y de ulbactinas, que inhiben la migración de células tumorales [42].

Otros genes beneficiosos. El gen *sufI*, que codifica una oxidasa multicobre o lacasa capaz de degradar aminas biógenas [43], se detectó en *L. mesenteroides* INIA C124, *L. paracasei* INIA P495 y *L. paracasei* INIA P708. También se detectaron descarboxilasas de ácidos fenólicos, que participan en la formación de compuestos volátiles [44], en las cepas de lactococos; y coliglicina hidrolasas, que hidroliza sales biliares e interviene en la reducción del colesterol [35, 45], en todas las cepas de origen humano y en *C. beijerinckii* INIA 63.

CONCLUSIONES

Los ensamblajes mostraron métricas similares o mejores que las de otros estudios de las mismas especies secuenciadas a mayor profundidad debido a la optimización realizada con Unicycler. De las cepas de origen lácteo, *L. mesenteroides* INIA C124 resultó la más segura al carecer de genes de virulencia. Las resistencias

halladas en las cepas de clostridios dificultan su uso como posibles probióticos. *C. beijerinckii* INIA 63 resultó interesante por presentar una gran variedad de clústeres biosintéticos de metabolitos secundarios, aunque las resistencias que presenta dificultan su uso como posible probiótico. Todas las cepas de origen humano son potenciales probióticos, ya que carecen de genes de virulencia y presentan genes con propiedades beneficiosas.

AGRADECIMIENTOS

Proyectos RTI2018-099271-R-I00 y RTA 2015-00018-C03-01.

REFERENCIAS

[1] Miyaoka et al., CLNEDB, **2018**, *41*, 151-155.

[2] Tang, Animals, **2024**, *14*, 1069.

[3] EFSA, https://n9.cl/efsa_2021. 10/06/2024

[4] Andrews, Brabraham Bioinformatics, **2010**

[5] Ewels et al., BOINFP, **2016**, *32*, 3047-3048.

[6] Chen et al., BOINFP, **2018**, *34*, 884-890.

[7] Bolger et al, BOINFP, **2014**, *30*, 2114-2120.

[8] Langmead & Salzberg, NMAEA3, **2012**, *9*, 357-359.

[9] Prjibelski et al., CPBUCQ, **2020**, *70*, e102.

[10] Wick et al., PCBLBG, **2017**, *13*, e1005595.

[11] Gurevich et al., BOINFP, **2013**, *29*, 1072-1075.

[12] Parks et al., GEREFS, **2015**, *25*, 1043-1055.

[13] Chklovski et al., NMAEA3, **2023**, *20*, 1203-1212.

[14] Jain et al., NCAOBW, **2018**, *9*, 5114 .

[15] Meier-Kolthoff & Göker, NCAOBW, **2019**, *10*, 2182.

[16] Schwengers et al., MGIEBP, **2021**, *7*, 000685.

[17] Cantalapiedra et al., MBEVEO, **2021**, *38*, 5825-5829.

[18] Carattoli et al., AMACCQ, **2014**, *58*, 3895-3903.

[19] Wishart et al., NARHAD, **2023**, *51*, 443-450.

[20] Camargo et al., NABIF9, **2023,** https://doi.org/10.1038/s41587-023-01953-y**.**

[21] Schwengers & Guthmann, https://n9.cl/tadrep, 2023

[22] Russel et al., CJROAA, **2020**, *3*, 462-469.

[23] Payne et al., NARHAD, **2021**, *49*, 10868-10878.

[24] Bortolaia et al., JACHDX, **2020**, *75*, 3491-3500.

[25] Feldgarden et al., SRCEC3, **2021**, *11*, 12728.

[26] Alcock et al., NARHAD, **2022**, *51*, 690-699.

[27] Kleinheinz et al., BACTBD, **2014**, *4*, https://doi.org/10.4161/bact.27943.

[28] Naor-Hoffmann et al., BBMIC4, **2022**, *23*, 253.

[29] Cosentino et al., POLNCL, **2013**, *8*, e77302.

[30] Blin et al., NARHAD, **2023**, *51*, 46-50.

[31] Van Heel et al., NARHAD, **2018**, *46*, 278-281.

[32] Hannigan et al., NARHAD, **2019**, *47*, 110.

[33] Wels et al., Front. Microbiol. **2019**, *10, 4.*

[34] Kumar et al., Food Microbiol., **2022**, *106*, 104039.

[35] Rodrigo-Torres et al., Gene, **2022**, *840*, 146743.

[36] Tarrah et al., AMICCW, **2020**, *202*, 1997-2003.

[37] Rodrigo-Torres et al., Microbiol. Resour. Announc. **2021**, *10*, e00871-20.

[38] Mileriene et al., MICRKN, **2023**, *11*, 1034.

[39] Podrzaj et al., Front. MIicrobiol., **2022**, *13*, 889551.

[40] Zou et al., GGGGBN, 2021, *11*, jkab317.

[41] Kemperman et al., AEMIDF, **2003**, *69*, 5839-5848.

[42] Komaki et al., GREEDI, **2016**, *5*, 140-143.

[43] Callejón et al., AMBIDG, **2015**, *100*, 3113-3124.

[44] Muñoz et al., En "Fermented Foods in Health and Disease Prevention", **2017**, 63-83.

https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802309-9.00004-2,

[45] Dong et al., EFRTFO, **2012**, *235*, 419-427.

LA ESPORULACIÓN EN CONDICIONES DE ALTA SALINIDAD ACELERA EL ENTRECRUZAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DEL "COAT" EN *BACILLUS SUBTILIS* INCREMENTANDO LA RESISTENCIA FRENTE AL H_2O_2 Y AL CALOR HÚMEDO.

Freire V[1]., Condón S[1]., Gayán E[1].

1 Universidad de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2) /Facultad de Veterinaria/Depto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. C/Miguel Servet 177,

vfreire@unizar.es

Resumen / Abstract

La inactivación de esporos bacterianos requiere de tratamientos térmicos de esterilización para garantizar la inocuidad y estabilidad alimentaria. Sin embargo, la intensidad de estos tratamientos afecta negativamente a las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos, y, además, conllevan un alto gasto energético, por ello, se busca su optimización. Esta optimización generalmente se basa en datos de la termorresistencia de especies y cepas modelo, obtenidos bajo condiciones óptimas de esporulación. Sin embargo, en la naturaleza, las condiciones ambientales sufren constantes fluctuaciones y se sabe que estas, afectan a las propiedades de resistencia de los esporos. Desafortunadamente, aunque la influencia de condiciones como la temperatura de esporulación han sido estudiadas en profundidad, la influencia de otras, como la actividad de agua (a_w) permanecen sin caracterizar adecuadamente. Esta última resulta particularmente interesante debido a la desecación de los suelos, consecuencia del calentamiento global, que previsiblemente aumentará la relevancia de esporos originados a baja a_w en la industria alimentaria.

Por ello, se estudió la resistencia de esporos de Bacillus subtilis 168 obtenidos en condiciones óptimas de esporulación y de baja actividad de agua (a_w = 0.98) usando cloruro sódico y glicerol como solutos. Se observó una mayor resistencia al calor húmedo y al peróxido de hidrógeno en aquellos esporos obtenidos en condiciones de alta salinidad, mientras que eran más sensibles al ácido peracético, sugiriendo alteraciones en el "coat". La caracterización de la termorresistencia de esporos morfo-genéticamente deficientes en diferentes capas del coat, confirmó, el papel del crust y "outer coat" en este aumento de termorresistencia provocado por la esporulación a alta salinidad. En este mismo sentido, una menor extracción proteica en la solubilización de proteínas del coat, indicó un mayor entrecruzamiento de proteínas del coat en esporos obtenidos a alta salinidad. Estos hallazgos proporcionan datos relevantes para el diseño eficiente de tratamientos térmicos en la industria alimentaria y destacan la importancia del coat en la contribución a la resistencia al calor húmedo y agentes químicos en condiciones de esporulación de alta salinidad, contribuyendo a generar otras estrategias alternativas inactivantes frente a estos esporos.

Palabras clave / Key words: *Bacterial spores, B. Subtilis, Wet heat resistance, Sporulation water activity, coat, "cross-linking".*

Los esporos bacterianos, posen una extraordinaria resistencia frente a agentes físicos y químicos debido a su particular estructura y ametabolismo. Esto les permite sobrevivir durante décadas e incluso siglos en el entorno, diseminándose con facilidad, e inevitablemente ingresando en la cadena alimentaria. Donde bajo condiciones adecuadas, revierten a un estado de célula vegetativa provocando alteraciones y toxiinfecciones alimentarias [1,2].

Hasta la fecha, la única tecnología de aplicación industrial capaz de garantizar estabilidad la estabilidad e inocuidad alimentaria frente a estos esporos, es el calor húmedo. La inactivación de esporos bacterianos por calor húmedo podría deberse a la inactivación de algunas proteínas críticas en la membrana interna, posiblemente relacionadas con la fosforilación oxidativa. Entre las estructuras y propiedades que contribuyen a la resistencia frente a este agente se encuentran principalmente el alto grado de deshidratación y mineralización del núcleo que contiene el material genético, la saturación del mismo por proteínas que lo estabilizan, y un alto contenido en DPA, que junto al córtex y coat, ayudan a mantener este grado de deshidratación y a estabilizar la membrana interna, estructura crítica para la germinación y posteriormente, para el metabolismo de la futura célula vegetativa [3, 4, 5].

En consecuencia, su inactivación requiere de la aplicación de tratamientos térmicos de esterilización, habitualmente, empleando temperaturas superiores a 100ºC, para garantizar la seguridad y estabilidad de los alimentos. Para evitar sobretratamientos, costosos energéticamente y negativos para la calidad de los alimentos, es esencial un diseño racional de estos tratamientos. Por lo general, esto se realiza utilizando datos obtenidos de diferentes cepas modelo, esporuladas en condiciones óptimas.

No obstante, las condiciones de esporulación influyen notablemente en la resistencia. En este sentido, el incremento de la temperatura global, la desertización y salinización de los suelos, hace pensar que los esporos formados a baja actividad de agua (a_w) puedan ser cada vez más relevantes, sin embargo, existen pocos datos sobre su comportamiento.

Por ello, en este trabajo se caracterizó la resistencia frente a diversos agentes de suspensiones de Bacillus subtilis 168 obtenidas tanto en condiciones óptimas ($S_{control}$) como de baja actividad de agua (a_w = 0.98) usando para ello diferentes solutos, cloruro sódico y glicerol (S_{sal} y S_{gly}, respectivamente). El valor $3D_{105ºC}$ de S_{sal} se incrementó hasta los 3,60 minutos, mientras que el de S_{gly} lo hizo hasta los 3,02 minutos, frente a los 1,96 minutos de $S_{control}$. Constatándose así un incremento en la resistencia frente al calor húmedo de las suspensiones obtenidas a baja actividad de agua, especialmente de aquellas obtenidas en condiciones de alta salinidad (Figura 1).

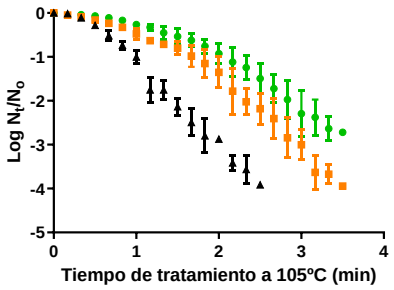


Figura 1: Gráfica de supervivencia a 105ºC en tampón McIvlaine de pH 7.0 de las suspensiones control (▲, negro) y obtenidas a a_w reducida en presencia de glicerol (■, naranja) o cloruro sódico (●, verde). Se muestra la tendencia promedio de tres réplicas biológicas.

Estos resultados nos impulsaron a estudiar la influencia de la alta salinidad en la resistencia frente a agentes de limpieza y desinfección comúnmente empleados en la industria alimentaria, ácido peracético (APA) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Frente a este último, se reveló un incremento en la resistencia de las suspensiones S_{sal} que se inactivaban únicamente en torno a 0,3 ciclos logarítmicos frente a los 2,3 ciclos inactivados para $S_{control}$. Mientras que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el caso del APA.

Un factor común que pudiera explicar tanto el incremento de resistencia húmeda como el incremento de resistencia al H_2O_2 podrían ser alteraciones en el coat. Por lo que, se estudió la termorresistencia de varios mutantes deficientes en la formación de diversas capas del coat (Tabla 1). Revelándose un rol destacado del crust en el incremento de la termorresistencia debida a la esporulación en S_{sal} , puesto que su disrupción a través de la deleción de CotY, eliminaba las diferencias entre condiciones de esporulación que eran observadas en las cepas parentales.

Además, el análisis electroforético del coat reveló una menor extracción en S_{sal} de proteínas de entre 75-25 kDa, lo que podría deberse a un mayor entrecruzamiento de estas. Además, la termorresistencia de esporos madurados prolongadamente, fenómeno conocido por aumentar el entrecruzamiento de las proteínas del coat [6], también aumentó la termorresistencia de $S_{control}$ hasta valores de S_{sal}. Lo que hace pensar en un entrecruzamiento diferencial, quizás más acelerado en las suspensiones obtenidas en condiciones de alta salinidad. Actualmente, se está trabajando en la identificación de dichas proteínas. Estos resultados muestran la relevancia del "coat" y en especial, del "crust" en el incremento de resistencia causado por la esporulación en alta salinidad en esporos de B. subtilis 168. Estos datos podrán ser empleados para el diseño racional de tratamientos térmicos y otras estrategias para la inactivación de esporos bacterianos.

Tabla 1: Lista de cepas empleadas en la investigación

Cepa	Genotipo	Alteraciones
B.subtilis 168	trpC2	Ninguna
B.subtilis 168 Δ*cotY*	trpC2 Δ*cotY*::*erm*	"Crust"
B.subtilis 168 Δ*cotE*	trpC2 Δ*cotE*::*erm*	"Crust" y "outer coat"
B.subtilis 168 Δ*safA*	trpC2 Δ*safA*::*erm*	"Crust","outer coat" e "inner coat"

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo ha sido financiado con una beca predoctoral del Gobierno de Aragón concedida a Víctor Freire y un proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación-AEI (PID2019-104712RA-I00).

REFERENCIAS:

[1] André, S., Vallaeys, T., & Planchon, S. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Res. Microbiol.* **2017**. *168*(4), 379–387.

[2] Wells-Bennik, M. H. J., Eijlander, R. T., den Besten, H. M. W., Berendsen, E. M., Warda, A. K., Krawczyk, A. O., Nierop Groot, M. N., Xiao, Y., Zwietering, M. H., Kuipers, O. P., & Abee, T. Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **2016**. *7*, 457–482.

[3] Coleman, W. H., Chen, D., Li, Y., Cowan, A. E., & Setlow, P. How Moist Heat Kills Spores of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **2007** .*189*(23), 8458–8466.

[4] Korza, G., DePratti, S., Fairchild, D., Wicander, J., Kanaan, J., Shames, H., Nichols, F. C., Cowan, A., Brul, S., & Setlow, P. Expression of the 2Duf protein in wild-type Bacillus subtilis spores stabilizes inner

membrane proteins and increases spore resistance to wet heat and hydrogen peroxide. **2023.** *J. Appl. Microbiol. 134*(3).

[5] Setlow, P., & Christie, G. What's new and notable in bacterial spore killing! *World JMB*, **2021.** *37*(8), 144.

[6] Abhyankar, W., Pandey, R., Ter Beek, A., Brul, S., de Koning, L. J., & de Koster, C. G. Reinforcement of Bacillus subtilis spores by cross-linking of outer coat proteins during maturation. *Food Microbiol.* **2015**. *45*, 54–62.

DISEÑO DE UNA SOLUCIÓN DE LAVADO A BASE DE D-LIMONENO NANOEMULSIONADO PARA TOMATES CHERRY COMO SUSTITUTO DE LOS DESINFECTANTES A BASE DE CLORO

Antonio Luciano[1], Noel A. Espaillat[1], Natanael Espaillat[1], Jorge Baixauli[1], Alberto Garre[1], Alfredo Palop[1], Pablo S. Fernández[1], Silvia Guillén[1,2]

1 Universidad Politécnica de Cartagena, Departamento de Ingeniería Agronómica & Instituto de Biotecnología Vegetal, Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, España.
2 Universidad de Zaragoza-CITA, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón—IA2, 50013 Zaragoza, España.

antonio.luciano@upct.es

Resumen / Abstract

Los vegetales frescos son alimentos muy perecederos y, para garantizar su seguridad, suelen lavarse con compuestos químicos como el cloro, o sus derivados, para reducir la carga microbiana superficial. Sin embargo, se ha demostrado que esta sustancia puede formar compuestos secundarios dañinos para los consumidores. Por ello, se han buscado antimicrobianos alternativos como son los aceites esenciales (AEs). En este estudio se investigó la capacidad antimicrobiana de una nanoemulsión de D-limoneno, frente a dos microorganismos, Staphylococcus aureus *(una bacteria patógena de interés) y* Meyerozima guilliermondii *(una levadura alterante). Como modelo vegetal se utilizaron tomates cherry, que fueron inoculados y lavados con tres soluciones, una nanoemulsión de D-limoneno, una solución comercial de hipoclorito de sodio y con agua. Se evaluaron diferentes tiempos de exposición y concentraciones de D-limoneno. Se observaron mayores reducciones en los recuentos microbianos a mayores concentraciones de D-limoneno. A la mayor concentración de D-limoneno probada, se obtuvieron resultados comparables (para* S. aureus*) o superiores (para* M. guilliermondii*) a los obtenidos con la solución comercial de hipoclorito de sodio. Además, al disminuir el tiempo de lavado, se obtuvo una disminución de la eficacia antimicrobiana en ambas soluciones de lavado. Respecto a* M. guilliermondii*, los resultados obtenidos utilizando la solución de D-limoneno fueron prácticamente idénticos respecto a los obtenidos con la comercial, no observándose diferencias significativas en ninguna condición. Para* S. aureus*, se encontraron diferencias significativas en la concentración bacteriana en función del tiempo de lavado.*

Palabras clave / Key words

Antimicrobianos, lavado, vegetales, cloro, D-limoneno

1. Introducción

La contaminación microbiana es una de las mayores preocupaciones en la industria agrícola. La higienización de frutas y hortalizas es una etapa fundamental en la que se utilizan desinfectantes para disminuir la presencia de microorganismos patógenos o alterantes (1). Para reducir el riesgo de contaminación microbiológica actualmente, el método más común para desinfectar estos productos es el agua con cloro y el desinfectante más utilizado en las industrias es el hipoclorito de sodio (NaClO) (2). El cloro (Cl) es un desinfectante altamente efectivo con fuertes propiedades oxidativas y sus propiedades antibacterianas se deben sobre todo a la concentración de cloro libre. Habitualmente se utiliza una concentración de 50-200 mg/L para productos frescos cortados. Otros factores que influyen en la eficacia son la temperatura que debe ser inferior a 50 °C y el tiempo de contacto, que no debe superar los 30 minutos. Recientemente su uso ha sido regulado por el Real Decreto 773/2023, en el cual se han reducido la concentración máxima de cloro en los alimentos a 80 ppm (3). Debido a ello se han buscado compuestos antimicrobianos naturales que puedan sustituir a los basados en el cloro.

Uno de estos compuestos alternativos son los aceites esenciales. Estos son un grupo de terpenoides que incluyen varios grupos de hidrocarburos alifáticos, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres acíclicos o lactonas (4).

Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de la solución de lavado con D-limoneno frente a diferentes de microorganismos. Además se evaluó el efecto de la concentración del antimicrobiano.

2. Materiales y métodos

En este trabajo se utilizaron dos microorganismos, *Meyerozyma guilliermondii* CECT 1438 y *Staphylococcus aureus* CECT 86.

Meyerozyma guilliermondii se creció en caldo de patata dextrosa (PDC; Scharlab, Barcelona, España) a 25°C durante 5 días. Y *Staphylococcus aureus* se creció en caldo tripticasa-soja (TSB; Scharlab) durante 24 horas a 37 °C.

