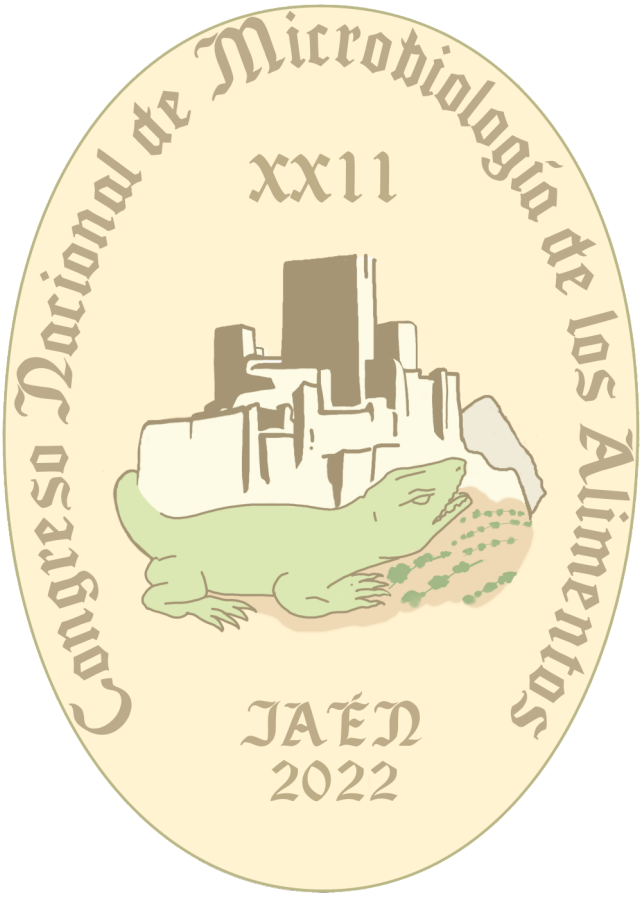


Microbiología de los Alimentos bajo el concepto de One Health

Libro de Comunicaciones

Universidad de Jaén

Microbiología de los Alimentos
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA

Microbiología de los Alimentos bajo el concepto de One Health

Libro de Comunicaciones

Universidad de Jaén

Microbiología de los Alimentos
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA

Editores:
Magdalena Martínez Cañamero, Rosario Lucas López, Elena Ortega Morente, Rubén Pérez Pulido, Mª José Grande Burgos, Antonio Cobo Molinos y Antonio Gálvez del Postigo Ruiz
©De los textos:
Sus autores
Diseño de cubierta:
Elena Yañez
ISBN: 978-84-09-45137-1
1.ª edición: septiembre de 2022

Bienvenida

Estimados/as compañeros/as:

Es una enorme satisfacción recibiros en el XXII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos de la SEM en la Universidad de Jaén. Es la primera vez que un congreso de la Sociedad Española de Microbiología se realiza en nuestra ciudad y todo el equipo de "Microbiología de los Alimentos y del Medio Ambiente" estamos trabajando para que sea una experiencia inolvidable al igual que ha ocurrido en las ediciones anteriores.

Hemos querido proyectar la transversalidad de nuestro grupo al programa científico y por ello esta edición está pensada desde la perspectiva global e inclusiva del enfoque "One Health", con sesiones más clásicas y otras novedosas en las que se puedan sentir identificados el mayor número de investigadores. Todo ello en las instalaciones del campus de las Lagunillas de la Universidad de Jaén, una institución joven que acaba de celebrar sus primeros 25 años y que se congratula de ofrecer sus modernas infraestructuras a nuestra Sociedad.

La ciudad de Jaén es una gran desconocida, por ello os ofrecemos también un programa cultural que incluye una visita guiada por el centro histórico, sumiéndonos en sus leyendas y misterios, así como una inmersión en el mundo del aceite de oliva, del que nuestra provincia es la principal productora mundial con un mar de 66 millones de olivos que se pierde en el horizonte. Como podéis observar, en nuestro logo hemos querido incluir todos estos elementos. Además de la presencia de los olivares, domina el diseño el Castillo de Jaén, que puede divisarse desde prácticamente todos los puntos de la ciudad y que alberga el único establecimiento hotelero que conocemos con una investigación oficial por fenómenos extrasensoriales. También tiene un papel principal el famoso Lagarto de Jaén, cuya leyenda data de tiempos inmemoriales y ha sido declarada como uno de los diez Tesoros del Patrimonio Cultural Inmaterial de España. Esta historia está imbricada en innumerables tradiciones y celebraciones, incluso en las más recientes y heterodoxas. Finalmente, es posible que alguien reconozca, en el diseño del logo, el homenaje que hemos querido rendir a una de las bebidas fermentadas alcohólicas más simbólicas de la ciudad, desaparecida un tiempo y recuperada más recientemente y que aún sirve de emblema para muchos movimientos culturales y de reafirmación. Estamos deseando compartir con vosotros estas y muchas otras cosas. Feliz estancia en Jaén.

Comité de Honor

- Excmo. Sr. D. Juan Manuel Moreno Bonilla. Presidente de la Junta de Andalucía
- Sr. D. Juan Gómez Ortega. Rector Magnífico de la Universidad de Jaén
- Ilmo. Sr. D. Julio Millán Muñoz. Alcalde del Excmo. Ayuntamiento de Jaén
- Ilmo. Sr. D. Francisco Reyes Martínez. Presidente de la Excma. Diputación Provincial
- Ilmo. Sr. Jesús Manuel Estrella Martínez. Delegado del Gobierno de la Junta de Andalucía en Jaén
- Sra. Dª. Catalina Madueño Magdaleno. Subdelegada del Gobierno en Jaén
- Sr. Miguel Moreno Carretero. Decano de la Facultad de Ciencias Experimentales
- Sr. Dr. D. Antonio Ventosa Ucero. Presidente de la Sociedad Española de Microbiología
- Sr. Dr. D. Gonzalo Doroteo García de Fernando Minguillón. Presidente del Grupo de Microbiología de Alimentos de la SEM

Comité Organizador

- Presidente: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz
- Vicepresidenta: Magdalena Martínez Cañamero
- Secretaria: Rosario Lucas López
- Tesorera: Elena Ortega Morente
- Vocales:
    - Rubén Pérez Pulido
    - Mª José Grande Burgos
    - Antonio Cobo Molinos
    - Javier Rodríguez López
    - Laura Mena Ordoñez
    - Natalia Andújar Tenorio
    - Mª Belén Iglesias Valenzuela

Comité Científico

- Antonio Gálvez del Postigo Ruiz. Universidad de Jaén
- Magdalena Martínez Cañamero. Universidad de Jaén
- Rosario Lucas López. Universidad de Jaén
- Elena Ortega Morente. Universidad de Jaén
- Rubén Pérez Pulido. Universidad de Jaén
- Mª José Grande Burgos. Universidad de Jaén
- Antonio Cobo Molinos. Universidad de Granada
- Gonzalo Doroteo García de Fernando Minguillón. Universidad Complutense de Madrid
- Pablo Fernández Escámez. Universidad Politécnica de Cartagena
- Rosa del Campo Moreno. Hospital Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria
- José Manuel Guillamón Navarro. IATA-CSIC Valencia
- Susana Langa Marcano. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
- Carlos Alonso Calleja. Universidad de León
- Albert Bordons de Porrata-Doria. Universitat Rovira i Virgili
- Beatriz Martínez Fernández. Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC
- Ignacio Álvarez Lanzarote. Universidad de Zaragoza
- Manuel Ramírez. Universidad de Extremadura

Programa e índice de comunicaciones

Lunes 12 de septiembre

Hora	Sesión	Ponente	Pág
18.00	**Entrega de credenciales y documentación**		
19.00	**Acto Inaugural**		
19.30	**Conferencia Inaugural** Microbiome in the food system: challenges and opportunities	Luca Cocolin (Universidad de Turín)	2
20.30	**Cóctel de Bienvenida. Plaza de los pueblos**		

Martes 13 de septiembre

Hora	Sesión	Ponente / Moderador	Pág
09.00	**Sesión 1 (LT1): Microbiota de materias primas y alimentos.**	Moderador: Beatriz Martínez Fernández (Instituto de Productos Lácteos de Asturias)	
	Uso de fitobióticos, microalgas y enzimas como estrategias en la producción animal	Manuel Martínez Bueno (Universidad de Granada)	4
09.30	**Comunicaciones orales seleccionadas**		
	Estudio de la biodiversidad de bacterias y levaduras de envasados de aceitunas de la variedad aloreña mediante análisis metagenómico	Antonio Benítez Cabello	6
	Estudios de desafío de patógenos alimentarios en envasados de aceituna de mesa	Guiomar Denisse Posada Izquierdo	8
	Distribución de microorganismos entre la superficie y el interior en aceitunas de mesa	Elio López García	10
	Caracterización metagenómica de la población bacteriana y de los genes de resistencia antimicrobiana durante la cadena de producción de salchichón Málaga	Cristina Díaz Martínez	12
	Aplicaciones genómicas en alimentación y nutrición	María Empar Chenoll-Cuadros (Biopolis S.L. Health & Wellness)	
11.00	**Pausa Café y Pósteres**		
11.30	**Sesión 2 (LT4): Fermentaciones alcohólicas.**	**Moderadores: Albert Bordons (Universitat Rovira i Virgili) y Manuel Ramírez (Universidad de Extremadura)**	