Antes de inocular los tomates cherry, estos fueron aclarados con agua del grifo y posteriormente sumergidos 30 minutos en el cultivo de *M. guilliermondii* y *S. aureus*.

La nanoemulsión se preparó utilizando un procesador ultrasónico (Hielscher UP400St Teltow-Berlín, Alemania) a 12000 Wts de potencia y al 100 % de la amplitud de la onda durante 30 minutos. La fase oleosa se preparó mezclando 6 mL de Tween80 y 8 mL de limoneno; la fase acuosa se realizó mezclando 13,75 mL de propilenglicol y 22,25 mL de agua destilada. Ambas fases se combinaron y homogeneizaron con el procesador ultrasónico. La concentración final de limoneno en la nanoemulsión fue de 1 M. La nanoemulsión obtenida se almacenó a 4 °C para su posterior uso.

Para los lavados se utilizaron tres tomates cherry contaminados artificialmente. Se lavaron por inmersión en 300 mL de tres diferentes soluciones de lavado durante 15 min sin agitación: una solución de agua destilada estéril como control, una solución de hipoclorito de sodio comercial (13 g de cloro activo por litro) para lavado de verduras y frutas, y una solución de nanoemulsión de D-limoneno. Se

prepararon diferentes soluciones a diferentes concentraciones de D-limoneno para las dos cepas. Para *M. guilliermondii* se utilizaron concentraciones de 1, 3, 5, 25 and 50 mM mientras que para *S. aureus* se utilizaron concentraciones de 25, 50, 100 and 200 mM. El desinfectante comercial contenía hipoclorito de sodio y se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante (3,6 mL de solución en 296,4 mL de agua, lo que resulta en una concentración final de 156 ppm de cloro activo), con una dosis de 12 mL/L.

3. Resultados

La tabla 1 muestra los recuentos de *S. aureus*, expresados en logaritmos, en los tomates cherry a lo largo del tiempo de lavado con dos soluciones desinfectantes, NaClO y nanoemulsión de limoneno 50 mM. Se puede observar que el primer minuto de tratamiento fue el más eficaz para descontaminar los tomates cherry, alcanzándose reducciones logarítmicas superiores a un ciclo logarítmico con ambas soluciones de lavado. A partir del primer minuto no se encontraron diferencias significativas entre los recuentos obtenidos tas el lavado con la solución de limoneno y, en el caso del hipoclorito, aunque si se observaron diferencias significativas entre los recuentos a tiempo 1 y 10 minutos, esas diferencias desaparecieron a los 15 minutos.

Tabla 1. Recuento de *Staphylococcus aureus* (media ± desviación estándar log (UFC/g)), en tomates cherry tras diferentes tiempos de lavado con una solución comercial de hipoclorito de sodio y con una nanoemulsion de D-limoneno 50 mM.

Tiempo (min)	D-limoneno	Hipoclorito de sodio
0	6,59 ± 0,13^{B}	6,59 ± 0,13^{C}
1	5,23 ± 0,15^{AB}	5,42 ± 0,18^{BC}
5	4,58 ± 0,38^{A}	4,66 ± 0,53^{AB}
10	4,39 ± 0,44^{A}	3,36 ± 0,26^{A}
15	4,67 ± 0,40^{A}	4,22 ± 0,08^{AB}

A-C letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

La tabla 2 muestra los valores medios de los recuentos de la levadura *M. guilliermondii* en tomates Cherry, tras diferentes tiempos de lavado con la nanoemulsión de limoneno en concentración de 50 mM y con la de hipoclorito de sodio. Se observó que, el hipoclorito de sodio actuó de forma rápida ya que, tras solo 30 segundos de contacto con los tomates, la carga microbiana se redujo de manera significativa, 0,72 ciclos logarítmicos. Al prolongar el tiempo de lavado aumentó el efecto antimicrobiano, observándose una reducción progresiva de la carga microbiana de los tomates. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de lavado con el hipoclorito (30 segundos, 3, 5 y 10 minutos), pero si se encontraron diferencias entre 30 segundos y 15 minutos, siendo más efectivo cuando hay un contacto de los tomates durante 15 minutos con el hipoclorito de sodio.

Tabla 2. Recuento de *M. guilliermondii* (media ± desviación estándar log (UFC/g)), en tomates cherry tras diferentes tiempos de lavado con una solución comercial de hipoclorito de sodio y con una nanoemulsion de D-limoneno 50 mM.

Tiempo (min)	D-limoneno	Hipoclorito de sodio
0	6,12±0,03^{e}	6,12±0,03^{e}
0,5	5,55±0,12^{cd}	5,40±0,11^{cd}
3	5,3±0,49^{bcd}	5,24±0,29^{abcd}
5	5,14±0,22^{abcd}	5,1±0,25^{abcd}
10	4,86±0,49^{abc}	4,91±0,46^{abc}
15	4,64 ± 0,46^{a}	4,74±0,56^{a}

a-d letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Además de los tiempos de lavado se probaron diferentes concentraciones de D-limoneno. La figura 1 muestra los recuentos de *M. guilliermondii* y la figura 2 los de *S.*

aureus tras la exposición a diferentes concentraciones de D-limoneno.

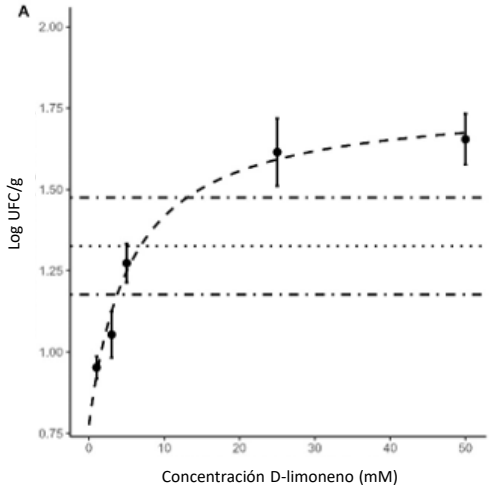


Figura 1. Recuentos de *M. guilliermondii* tras la exposición a diferentes concentraciones de D-limoneno. Las líneas horizontales representan la reducción media (--) y su desviación estándar (---) obtenidas utilizando una solución de lavado comercial clorada. La línea discontinua (- -) muestra el ajuste de la ecuación empírica a los datos experimentales.

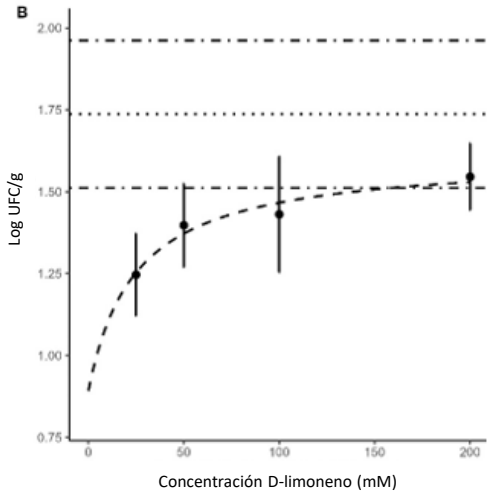


Figura 2. Recuentos de *S. aureus* tras la exposición a diferentes soluciones de lavado. Las líneas horizontales representan la reducción media (--) y su desviación estándar (---) obtenidas utilizando una solución de lavado comercial clorada. La línea discontinua (- -) muestra el ajuste de la ecuación empírica a los datos experimentales.

En ambos casos, la mayor concentración de D-limoneno probada dio lugar a resultados comparables (para *S. aureus*) o superiores (para *M. guilliermondii*) a los obtenidos con la solución comercial de hipoclorito de sodio, lo que demuestra lo prometedor de esta solución de lavado alternativa. También observamos que a mayor concentración mayor reducción, de forma similar a nuestro estudio anterior en el que se utilizó una solución de lavado basada en aceite esencial de orégano o romero nanoemulsionado (6).

Otro resultado importante que se obtuvo fue la diferencia en el efecto contra *M. guilliermondii* y *S. aureus*. Mientras que la solución de lavado comercial es más eficaz contra *S. aureus* que contra *M. guilliermondii*, la solución basada en el aceite de lavado nanoemulsionado es más eficaz contra el patógeno bacteriano que contra la levadura alterante.

4. Conclusiones

El tiempo de contacto de la solución de lavado provocó una reducción importante de la carga microbiana de *M. guilliermondii* y *S. aureus* inoculados artificialmente en tomates cherry. La prolongación del tiempo de contacto condujo a reducciones mucho mayores de la carga, observándose un comportamiento asintótico entre la reducción de la carga y el tiempo de contacto. Este comportamiento fue similar al observado con una solución de lavado a base de hipoclorito sódico. La concentración de D-limoneno en la solución de lavado tuvo un efecto notable en la reducción de la carga microbiana tanto en *M. guilliermondii* como en *S. Aureus*. Estos resultados demuestran que la adición de una nanoemulsión de D-limoneno al agua de lavado podría ser una alternativa eficaz al uso de compuestos clorados en el lavado de productos hortofrutícolas.

Agradecimientos

Agradecemos al Ministerio de Ciencia e Innovación y a la Agencia Estatal de Investigación (Proyectos PID2020-116318RB-C32) el apoyo prestado a esta investigación.

Este trabajo es resultado del programa AGROALNEXT y ha sido apoyado por MCIN con financiación de la Unión Europea NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) y por la Fundación Séneca con financiación de la Comunidad Autónoma Región de Murcia (CARM).

REFERENCIAS

[1] G. Wirtanen, S. Salo, Environ Sci Technol, 2003; 2: 293-306.

[2] S. Y. Lee, S. Y. Baek, Food Microbiol, 2008, 25: 582-587.

[3] Real Decreto 773/2023, de 3 de octubre, por el que se regulan los coadyuvantes tecnológicos utilizados en los procesos de elaboración y obtención de alimentos.

[4] A. Prakash, R. Baskaran, N. Paramasivam, V. Vadivel, Food Res Int, 2018, 111: 509-523.

[5] I. M. Bodea, G. M. Cătunescu, A. Palop, P. S. Fernández, A. Garre, Food Sci Technol Res, 2023, 190: 115549.

TODO TIENE UN PRECIO – "SPANC BALANCE" EN LA APTITUD PARA EL CRECIMIENTO EN ALIMENTOS DE UNA VARIANTE DE *ESCHERICHIA COLI* ADAPTADA AL TIMOL

Jorge Baixauli[1], Alberto Garre[1], Antonio Luciano[1] , Daniel Berdejo[2], Alfredo Palop[1].

[1] Dpto (dirección completa): a Departamento de Ingeniería Agronómica, ETSIA-Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Spain
[2] Departamento de Produccion Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, Zaragoza, Spain

Jorge.baixauli@edu.upct.es

Resumen / Abstract

En los últimos años ha incrementado la preocupación por la aparición de nuevas cepas resistentes a antimicrobianos. Esto, sumado a la demanda de productos alimentarios naturales, sin compuestos químicos potencialmente perjudiciales para la salud, lleva a la búsqueda de compuestos naturales como los aceites esenciales para evitar y eliminar el crecimiento de microorganismos en los alimentos. No obstante, actualmente hay una gran preocupación por la resistencia y resistencias cruzadas que pueden generar los microorganismos frente a otros agentes antimicrobianos como los antibióticos.

En esta investigación, se realizaron experimentos de evolución dirigida exponiendo *Escherichia coli* O157:H7 a 20 ciclos sucesivos de una concentración subinhibitoria (1,25 mM) de timol. Así mismo, se estudia si existe un balance SPANC (self-preservation and nutritional competence; autoconservación y competencia nutricional) en esta cepa, observando su capacidad de crecimiento a diferentes valores de pH y temperaturas, con o sin la aplicación de un tratamiento térmico subletal previo. También se analizó la dinámica de crecimiento en "smoothies" de verduras con diferentes valores de pH. De esta manera pudimos simular cómo la cepa adaptada al antimicrobiano se desarrolla en el alimento en comparación con la cepa silvestre.

Palabras clave / Key words

Escherichia coli, resistencia, antimicrobianos.

La creciente demanda de productos naturales ha impulsado el interés por los compuestos antimicrobianos naturales, como los aceites esenciales, para prevenir el crecimiento de microorganismos en los alimentos. Sin embargo, algunos estudios han sugerido que la exposición prolongada a los antimicrobianos naturales puede inducir la adaptación bacteriana, e incluso la resistencia cruzada a otros compuestos, como los antibióticos (Rout et al., 2022). Por otro lado, estas adaptaciones suelen producirse a expensas de otros fenotipos (como la resistencia térmica o el

crecimiento en condiciones óptimas) a través del "SPANC balance" (Alvarez-Ordóñez et al., 2015).

En una investigación anterior se comprobó la adaptación de *Escherichia coli* O157:H7 al timol mediante la realización de experimentos de evolución dirigida exponiendo este microorganismo a 20 ciclos sucesivos de concentraciones subinhibitorias (1,25 mM) de timol. También se comprobó si la concentración subinhibitoria sucesiva de timol indujo una mayor resistencia en la bacteria al timol, así como resistencias cruzadas a un gran número de antibióticos, como ampicilina, cefalexina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, norflozacina y trimetroprim.

La cepa adaptada al timol se utilizó para comprobar la diferencia entre dicha cepa y la cepa silvestre de *E. coli*, evaluando su capacidad de crecimiento a diferentes valores de pH (7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0 y 4,5) y temperaturas (25°C, 30°C, 35°C y 40°C), en caldo LB.

Posteriormente se realizó una comprobación de la dinámica de crecimiento en "smoothies" de verduras con diferentes valores de pH. De esta manera pudimos simular cómo la cepa adaptada al antimicrobiano se desarrolla en el alimento en comparación con la cepa silvestre. Dichos "smoothies" fueron elaborados con tomate, pepino, pimiento y zanahoria en distintas proporciones para obtener valores de pH entre 4,5 y 6.

A continuación, se muestran los resultados del ratio de crecimiento a 25ºC tanto en el caldo LB a los diferentes pH investigados, como en los "smoothies" de verduras.

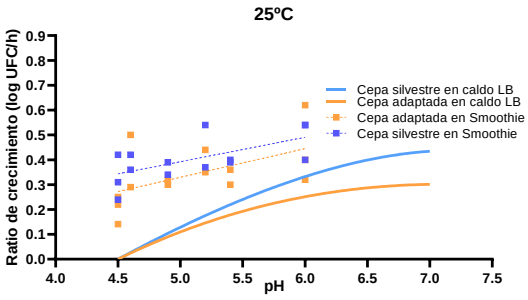


Figura 1. En línea continua se muestra la tasa de crecimiento a 25ºC en caldo LB ajustada al modelo de Aryani a diferentes pH. Con puntos se muestran los valores de tasa de crecimiento en los "smoothies" a diferentes pH.

Podemos observar que, en el caso del crecimiento en el caldo LB, se muestra un ratio de crecimiento mayor en todo los pH estudiados. Se muestra también, que en el caso del crecimiento en los "smoothies", la cepa silvestre también tiene una mayor ratio de crecimiento en la mayoría de los valores de pH estudiados. No obstante, en los "smoothies" se presenta una mayor variabilidad en el crecimiento. En el caso del pH 4.5, a diferencia del crecimiento en el caldo LB, podemos observar que sí se muestra crecimiento. Esto último es debido a que en los "smoothies" el microorganismo tiene mayor disponibilidad de nutrientes que en el caldo LB.

Con los resultados obtenidos en los "smoothies" observamos que el crecimiento es notablemente mayor que en el caso del crecimiento en el caldo, pero, además, también la variabilidad en el crecimiento es mayor.

Como conclusiones podemos afirmar que:

- La cepa silvestre tiene mayor capacidad de crecimiento que la cepa adaptada a todos los valores de pH y temperatura investigados en el caldo LB

- En los “smoothies” también se observa un mayor ratio de crecimiento en la cepa silvestre, pero con una mayor variabilidad de crecimiento.

- El crecimiento en los “smoothies” es mayor que en el caldo en ambas cepas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Ministerio de Ciencia e Innovación y a la Agencia Estatal de Investigación (Proyectos PID2020-116318RB-C32) el apoyo prestado a esta investigación.

Este trabajo es resultado del programa AGROALNEXT y ha sido apoyado por MCIN con financiación de la Unión Europea NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) y por la Fundación Séneca con financiación de la Comunidad Autónoma Región de Murcia (CARM).

REFERENCIAS

[1] Alvarez-Ordóñez, A., Broussolle, V., Colin, P., Nguyen-The, C., & Prieto, M. (2015). The adaptive response of bacterial food-borne pathogensin the environment, host and food: Implications for food safety. International Journal of Food Microbiology, 213, 99-109. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.004

[2] Rout, S., Tambe, S., Deshmukh, R. K., Mali, S., Cruz, J., Srivastav, P. P., Amin, P. D., Gaikwad, K. K., Andrade, E. H. D. A., & Oliveira, M. S. D. (2022). Recent trends in the application of essential oils: The next generation of food preservation and food packaging. Trends in Food Science & Technology, 129,421-439 https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.10.012

DETECCIÓN DEL AGENTE CAUSANTE DE LA "MANCHA" EN CEREZA (BOTRYTIS SP.) MEDIANTE PCR

Paula Tejero[1], Carlos Moraga[2], Alberto Martín[1], Alejandro Hernández[1], Alicia Rodríguez[1]

1 Nutrición y Bromatología, Instituto Universitario de Recursos Agrarios (INURA), Universidad de Extremadura, Av. De la Investigación s/n 06006. Escuela de Ingeniería Agrarias, Universidad de Extremadura. Avda. Adolfo Suarez s/n, 06007 Badajoz, España
2 Área de postcosecha. Instituto Tecnológico y Agroalimentario de Extremadura (INTAEX-CICYTEX). Junta de Extremadura. Avda. Adolfo Suarez s/n, 06007 Badajoz, España

paulatc@unex.es

Resumen

En los últimos años se está detectando con mayor frecuencia una enfermedad conocida como "mancha" en las cerezas producidas en la región extremeña del Valle del Jerte, la cual comienza con la infección de la cereza por las especies Botrytis cinerea y Botrytis euroamericana. Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de PCR para la detección del agente causante de la "mancha" en cereza (Botrytis sp.).

Para la realización de este trabajo se utilizaron 4 cepas pertenecientes a especies asociadas a la "mancha", B. cinerea CECT2850 y CECT20793, y B. euroamericana M43 y M2BC. Para la realización de las reacciones de PCR se utilizaron 8 parejas de cebadores diseñados a partir de los genes HSP60, RPB2 y G3PDH de B. cinerea y B. euroamericana. Con aquellas parejas con las que se obtuvieron mejores resultados se evaluó un gradiente de temperaturas de hibridación que osciló entre 50 y 56ºC. Finalmente, se estudió la sensibilidad del método mediante la extracción de ADN de cerezas inoculadas con distintas concentraciones de esporas de ambas especies.

Las parejas de cebadores HSP60-F1D/R1D y RPB2-F1D/R1D permitieron la amplificación de manera específica de B. euroamericana. Por otro lado, la pareja de cebadores G3PDH-F2D/R2D, permitió la amplificación específica de B. cinerea, mientras que la pareja de cebadores G3PDH-F3I/R3I amplificó de manera específica las 4 cepas estudiadas. Las condiciones de PCR fueron: 35 ciclos desnaturalización (94ºC), hibridación (56ºC) y extensión (72ºC). La sensibilidad del método se estableció en 10^2 esporas/cereza. Los métodos desarrollados demostraron ser rápidos y específicos para la detección tanto in vitro como in vivo de estas especies en cereza.

Palabras clave:

Cerezas, Botrytis sp., PCR

INTRODUCCIÓN

El cerezo es uno de los árboles frutales de hueso más importantes de Extremadura [1]. La producción de este cultivo en la región extremeña se centra en el Valle del Jerte, donde se ha caracterizado por ser un cultivo tradicional. Se puede considerar que entre los principales factores que afectan a la vida útil de las

cerezas destaca el deterioro asociado a mohos que aparecen tanto en precosecha como en postcosecha. Entre los principales patógenos que pueden causar enfermedades se encuentran *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Alternaria* spp., *Monilia* spp., *Mucor* spp. y *Rhizopus* spp. [2, 3, 4, 5, 6]. En los últimos años se está detectando cada vez con mayor frecuencia una enfermedad conocida como "mancha" en las cerezas producidas en el Valle del Jerte. Esta patología, que comienza con la infección de la cereza por las especies *Botrytis cinerea* y *Botrytis euroamericana* [7], preocupa cada vez más a los productores de cerezas, que carecen de herramientas de utilidad para su detección y control. Debido a esto, el objetivo general de este trabajo fue desarrollar un método basado en PCR para la detección del agente causante de "Mancha" en cereza (*Botrytis* sp.).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron 4 cepas pertenecientes a dos especies de *Botrytis* sp. asociadas a la "mancha", aisladas de cerezas con síntomas de "mancha" que habían sido identificados previamente por el grupo CAMIALI (Calidad y Microbiología de los Alimentos) de la Universidad de Extremadura (*B. euroamericana* M43 y M2BC) así como cepas provenientes de la Colección Española de Cultivos Tipo (*B. cinerea* CECT2850 y CECT20793). Además, para evaluar la especificidad de los métodos de PCR se utilizaron diferentes cepas de las especies de moho patógenos como *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum*, *Monilia fructicola*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* y *Cladosporium cladosporioides* previamente aislados en muestras de cerezas e identificados molecularmente por el grupo CAMIALI.

Para el desarrollo de las reacciones de PCR se diseñaron 8 parejas de cebadores diseñados a partir de secuencias de nucleótidos de los genes de virulencia HSP60, RPB2 y G3PDH de *B. cinerea* y *B. euroamericana* utilizando el programa Primer3Plus. Tras un primer ensayo se descartaron aquellas parejas de cebadores que no mostraron una amplificación adecuada de los productos de PCR.

Con las parejas de cebadores que fueron capaces de distinguir entre las dos especies de *Botrytis* estudiadas, se evaluó un gradiente de temperaturas de hibridación que osciló entre 50 a 56 ºC. La fase de desnaturalización y extensión en todas las reacciones de PCR que se llevaron a cabo en este trabajo fueron de 94 y 72ºC, respectivamente, durante 35 ciclos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La pareja de cebadores HSP60-F1D/R1D diseñada a partir del gen HSP60, al igual que la pareja de cebadores RPB2-F1D/R1D, diseñada a partir del gen RPB2, permitieron la amplificación de manera específica de *B. euroamericana*. Por su parte, la pareja de cebadores G3PDH-F2D/R2D diseñada a partir del gen G3PDH, permitió la amplificación específica de *B. cinerea*. Por otro lado, la pareja de cebadores G3PDH-F3I/R3I, amplificó para ambas especies de *Botrytis*. Esta última pareja de cebadores fue optimizada a una temperatura de hibridación de 56 ºC, demostrándose que las dos especies de *Botrytis* causantes de la "mancha" en la cereza pueden ser detectadas de manera rápida y específica a dicha temperatura. En cuanto a los resultados obtenidos en el

estudio de la especificidad se observó que esta pareja de cebadores solamente amplificó las especies de *Botrytis* sp. relacionadas con la alteración de la cereza, no detectándose otros mohos patógenos de cereza, tal y como se muestra en la Figura 1.

Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) del producto de amplificación de las cepas de referencia *B.euroamericana* M2BC (líneas 1), *B.cinerea* 2850 (línea 2), *M. fructicola* (línea 3), *A. flavus* (línea 4), *P. expansum* (línea 5), *A. alternata* (línea 6), *F. oxysporum* (línea 7) y *C. cladosporioides* (línea 8) obtenido mediante PCR con las parejas de cebadores G3PDH-F3I/G3PDH-R3I (líneas 1, 2, 3, 4, 5, 6, ,7, 8 y 9), Línea M: marcador de peso molecular de 100- 3000 pb; controles negativos (línea 9).

Finalmente, se demostró la utilidad del método PCR diseñado a partir de la pareja de cebadores G3PDH-F3I/R3I, para la detección *in vivo* de *Botrytis*, tras su validación mostrando una alta sensibilidad a niveles de inóculo de 10^2 esporas por cereza.

CONCLUSIÓN

Los métodos desarrollados demostraron ser rápidos y específicos para la detección tanto *in vitro* como *in vivo* de las especies *B.cinerea* y *B.euroamericana*, causantes de la enfermedad de la mancha en cerezas.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido llevado a cabo gracias al apoyo económico del grupo GR21180 y GR21198. PTC agradece la obtención de un contrato predoctoral financiado por la Fundación Valhondo.

REFERENCIAS

[1] Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, https://www.mapa.gob Accessed: 29 de junio de 2024.

[2] Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., & Salerno, M. Effect of short hypobaric treatments on postharvest rots of sweet cherries, strawberries and table grapes. *Postharvest Postharvest Biol Technol*, **2001**, *22(1),* 1-6.

[3] Venturini, M. E., Oria, R., & Blanco, D. Microflora of two varieties of sweet cherries: Burlat and Sweetheart. *Food Microbiol*, **2002** *19(1)*, 15-21.

[4] Chen, F., Liu, X., & Schnabel, G. First report of brown rot caused by *Monilinia fructicola* in sweet cherry in Maryland. *Plant Dis*, **2013**, *97(1)*, 145.

[5] O'Gorman, D. T., Walker, M., Fraser, J., Boulé, J., Úrbez-Torres, J. R., & Toivonen, P. M. Unravelling cherry slip-skin maceration disorder. Can. *J. Plant Pathol*, **2016**, *38*, 533-540.

[6] Aktaruzzaman, M., Afroz, T., Kim, B. S., & Lee, Y. G. Occurrence of postharvest gray mold rot of sweet cherry due to *Botrytis cinerea* in Korea. *J Plant Dis Prot*, **2017**, *124*, 93-96.

[7] Serradilla, M. J., Moraga, C., Ruiz-Moyano, S., Tejero, P., Córdoba, M. D. G., Martín, A., & Hernández, A. Identification of the causal agent of aqueous spot disease of sweet cherries (*Prunus avium L.*) from the Jerte Valley (Cáceres, Spain). Foods, **2021**, *10(10)*, 2281.

LA ADICIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN EN FORMA DE NANOEMULSIÓN REDUCE DE MANERA ESPECTACULAR LA RESISTENCIA TÉRMICA DE DOS CEPAS DE *SALMONELLA*

Zhour Fateh, Antonio Luciano, Alfredo Palop.

Dpto de Ingeniería Agronómica, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena.

zhourfateh26@gmail.com; antonio.luciano@upct.es; alfredo.palop@upct.es

RESUMEN

Los tratamientos térmicos tienen la gran ventaja, frente a otros métodos de conservación de alimentos, de que permiten asegurar la seguridad alimentaria al garantizar la inactivación de los microorganismos patógenos presentes. Sin embargo, el calor también afecta a la calidad organoléptica y nutritiva de los alimentos. Por ello, uno de los grandes retos de la industria alimentaria actual es encontrar tratamientos alternativos a los térmicos o bien tratamientos combinados que, mediante sus efectos sinérgicos, permitan reducir la intensidad de los tratamientos térmicos aplicados. Los aceites esenciales pueden constituir una de estas alternativas debido a sus conocidos efectos antimicrobianos.

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto combinado del calor con una nanoemulsión de aceite esencial de limón sobre la inactivación de dos cepas de Salmonella *S. Enteritidis y S. Senftenberg. La adición de nanoemulsión de aceite esencial de limón al medio de calentamiento redujo alrededor de 100 veces la termorresistencia de ambas cepas de* Salmonella*. Este constituye uno de los efectos más grandes descritos por el momento, y el más grande encontrado para este microorganismo.*

Estos hallazgos revelan el gran potencial de los aceites esenciales nanoemulsionados en combinación con calor, ya que su aplicación permitiría reducir muy notablemente la intensidad de los tratamientos térmicos actuales en el procesado de alimentos. Además, el pequeño volumen de nanoemulsión empleado apenas tiene efecto sobre el aroma y sabor del alimento.

Palabras clave

Nanoemulsión, aceite esencial, Salmonella, *termorresistencia, alimentos, tratamiento térmico, efecto combinado.*

Introducción

El tratamiento térmico es el método más utilizado en la industria agroalimentaria para la reducción de la carga microbiana. Algunos de estos microorganismos son resistentes y si se utilizan altas temperaturas o durante un tiempo prolongado, la calidad sensorial y organoléptica del producto se reduce (Hardly et al, 1999). Por ello, se buscan tratamientos para combinar con el tratamiento térmico y así obtener una reducción adecuada de los microorganismos patógenos presentes además de mantener la mejor calidad sensorial y nutritiva de los productos.

El uso de aceites esenciales junto al tratamiento térmico es una conveniente alternativa, cumple con las preferencias de los consumidores por el uso de conservantes naturales y los aceites esenciales son conocidos por sus efectos antibacterianos y antioxidantes, que han demostrado muchos estudios (Ros et al, 2017; Maté et al, 2016).

La salmonelosis es la segunda zoonosis de transmisión alimentaria más notificada en humanos, solo superada por la campilobacteriosis. En la Unión Europea (UE) y en países no pertenecientes a la UE, la salmonelosis representa la principal causa de brotes alimentarios (AESAN, 2024) con 65,208 casos notificados en 2022 en la UE. La mayoría de los brotes de salmonelosis están asociados con el consumo de huevos y productos derivados, alimentos mixtos, productos de panadería, carne de cerdo y vegetales. Estas infecciones suelen ocurrir por la ingesta de alimentos contaminados e insuficientemente cocinados (EFSA, 2023).

Salmonella se ha utilizado muchas veces como indicadora del rendimiento en tratamientos térmicos en numerosos alimentos (Kang et al, 2018). Siendo el serotipo *S*. Senftenberg el más termorresistente (Ros et al, 2017).

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto combinado del calor con una nanoemulsión de aceite esencial limón sobre la inactivación de dos cepas de *Salmonella*, *S.* Enteritidis y *S.* Senftenberg.

Materiales y métodos

Microorganismo

Se emplearon dos cepas de *Salmonella enterica,* el serotipo Enteritidis CECT 4300 y el serotipo Senftenberg CECT 4565, proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España).

Preparación de nanoemulsiones

La nanoemulsión se preparó a partir de dos fases, una fase oleosa compuesta por 1,2 mL de Tween80 (PanReac AppliChem, Barcelona, España) y 2 mL de aceite esencial de limón (70% D-limoneno, Marnys) y una fase acuosa, que se preparó mezclando 2,75 mL de propilenglicol (Guinama S.L.U, Valbona, Valencia) y 4,05 mL de agua destilada. Ambas fases se combinaron juntas y se homogeneizaron con el equipo de ultrasonidos Hielsher (modelo UP400St, Teltow, Alemania), al 100% de amplitud, 400 W de energía, con un valor límite de 12.000 Ws, por pulsos con 10 segundo de funcionamiento (on time) y 3 segundos de paro (off time). La nanoemulsión obtenida se almacenó a temperatura de refrigeración hasta su uso (Bodea et al, 2023).

Tratamiento térmico

La cinética de inactivación de las dos cepas de *Salmonella* se determinó en el termorresistómetro Mastia.

En el recipiente del termorresistómetro se adicionan 450 mL de TSB y se esterilizan a 130°C durante 5 minutos y luego se reduce la temperatura hasta la de tratamiento, 52°C para *S.* Enteritidis y 58°C para *S.* Senftenberg. Cuando se estabiliza la temperatura inoculamos 0,2 mL de nanoemulsión de aceite esencial de limón (NAEL) y luego inoculamos 0,2 mL del cultivo celular. A intervalos de tiempo establecidos se recogen muestras en tubos Eppendorf previamente esterilizados, se realizan las diluciones seriadas necesarias y se siembra 0,2 mL de cada una de ellas en placa y se le adiciona agar Triptona Soja (TSA, Scharlab) y se homogeniza. Una vez gelificadas las placas se incuban durante 24 h a 37°C.

Se realiza el recuento de supervivientes en placas de entre 30 y 300 colonias. A partir de dichos recuentos se representaron las correspondientes gráficas de supervivencia, enfrentando el logaritmo del número de supervivientes frente al tiempo de tratamiento. A partir de estas gráficas se calcularon los valores D o tiempos de reducción decimal, como el tiempo necesario para inactivar al 90% de la población microbiana.

Resultados y discusión

En la Figura 1 se muestra la representación gráfica del recuento de los supervivientes de *S*. Enteritidis a lo largo de un tratamiento térmico de 52ºC, donde se alcanzó alrededor de 2 reducciones logarítmicas después de 120 minutos de tratamiento en TSB. Además, observamos como añadiendo tan solo 0,2 mL de nanoemulsión de aceite esencial de limón (NAEL) al TSB a la misma temperatura de tratamiento se alcanzan el doble de reducciones en tan solo 1 minuto.

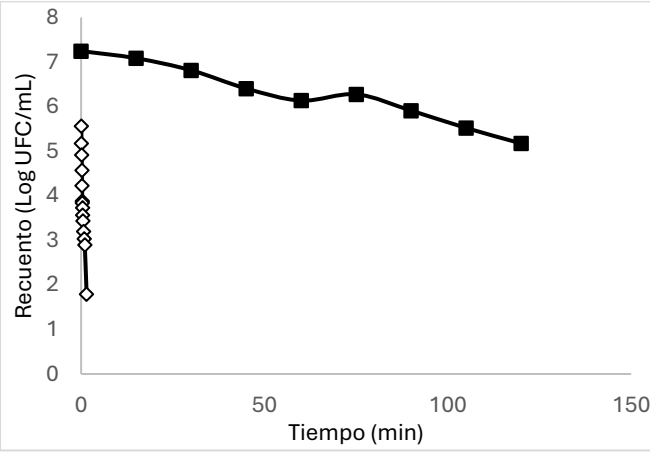


Figura 4: Gráficas de supervivencia de *Salmonella* Enteritidis a 52º C en TSB (■) y en TSB con 0,2 mL de nanoemulsión de aceite esencial de limón (◇).

Resultados similares se obtuvieron con la cepa de *S*. Senftenberg (Figura 2), a una temperatura de 58ºC de tratamiento.

En la Tabla 1 se muestra el valor de D correspondiente a cada una de las cepas estudiadas de Salmonella, donde vemos que para la reducción de un ciclo logarítmico de S. Enteritidis es necesario un tratamiento durante 60,30 min a 52ºC y para S. Senftenberg es necesario 13,17 min a 58ºC, mientras que con el tratamiento combinado el valor D se reduce hasta 0,429 minutos para S. Enteritidis y 0,136 minutos para S. Senftenberg.

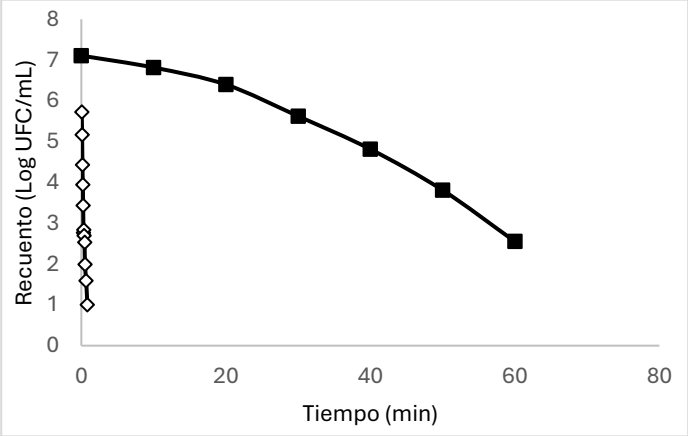


Figura 5: Gráficas de supervivencia de *Salmonella* Senftenberg a 52º C en TSB (■) y en TSB con 0,2 mL de nanoemulsión de aceite esencial de limón (◇).

Tabla 7: Resumen de los parámetros estimados por el modelo de Bigelow en el tratamiento térmico solo y el tratamiento combinado.

CEPA	Medio	Temperatura (ºC)	D (min)	RMSE*
S. Enteritidis	TSB	52	60,30 ± 4,27	0,12
	TSB + NAEL**		0,429 ± 0,04	0,34
S. Senftenberg	TSB	58	13,17 ± 1,25	0,32
	TSB + NAEL		0,136± 0,01	0,59

*RMSE: Desviación estándar de los valores residuales (Errores de predicción); **NAEL: Nanoemulsión de aceite esencial de limón.

Conclusión

La combinación del tratamiento térmico con la adicción de nanoemulsión de aceite esencial de limón ha reducido de forma considerable la resistencia térmica de las dos cepas estudiadas de *Salmonella,* incluso por encima de 100 veces el valor inicial estudiado.

Este efecto sinérgico del tratamiento combinado se ha estudiado anteriormente con otros microorganismos como *Listeria monocytogenes* e incluso con *S.* Senftenberg obteniendo unos resultados similares.

Sería interesante estudiar este efecto sinérgico en un alimento ya preparado tipo smoothies, zumo o cualquier alimento líquido, en principio, para ver si estos excelentes resultados se mantienen.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICIN) y por la Agencia Estatal de Investigación (AEI) a través del proyecto PID2020-116318RB-C32 y por el Programa AGROALNEXT, financiado por MICIN con fondos NextGenerationEU (PRTR-C17.I1) y por la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia a través de la Fundación Séneca - Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia.

Referencias

Kang I, Kim D, Jeong D, Park J, Lim H, Seo K. 2018. Heat resistance of Salmonella Enteritidis in four different liquid egg products and the performance and equivalent conditions of Ministry of Food and Drug Safety of South Korea and US Department of Agriculture protocols, Food Control, Volume 94, Pages 1-6. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.024.

Hardy J, Parmentier M, Fanni J. 1999. Functionality of nutrients and thermal treatments of food. Proceedings of the Nutrition Society, Volume 58, Pages 579-585. doi:10.1017/S0029665199000762.

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutricional). Enfermedades de transmisión alimentaria: Salmonelosis. Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Fecha de último acceso: 27/06/2024

Ros M, Garre A, Maté J, Palop A, Periago P.M. 2017. Nanoemulsified D-Limonene Reduces the Heat Resistance of Salmonella Senftenberg over 50 Times. Nanomaterials, Volume7, Page 65. doi.10.3390/nano7030065.

Maté J, Periago P.M, Palop A. 2016. When nanoemulsified, d-limonene reduces Listeria monocytogenes heat resistance about one hundred times. Food Control, Volume 59, Pages 824-828, https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.020.

Bodea I.M, Cătunescu G.M, Palop A, Fernandez P.S, Garre A. 2023. Washing solutions containing nanoemulsified essential oils as a potential substitute of commercial washes for the decontamination of Escherichia coli O157:H7 on cherry tomatoes LWT. Food Science and Technology, volume 190, 115549 https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115549

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD ANTIFÚNGICA DE SUBPRODUCTOS DE FRUTAS Y ACEITES ESENCIALES FRENTE A *PENICILLIUM DIGITATUM*

Zapata R.[1], Martínez-Zamora L.[1,2], Artés-Hernández F.[1]

1 Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Departamento de Ingeniería Agronómica e Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.
2 Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100 Murcia, España.

fr.artes-hdez@upct.es

Resumen / Abstract

De los principales problemas actuales en el cultivo de cítricos, quizás los más importantes sean las pérdidas debidas al ataque de plagas desde el campo y al crecimiento del hongo Penicillium digitatum. Es de interés encontrar soluciones a través de nuevas prácticas en la industria agroalimentaria, respetuosas con el medio ambiente y que no utilicen fungicidas peligrosos para la salud, para reducir las pérdidas de fruta y alargar su vida útil.
El objetivo general de este trabajo fue estudiar la capacidad antifúngica in vitro frente al crecimiento de Penicillium digitatum para el estudio de potenciales recubrimientos de cítricos que minimicen las pérdidas postcosecha causadas por podredumbres. Para ello, se utilizó un método de enriquecimiento del medio de cultivo con aceites esenciales (0,1; 0,5; 1 y 2 %) y extractos de subproductos (1 y 5%) de cítricos (limón, naranja y pomelo).
Los resultados mostraron como los aceites esenciales obtuvieron una mayor capacidad antifúngica, siendo el aceite esencial de pomelo el más eficaz, inhibiendo el crecimiento del hongo en un ~88% y el de su espora en un ~91% respecto al CTRL tras 5 días de incubación. En el caso de los subproductos, tanto la naranja como el pomelo y el limón mostraron un % de inhibición del crecimiento de Penicillium digitatum de ~10% tras 5 días de incubación, aunque fue de ~90% frente al crecimiento de la espora del mismo hongo.
En futuros experimentos, se espera que estos extractos y aceites esenciales puedan ser incorporados en recubrimientos a las frutas in vivo para optimitzar la conservación de cítricos a partir de sus propios subproductos, adaptándose así a un modelo de economía circular, particularmente intresante en agricultura ecológica.