	Evolución adaptativa de las levaduras vínicas a ambientes antrópicos: uso para su mejora genética	José Manuel Guillamón Navarro (IATA-CSIC de Valencia)	14
	Microbiología cervecera. Visión práctica de les fermentaciones alcohólicas	Núria Feliu Besora (Mahou-San Miguel)	16
12.30	**Comunicaciones orales seleccionadas**		
	Efecto sinérgico de la combinación de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) con dosis subletales de sulfitos (SO_2) en la inactivación de *Saccharomyces bayanus* y *Brettanomyces bruxellensis* en vino.	Carlota Delso	18
	¿Supone *Aspergillus flavus* un riesgo en los viñedos?	Belén Patiño Álvarez	20
13.00	**Asamblea del Grupo Especializado SEM**		
13.30	**Comida y visita pósteres**		
15.30	**Sesión 3 (LT6): Resistencia a antibióticos. One Health.**	**Moderador: Antonio Gálvez del Postigo (Universidad de Jaén)**	
	Resistencia a los antibióticos desde el enfoque OneHealth. El caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.	Carmen Torres Manrique (Universidad de la Rioja)	22
16.00	**Comunicaciones orales seleccionadas**		
	Propiedades anti-oxidantes, anti-inflamatorias y anti-bacterianas de extractos de hoja de olivo frente a cepas de *Helicobacter pylori* resistentes a antibióticos	José Manuel Silván Jiménez	24
	Caracterización del microbioma y resistoma de industrias de productos cárnicos fermentados.	José Francisco Cobo Díaz	26
	Prevalencia y factores asociados a la colonización de enterobacterales productores de beta-lactamasas de espectro extendido en la provincia de Tarragona (España)	Pedro Moral Parras	28
	Enterobacter cloacae complex productores de beta-lactamasas procedentes de vegetales de consumo directo y su entorno de producción.	Ángel Alegría	30
	Aislamiento, identificación y resistencia a antibióticos de *Enterococcus* spp. en canales de pollo	Lucía Gómez Limia	32

	Estimación por citometría de flujo del porcentaje de supervivencia tras el tratamiento con tetraciclina en células de *Listeria monocytogene*s previamente expuestas o no expuestas a dosis bajas de biocidas	Cristina Rodríguez-Melcón	34
	La adaptación a hipoclorito sódico se asocia con modificaciones en la susceptibilidad a los antibióticos y en el perfil proteómico en *Salmonella* Enteritidis	Camino González Machado	36
	Estudio prospectivo del perfil fenotípico de resistencia a antibióticos en la cadena alimentaria andaluza	Araceli Bolívar Carrillo	38
18.00	**Visita Guiada por Jaén**		

Miércoles 14 de septiembre

Hora	Sesión	Ponente / Moderador	Pág
09.00	**Sesión 4 (LT5): Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias**	**Moderador: Carlos Alonso Calleja (Universidad de León)**	
	Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias. Su importancia en la Salud Pública y la Vigilancia Epidemiológica en Andalucía	Rafael Martínez Nogueras (Hospital Universitario de Jaén. Colegio Oficial de Médicos de Jaén)	40
09.30	**Comunicaciones orales seleccionadas (10+5 min**)		
	Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en salmuera de aceitunas de mesa verdes estilo español o Sevillano	Antonio Valero Díaz	42
	Citotoxicidad en aislados de *Aeromonas* provenientes de productos vegetales frescos y agua de riego.	Alberto Pintor-Cora	44
	Caracterización genotípica de aislamientos de *Staphylococcus aureus* obtenidos a partir de leche y queso	Aitor Atxaerandio Landa	46
	Prevalencia y cuantificación de las células de *Salmonella enterica* de diferentes estados fisiológicos presentes de forma natural en carne de ave	Sarah Panera-Martínez	48

	Detección de genes implicados en la formación de celulosa mediante análisis del pangenoma en aislamientos de *Arcobacter butzleri*	Adrián Salazar Sánchez	50
	Papel que juegan las bacterias viables no cultivables en el agua de lavado y adhesión y recuperación en el producto lavado: ¿Existe un riesgo?	María Isabel Gómez Galindo	
11.00	**Pausa Café y Pósteres**		
11.30	**Sesión 5a (LT2 y LT3): Probióticos, Bacterias Lácticas y Microbiota intestinal.**	**Moderadoras: Susana Langa (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) y Magdalena Martínez Cañamero (Universidad de Jaén)**	
	El doble significado de los probióticos	Leónides Fernández (Universidad Complutense de Madrid)	52
	Modulación de la microbiota intestinal a través de la dieta	Rosa del Campo (Hospital Universitario Ramón y Cajal)	54
12.30	**Comunicaciones orales seleccionadas (10+5 min)**		
	Interacciones bacteriocina-bacteriófago en *Lactococcus*	Claudia Rendueles	56
	Estudio de la actividad bactericida de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias ácido-lácticas aisladas de animales salvajes	Lara Pérez Etayo	58
	Desarrollo de quesos funcionales con extracto de alcachofa y la cepa *Bifidobacterium longum* INIA P132	Antonia Picon	60
	Aplicación de bacterias ácido-lácticas seleccionadas para el biocontrol de *Listeria monocytogenes* en quesos “Torta del Casar”	Irene Martín Tornero	62
11.30	**Sesión 5b (LT7): Seguridad Microbiológica en la Industria Alimentaria. Análisis de riesgos y Microbiología Predictiva.**	**Moderador: Pablo Fernández Escámez (Universidad Politécnica de Cartagena)**	
	Hacia un nuevo paradigma en la concepción del uso de modelos predictivos en la gestión de la seguridad alimentaria	Antonio Valero Díaz (Universidad de Córdoba)	64
12.00	**Comunicaciones orales seleccionadas (10+5 min)**		
	La temperatura y la actividad de agua influyen	Laura Rabasco Vílchez	66

	sobre la probabilidad de germinación de *B. cinerea* en sistemas modelo de fresa.		
	Evaluación de modelos predictivos que consideran la variabilidad de cepas de *Salmonella* spp. expuestas a tratamientos térmicos dinámicos	Alberto Garre	68
	Control de la producción de ocratoxina A de *Aspergillus westerdijkiae* en jamón curado mediante microorganismos autóctonos	Eva Cebrián	70
	Evaluación del efecto antiocratoxigénico de *Debaryomyces hansenii* y *Staphylococcus xylosus* frente a *Penicillium nordicum* en jamón curado	Elia Roncero Benavente	72
	Efecto de agentes de biocontrol sobre la calidad de los embutidos curado-madurados	Micaela Álvarez	74
13.30	**Comida y Pósteres**		
15.30	**Sesión 6 (LT9): Nuevas tecnologías en conservación de alimentos.**	**Moderador: Ignacio Álvarez (Universidad de Zaragoza)**	
	Bioconservantes derivados de bacteriófagos y endolisinas	Pilar García Suárez (Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC)	76
16.00	**Comunicaciones orales seleccionadas (10+5 min)**		
	Ensayos de evolución dan lugar a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a aceite esencial de naranja	Daniel Berdejo Martínez	78
	Evaluación de la eficacia de levaduras del género *Hanseniaspora* para controlar el desarrollo de *B. cinerea* mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles	Alicia Rodríguez Jiménez	80
16.30	**Salida buses. Visita al Museo de la Cultura del Olivo**		
21.00	**Cena de clausura. Restaurante Cerro Puerta**		

Jueves 15 de septiembre

Hora	Sesión	Ponente / Moderador	Pág
9.00	**Sesión 7 (LT8): Biotecnología y Transferencia del Conocimiento. (10+5 min)**	**Moderador: Fco Javier Sallago Bernal (Colegio Oficial de Biólogos)**	
	MALDI Biotyper® e IR Biotyper® - la solución completa de Bruker para la confirmación/identificación y tipado de microorganismos en microbiología de alimentos	Francesc Marquez (Bruker Española)	
	Efecto de la sal sobre el metabolismo de la levadura de alimentos *Debaryomyces hansenii*	Francisco Solano Ruiz Pérez	82
	Debaryomyces hansenii, una levadura con potencial biotecnológico real en la industria alimentaria de embutidos y productos cárnicos curados.	Francisco Javier Ruiz Castilla	84
	Análisis de cepas autóctonas de la levadura *Debaryomyces hansenii* como agentes de biocontrol ante hongos indeseados en productos cárnicos curados.	Helena Chacón-Navarrete	86
	Aplicación de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje como alternativa al método tradicional para la producción de extractos de levadura	Alejandro Berzosa	88
	Desarrollo de un método basado en impedancia para la detección de residuos antibióticos en carne y animal vivo	María Jesús Serrano Andrés	90
	Estudio de la aplicación en seguridad alimentaria de extractos de plantas comunes en la región Mediterránea con capacidad antimicrobiana: una evaluación meta-analítica.	Olga María Bonilla Luque	92
11.00	**Pausa Café**		
11.30	**Acto de clausura. Parlamentos y Entrega de Premios**		
	El software científico de código abierto - una herramienta para poner métodos matemáticos complejos al alcance de l@s microbiólog@s de alimentos	Alberto Garre	94
	Bioinformatic investigation of microbiota and antibiotic resistance occurrence from farm to	Narciso Martín Quijada	96

humans by using highthroughput DNA sequencing approaches		
Aislamiento y caracterización de variantes genéticas bacterianas resistentes como herramienta de estudio para la mejora de la conservación de alimentos	Daniel Berdejo Martínez	98
Caracterización de la actividad antiviral del extracto de té verde y su aplicación para la mejora de la seguridad	Irene Falcó	100
Perspectivas y retos en la mejora genética de levaduras	Joaquín Bautista Gallego	102
Desarrollo de resistencia a las altas presiones hidróstaticas en *Escherichia coli*	Elisa Gayán	104
Importancia del contexto ecológico en el funcionamiento de comunidades fermentativas de levaduras vínicas	Ignacio Belda Aguilar	106
Impacto de los factores perinatales en la microbiota maternoneoantal y su posible influencia en la salud	Marta Selma Royo	108