Palabras clave / Keywords

Desperdicio alimentario, recubrimientos, cítricos, co-productos, extractos; compuestos fenólicos

Los cítricos son un cultivo de elevada importancia mundial, contribuyendo a la economía global produciendo más de 1000 M de dólares al año y millones de empleos. El top 5 de países productores son China, Brasil, India, México y España. Entre todas las especies, cabe destacar la naranja, el limón y el pomelo. La producción mundial ha aumentado en la última década hasta los 130 Mt anuales. El principal problema

postrecolección en cítricos son las pérdidas por podredumbres, en especial por hongos. *Penicillium digitatum* es el hongo mesofílico que ocasiona el moho verde, responsable del 90 % de las podredumbres de cítricos [1]. Para combatirlo se investigan tratamientos respetuosos con el medioambiente y la salud que no consistan en fungicidas. Con el objetivo de formular potenciales recubrimientos que minimicen pérdidas y alarguen la vida útil de cultivo citrícola ecológico se evaluó la capacidad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales y subproductos citrícolas mediante su adición al medio de cultivo. Para ello, se prepararon los medios con agar de dextrosa de patata (PDA), agua destilada, tween 80, cera de carnauba y diferentes concentraciones de piel liofilizada y molida (1 y 5 %) y de aceites esenciales ecológicos comerciales (0,1; 0,5; 1 y 2 %) de limón, pomelo y naranja. Se dispersaron en placas Petri e inocularon con *P. digitatum* (10^6 UFC/mL). Se siguió el crecimiento de la hifa y de la espora durante 7 días (n = 5).

Los resultados representados en la Figura 1 tras 7 días de incubación muestran una disminución significativa ($p<0,5$) del crecimiento de la espora con la adición de los subproductos (hasta un 80 %), especialmente con piel de naranja al 5 %. Con respecto al crecimiento de hifa no hay diferencias entre tratamientos.

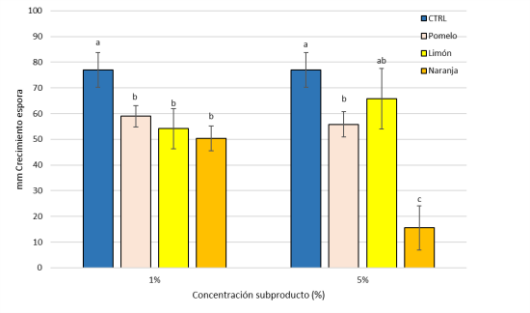


Figura 1: Crecimiento de espora (mm) en placas inoculadas con *P. digitatum* a los 7 días utilizando medios enriquecidos con subproductos de cítricos. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las muestras ($p<0,05$).

Los resultados obtenidos para los aceites esenciales se representan en la Figura 2. Muestran una gran disminución en el crecimiento de hifa y espora con respecto al CTRL (90 %) y a los recubrimientos con subproductos (aunque estén en mayor concentración). La mayor inhibición de crecimiento se obtiene con aceite esencial de pomelo a la mayor concentración (2 %).

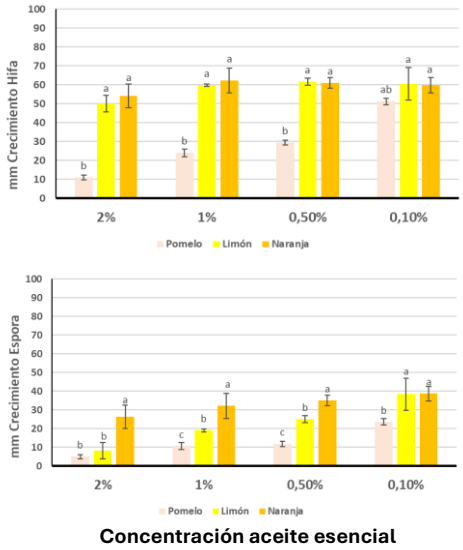


Figura 2: Crecimiento de hifa y de espora (mm) en placas inoculadas con *P. digitatum* a los 7 días usando medios enriquecidos con aceites esenciales. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las muestras ($p<0,05$).

Como conclusión, los ensayos *in vitro* hacen patente la posibilidad de formular potenciales recubrimientos *in vivo* de cítricos ecológicos enriquecidos con aceites esenciales y subproductos de sus propios desechos, apostando así por un modelo de economía circular de 'residuo zero' [2].

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el proyecto PID2021-123857OB-100, financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y a la Fundación Séneca, y la ayuda PRTR-C17.I1, financiada por EU NextGenerationEU/PRTR (AGROALNEXT). Zapata R. agradece a la

UPCT el contrato predoctoral IFPI – SEFYCU 2629070. Martínez-Zamora, L. agradece el contrato postdoctoral Margarita Salas por la UM financiado por NextGenerationEU.

REFERENCIAS

[1] N. Hendel, L. Larous, L. Belbey, *IFRJ*, **2016**, *23(4).*

[2] M., Cano-Lamadrid, F., Artés-Hernández. *Foods*, **2021***, 11(1)*

CUANTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA TRANSFERENCIA DE BIOFILMS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* A ALIMENTOS LISTOS PARA EL CONSUMO MEDIANTE RISK RANGER 2.0

Sánchez-Martín J., Serrano-Heredia S., Bonilla-Luque O., Carrasco Jiménez E., Valero A.

Universidad de Córdoba. Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes (ENZOEM), CeiA3, Campus Rabanales, 14014.

t52samaj@uco.es

Resumen / Abstract

Listeria monocytogenes supone un importante reto para la industria alimentaria debido a su capacidad para desarrollar biofilms persistentes en diversas superficies. Estos biofilms permiten que el patógeno perdure en entornos de procesado, lo que se traduce en una contaminación continuada y una mayor posibilidad de aparición de brotes alimentarios. Comprender el alcance de la transferencia de los biofilms a los productos cárnicos y pesqueros listos para el consumo dentro de la industria alimentaria es fundamental para realizar una correcta evaluación de riesgos que ayude a identificar los puntos más vulnerables en la cadena alimentaria. Por ello, el objetivo del estudio fue cuantificar la transferencia de biofilms de tres cepas de L. monocytogenes a pechuga de pavo cocida (PP) y trucha arco iris ahumada en frío (TA) y estudiar el riesgo derivado mediante herramientas de evaluación de riesgo (Risk Ranger 2.0). Se trabajó con un biofilm formado por tres cepas de L. monocytogenes (L1.96; L1. C5; L1.38) que se cultivó durante 120 h a 25°C en cupones de acero inoxidable (SS) en medio TSB:PBS diluido 1:1000. Las células de los biofilms obtenidos se transfirieron a los alimentos mediante contacto directo durante 90 s y se procedió al tradicional recuento en placa en medio selectivo (Oxford). Finalmente se realizó una evaluación semi-cuantitativa de riesgos utilizando la herramienta Risk Ranger 2.0, comparando el riesgo derivado por contaminación del alimento por células planctónicas o de biofilm. Como resultado se observó un elevado porcentaje de transferencia de células de biofilms a PP (87,8%) y TA (85,7%). La evaluación cuantitativa del riesgo indicó un aumento significativo de alrededor de un 200% en el número de casos/día en la población europea al incorporar esta nueva variable en la herramienta Risk Ranger 2.0.

Palabras clave / Keywords

evaluación semicuantitativa del riesgo, listeriosis, pescado ahumado, producto cárnico cocido.

Listeria monocytogenes es un patógeno de transmisión alimentaria que presenta una elevada persistencia en instalaciones, equipos y material utilizado en industrias del sector agroalimentario, lo que incrementa la probabilidad de contaminación de los alimentos durante el procesado. La fuente principal de estas contaminaciones procede del contacto directo con superficies o material donde se han desarrollado biofilms de *L. monocytogenes*, pudiendo alcanzar un nivel

de 3 log UFC/cm^2 de acuerdo con investigaciones previas [1].

Por lo tanto, para conocer con una mayor precisión el riesgo de contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes* durante las operaciones de procesado del producto se necesita un conocimiento más profundo de la mecánica de formación del biofilm, así como su transferencia a los alimentos. Estos datos pueden ser recopilados e incorporados a herramientas informáticas de evaluación del riesgo microbiológico.

Risk Ranger 2.0 [2] es un software que permite realizar estas evaluaciones de riesgo mediante la aportación de datos cuantitativos y semi-cuantitativos. En el presente estudio se implementó esta herramienta para simular el impacto sobre el riesgo microbiano de la contaminación por transferencia de *L. monocytogenes* en estado planctónico y desde biofilm. Para ello se trabajó con trucha ahumada envasada al vacío y pechuga de pavo cocida, dos alimentos listos para el consumo para los que hay evidencia científica de contaminación por *Listeria monocytogenes* [3].

Se procedió al desarrollo del biofilm sobre superficies de acero inoxidable, para conocer el potencial de crecimiento en condiciones que simulaban una superficie húmeda en una industria alimentaria (cupones de acero inoxidable de 5 x 5 cm sumergidos en medio TSB:PBS (1:1000; v/v) incubados 5 días a 25° C). Se procedió al recuento de células adheridas a la superficie de acero, así como las transferidas al alimento mediante contacto directo (90 s) (Figura 1). Asimismo se calculó la tasa de transferencia.

Se obtuvo un alto porcentaje de transferencia (> 84%), por lo que se demostró que una gran cantidad de las células que forman el biofilm serían

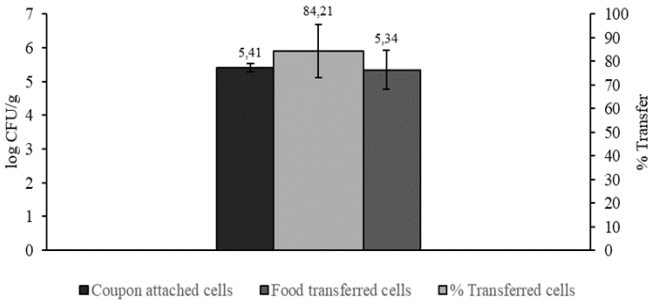


Figura 1: Concentración de *L. monocytogenes* en cupones de acero inoxidable y em trucha ahumada (gris claro).

transferidas al alimento en caso de contacto, siendo fundamental la utilización de estos datos a la hora de plantear una evaluación cuantitativa del riesgo. De igual forma, se recopilaron datos de bibliografía [4] donde se utilizaban biofilm de otras cepas de *L. monocytogenes* cultivados en condiciones similares donde la transferencia de células de biofilm al alimento era similares a las del presente estudio.

Estos datos fueron utilizados para completar las diferentes entradas del software Risk Ranger 2.0 (Tabla 1), creando dos evaluaciones de riesgo en función a los dos supuestos mencionados anteriormente (contaminación por células en estado planctónico o contaminación por células de biofilm).

Tabla 1: Valores de entrada definidos para los supuestos escenarios planteados, alimentos contaminados con células de *L. monocytogenes* normales (respuesta en azul) o células de biofilm (respuesta en rojo) y los valores comunes en ambos (respuesta en negro) en la evaluación de riesgo mediante el software Risk Ranger 2.0.

Factor	Valor	Fuente
Gravedad del peligro	Peligro leve: a veces se requiere atención médica	McLauchlin et al. 2004, doi: 10.1016/S0168-1605(03)00326-X. PMID: 15033265.
¿Qué tan susceptible es la población de interés?	General-Toda la población	Lecuit M. 2020, doi: 10.1111/cmi.13186. PMID: 32185900.
Frecuencia de consumo	Semanal	Datos sobre el consumo de alimentos (EFSA, 2022)
Proporción de la población que consume el producto	La mayoría (75%)	Food consumption data (EFSA, 2022).
Tamaño de la población consumidora	484.000.000	Population in the European Union (Eurostat)
Probabilidad de contaminación del producto crudo por ración	Poco frecuente (1%)/Apenas (2%)	Rodríguez-López et al. 2019.
Efecto del tratamiento	Reduce ligeramente los peligros	El producto de pescado RTE sin tratamiento térmico / La pechuga de pavo cocida reduce significativamente la concentración de microorganismos
¿Existe la posibilidad de recontaminación después del procesamiento?	No/Sí, poco frecuente (1%)	Rodríguez-López et al. 2020.
¿Qué tan efectivo es el sistema de control de posprocesamiento?	Mayoritariamente controlado	Scientific Opinion on the public health risks related to the maintenance of the cold chain during storage and transport of meat. (EFSA, 2014)
¿Qué aumento en el nivel de contaminación posterior al proceso causaría infección o intoxicación al consumidor promedio?	Moderado (aumento de 100 veces)	COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs
Efecto de la preparación antes de comer	Ligera reducción (10%)	Productos RTE (apenas cocidos/calentados)

Como resultado de la evaluación del riesgo, Risk Ranger 2.0 calculó los valores para tres parámetros diferentes. En primer lugar, la probabilidad de enfermedad/servicio/día, donde los valores obtenidos fueron de 1,93 x 10^{-6} y 3,85 x 10^{-6} para el escenario de contaminación con células planctónicas y el escenario con células de biofilm, respectivamente. En segundo lugar, el número de casos/año en la población de estudio, siendo los valores obtenidos de 2,55 x 10^{5} y 5,10 x 10^{5} para el escenario de contaminación con células planctónicas y el escenario con células de biofilm, respectivamente. Esto supone para los dos primeros parámetros un aumento del riesgo de aproximadamente un 200% en el escenario propuesto de contaminación por células de biofilm. En tercer lugar, el software proporcionó el valor de ranking de riesgo, un parámetro definido por los desarrolladores del software con una escala de 0 a 100 puntos, donde 0 puntos representa la probabilidad más baja de enfermar, un hipotético escenario donde no hay población susceptible y la

contaminación real del alimento es inexistente, mientras que 100 puntos representa el hipotético escenario de mayor riesgo donde toda la población es susceptible al peligro analizado. El valor calculado en este trabajo fue de 50 para el escenario de contaminación por células planctónicas, y de 51 para el escenario con células de biofilm, con lo que supone un cambio sustancial teniendo en cuenta que cada seis puntos de diferencia en la escala de ranking de riesgo suponen una diferencia de un orden de magnitud en el riesgo medido.

Las conclusiones derivades del estudio estriban en que para poder realizar evaluaciones de riesgo más precisas deben ser tenidas en cuenta las contaminaciones de productos listos para el consumo provenientes de biofilm, siendo necesario también un estudio más profundo de los mecanismos de formación y transferencia de células del biofilm, que nos permitan aplicar eficientemente las medidas de control no sólo a nivel de producción en la industria alimentaria, sino a lo largo de toda la cadena de la granja a la mesa.

AGRADECIMIENTOS

*Este trabajo ha sido financiado por el proyecto **ASEQURA** (**PID 2019-108420RB-C31**) de la Convocatoria 2019 "Proyectos de I+D+i" y las Ayudas a contratos predoctorales para la formación de doctores (**PRE2020-092741**).*

REFERENCIAS

[1] Rodríguez-López, P., Bernárdez, M., Rodríguez-Herrera, J. J., Comesaña, Á. S., & Cabo, M. L. (2019). Identification and metagenetic characterisation of *Listeria monocytogenes*-harbouring communities present in food-related industrial environments. Food Control, 95, 6-17.

[2] Ross, T., & Sumner, J. (2002). A simple, spreadsheet-based, food safety risk assessment tool. International journal of food microbiology, 77(1-2), 39-53. https://foodsafetyportal.eu/riskranger/rr_riskranger.html

[3] Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Põltsama, P., & Elias, T. (2013). *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. Food control, 30(1), 24-29.

[4] Nogueira, R., Cabo, M. L., García-Sanmartín, L., Sánchez-Ruiloba, L., & Rodríguez-Herrera, J. J. (2023). Risk factor-based clustering of *Listeria monocytogenes* in food processing environments using principal component analysis. Food Research International, 170, 112989.

INTERACCIÓN DE *SALMONELLA* CON LA MICROBIOTA INTESTINAL: INFLUENCIA EN LA CAPACIDAD DE INVASIÓN

Gutiérrez M.[1], Piris, V. [1], Val, L. [1], Cebrián G.[1]

[1] Universidad de Zaragoza/ Facultad de Veterinaria/ Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/ Tecnología de los Alimentos. Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA). Calle de Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España.

m.gutierrez@unizar.es

Resumen / Abstract

La relevancia de Salmonella como patógeno alimentario es de sobra conocida. La microbiota intestinal es una de las primeras líneas de defensa contra la infección por estas bacterias entéricas, por lo que conocer cómo interaccionan estos patógenos con la microbiota es clave para comprender mejor este proceso de invasión e infección y desarrollar posibles estrategias para su prevención. Por ello en este trabajo se estudió la influencia que distintos grupos/ especies microbianas tienen en la capacidad de Salmonella de invadir el epitelio intestinal (simulado con células Caco-2). Los resultados mostraron que varios de estos microorganismos son capaces de reducir la capacidad de invasión de Salmonella, y que este efecto, además de ser dependiente de la dosis, se podría atribuir a la competición con Salmonella cuando las células se encontraban en estado viable.

Palabras clave / Keywords

Salmonella, microbiota intestinal, adhesión, invasión, Caco-2.

La importancia de *Salmonella* en el contexto de la salud humana es ampliamente conocida, y es que solo en 2022 fue el patógeno responsable del mayor número de toxiinfecciones de origen alimentario en humanos en Europa, con 65.208 casos de enfermedad confirmados [1]. Por este motivo, cada vez existen más estudios enfocados tanto a comprender los mecanismos que favorecen la infección del ser humano, como los posibles agentes o tratamientos capaces de prevenir o tratar la enfermedad. Recientemente se ha puesto el foco en el rol que desempeña la microbiota como una de las primeras barreras contra la infección por *Salmonella*. El tracto gastrointestinal está densamente poblado por un conjunto de microorganismos muy heterogéneo, cuya composición varía en gran medida entre individuos de la misma especie, y depende de multitud de factores como la dieta, la edad, condicionantes genéticos y patologías concomitantes, entre otros. En los últimos años se ha señalado que estas variaciones o la presencia de determinados grupos/especies bacterianas en el intestino pueden condicionar una mayor o menor resistencia frente a la colonización del

intestino por *Salmonella*, debido a su distinta capacidad competitiva y para mantener la integridad de la barrera intestinal [2,3]. En este contexto, es fundamental comprender la interacción patógeno-microbiota, así como los factores que determinan su supervivencia durante el tránsito gastrointestinal y su capacidad de atravesar o invadir el epitelio intestinal.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto que la presencia de la microbiota tiene en la virulencia relativa de *Salmonella*, utilizando un modelo celular *in vitro* (células Caco-2) que simula el epitelio intestinal. Como primer paso se evaluó la influencia de la presencia por separado de distintas especies de los principales grupos microbianos que se encuentran en la microbiota del colon humano en la capacidad de adhesión e invasión de *Salmonella,* así como el efecto de la viabilidad de las células de estas especies/cepas durante la invasión, y finalmente de la dosis o concentración de las mismas (ratio *Salmonella*-microbiota de 1:1 a 1:100). Los ensayos de adhesión-invasión se realizaron según la metodología descrita en trabajos previos de este grupo de investigación [4], con algunas modificaciones.Los resultados obtenidos indican que la capacidad de adhesión de

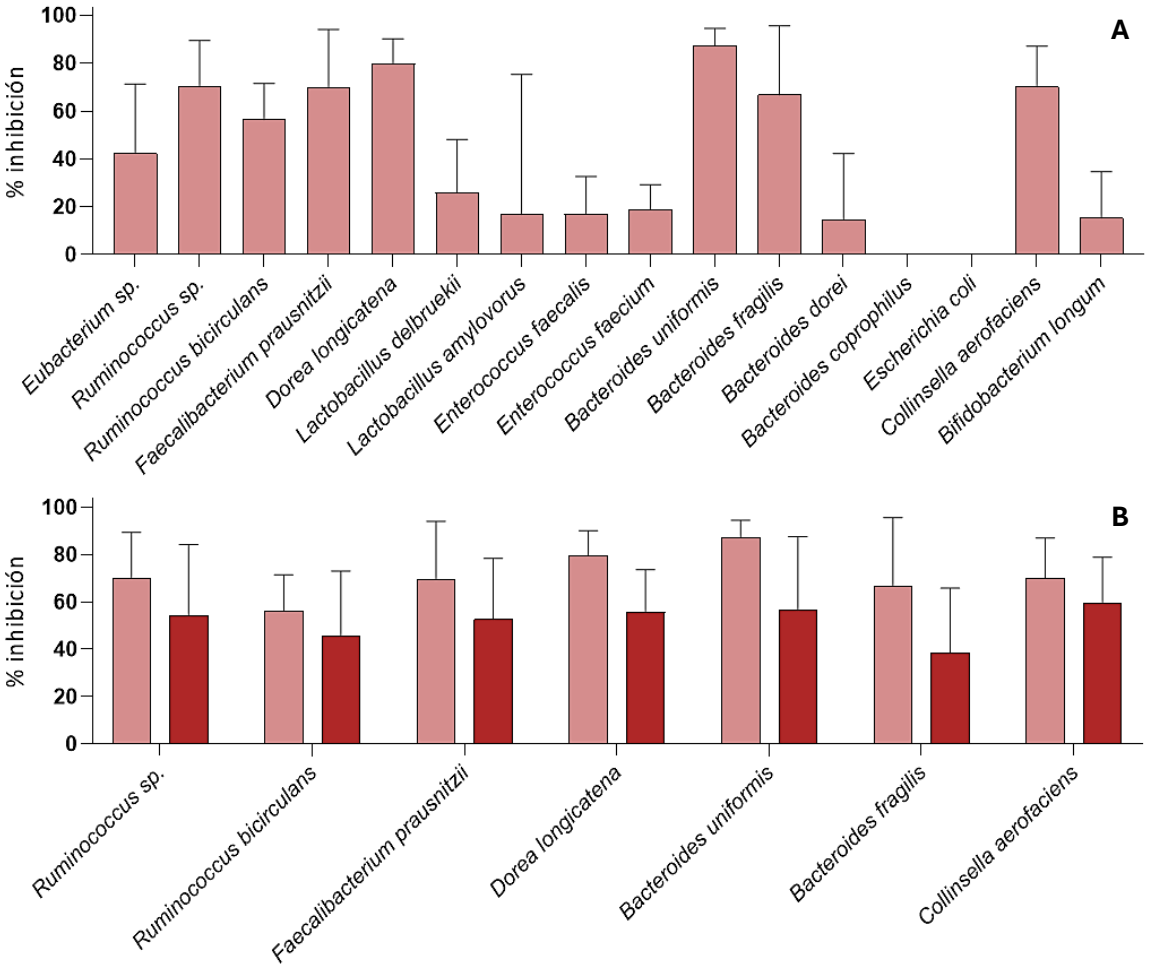


Figura 6: Capacidad de distintas especies/cepas de la microbiota del colon humano de inhibir la invasión de *Salmonella* Typhimurium SL1344 en un cultivo celular de Caco-2 (MOE 1:100 de células de Caco-2 -*Salmonella*) respecto al control sin microbiota, según la presencia de las 16 especies/cepas de la microbiota (A) y según la viabilidad de determinadas especies/cepas (células viables (■) y células inactivadas con luz UV-C (■)).

Salmonella no se ve apenas influenciada por la presencia o no de las distintas especies microbianas estudiadas por separado, mientras que algunas de ellas (*Bacteroides uniformis, Bacteroides fragilis, Dorea longicatena*, y *Ruminococcus* sp., entre otras) sí que mostraron una media-alta capacidad de inhibición de la invasión respecto al control sin microbiota añadida (**Figura 1A**). Además, se comprobó que este descenso en la capacidad de invasión de *Salmonella* sólo se producía en mayor medida cuando la microbiota añadida se encontraba viable (**Figura 1.B**) y que el efecto era dependiente de la concentración de las mismas (mayor inhibición de la invasión cuanto mayor concentración de microbiota).

Estos resultados demuestran que la presencia de una microbiota viable, y con la suficiente concentración de determinados grupos o especies, ejercería un efecto protector contra la infección de *Salmonella*.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2021-125609NB-I00).

REFERENCIAS

[1] European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), *EFSA J.*, **2023**, *21*(12).

[2] Y. Cherrak, M. A. Salazar, K. Yilmaz, M. Kreuzer, W-D. Hardt, *PLoS Biol*, **2024**, *22*(6).

[3] L. Cheng, M. S. P. Correia, S. M. Higdon, F. R. Garcia, I. Tsiara, E. Joffré, Å. Sjölinga, F. Boulund, E. L. Norin, L. Engstrand, D. Globisch, J. Du, *Gut Microbes*, **2024**, *16*(1).

[4] S. Guillén, M. Marcén, E. Fau, P. Mañas, G. Cebrián, *Int. J. Food Microbiol*., **2022**, *361*.

SUERO QUESERO FERMENTADO POR BACTERIAS LÁCTICAS COMO INHIBIDOR DE *PSEUDOMONAS* SPP. ALTERANTES DE PRODUCTOS LÁCTEOS

Picón A., Sánchez C., Ávila M., Vázquez E., Garde S., Calzada J, Briega I., Rodríguez-Mínguez E.

Grupo de Tecnología de Productos Lácteos, Dpto. de Tecnología de Alimentos, INIA (CSIC), Carretera de La Coruña Km 7, 28040 Madrid

apicon@inia.csic.es

Resumen / Abstract

El deterioro por Pseudomonas produce grandes pérdidas económicas en el sector lácteo. El suero lácteo, un subproducto contaminante con alto contenido en nutrientes, puede ser utilizado como sustrato para que las bacterias lácticas produzcan compuestos con actividad antipseudomonas (AA). Su empleo permitiría satisfacer las demandas de los consumidores de alimentos libres de aditivos químicos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad antipseudomonas de suero quesero fermentado con distintas cepas de bacterias lácticas y bifidobacterias.
Se utilizó suero quesero industrial, esterilizado a 0,6 atm, e inoculado al 2% de manera individual con 256 cepas de la colección de bacterias beneficiosas del INIA (233 bacterias lácticas y 24 bifidobacterias), y la cepa comercial Bifidobacterium animalis BB12. En un primer cribado, ninguno de los sueros fermentados inhibió el crecimiento de Pseudomonas en agar TSA a 25°C (48 h), ni a 6°C (5 días). Posteriormente, en medio líquido (TSB), se observó inhibición frente a P. fluorescens Mc02. En base a su AA y la diversidad filogenética, se seleccionaron 25 sueros fermentados, y se evaluaron frente a 9 cepas de Pseudomonas (con alta capacidad de deterioro y/o factores de virulencia), y la cepa de referencia P. fluorescens ATCC 948.
En general, la susceptibilidad de las cepas de Pseudomonas varió en función de la cepa, el suero fermentado empleado y la temperatura de incubación. La AA fue generalmente superior a 6°C. A 25°C, se observó una AA reducida y de tipo bacteriostático (superior a las 24 h que a 48 h). Los sueros fermentados con B. bifidum INIA P826, L. paracasei INIA P393 e INIA P495, L. lactis INIA C155 y S. macedonicus INIA C138 presentaron un mayor espectro de AA y los porcentajes de inhibición más altos a ambas temperaturas por lo que podrían considerarse de interés para aumentar la vida útil de productos lácteos.

Pseudomonas spoilage causes huge economic losses in the dairy sector. Whey, a contaminant dairy by-product with a high nutrient content, can be used as substrate for lactic acid bacteria, to produce compounds with antipseudomonas activity (AA). Its use would satisfy consumers' demands for chemical-free food products. The main goal of this work was to study the antipseudomonas capacity of dairy whey fermented with different strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria.
Industrial dairy whey samples, sterilized at 0.6 atm, were individually inoculated at 2% with each one of the 256 strains belonging to the INIA beneficial bacteria collection (233 lactic acid bacteria and 24 bifidobacteria), and the commercial strain Bifidobacterium animalis BB12. In a first screening, none of the fermented whey samples inhibited Pseudomonas growth in TSA agar at 25°C (48 h), or 6°C (5 days). Later on, in liquid medium (TSB), we observed inhibition against P. fluorescens Mc02. Taking into account their AA and phylogenetic diversity, 25 fermented whey samples were selected, and evaluated against 9 Pseudomonas strains (selected by their high

spoilage capacity and/or possesing virulence factors), and the reference strain P. fluorescens ATCC 948.
In general, the susceptibility of Pseudomonas strains was dependent on the strain, the specific fermented whey, and the incubation temperature. The AA was generally superior at 6°C. At 25°C, a reduced bacteriostatic AA (higher at 24 h than at 48 h) was observed. Whey samples fermented with strains B. bifidum INIA P826, L. paracasei INIA P393 and INIA P495, L. lactis INIA C155 and S. macedonicus INIA C138 showed high AA spectra, and high inhibition percentages at both temperatures. These five fermented whey samples could be used to extend dairy shelf-life.

Palabras clave / Key words

actividad antipseudomonas, suero fermentado, bacterias lácticas, bifidobacterias

antipseudomonas activity, fermented whey, lactic acid bacteria, bifidobacteria

INTRODUCCIÓN

El género *Pseudomonas* comprende un grupo muy heterogéneo de bacilos aerobios gram-negativos y móviles. Son bacterias ubicuas debido a sus requisitos nutricionales simples y a su alta versatilidad metabólica. Algunas especies son capaces de crecer a temperaturas de refrigeración, y aunque la pasterización las elimine, sus proteasas y lipasas termoestables permanecen activas en la leche pasterizada, e incluso en la UHT [1]. Por todas estas características, las especies de *Pseudomonas* psicrotróficas se han convertido en una de las mayores preocupaciones de la industria láctea como causa principal de alteraciones y pérdidas económicas significativas. En leche, *Pseudomonas* causa defectos de sabor, olor y textura (debido a la producción de proteinasas y lipasas), y de color (debido a la producción de pigmentos). En quesos frescos, *Pseudomonas* puede generar cambios de color y viscosidad en la superficie, defectos de textura y sabor/olor desagradable [2, 3].

El suero lácteo es un subproducto que contamina el medio ambiente, con un alto contenido en lactosa, proteínas solubles y sales minerales, que puede ser utilizado como sustrato para el crecimiento de bacterias lácticas (BL) [4]. La fermentación del suero podría servir para la producción de compuestos antimicrobianos de interés con actividad antipseudomonas (AA), satisfaciendo así la demanda creciente de los consumidores de alimentos naturales libres de aditivos químicos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad antipseudomonas del suero quesero fermentado con distintas cepas de bacterias lácticas y bifidobacterias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suero y condiciones de esterilización. Suero procedente de la elaboración de queso de mezcla (leche de vaca, cabra y oveja) por la empresa láctea "Quesos Campo Real" (Campo Real, Madrid). Se ensayaron diferentes tratamientos térmicos en un rango de temperatura de 63 a 95°C, y tratamientos combinados de temperatura y presión.

Evaluación del suero estéril como medio de cultivo. Se prepararon medios con agar al 1,5% (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y

azul de metilo al 0,03% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), disueltos en un 60% del volumen de agua. Tras su autoclavado y atemperado a 50°C, se les añadió un 40% de leche reconstituida estéril (Oxoid), o suero estéril, y se vertieron placas con las mezclas. Sobre las placas solidificadas se depositaron, por duplicado, 5 µl de suspensiones celulares de 12 BL, 2 bifidobacterias y 2 *Pseudomonas*, incubándose a temperatura y condiciones adecuadas para cada especie.

Obtención de sueros fermentados. Los sueros esterilizados fueron inoculados al 2% de manera individual con 256 cepas de BL y bifidobacterias de la colección INIA: 66 *Lactococcus*, 50 lactobacilos de origen lácteo y 21 de origen humano, 33 *Leuconostoc*, 49 *Enterococcus*, 6 *Streptococcus*, 4 *Pediococcus*, 2 *Weisella*, y 1 *Carnobacterium*; y la cepa comercial *Bifidobacterium animalis* BB12.

Actividad antipseudomonas de sueros fermentados. Se realizó un primer cribado de los 256 sueros fermentados mediante la técnica de difusión en agar, en TSA, frente a 3 cepas alterantes (*P. fluorescens* Mc02 y Ps220, y *P. libanensis* INIA 724), con incubaciones a 25°C (48 h) y 6°C (5 días). Posteriormente, tras la evaluación de los sueros fermentados en medio líquido (TSB) frente a la cepa Mc02, se seleccionaron 25 sueros fermentados, y se evaluaron frente a 9 cepas de *Pseudomonas* (seleccionadas por su capacidad de deterioro y/o poseer factores de virulencia, a partir de una colección obtenida de muestras de leche y productos lácteos deteriorados): *P. alcaligenes* Ps105, *P. fragi* Ps51, *P. fluorescens* Mc02, Ps47, Ps146 y Ps242, *P. libanensis* Ps41, *P. lundensis* Ps52 y *P. shahriarae* Ps72. Se incluyó también la cepa *P. fluorescens* ATCC 948 como referencia.

RESULTADOS

Esterilización del suero. Ninguno de los tratamientos térmicos ensayados permitió, por sí mismo, obtener un suero estéril (Figura 1). Los tratamientos combinados de temperatura y presión (121°C y 1 atm, y 105°C y 0,6 atm) fueron los únicos en los que se observó ausencia de crecimiento después de incubar las muestras tratadas a 30°C (3 días). Ambos tratamientos fueron igualmente efectivos en eliminar las formas vegetativas y las esporas.

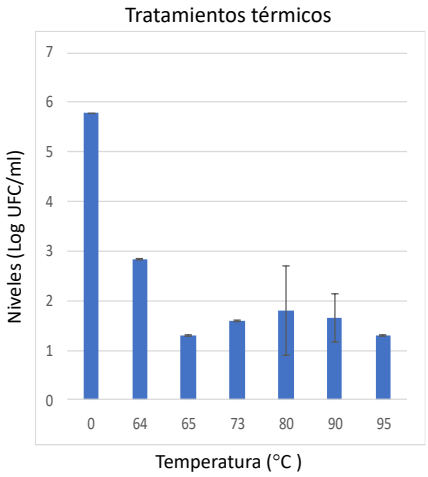


Figura 1. Reducción de los niveles de microorganismos aerobios totales en suero tras tratamientos térmicos.

Suero lácteo como medio de cultivo. Tanto el tratamiento a 0,6 atm como el de 1 atm permitieron el crecimiento de todas las cepas ensayadas de una forma similar al crecimiento observado sobre agar con leche (Figura 2). Los anillos de color azul (o amarillo, para la cepa Mc02) alrededor de las gotas crecidas en placas con suero fueron similares o, en algunos casos, de mayor diámetro que los de la correspondiente placa con leche.

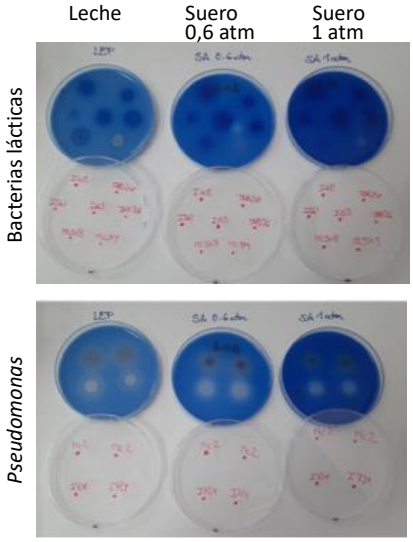


Figura 2. Crecimiento de bacterias lácticas y *Pseudomonas* spp. en agar con azul de metilo y 40% de leche entera UHT o suero estéril.

Actividad antipseudomonas de sueros fermentados. En placas de TSA, ninguno de los 256 sueros fermentados inhibió el crecimiento de las 3 cepas de *Pseudomonas* alterantes, ni a 25°C (48 h) ni a 6°C (5 días).

En medio líquido TSB, 25 sueros fermentados sí inhibieron el crecimiento de *P. fluorescens* Mc02. Estos 25 sueros fermentados se probaron frente a las 9 cepas de *Pseudomonas* alterantes. A 25°C, se observó una AA reducida de tipo bacteriostático, superior a las 24 h que a las 48 h. La cepa más sensible fue *P. fluorescens* Ps146, inhibida por 13 de los sueros con porcentajes de inhibición de crecimiento (PIC) superiores al 50%, y las más resistentes fueron *P. libanensis* Ps41, *P. fragi* Ps51, *P. lundensis* Ps52 y *P. fluorescens* Mc02, con PIC inferiores al 50% para todos los sueros ensayados. A 6°C, se observó en general una AA mayor de los sueros fermentados, especialmente en los sueros fermentados con bifidobacterias y lactobacilos. Los sueros fermentados con las cepas *B. bifidum* INIA P826, *L. paracasei* INIA P393 e INIA P495, *L. lactis* INIA C155 y *S. macedonicus* INIA C138 presentaron un mayor espectro de AA, y los PIC más elevados (Tabla 1).

Los descensos de pH en estos 5 sueros fermentados estuvieron comprendidos entre 1 y 2 unidades. De forma similar, 16 de las 25 cepas seleccionadas produjeron descensos de pH iguales o superiores a los de estas cepas, sin observarse AA.

Tabla 1. Porcentajes de inhibición del crecimiento (PIC) de 6 cepas de *Pseudomonas* en presencia de 6 sueros fermentados. En verde, PIC > 70%, y en amarillo, PIC entre 50-70%.

Cepa	ATCC 948	Mc02	Ps41	Ps51	Ps146	Ps242
	Incubación a 25°C (24 h)					
B. bifidum INIA P826	98,64	37,64	18,28	39,43	73,14	6,34
L. paracasei INIA P393	25,34	47,65	43,90	27,37	72,75	50,24
L. paracasei INIA P495	73,54	39,34	3,27	39,07	76,29	41,68
L. lactis INIA C155	74,72	45,61	24,79	46,45	75,63	60,99
S. macedonicus INIA C138	32,75	43,48	6,91	0,53	1,62	52,00
	Incubación a 6°C (5 d)					
B. bifidum INIA P826	99,35	92,80	40,94	87,15	80,92	25,03
L. paracasei INIA P393	83,82	69,33	-9,61	49,49	37,70	24,33
L. paracasei INIA P495	98,48	86,03	31,27	73,16	50,82	28,90
L. lactis INIA C155	99,01	70,91	26,76	81,33	48,62	24,29
S. macedonicus INIA C138	92,58	18,90	5,67	45,74	8,09	23,69

Conclusión. Los sueros fermentados con estas 5 cepas podrían utilizarse para aumentar la vida útil de productos lácteos.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PID2021-122145OR-C21.

REFERENCIAS

[1] N.H. Martin et al. J. Dairy Sci., **2021**, *104,* 1251-1261.

[2] R. da Silva Rodrigues et al. Int. Dairy J., **2021**, *117*, 105020.

[3] A. del Olmo et al. Food Control, **2018**, *86*, 359-366.

[4] E.L. Chaves de Lima et al. LWT, **2017**, *84*, 710-716.