Relación de pósteres en la convocatoria

Título	Nombre	Pág
Estudio de la actividad antimicrobiana de *Lactococcus lactis* MP11 y *Pediococcus acidilactici* MP14 frente a *Staphylococcus aureus* en un modelo cárnico	Manuela Fernández Álvarez et al.	111
Evaluación de la contribución de levaduras con propiedades tecnológicas, a las propiedades sensoriales de quesos de pasta blanda	Santiago Ruiz-Moyano et al.	113
Una nueva especie de aspergillus productora de aflatoxinas aislada de la caña de azúcar brasileño	Josué J. Silva et al.	115
Evolución cuantitativa de *Campylobacter* a lo largo de la cadena alimentaría. Riesgo asociado a los preparados y productos cárnicos de aves.	Mari Ángeles Castaño Garrido et al.	117
Vigilancia de especies de *Vibrio* en Bivalvos comercializados en la Región de Murcia durante el periodo 2019-2021.	Ana María Sánchez Cánovas et al.	119
Determinación de los niveles de resistencias a antibióticos en una colección de cepas aisladas de langostino	Belén Iglesias Valenzuela et al.	121
Determinación de la resistencia a antibióticos en cepas bacterianas aisladas de muestras de aliño procesadas o no por alta presión hidrostática	Javier Rodríguez López et al.	123
Estudio de tolerancia a metales en cepas de *Salmonella enterica* subsp. enterica serotipo 4,5,12:i:-	Ainhoa Arrieta-Gisasola et al.	125
Cinética de activación y germinación de esporos de B. weihenstephanensis frente a tratamientos físicos y químicos	Maika Salvador et al.	127
Caracterización bioquímica de GluLm de *Limosilactobacillus mucosae* INIA P508 y su papel en la desglicosilación de flavonoides y secoiridoides en alimentos de origen vegetal	José Antonio Curiel Gámiz et al.	129
Efectos de una bebida de soja fermentada por *Bifidobacterium pseudocatenulatum* INIA P815 en la fertilidad y perfil lipídico en un modelo murino de pre-menopausia.	Ana Ruiz de la Bastida et al.	131
Microbiota Intestinal, Hipertensión y Sistema Renina-Angiotensina Intrarrenal	Marina Hidalgo Pestana et al.	133
Estudio de bacterias lácticas procedentes de la mucosa intestinal murina tras la ingesta de dietas ricas en grasas.	Antonio Cobo Molinos et al.	135
Estudio del efecto antimicrobiano in vitro de polifenoles del aceite de oliva sobre enterococos intestinales aislados de ratones alimentados con diferentes dietas altas en grasa.	Natalia Andújar Tenorio et al.	137

Microbiota intestinal murina y su relación con variables fisiológicas tras seis semanas de dieta enriquecida en aceite de oliva virgen o mantequilla.	Natalia Andújar Tenorio et al.	139
Metabolismos de levaduras potencialmente probióticas de 10 prebióticos comerciales	María Vázquez Hernández et al.	141
Efecto de las lías de levaduras sobre la realización de la fermentación maloláctica	Violeta García Viñola et al.	143
Caracterización de cepas de bacterias lácticas responsables de la fermentación maloláctica no deseada en vinos de la D.O. Cava	Daniel Fernández Vázquez et al.	145
Análisis genómico de cepas de *Lactococcus lactis* subsp. lactis y *Streptococcus thermophilus* productoras de ácido gamma-aminobutírico (GABA)	José Alejandro Valenzuela et al.	147
Aislamiento de mutantes de *Torulaspora delbrueckii* resistentes a sulfuroso, etanol y alta presión de CO_2 para la elaboración de cava	Alberto Martínez Brígido et al.	149
El suelo del viñedo como reservorio natural de levaduras fermentativas	Manuel Ramírez Fernández et al.	151
Prevalencia y niveles de células de *Listeria monocytogenes* de distintos estados fisiológicos en carne de ave	Rosa Capita et al.	153
Efecto de diferentes terpenos sobre los biofilms de *Listeria* spp.	David Jiménez de Juan et al.	155
Nuevas especies de *Fusarium* productoras de toxinas T-2 y HT-2 en campos de avena	Jéssica Gil Serna et al.	157
Caracterización de *Staphylococcus aureus* procedentes de industrias elaboradoras de embutidos y jamón curado	David Pérez-Boto et al.	159
Desarrollo de nuevos biocidas naturales de origen microbiano con eficacia frente a *Listeria monocytogenes*	Mercedes de la Cruz et al.	161
Estudio fenotípico y genético de la producción de aminas biógenas en *Enterococcus* sp. aislados de quesos tradicionales.	Daniel Abarquero Camino et al.	163
Identificación y análisis de genes responsables de la adhesión de cepas de *Lentilactobacillus parabuchneri* productoras de histamina	Maria Agustina Sarquis et al.	165
Efecto de varios aditivos alimentarios sobre la resistencia a antibióticos en cepas de *Listeria monocytogenes* presentes de forma natural en carne de pollo	Carlos Alonso-Calleja et al.	167
Detección y caracterización de *Escherichia coli* productora de ESBL y/o STEC-EPEC en aislados de granjas porcinas.	Sandra Martínez-Álvarez et al.	169

Mecanismos de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Arcobacter* procedentes de aguas y alimentos	Itsaso Baztarrika Uria et al.	171
Variantes resistentes a gentamicina de *Salmonella* Typhimurium pueden mostrar resistencia cruzada frente al calor	Raúl Campillo Pérez et al.	173
Estudio de los niveles de resistencia a antibióticos en cepas bacterianas aisladas de pulpo	Belén Iglesias Valenzuela et al.	175
Evaluación de las propiedades bioactivas frente a Helicobacter pylori de un extracto de *Achillea millefolium* L. y sus fracciones obtenidas por fraccionamiento supercrítico antisolvente	Jose Manuel Silván et al.	177
Resistencias a antibióticos en cepas de *Pseudomonas* aisladas de alimentos vegetales	Rubén Pérez Pulido et al.	179
Identificación y determinación de los perfiles de resistencia a antimicrobianos en cepas bacterianas aisladas a partir de guacamole.	Javier Rodríguez López et al.	181
Estudio de resistencias a antimicrobianos en cepas de *Campylobacter* spp. aisladas en pollos de engorde en la provincia de Valencia	Begoña Bort Tormo et al.	183
Efecto sinérgico entre aceites esenciales y EDTA frente a cepas multirresistentes de *Pseudomonas* sp.	Natacha Caballero Gómez et al.	185
Resistencia a antibióticos en cepas de *Escherichia coli* productoras de beta-lactamasas de amplio espectro.	Laura Morales Hervás et al.	187
Efecto de la actividad de agua, la sal y el tamaño del inóculo en la fase de latencia de *Staphylococcus aureus*	Maria Clara Grossi Andade et al.	189
Aplicación de una nanoemulsión de limoneno para la descontaminación de tomates Cherry contaminados artificialmente con *Listeria monocytogenes*	Andrea Mozzetti et al.	191
Re-definiendo la temperatura mínima de crecimiento de *Salmonella* Enteritidis en huevo y ovoproductos: influencia de la dosis inicial y la historia térmica del ovoproducto.	Silvia Guillén et al.	193
Modelización de la cinética de crecimiento de la cepa epidémica F2365 de *L. monocytogenes* y de su mutante que sobreexpresa PRFA en leche UHT a temperatura de refrigeración	Alba Espí Malillos et al.	195
Aplicación de una cepa autóctona de *Debaryomyces hansenii* en la preparación de lomos ibéricos con menores concentraciones de conservantes químicos.	Helena Chacón-Navarrete et al.	197
Aplicación de compuestos orgánicos volátiles (VOCS) procedentes de levaduras para el control de *Penicillium*	Ana Martínez et al.	199

expansum en manzana

Efecto del protocolo de aplicación de los pulsos en la eficacia de la inactivación de *Sacharomyces cerevisiae* mediante pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF)	Jorge Sanz Marínez et al.	201
Termorresistencia y cinética de germinación de esporos de *Bacillus subtilis* 168 obtenidos en medios con actividad de agua reducida.	Víctor Freire Carrascosa et al.	203
Caracterización y evaluación de la susceptibilidad a fagos y endolisinas de distintas cepas de *Staphylococcus Aureus*	Andrea Jurado Muñoz et al.	205
Desarrollo de una metodología para la determinación de la concentración celular de una colonia sembrada en superficie y su relación con la eficacia de tratamientos con luz UV-C sobre la superficie de alimentos sólidos	Sebastian Ospina Corral et al.	207
Actividad antimicrobiana de análogos de procianidinas de origen vegetal frente a microorganismos patógenos alimentarios resistentes a biocidas y antibióticos.	Daniel Cruz Sáez et al.	209
Desarrollo de recubrimientos comestibles con pisciolina 126 para mejorar la calidad microbiológica y reducir la producción de histamina en salmón marinado	Elías González Gragera et al.	211
Influencia del factor σB en la resistencia a los pulsos eléctricos de alto voltaje dependiente de la fase y temperatura de crecimiento en *Staphylococcus aureus*	Laura Nadal Calvo et al.	213
Desarrollo de recubrimientos comestibles bioprotectores para mejorar la seguridad alimentaria de aguacate y melón IV gama.	J. David García-López et al.	215
Nebulización de un formulado natural para mejorar la calidad microbiana del aire en instalaciones alimentarias.	Juan José Ariza et al.	217
Formación de biofilms en *Paenibacillus* y método de marcado con proteína verde fluorescente	Laura Mena Ordóñez et al.	219
Actividad antimicrobiana de un compuesto parcialmente purificado de origen natural frente a diferentes patógenos	María José Grande Burgos et al.	221
Optimización del protocolo de calentamiento de matrices sólidas mediante Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV): efecto en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* 5672	Leire Astráin-Redín et al.	223
Solución natural higienizante para la eliminación de biofilms en la industria alimentaria	Abdelkader Boutine et al.	225
Estudio de la diversidad microbiana en queso de cabrales por técnicas metagenómicas y de cultivo	Javier Rodríguez et al.	227

Comunicaciones orales

MICROBIOME IN THE FOOD SYSTEM: CHALLENGES AND OPPORTUNITIES

Luca Cocolin

University of Turin, Department of Agriculture, Forest and Food Sciences, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco, Torino, Italy. lucasimone.cocolin@unito.it

The food system is facing a number of challenges, which should be properly addressed by using the most appropriate strategies, based on strong scientific evidences. Increase of the world population, malnutrition and non-communicable diseases in under-developed and industrialized countries, respectively, climate change, water scarcity and land desertification are just some of the main challenges that human beings have to address in the near future. Sustainability has become a must, and modern food production systems have to be designed in order to take this into consideration.

In 2015, the World Health Organization identified 17 sustainable development goals (SDGs) to be addressed and reached by 2030 and food production can be identified as one of the main drivers to reach the objectives identified by several of them.

There is urgency in contributing to the advancement of the scientific knowledge in the context of the food system. More specifically, there is a strong evidence that current food production systems, especially those related to protein sources, are not sustainable. Food production is the largest cause of global environmental change. Agriculture occupies about 40% of global land, and food production is responsible of up to 30% of global greenhouse-gas emissions and 70% of freshwater use. In this scenario, microbiome, defined as the group of microorganisms present in a specific ecosystem, including also their functional characteristics (i.e metabolic pathways), have been identified as tools to exploit to find solutions to the above-mentioned challenges.

Microbiome can play an important role in modulating the gut ecology of productive animals, thereby improving their health and welfare. The inclusion of alternative ingredients and new feeding strategies were investigated to allow more sustainable productions. Inulin and a multi-strain probiotic mixture of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactiplantibacillus pentosus* were utilized to positively impact the microbiota composition and functions of the gastro-intestinal tract of the broilers during breeding. Fecal samples were collected at the beginning of the trial and after 11 and 32 days for metataxonomic analysis. At the end of the trial, broilers were submitted to anatomo-pathological investigations and caecal content was subjected to volatilome analysis and DNAseq. Probiotic plus prebiotic inclusion did not significantly influence bird performance and did not produce histopathological alterations or changes in blood measurements, which indicates that the probiotic did not impair the overall health status of the birds. The multi-strain probiotic plus inulin inclusion in broilers increased the level of butanoic acid. In addition, the administration of probiotics plus inulin modified the gut microbiota composition also at strain level since probiotics alone or in combination with inulin select specific *Faecalibacterium prausnitzi* strain populations.

The metagenomic analysis showed in probiotic plus prebiotic fed broilers a higher number of genes required for branched-chain amino acid biosynthesis belonging to selected *F. prausnitzi* strains, which are crucial in increasing immune function resistance to pathogens and is recognized to improve growth performance. In the

presence of the probiotic/prebiotic a reduction in the occurrence of antibiotic resistance genes belonging to aminoglycoside, beta-lactamase and lincosamide family was observed.

Human gut microbiome is well recognized to be influenced by many factors such as life-style, age and diet. In the last 10 years we have deeply investigated the role of food in shaping the gut microbiota/microbiome and found that different components of the diet not only influence the functions of microbial populations, but also impacts on the strain variability. The gut microbiome is a complex consortium of different microbial species and strains. However, our knowledge of the gut microbiome is usually limited to a genus or species level, whilst each species in the gut may be represented by several strains, which may show specific functional properties and be differently linked with human health. The role of *Prevotella* in relation to human health is currently controversial, since it was conversely associated with potential positive or negative effects for the host. Dissecting gut metagenomes of 38 subjects with different dietary habits it was possible to highlight the presence of different *Prevotella copri* strains and with different potential functional properties. In particular, diets rich in fibres selected strains with enhanced potential of carbohydrates catabolism, while *P. copri* strains associated with omnivore diet were characterized by the presence of key genes involved in branched-chain amino acid biosynthesis, a recognized risk factor in the development of glucose intolerance and type-2 diabetes. In this was it was demonstrated the existence of a diet-mediated selection of specific *P. copri* strains and the current oversimplification of diet-dependent microbe-host associations. Exploitation of gut microbiome in human health must consider that many relevant functions may be strain-specific.
Metagenomics is a powerful tool to study and understand the microbial dynamics that occur during food fermentation and allows to close the link between microbial diversity and final organoleptic characteristics. Each food matrix can be colonized by different microbes, but also by different strains of the same species. In a study of the Salame Piemonte, a Protected Geographical Indication (PGI) Italian fermented sausage, three independent batches produced in February, March and May 2019 were analysed. The sausages were manufactured, following the production specification, in a local meat factory without the use of starter cultures. A pangenomic approach was applied in order to identify and evaluate the lactic acid bacteria (LAB) population driving the fermentation process. It was observed that all batches were characterized by the presence of few LAB species, namely *Pediococcus pentosaceus*, *Latilactobacillus curvatus* and *Latilactobacillus sakei*. Sausages from the different batches were different when the volatilome was taken into consideration, and a strong association between quality attributes and strains present was determined. In conclusion, different strains of *L. sakei*, showing heterogeneity at genomic level, colonized the meat at the beginning of each production and deeply influenced the fermentation process by distinctive metabolic pathways that affected the fermentation process and the final organoleptic aspects.

By describing these three examples of investigating the microbiome gut productive animals, human gut and fermented sausages it can be understood the huge potentials those microbial associations can have to impact the health of the animals and of the humans, and on the quality characteristics of the fermented foods we eat. Using microbiome in the food system is a valid strategy that can be used in order to address the challenging out Planet is facing and offer never imagined solutions to improve the sustainability of food production systems.

USO DE FITOBIÓTICOS, MICROALGAS Y ENZIMAS COMO ESTRATEGIAS EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL

Manuel Martínez Bueno[1], Miguel Rabelo-Ruiz[1], Juan Manuel Peralta-Sánchez[1,2], Claudia Teso Pérez[1], Eva Valdivia[1], Alberto Baños[3], Juan José Ariza Romero[3], Francisco J. Alarcón[4], Judit Macias-Vidal[5], Antonio Manuel Martín-Platero[1]

[1] Universidad de Granada/Facultad de Ciencias/Departamento Microbiología/18002.Granada
[2] Universidad de Sevilla/Departamento de Biología Vegetal y Ecología/ 41012-Sevilla
[3] Departamento de Microbiología y Biotecnología - DMC Research Center/18620 Granada
[4] Departamento de Biología y Geología, CEI·MAR-Universidad de Almería. 04120, Almería
[5] Departamento de I+D+i, Global Feed S.L., Grupo Tervalis, 21001, Huelva.
mmartine@ugr.es

El aumento exponencial de la población humana en el último siglo junto con las previsiones de la OMS que esta siga creciendo hasta 2100 hace necesaria la búsqueda de estrategias que permitan aumentar la producción de alimentos de origen animal. Durante los últimos 50-70 años se ha conseguido aumentar considerablemente los niveles productivos en este sector gracias a la mejora de las dietas, mejora genética de las razas de animales destinadas a la producción y también por la utilización de antibióticos promotores del crecimiento animal o de uso veterinario. Sin embargo, el uso excesivo de estos compuestos ha llevado a la prohibición de su uso en alimentación animal por el incremento en la resistencia a antibióticos. Todo ello, junto con la búsqueda de sostenibilidad en las dietas, ha hecho necesaria la búsqueda de alternativas. Entre estas destacan la incorporación de compuestos derivados de plantas con actividad biológica (fitobióticos), enzimas, microalgas o sus hidrolizados, prebióticos y probióticos. Con ello se pretende no solo aumentar la calidad y sostenibilidad de las dietas, sino también incrementar la producción animal, mejorar el bienestar animal y reducir el uso de antibióticos como promotores del crecimiento o como agentes terapéuticos. Entre los fitobióticos empleados en alimentación animal destacan las especies del género *Allium*, como por ejemplo los compuestos organosulfurados como la alicina, el PTS (propil propano tiosulfinato) o el PTSO (propil propano tiosulfonato). Los resultados de estos estudios han mostrado posibles beneficios sobre la productividad, el crecimiento, la salud o la inmunidad de animales de granja y acuicultura como gallinas ponedoras, lechones y doradas.