BEBIDA DE SOJA ENRIQUECIDA EN LINO MEJORA LOS EFECTOS METABÓLICOS DE UNA DIETA ALTA EN GRASA EN UN MODELO DE RATÓN

Ana Ruiz de la Bastida[1], Susana Langa[1], Ángela Peirotén[1], José Antonio Curiel[1], Raúl Fernández González[2], María Maroto Oltra[2], Juan Luis Arqués[1], Alfonso Gutiérrez-Adán[2], José María Landete[1].

1 Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA-CSIC, Madrid, Spain.
2 Departamento de Reproducción Animal, INIA-CSIC, Madrid, Spain.

langa.susana@inia.csic.es

Resumen / Abstract

Las bebidas vegetales fermentadas por cepas bacterianas seleccionadas tienen efectos potencialmente beneficiosos para la salud asociados a la producción de flavonoides bioactivos y lignanos producidos durante la fermentación. En este trabajo, estudiamos los efectos de una bebida de soja y una bebida de soja fermentada por Bifidobacterium pseudocatenulatum *INIA P815, ambas suplementadas con extractos de lignanos, en un modelo de ratón hembra sometido a una dieta alta en grasa durante 16 semanas. La dieta alta en grasa ocasionó un aumento del tejido adiposo y del colesterol en plasma en los animales, así como modificaciones en la microbiota fecal. Los grupos que recibieron la dieta alta en grasa y cualquiera de estas bebidas experimentaron una reducción en el área media de los adipocitos de la grasa ovárica y exhibieron flavonoides bioactivos y lignanos en plasma y tejidos, además de una mayor actividad antioxidante en plasma. El grupo al que se le administró la bebida fermentada demostró además un menor incremento en los niveles del colesterol en plasma, un incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta y niveles más altos de daidzeina, genisteina, enterolignanos y herbacetina en plasma y órganos. Además, la fertilidad del grupo que recibió la bebida fermentada mejoró, teniendo como resultado un mayor porcentaje de blastocistos por hembra. Por tanto, el consumo de estas bebidas fermentadas por* B. pseudocatenulatum *INIA P815 podría estar favoreciendo la salud de este modelo animal mejorando, hasta cierto punto, los efectos de una dieta alta en grasa.*

Palabras clave / Key words

Bebida de soja fermentada, dieta alta en grasas, isoflavonas, flavonoides, lignanos, Bifidobacterium, fertilidad.

La bebida de soja destaca entre las bebidas vegetales por sus efectos beneficiosos para la salud. La presencia de proteína de soja y fitoestrógenos está asociada a la mejora de los síntomas de la menopausia, el perfil lipídico o las enfermedades cardiovasculares. La fermentación de la bebida de soja mejora sus características organolépticas y funcionales. En estudios anteriores se demostró que *Bifidobacterium pseudocatenulatum* INIA P815, durante la fermentación de la bebida, transformaba eficazmente las isoflavonas glicosiladas de la bebida de soja en su forma de aglicona,

que posee mayor biodisponibilidad y bioactividad [1]. La administración de dicha bebida fermentada por *B. pseudocatenulatum* INIA P815 mostró beneficios en el perfil lipídico y la fertilidad de un modelo murino de menopausia [2]. En este estudio, nuestro objetivo fue evaluar los efectos de la bebida de soja fermentada por *B. pseudocatenulatum* INIA P815 en un modelo murino sometido a una dieta alta en grasas durante 16 semanas. Para ello, se utilizaron una bebida de soja y la bebida de soja fermentada por *B. pseudocatenulatum* INIA P815, ambas enriquecidas con extractos de lignanos. Los ratones hembra CD1 fueron divididos según siguiesen una dieta estándar o una dieta alta en grasas. Los ratones con dieta estándar fueron considerados grupo control (CNT), y no recibieron ninguna bebida; los ratones alimentados con una dieta alta en grasas se subdividieron en tres subgrupos: el subgrupo control sin bebida (HFD), el subgrupo que recibió bebida de soja suplementada con lignanos (SB) y el subgrupo que recibió la versión fermentada de la bebida (FSB). Las bebidas se administraron diariamente durante 16 semanas para posteriormente comparar sus efectos.

En todos los grupos, independientemente de la dieta, se dio una dinámica similar en el incremento del peso corporal. Sin embargo, en los grupos que recibieron la dieta alta en grasas, se encontraron pesos relativos de grasa ovárica, inguinal y de espalda significativamente más altos.

El análisis del perfil lipídico en plasma mostró, en los grupos que siguieron una dieta alta en grasas, un aumento significativo de los niveles de colesterol total a tiempo final (Figura 1) en comparación con sus niveles a tiempo inicial; sin embargo, dichos niveles disminuyeron significativamente en el grupo FSB respecto a los otros grupos con una dieta alta en grasas. En los tres grupos con dieta alta en grasas también se observó un descenso significativo de los niveles de triglicéridos totales y HDL-C, mientras que no se encontraron diferencias significativas respecto a los resultados de tolerancia a la glucosa entre los cuatro grupos.

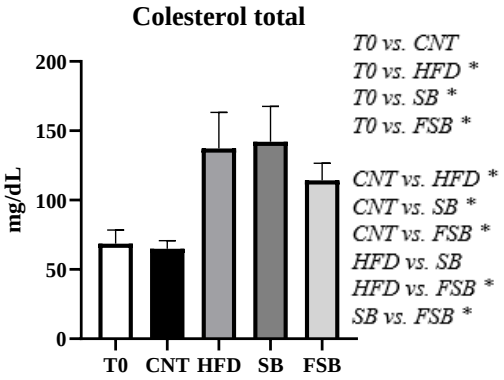


Figura 1: Colesterol total en plasma de ratones. Los valores se expresaron como media ± DE. * Indica diferencias estadísticamente significativas (P < 0,05) según la prueba de Mann-Whitney.

En el plasma de los ratones pertenecientes a los grupos SB y FSB se registró un aumento significativo del poder antioxidanterespecto a los grupos CNT y HFD, así como mostraron presencia de flavonoides (herbacetin, naringenin y kaempferol), lignanos (secoisolariciresinol, enterodiol y enterolactona), isoflavonas en su forma de aglicona y otros compuestos secundarios pertenecientes al metabolismo de las isoflavonas (Tabla 1). Los niveles en plasma de los compuestos daidzein, genistein, SECO y herbacetin en el grupo FSB fueron significativamente superiores a los niveles en el grupo SB. En cuanto a los tejidos analizados, tejido hepático y grasa ovárica, mostraron la presencia de los mismos flavonoides y lignanos observados en

plasma en los grupos SB y FSB, a excepción de herbacetina, kaempferol y naringenina, que no estuvieron presentes en ninguno de los tejidos. En hígado, los niveles de daidzeína, genisteína y ENL fueron mayores en el grupo FSB que en el grupo SB y también superaron las concentraciones registradas en plasma.

Tabla 1: Contenido de flavonoides y lignanos en plasma de ratones (µM). En los grupos CNT y HFD no se detectan los compuestos. Los valores se expresaron como media ± DE. n.q.= no cuantificado. [a–c] Los superíndices con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0,05) según la prueba de Tukey.

	SB	FSB
Daidzein	0.45 ± 0.14 [b]	1.46 ± 0.12 [c]
Genistein	1.09 ± 0.18 [b]	2.40 ± 0.45 [c]
Dihydrodaidzein	0.04 ± 0.02 [b]	0.04 ± 0.02 [ab]
Dihydrogenistein	n.q.	n.q.
***O*-desmethylangolensin**	0.03 ± 0.02 [a]	0.03 ± 0.02 [a]
6-hydroxy-*O*-desmethylangolensin	n.q.	n.q.
Secoisolariciresinol	0.06 ± 0.01 [b]	0.10 ± 0.01 [c]
Enterodiol	0.09 ± 0.03 [b]	0.1 ± 0.01 [b]
Enterolactone	0.17 ± 0.04 [b]	0.20 ± 0.03 [b]
Herbacetin	0.03 ± 0.03 [a]	0.61 ± 0.12[b]
Naringenin	n.q.	n.q.
Kaempferol	n.q.	n.q.

A pesar de que el tamaño de los adipocitos de la grasa ovárica aumentó considerablemente en los tres grupos que recibieron la dieta rica en grasas, los grupos SB y FSB mostraron un área de adipocito estadísticamente menor a la presentada por el grupo HFD, siendo el grupo FSB el que mostró la menor área de adipocito dentro de estos tres grupos (Tabla 2).

Tabla 2: Área media de adipocitos de la grasa ovárica. Los valores se expresaron como media ± DE. [a-c] Los superíndices con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0,05) según la prueba de Tukey.

	Área media de adipocito (mm^2/célula)
CNT	1190.07 ± 340.39 [a]
HFD	2366.73 ± 515.93 [c]
SB	2032.66 ± 411.67 [b]
FSB	1939.69 ± 434.04 [b]

Aquellos grupos que recibieron una dieta alta en grasas (HFD, SB y FSB) sufrieron una disminución significativa en los niveles de SCFA totales en comparación con el grupo CNT. Sin embargo, FSB fue el grupo que registró los niveles más altos en los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) analizados, registrando niveles de SCFA totales, ácido acético y ácido isobutírico significativamente más altos que los del grupo SB.

En cuanto a la biología reproductiva de los ratones, se observó un ligero aumento en el número de ovocitos ovulados (número de folículos hemorrágicos) en el grupo FSB en comparación con el resto de los grupos. En el grupo FSB también se observó un aumento en el porcentaje de blastocistos por ratón hembra en comparación con el resto de los grupos, siendo estadísticamente significativo en comparación con el grupo SB (Figura 2).

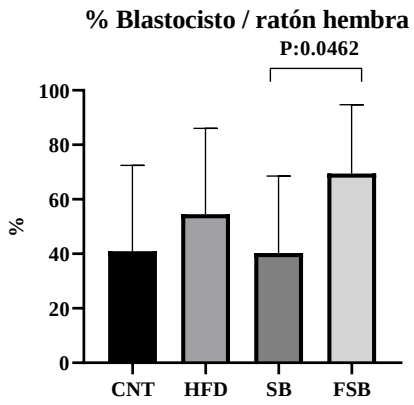


Figura 2: Porcentaje de blastocistos por ratón hembra. Los valores se expresaron como media ± DE. Las diferencias se consideraron significativas cuando P < 0,05.

En base a los datos obtenidos, la bebida de soja fermentada demostró potencial para promover la salud de los ratones, mejorando hasta cierto punto los efectos de una dieta rica en grasas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el proyecto PID2020-11960RB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación de España. ARdlB es beneficiario de un contrato predoctoral (PRE2018-086293). Agradecemos a la Unidad de Servicios de Análisis del ICTAN (Instituto de Ciencia, Tecnología y Nutrición de los Alimentos, Madrid, España) por proporcionar las instalaciones de cromatografía y espectrometría de masas.

REFERENCIAS

[1] A. Ruiz de la Bastida, Á. Peirotén, S. Langa, J.A. Curiel, J.L. Arqués, J.M. Landete. Effect of storage and heat treatment on the levels of bioactive flavonoids produced in fermented soy beverages. LWT **2022**, 154, No. 112872.

[2] A. Ruiz de la Bastida, S. Langa, Á. Peirotén, R. Fernández-Gonzalez, A. Sánchez-Jiménez, M. Maroto, J.A. Curiel, E. Guillamon, J.L. Arqués, A. Gutiérrez-Adán, J.M. Landete. Effect of fermented soy beverage in aged female mice model. Food Res. Int. **2023**, 169, No. 112745.

BIODIVERSIDAD MICROBIANA INTESTINAL EN UN MODELO MURINO DE ICTUS SUPLEMENTADO CON HIDROXITIROSOL

Magdalena Martínez Cañamero[1], Ángela Naranjo[2], Mª del Mar Muñoz-Gallardo[2], Raquel Hernández[2], Santos Blanco[2], Esther Martínez-Lara[2], Eva Siles[2]

1 Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento Ciencias de la salud, Área de Microbiología. Campus Las Lagunillas s/n, CP 23071, Jaén
2 Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento de Biología Experimental, Área de Bioquímica y Biología molecular. Campus Las Lagunillas s/n, CP 23071, Jaén

canamero@ujaen.es, anaranjo@ujaen.es, mmgallar@ujaen.es, rhernand@ujaen.es, sblanco@ujaen.es, elara@ujaen.es, esiles@ujaen.es

Resumen / Abstract

El accidente cerebrovascular se ha convertido en un problema social global que amenaza la salud y acorta la esperanza de vida. La lesión neuronal asociada al accidente cerebrovascular es causada por la ausencia de O_2 y glucosa durante la isquemia y por el estrés oxidativo y la inflamación durante la reperfusión. El hidroxitirosol (HT) es un compuesto fenólico del aceite de oliva virgen extra antioxidante y antiinflamatorio. Resultados previos del equipo de investigación han demostrado que el HT modula la respuesta a la hipoxia y puede servir como un enfoque terapéutico beneficioso para atenuar el daño asociado al accidente cerebrovascular isquémico, así como que este polifenol influye en el crecimiento de cepas de la microbiota intestinal por lo que es interesante estudiar también este aspecto. Por ello, se ha realizado un estudio con animales de experimentación que se han sometido a un modelo de ictus por oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO) y a los que se les ha evaluado la microbiota intestinal. Tras 24 h de reperfusión, los animales se alimentaron durante 35 días con una dieta enriquecida (0.03%, n=7) o no (n=5) con HT. Tras el sacrificio, se obtuvieron muestras de cerebro (zona infartada y contralateral) para estudios paralelos y heces para el análisis de microbiota. En este artículo se presentan los resultados obtenidos tras llevar a cabo secuenciación masiva del gen 16S del metagenoma fecal. La biodiversidad alfa se midió mediante los índices ACE, CHAO1, Shannon, Simpson y OBS mostrando que el grupo problema presentaba consistentemente menor biodiversidad en todos los niveles taxonómicos excepto en los de filo y especie, indicando una posible modulación de algunos taxones.

Palabras clave / Key words

Ictus, hidroxitirosol, eje intestino-cerebro, microbiota intestinal, disbiosis.

El accidente cerebrovascular se ha convertido en un problema social global que amenaza la salud y acorta la esperanza de vida. Numerosos estudios muestran un papel clave de la microbiota intestinal en la gravedad de este tipo de enfermedades, así como en la posterior recuperación. De hecho, los estudios clínicos indican que los pacientes isquémicos muestran disbiosis caracterizada por una diversidad microbiana reducida y un aumento de las bacterias oportunistas. Este desequilibrio

conlleva alteraciones en la barrera epitelial y la consecuente modificación de la fisiología y permeabilidad intestinal, neuroinflamación y daño tisular, así como la alteración de la barrera hematoencefálica y una peor recuperación funcional. En definitiva, estos datos ponen de manifiesto la comunicación bidireccional del eje intestino-cerebro [1, 2].

Un factor clave para modificar la microbiota intestinal es la dieta. En concreto, el uso de polifenoles y en especial del hidroxitirosol (HT) promovió la activación de NRF2, que potencia la acción antioxidante, e inhibió la inflamación mediada por NF-kB en un modelo de colitis [3, 4]. Además, se observó una regeneración de la barrera intestinal y la restauración de la diversidad de la microbiota intestinal, lo que se correlacionó con su efecto antiinflamatorio.

En este sentido, nuestro grupo de investigación ha publicado estudios preclínicos y clínico que evalúan el efecto del HT, un fenol presente en el aceite de oliva virgen extra (AOVE), tras un ictus isquémico [5, 6]. Todos los resultados convergen en que este compuesto es capaz de modular la respuesta al daño generado por la isquemia-reperfusión. Esta evidencia se apoya en su capacidad antiinflamatoria y antioxidante. Además, el tratamiento con HT mejora aspectos funcionales y neurológicos; la memoria a corto plazo debido a un aumento de la conectividad funcional; incrementa el flujo sanguíneo cerebral y modula la evolución del proteoma sérico, especialmente en la expresión de las apolipoproteínas. En conclusión, el HT podría constituir una aproximación no farmacológica para el tratamiento del ictus [5, 6].

En base a todos estos antecedentes, se ha realizado un estudio sobre el efecto que el HT ejerce sobre la microbiota de animales sometidos a un modelo de ictus por oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO) durante 30 minutos. Para ello, 24 horas después de la intervención se les alimentó durante 35 días con una dieta control o enriquecida en HT al 0.03%. Tras el sacrificio, se obtuvieron muestras de heces de nueve animales (cuatro control y cinco HT) para un análisis preliminar de microbiota por secuenciación masiva del gen 16S rRNA que se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación y Bioinformática de FISABIO (Valencia). La biodiversidad alfa se midió mediante los índices ACE, CHAO1, Shannon, Simpson y OBS y se hicieron comparaciones mediante análisis de Kruskal-Wallis de los porcentajes de cada taxón a diferentes niveles en el grupo control y el grupo HT. El análisis de las secuencias se hizo mediante qiime2 y el paquete estadístico R (R Core Team, 2012).

Los primeros resultados indican que ambas muestras son muy similares, aunque es posible detectar tendencias diferentes entre animales control y suplementados con HT. De este modo, aunque el bajo número de muestras hace que los resultados fueran estadísticamente significativos sólo al 90% en el caso del índice ACE a nivel de orden ($p= 0.941$), se mostró que el grupo HT presentaba consistentemente menor biodiversidad en todos los niveles taxonómicos excepto en los de filo y especie, indicando una posible modulación de algunos taxones (Figura 1).

Al realizar la comparación por pares de los porcentajes de los distintos grupos taxonómicos mediante el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis a nivel de

género, sólo se obtuvieron diferencias significativas al 95% en el caso de *Muribaculaceae* gen. (p= 0.042; Figura 2A) y al 90% en el caso de *Mucispirillum* (p= 0.061; Figura 2A), así como de un género del grupo Clostridia_vadinBB60 (p= 0.080) y de otro género no cultivado de la familia *Peptococcaceae* (p= 0,088).

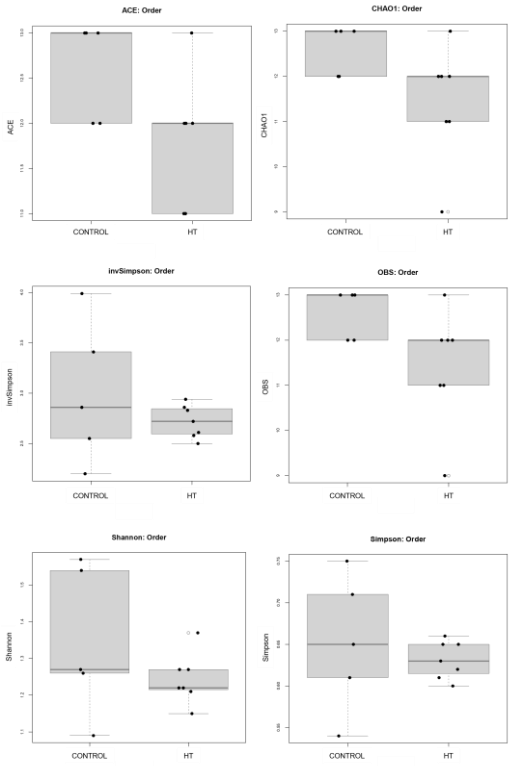


Figura 1: Comparación de los índices de biodiversidad entre el grupo control y el grupo HT a nivel de orden.

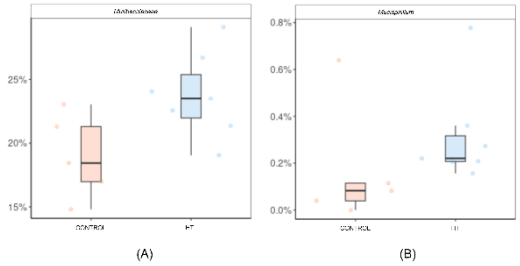


Figura 2: Comparación del porcentaje de los géneros *Muribaculaceae* (A) y *Mucispirillum* (B) entre el grupo control y el grupo HT.

Actualmente continuamos con los análisis de los resultados obtenidos a otros niveles taxonómicos. Estudios más amplios con un número mayor de muestras serán necesarios para encontrar una significación estadística más determinante.