La administración de un extracto de *Allium* con alta concentración en PTSO en gallinas ponedoras produjo un incremento no solo en la puesta de huevos, sino también un aumento de su peso y talla durante los 30 días del experimento. Este tratamiento se asoció con el incremento de algunos géneros bacterianos como *Lactococcus* en el íleon y *Lactobacillus* en el ciego.

En el caso de los lechones destetados, los animales suplementados con el extracto de *Allium* mostraron una mayor ganancia de peso y una mayor tasa de conversión alimentaria similar a la de los lechones tratados con antibiótico y superiores a la dieta control. En cuanto a la microbiota asociada al tracto gastrointestinal, se observó una disminución de su diversidad microbiana en los animales del grupo experimental, tanto en el ciego como en el colon, junto con un aumento de algunos géneros bacterianos como *Lactobacillus*, *Blautia* o *Megasphaera*.

También el PTSO parece tener un efecto beneficioso en el caso de juveniles de doradas, si bien lo animales no mostraron un incremento de su peso respecto al grupo control, si aumentó la diversidad microbiana del tracto digestivo, junto con una disminución en la abundancia de potenciales patógenos como el género *Vibrio* y *Pseudomonas*.

El uso de dietas enriquecidas en microalgas podría constituir una buena alternativa para la reducción del uso de harinas de pescado en la alimentación de peces y de esta forma conseguir dietas más sostenibles. El potencial de las microalgas o de sus hidrolizados radica en su alto contenido proteico, alta concentración en ácidos grados omega 3, vitaminas, minerales y pigmentos. Y a nivel industrial, son relativamente fáciles de producir.

La inclusión de 5% y 10% de biomasa cruda y/o hidrolizada de *Arthrospira platensis* en la dieta de larvas de dorada no mostró alteraciones en el crecimiento de éstas, apareciendo valores de peso y longitud corporal similares a los de las larvas control. Las dietas que presentaron un 5% de biomasa de *A. platensis* tanto cruda como hidrolizada mostraron una composición de las comunidades microbianas similar a las de las larvas control. Sin embargo, una dieta con el 10% de hidrolizado de esta microalga induce cambios en la composición de la microbiota de las especies minoritarias; mientras que al 10% de *A. platensis* cruda produjo alteraciones de las especies mayoritarias y una reducción de su diversidad microbiana. Por ello, la inclusión de 5% de *A. platensis* cruda o utilizando 5%-10% de *A. platensis* hidrolizada podría ser útil para reducir el uso de harinas de pescado en el pienso, manteniendo con ello el crecimiento de los animales y sin alterar la composición de la microbiota intestinal en el caso de larvas de dorada.

Por último y en cuanto al uso de enzimas en alimentación animal, destaca la fitasa. Se trata de una enzima que actúa hidrolizando el ácido fítico, uno de los compuestos más abundantes en semillas y fibras de origen vegetal e indigerible por la mayor parte de los animales. El ácido fítico principalmente está asociado con fosfatos y con cationes como calcio, magnesio, zinc, cobre, hierro o potasio, reduciendo con ello su biodisponibilidad para los animales. Su presencia también afecta de forma directa al estado fisiológico de los animales, produciendo efectos negativos en su crecimiento, en la utilización de nutrientes y la absorción de minerales.

En nuestro estudio la utilización de una dieta que incluye 2,5% de biomasa cruda de microalgas (*Arhtrospira platensis* y *Nannochloropsis gaditana*), junto con diferentes concentraciones de fitasa produjo un aumento en el peso de los peces. El incremento del peso de los animales fue proporcional a la concentración de fitasa utilizada. Finalmente con respecto a las comunidades microbianas intestinales, la dieta seleccionada (10.000 FTU/kg-2,5 % biomasa cruda de microalgas) no alteró la composición de la microbiota intestinal de las larvas de lubina y por ello resultó ser la más beneficiosa produciendo un aumento significativo del crecimiento de estos animales.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el programa FEDER-INNTERCONECTA-CDTI (CDTI, Ministerio de Economía y Competitividad de España). Proyectos MBIOPOR, AQUAHEALTH (IDI-20170032) y ALQUABIOTIC (ITC-20181099).

REFERENCIAS

[1] Peralta-Sánchez, J.M. et al. 2019. Egg production in poultry farming is improved by probiotic bacteria. Front. Microbiol. 10, 1042.

[2] Rabelo-Ruiz, M. et al. 2021. Allium-based phytobiotic enhances egg production in laying hens through microbial composition changes in ileum and cecum. Animals 11, 448.

[3] Rabelo-Ruiz, M. et al. 2021. Allium extract implements weaned piglet's productive parameters by modulating distal gut microbiota. Microorganisms, 10, 269.

[4] Rabelo-Ruiz, M. et al. 2022. Beneficial shifts in the gut bacterial community of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles supplemented with *Allium*-derived compound propyl propane thiosulfonate (PTSO). Animals 12, 1821.

ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD DE BACTERIAS Y LEVADURAS DE ENVASADOS DE ACEITUNAS DE LA VARIEDAD *ALOREÑA DE MÁLAGA* MEDIANTE ANÁLISIS METAGENÓMICO

Antonio Benítez-Cabello, Elio López-García, Javier Ramiro-García, Verónica Romero-Gil, Francisco Rodríguez-Gómez y Francisco Noé Arroyo-López.

Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de la Grasa (CSIC), Ctra. Sevilla-Utrera, km 1. Edificio 46. Campus Universitario Pablo de Olavide. 41013, Sevilla, España.

abenitez@ig.csic.es

Las aceitunas de mesa son los frutos fermentados más característicos de la cuenca mediterránea, con España, Egipto y Turquía como principales productores [1]. La *Aloreña de Málaga* es una especialidad de aceituna verde natural, partida y aliñada que se produce en el Valle del Guadalhorce (Málaga, España), bajo una Denominación de Origen Protegida (DOP).

Las técnicas de metataxonomía han demostrado ser excelentes enfoques para investigar las poblaciones microbianas presentes en una matriz alimentaria. En el caso de las aceitunas de mesa se han llevado a cabo diversos estudios metataxonómicos para determinar la evolución de bacterias y hongos durante la fermentación [2-3]. Sin embargo, pocos emplean este enfoque para analizar ambos grupos microbianos en el producto envasado final.

En este trabajo, se analizaron 8 variedades diferentes de envasados de *Aloreña*, obtenidas de 2 industrias diferentes. Las aceitunas se elaboraban siguiendo el estilo tradicional (frutos almacenados en salmuera durante 20 días). En total se obtuvieron 16 muestras de salmuera (B, n = 8) y fruto (F, n = 8) en diferentes tiempos (T0= 0 día, T1= 42 días, T2 = 130 días y T3 = 260 días) y se analizaron mediante métodos microbiológicos, fisicoquímicos, y de secuenciación masiva de amplicones del gen ARNr 16S (bacterias) e ITS (hongos).

Los datos fisicoquímicos mostraron que el pH medio en salmuera disminuyó a medida que avanzaba el tiempo de muestreo, desde un valor inicial de 4,7 hasta 4,1. En consecuencia, la acidez libre aumentó, pasando de un valor inicial de 0,20 % a un valor final de 0,50 %.

No se detectaron Enterobacterias en ninguna de las muestras analizadas. Tampoco se detectaron bacterias lácticas (BAL) al inicio del muestreo, pero la población aumentó hasta 4 $\log_{10}$UFC al final de la vida útil. Los niveles iniciales de levaduras (3,5 $\log_{10}$ UFC) disminuyeron rápidamente, no siendo detectadas desde el día 120 en adelante. Finalmente, observamos grandes cantidades de aerobios mesófilos al inicio del muestreo, con 5 $\log_{10}$ UFC en el día 130 de vida útil.

El análisis metataxonómico mostró que Lactobacillales y Alteromonadales fueron los órdenes predominantes entre las bacterias (Figura 1a). Otros órdenes como Oceanospirillales, Cardiobacteriales y Enterobaterales aparcieron en baja proporción. En la población de hongos se observaron cinco órdenes diferentes, con un claro predominio de Eurotiales y Saccharomycetales (Figura 1b). Los órdenes Dothideales, Capnodiales e Hyporeales

aparecieron en una proporción casi imperceptible.

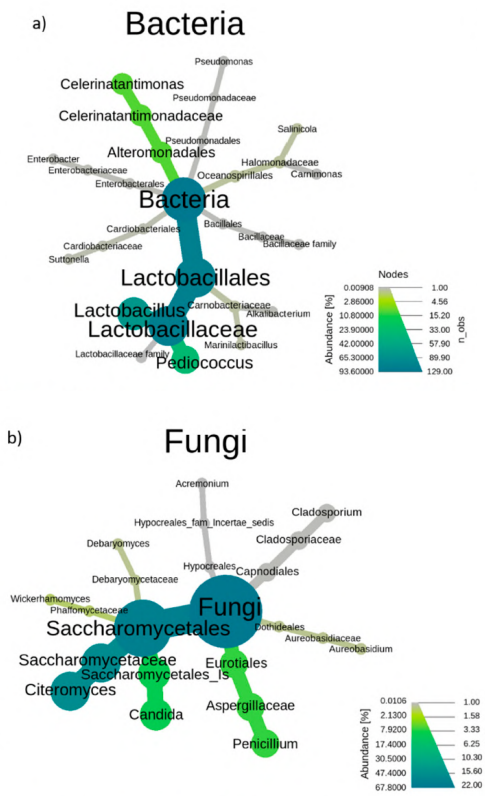
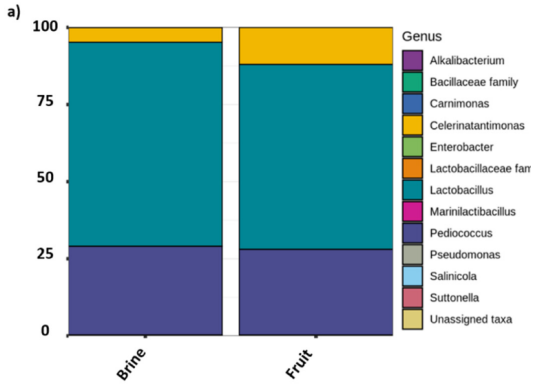


Figura 1. Árbol representativo de los grupos mayoritarios de bacterias (a) y levaduras (b) en la totalidad de las muestras, obtenido mediante análisis metataxonómico.