AGRADECIMIENTOS

Soporte técnico y humano proporcionado por el CPEA-SCAI (UJA, MICINN, Junta de Andalucía, FEDER). Proyecto financiado por el Programa Operativo FEDER (2014-2020) y la Consejería de Economía y Conocimiento, Junta de Andalucía (Ref.: 1380831). Los autores agradecen a Euromed SA la donación de HT.

REFERENCIAS

[1] A Peh, JA O'Donnell, BR Broughton and FZ Marques. *Stroke,* **2022**, *53*, 1788-1801.

[2] SB Chidambaram, AG Rathipriya, AM Mahalakshmi, S Sharma, TA Hediyal, B Ray, T Sunanda, W Rungratanawanich, RS Kashyap, MW Qoronfleh, MM Essa, B Song and TM Monaghan. *Cells,* **2022**, *11*, 1239.

[3] N Andújar-Tenorio, A Cobo, AM Martínez-Rodríguez, M Hidalgo, I Prieto, A Gálvez and M Martínez-Cañamero. *Front. Nutr*., **2023**, *10*.

[4] Q Wang, C Wang, N Abdullah, W Tian, Z Qiu, M Song, Y Cao and JJ Xiao. *Agric. Food Chem.,* **2022**, *70*, 2241-2252.

[5] J Calahorra, J Shenk, VH Wielenga, V Verweij, B Geenen, PJ Dederen, MÁ Peinado, E Siles, M Wiesmann and AJ Kiliaan. *Nutrients*, **2019**, *11*, 2430.

[6] Á Naranjo, MJ Álvarez-Soria, P Aranda-Villalobos, AM Martínez-Rodríguez, E Martínez-Lara and E Siles. *Int. J. Mol. Sci.*, **2024b**, *25*, 4799.

DESARROLLO DE UN ZUMO DE PIÑA Y UVA ENRIQUECIDO EN COMPUESTOS BIOACTIVOS REVALORIZADOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Martínez-Zamora L.[1,2], Mozafari L.[1], Soto I.[1], Zapata R.[1], Artés-Hernández F.[1]

1 Grupo de Postrecolección y Refrigeración, Departamento de Ingeniería Agronómica e Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.
2 Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30100 Murcia, España.

lorena.martinez@upct.es

Resumen / Abstract

La mayor parte de los subproductos vegetales en la industria alimentaria se debe principalmente a la eliminación de las partes no comestibles (pieles y cáscaras) durante su manipulación o procesado. Estos subproductos son igualmente ricos en compuestos bioactivos.
El objetivo de este trabajo ha sido formular un zumo de piña y uva enriquecido con extractos de subproductos de granada y limón con una caducidad comercial de 21 días a 5ºC. El zumo de piña y la uva se mezcló en una proporción de 200:50 mL y se añadieron 100 mg/L de los extractos. Los zumos se sometieron a una pasteurización de 1 min a 100 ºC. Durante 21 días a 5ºC se realizaron muestreos para su análisis microbiológico (mesófilos, mohos y levaduras) y físico-químico (pH, color y sólidos solubles totales -SST-). Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu para determinar la cantidad de compuestos fenólicos totales (CFT).
No se encontraron diferencias en la calidad microbiológica, así como en los análisis fisicoquímicos, lo que demuestra que la adición de extractos revalorizados no alteró la calidad de estos zumos. La concentración en CFT mostró una tendencia descendente entre 0 y 21 días, así como en los zumos pasteurizados, debido a la degradación por el paso del tiempo y el tratamiento térmico. Además, se observó que los zumos con extractos de granada tienen un mayor contenido en CFT que el resto de muestras.
Por tanto, en el escenario actual de desarrollo de una economía circular, se ha desarrollado una bebida de fruta segura y novedosa enriquecida en compuestos bioactivos revalorizados a partir subproductos hortofrutícolas. Además, no se han encontrado diferencias con las muestras comerciales, lo que demuestra el potencial de este producto para alcanzar nuevos mercados.

Palabras clave / Keywords

Desperdicio alimentario, bebida vegetal, co-productos, Clean label, extractos; polifenoles.

La mayoría del desperdicio de vegetales se debe, entre otras razones, a desechar partes no deseadas de estos productos, como pieles y cáscaras, donde se concentra la mayor parte de sus compuestos bioactivos. Por ello, es importante extraer estos compuestos de estas partes no comestibles de frutas para revalorizarlos y

utilizarlas en la formulación de otros productos, mejorando sus propiedades antioxidantes, reduciendo residuos y minimizando la contaminación ambiental [1]. El objetivo de este trabajo fue crear un zumo de piña y uva pasteurizado y enriquecido con subproductos de granada y limón, con una vida útil de 21 días a 5ºC.

Para ello, los subproductos analizados fueron obtenidos a partir de la liofilización y molienda de pieles de limón y granada. La piña y la uva se licuaron en una Robot Coupe J80 Ultra en una proporción de 200:50 mL, y se añadieron 100 mg/L de los extractos. Estos zumos fueron sometidos a un proceso de pasteurización de 1 minuto a 100 ºC. Se evaluó la vida útil de 21 días a 5ºC realizando un análisis microbiológico y midiendo el pH, el color y los sólidos solubles totales (SST). Para determinar la cantidad de compuestos fenólicos totales (CFT) en zumos se utilizó el método de Folin-Ciocalteu [2] expresándose en mg de ácido gálico equivalentes (GAE)/ 100 mL.

Los resultados medios obtenidos del análisis físico-químico se muestran en la Tabla 1, no encontrándose diferencias entre los distintos días de muestreo.

Tabla 1: Resultados del análisis físico-químico durante los 21 días de vida útil.

pH	SST	Color		
		L*	a*	b*
3,4±0,0	15,6±0,1	34,7±0,6	-0,3±0,1	8,9±0,1

*SST: sólidos solubles totales. No se encontraron diferencias entre los tratamientos ni entre los días de muestreo.

Del mismo modo, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a la carga microbiológica de microorganismos mesófilos (2,28±0,25 UFC/mL) y mohos y levaduras (3,27±0,26 UFC/mL).

Por otra parte, en la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos para la concentración de CFT por cada 100 mL de zumo. Como se aprecia, a lo largo del tiempo se produce un leve incremento de CFT, aunque las muestras más ricas en los mismos fueron aquellas enriquecidas en extracto de granada (un 25-40% más que el CTRL), seguidas de las muestras de limón, aunque estas no mostraron resultados tan significativos. Estos resultados pueden justificarse dado el alto contenido en punicalagina de las pieles de granada utilizadas como subproducto [1].

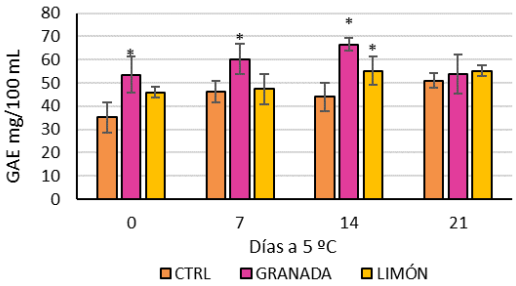


Figura 1: Resultados del análisis compuestos fenólicos durante los 21 días de vida útil. *muestran diferencias significativas (p<0,05) en comparación al CTRL.

Como conclusión, estos extractos mejoraron el contenido en CFT, sin alterar la calidad microbiológica, físico-química y sensorial del zumo de piña y uva elaborado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el proyecto PID2021-123857OB-100, financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y a la Fundación Séneca, bajo la ayuda PRTR-C17.I1, financiada por EU NextGenerationEU/PRTR (AGROALNEXT). Martínez-Zamora, L. agradece el contrato postdoctoral Margarita Salas por la Universidad de Murcia financiado por el fondo europeo NextGenerationEU.

REFERENCIAS

[1] M., Cano-Lamadrid, L., Martínez-Zamora, N., Castillejo, F., Artés-Hernández. *Foods*, **2022**, *11(17).*

[2] L., Martínez-Zamora, N., Castillejo, F., Artés-Hernández. *Horticulturae*, **2021***, 7(567).*

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO CON *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* EN MEDIO DE CULTIVO LÁCTEO

M. Victoria-Sanes[1], A. Sevillano[1], A. López-Cánovas[1], G.B. Martínez-Hernández[1], A. García-González[2], A. López-Gómez.[1*]

1 Grupo de Ingeniería del Frío y de la Seguridad Alimentaria, Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. P° Alfonso XIII, 48, 30203-Cartagena (Murcia, España).
2 Martínez Nieto S.A. Av. del Carbono, 96, 30369-Cartagena (Murcia, España).

Antonio.lopez@upct.es

Resumen / Abstract

Los probióticos son microorganismos capaces de producir efectos beneficiosos sobre la salud. Además, la mayoría de ellos producen ácido hialurónico (HA), que, a su vez, también tiene efectos saludables muy apreciados, por ejemplo, en la piel. Kluyveromyces marxianus es una levadura de grado alimentario que destaca por su termotolerancia y rápida tasa de crecimiento, que la hacen atractiva para diferentes aplicaciones industriales alimentarias y biotecnológicas. En este trabajo se ha optimizado el tiempo de crecimiento en la fase de activación a 30 °C (en caldo Potato Dextrose Broth; PDB) y posterior crecimiento a 30 °C en leche, para maximizar la producción de HA. Se observó que el crecimiento de esta levadura permaneció constante tras 20 h, y hasta 100 h, alcanzando unos niveles de 7,5±0,2 log UFC mL^{-1} a 37 °C. K. marxianus fue capaz de producir 61,2±53,2 mg L^{-1} de ácido hialurónico tras 100 h en cultivo lácteo tras una activación de 40 h en PDB. Como conclusión, son necesarias incubaciones de K. marxianus de 100 h a 30 °C para alcanzar niveles máximos de biosíntesis de HA.

Probiotics are microorganisms capable of producing beneficial effects on health. In addition, most of them produce hyaluronic acid (HA), which, in turn, also has highly appreciated healthy effects, for example on the skin. Kluyveromyces marxianus is a food-grade yeast that stands out for its thermotolerance and rapid growth rate, which make it attractive for different food and biotechnological industrial applications. In this work, the growth time has been optimized in the activation phase at 30 °C (in PDB broth) and subsequent growth at 30 °C in milk, to maximize HA production. It was observed that the growth of this yeast remained constant after 20 h, and up to 100 h, reaching levels of 7.5±0.2 log CFU mL^{-1} at 37 °C. K. marxianus was able to produce 61.2±53.2 mg L^{-1} of hyaluronic acid after 100 h in dairy culture after a 40-h activation in PDB. In conclusion, incubations of K. marxianus of 100 h at 30 °C are necessary to achieve maximum levels of HA biosynthesis.

Palabras clave / Key words

Probiótico, levadura, ácido hialurónico, / probiotic, yeast, hyaluronic acid

1 INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos con capacidades beneficiosas para la salud. Así, los probióticos son capaces de actuar previniendo enfermedades y produciendo efectos beneficiosos como un descenso de los niveles de tensión arterial, colesterol, etc. entre otros muchos. Esto lo consiguen los probióticos principalmente inhibiendo el crecimiento de bacterias patogénicas en el intestino, aunque también mediante la biosíntesis de compuestos beneficiosos para la salud (1) Normalmente, un producto probiótico debe contener más de 10^7 CFU g^{-1} de células probióticas viables. Por ello, es necesario optimizar el crecimiento de estos probióticos para alcanzar dichos niveles (tiempo y temperatura de incubación, medio de cultivo, etc.).

Las levaduras son organismos unicelulares fúngicos e incluyen un gran número de microorganismos empleados en campos como la medicina y la industria alimentaria. Se agrupan en dos *filos* dentro del reino *fungi*, denominados *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Los principales beneficios obtenidos de las levaduras se basan en sus efectos probióticos, biodegradación del ácido fítico, biofortificación del folato, degradación de micotoxinas y absorción de micotoxinas. *Kluyveromyces marxianus* es una levadura que destaca por tener características interesantes como termotolerancia, alta tasa de crecimiento, secreción de enzimas líticas, capacidad de asimilar varios azúcares o producción de etanol por fermentación, entre otros. Estas características hacen que sea utilizada con numerosos fines comerciales. Además, esta especie de levadura es un microorganismo dietético reconocido como GRAS (*Generally recognized As Safe*) según la *Food and Drug Administration* (2).

Los microorganismos GRAS están siendo considerados como candidatos para producir ácido hialurónico (HA) de manera segura, de forma alternativa a otros microrganismos que lo producen pero que son patógenos. Pero, existen pocos estudios que analicen el empleo de levaduras, como las del género *kluyveromyces*, para producir HA (3). Este compuesto bioactivo posee unas características físicas, químicas y biológicas que hacen que tenga un gran valor en el mercado de productos sanitarios y cosméticos.

El crecimiento de numerosos microorganismos probióticos se lleva a cabo en caldos de cultivo a base de leche pues son más completos que los medios sintéticos para este tipo de microorganismos (4).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el crecimiento de *K. marxianus* en una primera fase de activación en caldo de dextrosa de patata (PDB) y posteriormente su crecimiento en leche, y su influencia en la producción de HA.

2 METODOLOGÍA

2.1 *Estudio del crecimiento de "Kluyveromyces marxianus"*

Se llevó a cabo un estudio del efecto del tiempo de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* en dos etapas: 1) activación en caldo de dextrosa de patata (PDB) y 2) crecimiento en leche (Fig. 1). Para ello, la cepa de *K. marxianus* se activó mediante inoculación en 10 mL de caldo PDB (sin agitación) a 30 °C hasta 60 h con diferentes tiempos de muestreo. Seguidamente, se

transfirieron 0,5 mL de dicho cultivo en 200 mL de leche desnatada en polvo reconstituida (8 % en agua destilada estéril) y se estudió su crecimiento hasta las 100 h. A continuación, se realizaron las siembras pertinentes en medio MRS (De Man, Rogosa y Sharp agar) y se incubaron a 37 °C 48 h. El recuento de colonias se expresó como logaritmo de unidades formadoras de colonias por mL (log UFC mL^{-1}).

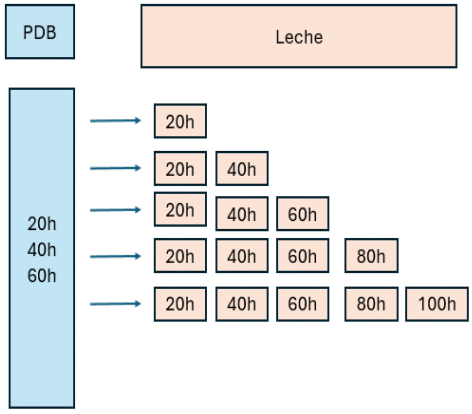


Figura 1: Diseño experimental para la optimización del tiempo de activación (20-60h) en caldo PDB (*potato dextrose broth*) y del crecimiento posterior (20-100 h) en leche desnatada reconstituida al 8 %.

2.2 *Análisis del contenido de ácido hialurónico*

El HA fue extraído y analizado como se muestra a continuación basado en el método de (5), con varias modificaciones como se describe a continuación (Fig. 2). Primeramente, se centrifugaron 10 mL de la leche (tras la fase de crecimiento correspondiente) a 27.000×*g* durante 40 min y 4 °C. Después, 4 mL del sobrenadante se mezcló con 9,5 mL de etanol absoluto frío (4 °C) y se dejó coagular/precipitar 1 h en condiciones de refrigeración. Posteriormente, se procedió a centrifugar las muestras bajo las condiciones previamente descritas. El *pellet* (que contiene el HA) fue lavado dos veces con 4 mL de 1,5 M NaCl y 9,5 mL de etanol absoluto frío. Finalmente, las muestras se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y se resuspendió el *pellet* lavado en 10 mL de agua destilada para el posterior análisis de este extracto de HA.

La determinación del contenido de HA se realizó en base al método turbidimétrico con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) según la metodología de (6), con algunas modificaciones como se detalla a continuación. A 1,5 mL del extracto anterior de HA se añadieron 3,5 mL de etanol absoluto y se agitó vigorosamente en vórtex durante 10 s. Posteriormente, y con el fin de que el HA precipitase, las muestras se incubaron durante 1 h a 4 °C. Tras la incubación, se descartó el sobrenadante y el *pellet* obtenido se resuspendió en 7,5 mL de agua destilada, procediéndose de nuevo a su agitación en vórtex.

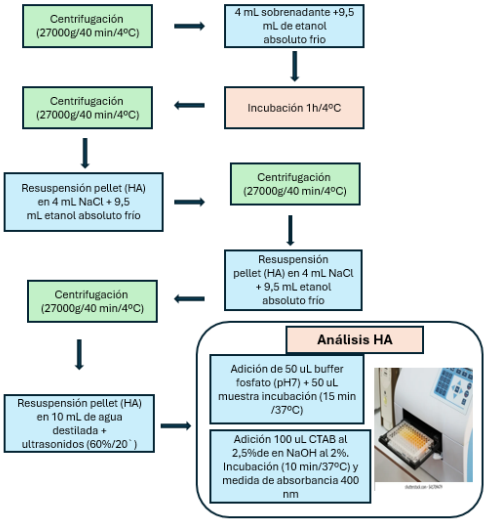


Figura 2: Determinación de ácido hialurónico en medios de fermentación a base de leche. Método modificado a partir de (5)

Seguidamente se introdujeron 50 µL del extracto anterior en una microplaca de 96 pocillos, donde previamente se había agregado 50 µL de 0,1 M buffer fosfato (pH 7). A continuación, la placa se agitó dentro del lector de microplacas (Infinite M Plex 200 PRO, Tecan Trading AG; Männedorf, Suiza) y se mantuvo durante 15 min a 37 °C en dicho lector de microplacas. Transcurrido dicho tiempo, se añadieron 100 µL del reactivo CTM (CTAB preparado al 2,5 % en una solución de NaOH (al 2%)), se agitó de nuevo la placa durante 10 s dentro del lector y se llevó a cabo la reacción durante 10 min a 37 °C. Finalmente, se midió la turbidez mediante absorbancia a 400 nm en el lector de microplacas. Para la cuantificación del contenido de HA se empleó una curva patrón de HA con concentraciones de entre 0 y 0,5 mg/mL.

3 RESULTADOS

3.1 *Estudio de diferentes condiciones de activación/crecimiento en "Kluyveromyces marxianus"*

Los resultados obtenidos muestran que, a diferencia de las activaciones de 20 y 40 h, una activación más prolongada (60 h) en caldo PDB de *K. marxianus* da lugar a un crecimiento menor posterior en leche, con valores de 7,6±0,11, 7,8±0,1 *y* 7,5±0,1 para las muestras activadas en caldo PDB 20, 40 y 60 h, respectivamente (Fig. 3). Se observa claramente que los recuentos comienzan a disminuir durante el crecimiento en leche ya a las 80 h para las muestras activadas en caldo PDB durante 20 y 60 h. Sin embargo, una activación en caldo PDB intermedia de 40 h permite que los recuentos de *K. marxianus* no se vean afectados durante su crecimiento en leche hasta las 100 h.

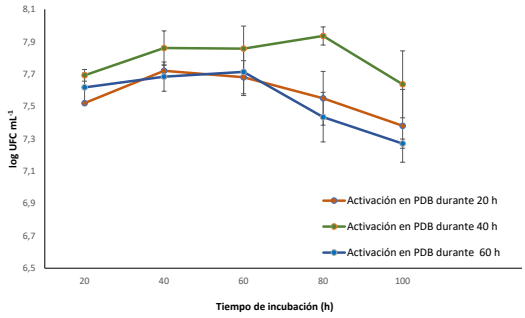


Figura 3: Crecimiento a 30 °C de *Kluyveromyces marxianus* en leche (20-100 h), previamente activado en caldo PDB a diferentes tiempos (20, 40 y 60 h). Se representan valores promedio (n=3)±desviación estándar.