La Figura 2 muestra la abundancia relativa de las poblaciones de bacterias y hongos en en muestras de fruto (F) y salmuera (S). Entre las poblaciones bacterianas predominaron tres géneros principales, *Lactiplantibacillus* (65,05% ± 8,65 en S vs. 58,70% ± 15,70 en F), *Pediococcus* (28,17 ± 7,36% en S vs. 27,20 ± 15,95% en F), y *Celerinatantimonas* (4,64 ± 1,08% en S vs 11,82 ± 18,17% en F).



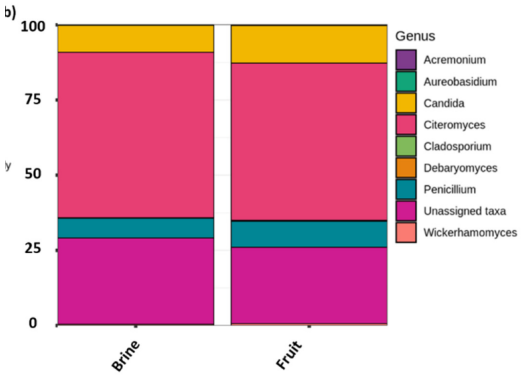


Figura 2. Abundancia relativa de secuencias (%) bacterianas (a) y de hongos (b) a nivel de género o familia para las muestras de salmuera y fruto de envasados de aceitunas Aloreña

Este estudio destaca que la aceituna *Aloreña de Málaga* envasada es un producto vivo desde el punto de vista fisicoquímico y microbiológico, lo que indica la necesidad de un mejor control y estabilización de las poblaciones microbianas. Sin embargo, la ausencia de géneros patógenos es una garantía de seguridad alimentaria para los consumidores.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido subvencionad a través del proyecto TOBE (RTI2018-100883-B-I00, MCIU/AEI/FEDER, UE). ABC agradece a la Junta de Andalucía por su contrato PAIDI2020-00162. ELG agradece al Ministerio de España de Ciencia e Innovación por su contrato FPI (PRE2019-087812).

REFERENCIAS

[1] IOC (2021). Key figures on the word market for table olives. International Olive Council. https://www.internationaloliveoil.org/wpcontent/uploads/2021/12/114-OT-2021.pdf. Accessed, June 2022.

[2] E Medina, M Brenes, P García-García, C Romero, & A de Castro, Food Control, 2018, 86, 35-41.

[3] F.J Rodríguez-Gómez, M.A Ruiz-Bellido, V Romero-Gil, A Benítez-Cabello, A Garrido-Fernández, FN Arroyo-López, Front. Microbiol, 2017, 8, 2209.

ESTUDIOS DE DESAFÍO DE PATÓGENOS ALIMENTARIOS EN ENVASADOS DE ACEITUNA DE MESA

Posada-Izquierdo, G.D.[1,2]; Romero-Gil, V.[1]; Cifuentes, A.[1]; Lopez-Garcia, E.[3]; Benítez-Cabello, A.[3]; Arroyo-Lopez, F.N.[3]; Garcia-Gimeno, R.M.[1,2]

[1] Department of Food Science and Technology, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), University of Córdoba, Córdoba, Spain
[2]Unidad de Investigación Competitiva Zoonosis y Enfermedades Emergentes desde la Perspectiva de Una Salud (ENZOEM), Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Darwin, Cordoba, Spain. 14014. bt2poizg@uco.es
[3]Food Biotechnology Department, Instituto de la Grasa (IG-CSIC), University Campus Pablo de Olavide, Seville, Spain

La aceituna de mesa verde de la variedad manzanilla es un producto de gran interés comercial, por ello se quiere demostrar con este estudio: cómo de seguro es su consumo una vez ha sido envasado. El producto se prepara siguiendo una elaboración estilo español sevillano, inoculado previamente con un started de bacterias ácido-lácticas con propiedades probióticas con el fin de obtener un biofilm maduro.

Las muestras evaluadas fueron procedentes de diez fermentadores directamente de la fábrica, las muestras ya preparadas y envasadas en tarros fueron inoculadas con diferentes cepas de cuatro especies patógenas de interés en salud pública provenientes de la colección española de cultivos tipo (CECT); estas cepas son: -*Staphylococcus aureus*: 534, 828, 4465, 4459, 4466. -*Escherichia coli*: 5947, 4783, 4782, 4267R+(resistente a antibióticos), 4267R-, 729, 405, 987GFP. -*Salmonella*: 443, 556, 4396, 4594, 4300. -*Listeria monocytogenes*: 935, 4032, 5366, 5725, 7467, 1034.

La inoculación de las cepas se realizó desde un cultivo vivo crecido con 24 horas en sus respectivos medios nutritivos, según el caso del patógeno empleado: caldo Tryptic Soy Broth (TSB) y caldo Brain Heart Infusion (BHI) ambos de OXOID-UK. Se ha realizado el análisis a lo largo de todo el experimento (durante 21 días) desde el mismo día de la inoculación hasta finalizar la experiencia. Con más puntos de análisis al comienzo y más espaciados en el tiempo conforme avanza el experimento, con un total de diez puntos de análisis. En cada análisis se muestrea la capacidad de formar biofilm de los patógenos en dos componentes, la salmuera y el fruto. Se utilizo en el último punto de análisis el muestreo total de la salmuera, a través de la filtración total y retención de las bacterias presentes en la membrana del filtro de poro 0,22 micras, con el fin de aumentar el limite de detección y conocer si finalmente no había presencia del patógeno inoculado.

Se repitió el mismo experimento tres veces en el tiempo para recoger la variabilidad biológica de lotes diferentes (dos de ellas analizaron en los laboratorios la Universidad de Córdoba y uno en el Instituto de la Grasa del CSIC en Sevilla) y en tres momentos diferentes.

Por último, el muestreo se centró en recuperar tanto salmuera como fruto en un volumen de 25 ml o 25gr (respectivamente) en 225ml de medio nutritivo con el fin de propiciar una condición de pre-enriquecimiento y favorecer la recuperación de las células estresadas o lesionadas, debido a la codicion restrictiva de bajo ph y alta concentración de sal, que durante es estudio fue monitorizada en torno 3.6-4.3pH y 10-12% NaCl.

En el caso del muestreo del fruto y la confirmación de la formación del biofilm se siguió el procedimiento del bombardeo con esferas de 6 mm de diámetro en condiciones estériles y en una proporción de 1.25mg por cada gramo de fruto sin hueso de la aceituna de mesa previamente fermentada.

Los resultados obtenidos son similares en todas las experiencias. En pocas horas desde la inoculación de los patógenos, su concentración va disminuyendo exponencialmente hasta su desaparición, y, debido al biofilm previo de BAL, tampoco son capaces de formar biofilm, en los casos en que se hizo la inoculación de los patógenos sin la previa formación del biofilms maduro.

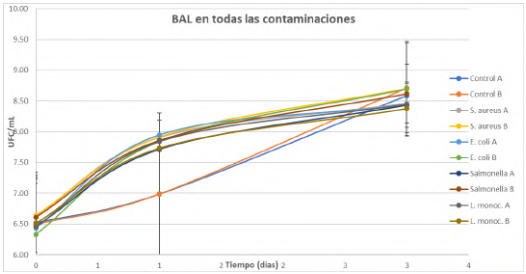


Figura 1: Comportamiento microbiano de los patógenos en co-cultivo (sin formación previa biofilm maduro de bacterias acido-lácticas) en aceituna de mesa.

El comportamiento observado en la figura 1, evidencia que la etapa de fermentacion es undamental para garantizar la inocudad de este tipo de alimentós ya que en las muestras evaluadas en co-cultivo fue possible en crecimiento de los diferentes patogenos, mientras que por el contrario en las muestras que previamente fueron inoculades con el un started de bacterias ácido-lácticas con propiedades probióticas y que presentaban un biofilm maduro de 90 dias desde el inicio de la fermentación, no solo no permitió el crecimiento de la bacteria sino que se observo un claro descenso de la carga inicial para todos los patógenos estudiados (figura 2). Caso similar ocurrió en el estudio publicado por Posada-Izquierdo, et al., 2021 para Vibrio en aceitunas de mesa.

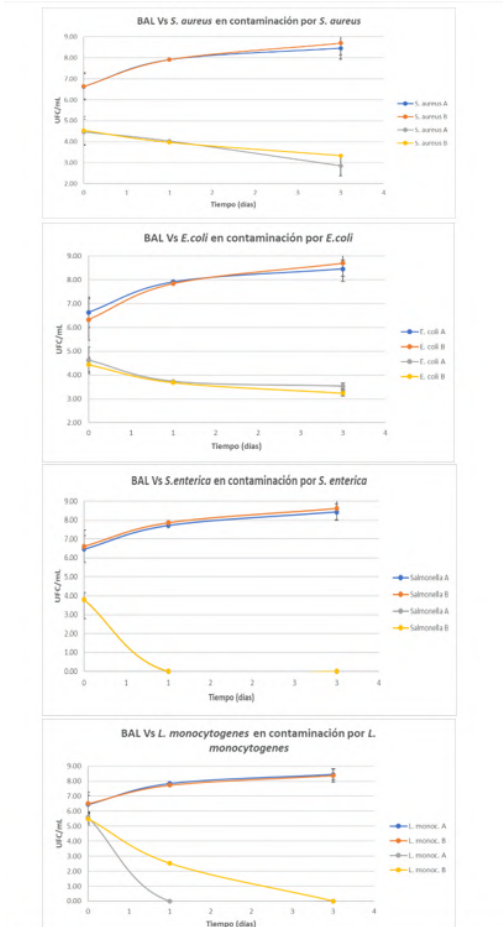


Figura 2: Comportamiento microbiano de los patógenos en co-cultivo (con biofilm maduro de bacterias acido-lácticas) en aceituna de mesa.

De manera que la conclusión es claramente satisfactoria, la aceituna verde manzanilla preparada mediante esta elaboración es un alimento muy seguro, cuyo consumo no supone ningún peligro para la salud pública.

AGRADECIMIENTOS

This work has been performed by the Research Group AGR-170 (HIBRO) and AGR-283 of the Research Andalusian Plan (PAIDI) & funding from the Spanish government through the TOBE project (RTI2018-100883-B-I00).

REFERENCIAS:Posada-Izquierdo, Valero, Arroyo, González-Serrano, Ramos-Benítez,Benítez-Cabello,Rodríguez-Gómez[2], Jimenez&García-Gimeno Behavior of *Vibrio* spp. in Table Olives. , *Journal Front. Microbiol., 04 June 2021 | https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.650754.*

DISTRIBUCIÓN DE MICROORGANISMOS ENTRE LA SUPERFICIE Y EL INTERIOR DE LAS ACEITUNAS DE MESA

López-García Elio, Benítez-Cabello Antonio, Garrido-Fernández Antonio, Arroyo-López Francisco Noé.

Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de la Grasa (CSIC), Ctra. Sevilla-Utrera, km 1. Edifico 46. Campus Universitario Pablo de Olavide. 41013, Sevilla, España.
elopez@ig.csic.es

La aceituna de mesa es uno de los vegetales fermentados más importante de los países ubicados en la cuenca del Mediterráneo. De la producción global, alrededor de un 60% se elaboran como estilo Español o Sevillano. Los microorganismos encargados de llevar a cabo el proceso de fermentación son principalmente las bacterias del ácido láctico (BAL), entre ellas *Lactiplantibacillus pentosus* y *Lactiplantibacillus plantarum*. Sin embargo, las levaduras pueden llegar a jugar un papel relevante, proporcionando interesantes características tecnológicas y organolépticas, destacan géneros como *Pichia, Saccharomyces, Candida* y *Wickerhanomyces*.

Un biofilm se define como un consorcio de microorganismos embebidos en una matriz o sustancia polimérica extracelular (EPS) producida por ellos mismos. Recientemente, varios estudios han demostrado la capacidad de ciertos microorganismos de colonizar la superficie de las aceitunas durante el proceso fermentativo, formando comunidades polimicrobianas adheridas a la epidermis del fruto [1]. La mayoría de los trabajos que estudian el biofilm de la aceituna utilizan un método de homogeneización mecánica (Stomacher), donde parte del fruto se destruye, liberando microorganismos, pero también células vegetales, lo que dificulta estudios metataxonómicos al obtener un gran número de secuencias no asignadas o asignadas a cloroplastos [2].

Nuestro grupo ha demostrado que se puede llevar cabo una liberación de los microorganismos que conforman el biofilm mediante un método no-destructivo con un "bombardeo" por bolas de vidrio (glass beads). Este método alternativo proporciona una recuperación de BAL algo menor que el Stomacher, en cambio, la cantidad de levaduras extraídas es mayor [3].

En este contexto, la hipótesis establecida para este trabajo es que el método destructivo libera BAL no solo de la de superficie del fruto, sino también de los espacios intercelulares donde las levaduras, por su tamaño, no pueden acceder. Para comprobarlo se han extraído las BAL y levaduras presentes en la superficie, así como del interior del fruto, por los dos métodos descritos anteriormente. Con el objetivo de mejorar la eficacia del método no-destructivo, se ha realizado un total de 5 tratamientos de extracción secuenciales. Por último, se ha realizado un genotipado de las BAL formadoras de biofilm en la epidermis del fruto y las que acceden a los espacios intercelulares.

Aceitunas de mesa de la variedad Manzanilla se elaboraron al estilo Español, se distribuyeron en frascos de 250 mL donde se adicionó una salmuera al 11% de NaCl y fueron pasteurizados a 80ºC durante 10 minutos y almacenados a 4ºC durante 7 días. Cuando el pH alcanzó un valor de 8,0 y la sal alcanzó el equilibrio al 5%, se inocularon por triplicado con un mix de tres

cepas diferentes de *Lactiplantibacillus pentosus* y dos levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Wickerhanomyces anomalus*) y se incubaron a 30ºC. Un envase se mantuvo sin inocular como control de la pasteurización. Se realizó un seguimiento de las fermentaciones tanto del pH como de las BAL y levaduras presentes en salmuera, en la superficie y en el interior del fruto.

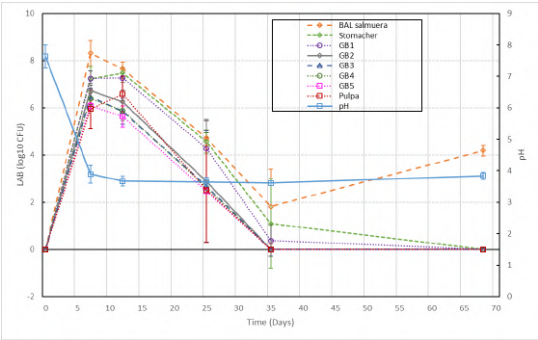


Figura 1: Evolución del pH y de BAL tanto de salmuera (UFC/mL), como del biofilm (UFC/g) por ambos métodos (Stomacher y glass beads) y del interior del fruto (UFC/g).

La extracción del biofilm se realizó tanto por Stomacher, como por bombardeo de glass beads. La liberación de BAL tras el primer bombardeo de glass beads (GB1) fue el valor más cercano a la extracción mediante Stomacher. Sin embargo, en los siguientes tratamientos con glass beads (GB2, GB3, GB4 y GB5) se continuaban liberando BAL, aunque, en menor cantidad (Figura 1). Tras el último tratamiento secuencial, se retiró la epidermis del fruto y se realizó un tratamiento con Stomacher para liberar las BAL que hubiesen conseguido penetrar la epidermis de la aceituna. Los resultados muestran que desde etapas tempranas de la fermentación se produce una entrada de las BAL en estos espacios intercelulares, pero no así de las poblaciones de levaduras, debido a su mayor tamaño.

Durante el seguimiento de las BAL, se aislaron aleatoriamente 5 colonias, por envase analizado, de las muestras de salmuera, de biofilm (GB1) y del interior del fruto (pulpa). Se generó un dendograma por rep-PCR con el primer GTG_5 usando los perfiles de bandas obtenidos de 135 BAL.

Cepa	Salmuera	Biofilm	Interior del fruto
LPG1	60	70	100
13B4	20	26,7	0
119	20	3,3	0

Tabla1: Frecuencia (%) de aparición de cada cepa en los diferentes ecosistemas: Salmuera, biofilm e interior del fruto.

Aunque se observa la presencia de las 3 cepas de *L. pentosus* en salmuera y biofilm, la cepa LPG1 predomina en ambas matrices, quedando las otras dos reducidas a un 40%. Además, la cepa LPG1 es la única con presencia en la pulpa del fruto, por tanto, parece ser la cepa que predomina en estos espacios intercelulares subepidérmicos (Tabla 1).

Nuestros datos muestran como ciertas cepas de *L. pentosus* tienen una mayor predisposición a formar biofilms y colonizar el interior del fruto. También se confirma el procedimiento de extracción de biofilms con glass beads como un método alternativo al Stomacher para el estudio de los biofilms de la aceituna de mesa.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido subvencionad a través del proyecto TOBE (RTI2018-100883-B-I00, MCIU/AEI/FEDER, UE). ELG agradece al Ministerio de España de Ciencia e Innovación por su contrato FPI (PRE2019-087812). ABC agradece a la Junta de Andalucía por su contrato PAIDI2020-00162.

REFERENCIAS

[1] Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Domínguez-Manzano, J., Romero-Gil, V., Rodriguez-Gómez, F., García-García, P., Garrido-Fernández, A., & Jiménez-Díaz, R. Food Microbiology (**2012**), 32(2), 295-301.

[2] Medina, E., Ruiz-Bellido, M. A., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., Montes-Borrego, M., Landa, B. B., & Arroyo-López, F. N. International journal of food microbiology **(2016)**, 236, 47-55.