3.2 *Efecto de diferentes condiciones de activación/crecimiento sobre el contenido de ácido hialurónico de "Kluyveromyces marxianus"*

La producción de HA se mantuvo en niveles de 20-80 mg L^{-1} (Tabla 1). Se observa claramente que los tiempos de activación más largos en caldo PDB (60 h) consiguen más rápidamente altos niveles de producción de HA tras solo 40 h de crecimiento en leche. Aun así, tiempos de activación en caldo PDB inferiores (20-40 h) mostraron niveles similares de HA tras 80 h de crecimiento en leche.

Tabla 1: Producción de ácido hialurónico durante el crecimiento a 30 °C de *Kluyveromyces marxianus* en leche (20-100 h), previamente activado en caldo PDB a diferentes tiempos (20-60 h). Se representan valores promedio (n=3)±desviación estándar.

Activación PDB (h)	Crecimiento en leche (h)	Producción HA (mg/L)
20	20	23±20
	40	45,5±25,9
	80	50,1±41,5
	100	40,9±21,9
40	20	20±10
	40	22,1±14,6
	80	39,8±36,8
	100	61,2±53,2
60	20	20±10
	40	53,3±30,4
	80	54,4±67,2
	100	41,5±48,5

4 CONCLUSIONES

Se observó un mayor crecimiento en leche de *K. marxianus* realizando una activación previa en caldo PDB durante 40 h. Además, una activación de 40 h en PDB a 30 °C permitió alcanzar contenidos de HA de 61 mg L^{-1} con 40-80 h de crecimiento en leche a 30 °C en leche.

Sin embargo, el bajo peso molecular del HA producido con *K. marxianus* (del orden de 30.000 Da; datos no mostrados), hace necesario plantear futuros estudios de su modificación genética, para conseguir HA de alto peso molecular (superior a 1 MDa).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico y la Innovación, Madrid) ref. IDI-20211211.

REFERENCIAS

1. Doğan M, Tekiner IH, DemirkesenBiçak H. Probiotics From Food Products and Gastrointestinal Health. In: Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases: Foods, Nutrients, and Dietary Supplements. 2019.

2. Homayouni-Rad A, Azizi A, Oroojzadeh P, Pourjafar H. Kluyveromyces marxianus as a Probiotic Yeast: A Mini-review. Curr Nutr Food Sci. 2020;16(8).

3. Gomes AMV, Netto JHCM, Carvalho LS, Parachin NS. Heterologous hyaluronic acid production in kluyveromyces lactis. Microorganisms. 2019;7(9).

4. Lew LC, Gan CY, Liong MT. Dermal bioactives from lactobacilli and bifidobacteria. Ann Microbiol. 2013;63(3).

5. Vázquez JA, Montemayor MI, Fraguas J, Murado MA. High production of hyaluronic and lactic acids by Streptococcus zooepidemicus in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishing by-products. Biochem Eng J. 2009;44(2–3).

6. Oueslati N, Leblanc P, Harscoat-Schiavo C, Rondags E, Meunier S, Kapel R, et al. CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid in complex environments and under cross-linked form. Carbohydr Polym. 2014;112.

ELIMINACIÓN DE ESPOROS EN LECHE COMERCIAL EN POLVO PARA PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS INACTIVADOS

A. Sevillano-Lozano[1], M.T. Gómez-Hernández[1], M. Victoria-Sanes[1], A. López-Cánovas[1], A. García-González[2], M. Barón-Yusty[1], G.B. Martínez-Hernández[1], A. López-Gómez[1*]

[1] Grupo de Ingeniería del Frío y de la Seguridad Alimentaria, Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. P. Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena (Murcia, España).
[2] Martínez Nieto S.A., Av. del Carbono, 96, 30369 Cartagena (Murcia, España).

antonio.lopez@upct.es

Resumen / Abstract

La leche en polvo comercial puede contener esporos que pueden limitar su uso como medio de cultivo para la producción de paraprobióticos, que se definen como células probióticas no viables, intactas o lisadas, pero con propiedades beneficiosas para la salud que pueden ser similares a las de probióticos. En una primera fase de este trabajo se estudió la obtención de un medio de cultivo óptimo libre de esporos para obtener el máximo rendimiento en biomasa de probiótico y en determinados metabolitos interesantes para la salud. Una vez optimizada la composición de dicho medio de cultivo, en la segunda fase de este trabajo de investigación se optimizaron los tratamientos térmicos y de altas presiones hidrostáticas (HPP) para inactivar los probióticos obtenidos en ese medio, y así obtener un paraprobiótico. Así, se estudiaron diferentes métodos de inactivación por calor (temperaturas de 80 a 90 °C; y tiempos hasta de 90 min) o con HHP (400 y 500 MPa; y tiempos de 10 a 20 min) de las cepas L. rhamnosus y L. acidophilus cultivadas en medio de leche en polvo reconstituida (8 %). Un tratamiento térmico de 100 °C durante 10 min inactivó los esporos presentes en ese medio de cultivo a base de leche en polvo reconstituida. Tratamientos durante 80 min a 80 °C y 90 °C consiguieron los mayores niveles de inactivación de L. acidophilus y L. acidophilus, respectivamente, mientras que un tratamiento de HPP a 500 MPa/20 min fue más efectivo para ambos microorganismos. En conclusión, este estudió ofrece un procedimiento para obtener un medio de cultivo a base de leche en polvo reconstituida para probióticos, y las condiciones óptimas de inactivación posteriores para obtener los correspondientes paraprobióticos.

Commercial milk powder may contain spores that may limit its use as a culture medium for the production of paraprobiotics, which are defined as non-viable, intact or lysed probiotic cells, but with beneficial health properties that may be similar to those of probiotics. In the first phase of this work, obtaining an optimal spore-free culture medium was studied to obtain maximum performance in probiotic biomass and certain metabolites of interest to health. Once the composition of said culture medium was optimized, in the second phase of this research work, the thermal and high hydrostatic pressure (HPP) treatments were optimized to inactivate the probiotics obtained in that medium, and thus obtain a paraprobiotic. Thus, different inactivation methods by heat (temperatures of 80 to 90 °C; and times of up to 90 min) or by HHP (400 and 500 MPa; and times of 10 to 20 min) were studied on the strains L. rhamnosus and L. acidophilus cultured in reconstituted milk powder medium (8%). A heat treatment of 100 °C for 10 min inactivated the spores present in this culture medium based on reconstituted powdered milk. Treatments for 80 min at 80 °C and 90 °C achieved the highest levels of inactivation of L. acidophilus and L. acidophilus, respectively, while a HPP treatment at 500 MPa/20 min was more

effective for both microorganisms. In conclusion, this study offers a procedure to obtain a culture medium based on reconstituted powdered milk for probiotics, and the optimal subsequent inactivation conditions to obtain the corresponding paraprobiotics.

Palabras clave / Key words

Paraprobiótico, inactivación, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*/ Paraprobiotic, inactivation, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos se definen como microorganismos que en las cantidades adecuadas pueden ejercer un efecto beneficioso sobre la salud. Además, también deben estar catalogados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*), tener capacidad de adhesión a la mucosa intestinal, poseer cierta resistencia a antibióticos y actividad contra microorganismos patógenos. Existe una gran diversidad de probióticos, sin embargo, los más utilizados son cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (*1*). Además, algunas especies como *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus* son de gran interés por tratarse de microorganismos GRAS capaces de producir ciertos metabolitos beneficiosos para la salud intestinal.

Los paraprobióticos son células microbianas no viables, intactas o lisadas, que conservan las propiedades beneficiosas de los probióticos (*2*). Actualmente, ha aumentado el interés en dichos paraprobióticos por su mayor estabilidad y menores requerimientos de conservación, así como por implicar una mayor seguridad clínica, permitiendo su uso en personas inmunodeprimidas, ya que las posibles reacciones adversas se reducen (*3*, *4*). La obtención de los paraprobióticos pasa por la inactivación del probiótico mediante un tratamiento adecuado [térmico, altas presiones hidrostáticas (HPP), etc.] que no afecte a las propiedades del mismo (*3*).

El cultivo de los probióticos para su crecimiento se suele realizar en leche en lugar de caldos de cultivo específicos sintéticos, pues la complejidad de componentes de la leche es completa para un óptimo crecimiento de los probióticos (*5*). En concreto, la leche en polvo ofrece las ventajas de una larga vida útil, reducido espacio de almacenamiento y transporte, etc., además de su rápida reconstitución con agua para su uso como medio de cultivo la hace idónea en estos procesos. Sin embargo, los procesos de producción de la leche en polvo pueden permitir la presencia de formas de resistencia (esporos), que, aunque no supongan un riesgo para la salud, son una fuente de contaminación cuando se usan como medios de cultivo para biofermentaciones con microorganismos específicos.

Este trabajo tiene como objetivos: i) determinar las condiciones óptimas de inactivación de esporos de leche en polvo reconstituida, y ii) optimizar el tratamiento de inactivación (térmica o con HHP) de los probióticos (*L. rhamnosus* y *L. acidophilus*), cultivados en el citado medio de leche en polvo reconstituida, para obtener los correspondientes paraprobióticos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. *Medios de cultivo, microorganismos y su activación*

Se usó leche de vaca desnatada en polvo obtenida de un supermercado local (Cartagena, España) con una composición (según especificaciones del fabricante) de: 1 % grasa, 54,5 % hidratos de carbono, 32,5 % proteínas, 1,2 % calcio y 1,3 % sal.

Los probióticos utilizados para estos estudios fueron *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus*, ambas cepas seleccionadas debido a su capacidad de producción de determinados metabolitos interesantes para la salud intestinal. Dichos microorganismos fueron activados previamente según indicaciones correspondientes de las colecciones correspondientes de cultivos tipo.

2.2 *Eliminación de esporos del medio de cultivo de leche*

Se utilizó como medio de cultivo la leche en polvo reconstituida al 8 % (peso:volumen) en agua estéril. Dicho medio de cultivo sin inocular fue incubado a 37 °C durante 20 h en agitación a 160 rpm, y se hicieron los recuentos microbiológicos (ver apartado 2.4) a tiempo 0 y tras las 20 h. Además, se observó el cultivo tras la incubación al microscopio óptico de contraste de fases (mod. Crossbean 350, ZEISS; Jena, Alemania).

Para eliminar los esporos observados se estudió el efecto de tratamientos térmicos suaves (100 °C a distintos tiempos) que no afectase a los componentes nutricionales de la leche necesarios para el cultivo de los probióticos. Posteriormente, se incubó la leche tratada (100 °C/10 min), así como un control (leche sin tratar). Se hicieron entonces los recuentos microbiológicos correspondientes.

2.3. *Crecimiento del probiótico sobre el medio de cultivo tratado libre de esporos*

Se realizó la inoculación de las cepas activadas de los probióticos en el medio de cultivo (1 % de volumen microorganismo activo/volumen medio de cultivo) en un biorreactor (con módulos mod. ADI 1030, comunicación ADI 1035 BioConsola, motor mod. P310, rotor de agitación tipo pala y sonda de temperatura mod. PT100; AppliKon; Maharashtra, India) a 37 °C durante 20 h en agitación a 160 rpm. Se hicieron los recuentos microbiológicos tras la incubación de 20 h.

2.4. *Inactivación del probiótico: obtención del paraprobiótico*

La inactivación de los cultivos (tras 20 h) de *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* para obtener los paraprobióticos se realizó por calor y HPP. Previamente a los tratamientos, 20 mL del cultivo (tras 20 h) se distribuyó en bolsas tipo *stomacher* que se sellaron térmicamente con una selladora manual (mod. A785100000, Alfa; Guipuzcua, España) eliminando el aire del interior.

Para el tratamiento térmico, las bolsas conteniendo el cultivo se trataron en un baño termostático (mod. 6000140, J.P. SELECTA, S.A.; Barcelona, España) a 80 °C y 90 °C, durante tiempos de hasta 90 min, extrayendo muestras de bolsas cada 10 min.

En el caso de los tratamientos de inactivación por HPP, se utilizó un equipo HPP (con vaso portamuestras de 2000 mL; Stansted Fluid Power L.T.D.; Harlow, Reino Unido) ubicado en el Instituto de

Biotecnología Vegetal (Cartagena, España). Los tratamientos HPP estudiados fueron 400/500 Mpa durante 10, 15 o 20 min (en base a estudios preliminares, datos no mostrados).

2.4. *Recuentos microbiológicos*

Los recuentos microbiológicos de las muestras de los cultivos se realizaron mediante diluciones seriadas en agua de peptona tamponada y posterior cultivo en superficie sobre agar MRS (De Man, Rogosa y Sharp agar), que fueron entonces incubadas a 37 °C durante 48 h en aerobiosis. Los resultados se expresaron en log de unidades formadoras de colonias por mL (log UFC mL^{-1}).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. *Efecto del tratamiento térmico previo del medio de cultivo*

Antes de este estudio, la leche reconstituida no se trató térmicamente debido a que los procesos habituales de esterilización (121 °C, 15 min) de los medios de cultivo producían procesos de caramelización de la leche. Igualmente, los medios de cultivo a base de leche en polvo reconstituida usados para cultivos con probióticos en publicaciones anteriores [5] tampoco se trataban térmicamente previamente al cultivo.

La leche reconstituida inoculada con los probióticos en nuestro estudio, y posteriormente inactivada, mostraba aun así recuentos de unas colonias típicas de esporulados (Fig. 1). Entonces, se realizó la incubación de leche reconstituida sin inocular y se observó la misma tipología de colonias. Dichas colonias se observaron al microscopio de contraste de fases (Fig. 2) y se observó la tipología de dichas formas esporuladas.

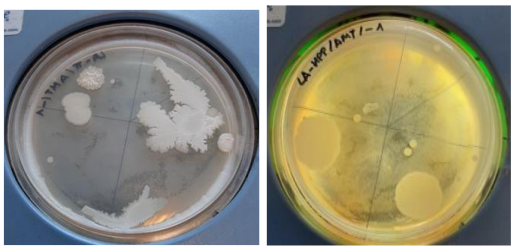


Figura 1: A) Cultivo de medio de leche inoculada con *Lactobacillus acidophilus* (37 °C/20 h 160 rpm) y posteriormente inactivado térmicamente. B) Cultivo de medio de leche inoculada con *L. acidophilus* (37 °C/20 h 160 rpm) y posteriormente inactivado por altas presiones hidrostáticas.

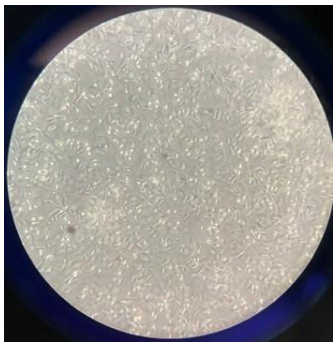


Figura 2: Cultivo de medio de leche inoculada con *Lactobacillus acidophilus* (37 °C/20 h 160 rpm) y posteriormente inactivado observado al microscopio de contraste de fases.

En base a estudios preliminares de inactivación térmica, se obtuvo que un tratamiento suave a 100 °C durante 10 min fue capaz de obtener unos recuentos microbiológicos por debajo del límite de detección (<1 log UFC/mL), eliminando así la presencia de esporos.

3.2. *Inactivación del probiótico*

Los resultados de inactivación obtenidos muestran una mayor inactivación térmica de L. rhamnosus a 90 °C tras 80 min, aunque dichos recuentos aun estuvieron alrededor de 3 log UFC/mL (Fig. 3A). En cambio, el tratamiento más suave de 80 °C/80 min sí

fue efectivo para inactivar L. acidophilus (Fig. 3B).

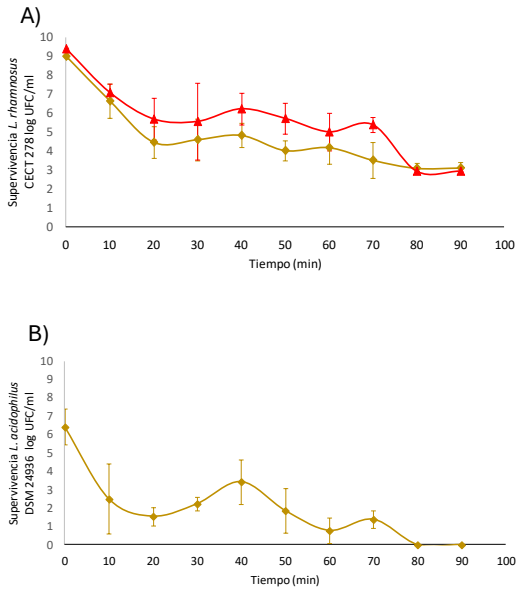


Figura 3: (A) Inactivación térmica de *Lactobacillus rhamnosus* y (B) *Lactobacillus acidophilus* a 90 °C (■) y 80 °C (■) hasta 90 min (valores promedios(n=3)±desviación estándar).

La inactivación por HPP demostró ser un método efectivo tanto para *L. rhamnosus* como para *L. acidophilus* (Fig. 4). En el caso de *L. acidophilus*, la aplicación tanto de 400 como 500 MPa fue eficaz a los 10 min, con total ausencia de recuentos a los 20 min (Fig. 4). Para *L. rhamnosus* también se observó una elevada inactivación a 400-500 MPa tras 10 min que se redujo a niveles mínimos (por debajo del límite de detección) tras 20 min a 500 MPa (Fig. 3). De forma interesante, la alta resistencia de *L. rhamnosus* (previamente observada para los tratamientos térmicos) hizo que el tratamiento de 400 MPa fuera insuficiente incluso con una reactivación tras 15 min (Fig. 3).

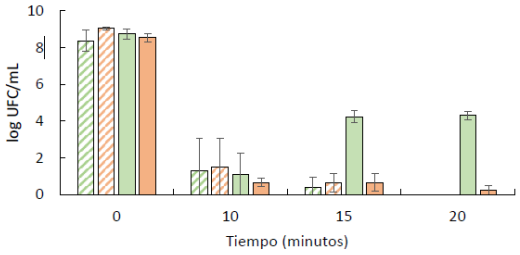


Figura 4: Inactivación por altas presiones hidrostáticas de *Lactobacillus acidophilus* (barras con rayas) y *Lactobacillus rhamnosus* (barras sólidas) a 400 MPa (■) y 500 MPa (■) tras 0, 10, 15 y 20 min (valores promedios(n=3)±desviación estándar).

4. CONCLUSIONES

El tratamiento térmico de 100 °C/10 min de la leche en polvo reconstituida, como medio de cultivo, ha demostrado ser un método efectivo para la eliminación de microorganismos y formas resistentes de los mismos. De esta manera, se pone de manifiesto la importancia de tratar térmicamente las leches en polvo comerciales cuando se usen como medio de cultivo en cualquier ensayo.

Para la producción de los paraprobióticos de *L. acidophilus* y *L. acidophilus*, los tratamientos térmicos durante 80 min a 80 °C y 90 °C, respectivamente, consiguieron las mayores reducciones de estos microorganismos. Sin embargo, un tratamiento de HPP de 500 MPa durante tan solo 20 min consiguió inactivar dichos microorganismos, con recuentos por debajo del límite de detección.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico y la Innovación, Madrid) ref. IDI-20211211.

REFERENCIAS

1. M. Bielecka, Probiotics in food. *Chem. Funct. Prop. Food Components, Third Ed.*, 413–426 (2006).

2. V. Taverniti, S. Guglielmetti, The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: Proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* **6** (2011), pp. 261–274.

3. T. Teame, A. Wang, M. Xie, Z. Zhang, Y. Yang, Q. Ding, C. Gao, R. E. Olsen, C. Ran, Z. Zhou, Paraprobiotics and Postbiotics of Probiotic Lactobacilli, Their Positive Effects on the Host and Action Mechanisms: A Review. *Front. Nutr.* **7** (2020), doi:10.3389/fnut.2020.570344.

4. M. R. Oggioni, G. Pozzi, P. Galieni, P. E. Valensin, C. Bigazzi, Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of Bacillus subtilis [2]. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 325–326 (1998).

5. L. C. Lew, C. Y. Gan, M. T. Liong, Dermal bioactives from lactobacilli and bifidobacteria. *Ann. Microbiol.* **63**, 1047–1055 (2013).

Universidad
Politécnica
de Cartagena

ediciones
UPCT