[3] López-García, E., Benítez-Cabello, Martín-Arranz, V., A., Garrido-Fernández, A. & Arroyo-López, F. N. LSTWB3 **(En prensa)**.

CARACTERIZACIÓN METAGENÓMICA DE LA POBLACIÓN BACTERIANA Y DE LOS GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DURANTE LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE SALCHICHÓN MÁLAGA

Díaz-Martínez C.[1], Bolívar A.[1], Ferrocino I.[2], Cocolin L.[2], Rantsiou K.[2], Pérez-Rodríguez F[1].

[1] Departamento de Bromatología y Tecnología de Alimentos, Facultad de Veterinaria, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14014, Córdoba, España

[2] Universidad de Turín. Departamento de Ciencias Agrícolas, Forestales y Alimentarias. Largo Paolo Braccini, 2, 10095 Grugliasco Turín, Italia.

t12bocaa@uco.es

La transmisión de genes de resistencia a los antibióticos (ARGs) es un factor primordial en el creciente número de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos en todo el mundo. El uso extensivo de antibióticos en las granjas ha sido reconocido como el mayor contribuyente al resistoma de los animales productores de alimentos [1]. La cadena alimentaria puede considerarse una importante vía de transmisión de ARGs de los animales a los humanos. En ella se establece un ecosistema conformado por diferentes grupos que actúan como reservorios de genes de resistencia [2]. Un ejemplo de esto es *Escherichia coli* [3]. Frente a esto, la metagenómica se presenta como un método independiente de cultivo de gran utilidad para elcontrol y vigilancia de la resistencia a antibióticos, accediendo al material genético de la muestra completa [4].

El objetivo de este trabajo se centró en investigar la dinámica del microbioma así como la incidencia de los ARGs durante la cadena de producción y consumo de un producto cárnico fermentado (salchichón Málaga) mediante secuenciación metagenómica de escopeta.
Para dar una visión "de la granja a la mesa", se recogieron muestras de heces de cerdo (n = 10) y humanos (n = 30), pienso (n = 5), canales (n = 10), masa cárnica (n = 20), producto final (n = 10) y muestras de superficies (n = 9). Se llevó a cabo la extracción de ADN total de cada muestra y paralelamente se realizaron análisis microbiológicos mediante técnicas dependientes de cultivo.

Los resultados metagenómicos fueron sometidos a un análisis bioinformático comenzando con la eliminación del genoma del cerdo y humano en cada muestra para trabajar únicamente con el genoma bacteriano. Se filtraron las secuencias cortas y de baja calidad. Las secuencias limpias se ensamblaron, obteniendo la abundancia taxonómica microbiana y la reconstrucción de genomas. De este modo se realizó una predicción de los genes de resistencia en cada genoma reconstruido. Identificada la presencia de los genes de resistencia en las muestras, se estudió el origen de estos mediante métodos bayesianos empleando SourceTracker [5].

El análisis metagenómico mostró el predominio de *Pantoea* en las muestras de pienso, un microorganismo de presencia natural en entornos alimentarios y con aplicaciones en alimentación animal por la producción de L-cistina y otros tipos de

ácidos [6]. Las canales de cerdo mostraron el predominio de *Anoxybacillus*, una bacteria termófila frecuentemente asociada a los procedimientos de escaldado [7]. *Latilactobacillus sakei* fue el microorganismo predominante en la masa cárnica y en el producto final, ya que suele utilizarse como cultivo iniciador en la producción de embutidos fermentados [8]. Por último, en las muestras de humanos destaca la presencia de poblaciones características del producto que no existían antes del consumo, en concreto *L. sakei* [9].

El seguimiento de los ARGs en las muestras estimó que los piensos eran el mayor contribuyente de ARGs (20%) presentes en el producto final, seguidos de la piel de las canales como se refleja en la Figura 1.

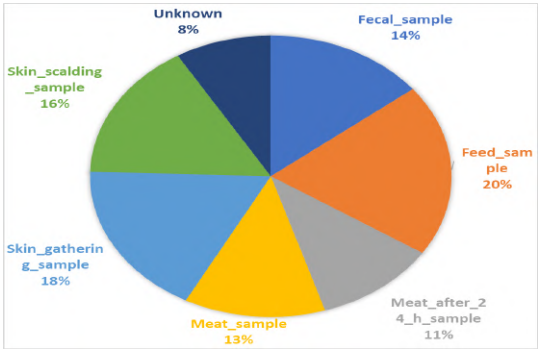


Figura 1: Distribución del origen de los ARG detectados en salchichón Málaga según las diferentes muestras estudiadas.

En humanos, este seguimiento mostró que el 29% de los ARGs encontrados en la microbiota intestinal tras una semana de ensayo proceden del producto final (Figura 2).

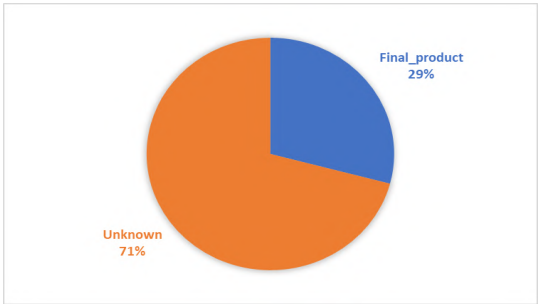


Figura 2: Distribución del origen de los ARG detectados en heces humanas después de una semana de consumo del producto final.

En conclusión, los datos metagenómicos permitieron determinar las etapas con mayor impacto en la persistencia y diseminación de poblaciones microbianas y sus genes de resistencia en la cadena de producción de productos cárnicos fermentados (i.e., salchichón Málaga). La colonización microbiana del tracto intestinal, así como los resultados del origen de los ARGs observados en humanos indican la importancia de desarrollar medidas de control adecuadas para evitar un aumento en la diseminación de resistencias.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto P18-RT-1386 (Resistali) de la Junta de Andalucía (España),

REFERENCIAS

[1] J. A Ayukekbong, M Ntemgwa, A. N Atabe, *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, **2017**, *6*(1), 1-8.

[2] D Florez-Cuadrado, M. A Moreno, & L Domínguez, *Adv. Food Nutr. Res.*, **2018**, 115-136.

[3] E Oniciuc, E Likotrafiti, A Alvarez-Molina, M Prieto, J Santos, & A Alvarez-Ordoñez, *Genes*, **2018**, *9*(5), 268.

[4] E Likotrafiti, E Oniciuc, M Prieto, J Santos, S López, & A Álvarez-Ordoñez, *EFSA Journal*, **2018**, *16*.

[5] D Knights, J Kuczynski, E. S Charlson, J Zaneveld, M. C Mozer, R. G Collman, F. D Bushman, R Knight, & S. T Kelley, *Nature Methods*, **2011**, *8*(9), 761-763.

[6] V Bampidis, G Azimonti, M. D. L Bastos, H Christensen, B Dusemund, M Kos Durjava, M Kouba, M López-Alonso, S López-Puente, F Marcon, B Mayo, A Pechová, M Petkova, F Ramos, Y Sanz, R. E Villa, R Woutersen, P. S Cocconcelli, B Glandorf, & J Tarrés-Call, *EFSA Journal*, **2020**, *18*(2).

[7] B Zwirzitz, S. U Wetzels, E. D Dixon, B Stessl, A Zaiser, I Rabanser, S Thalguter, B Pinior, F Roch, C Strachan, J Zanghellini, M Dzieciol, M Wagner, & E Selberherr, *npj Biofilms Microbiomes*, **2020**, *6*(1), 1-12.

[8] M Zagorec, & M. C Champomier-Vergès, *Microorganisms*, **2017**, *5*(3), 56.

[9] S Lim, J. H Moon, C. M Shin, D Jeong, B Kim, *Endocrinol Metab*, **2020**, *35*(2), 425-434.

EVOLUCIÓN ADAPTATIVA DE LAS LEVADURAS VÍNICAS A AMBIENTES ANTRÓPICOS: USO PARA SU MEJORA GENÉTICA

José Manuel Guillamón

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC). C/ Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7. 46980-Paterna (VALENCIA). guillamon@iata.csic.es

Desde la antigüedad, el ser humano ha empleado la capacidad de la levadura, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, para transformar los azúcares en etanol y en varios compuestos deseables para producir alimentos y bebidas, de los cuales el vino y la cerveza son los productos más conocidos. Estos procesos fermentativos someten a las levaduras a situaciones muy poco favorables para su desarrollo. Por tanto, las levaduras del vino han estado expuestas a condiciones de estrés durante milenios, lo que ha dado lugar a estrategias evolutivas adaptativas. Es por ello que las levaduras vínicas del género *Saccharomyces* se consideran un modelo interesante y muy valioso para estudiar los procesos de domesticación impulsados por el hombre. Si además tenemos en cuenta el desarrollo tecnológico, fundamentalmente la rapidez y abaratamiento de las técnicas de secuenciación masiva, estamos en disposición de describir estos procesos adaptativos, de gran interés para la industria, y conseguir unir diversidad fenotípica de las distintas cepas de *S. cerevisiae* con la variabilidad genómica de las mismas. Este conocimiento es de gran interés para llevar a cabo programas de mejora genética de cepas, tanto mediante ingeniería genética como por métodos no considerados GMOs (mutación, evolución adaptativa, hibridación, etc.).

En nuestro grupo hemos trabajo en los últimos años en describir los mecanismos moleculares que están detrás de algunos de estos mecanismos de adaptación, que, generalmente, coinciden con caracteres de gran interés para la industria. Un ejemplo clásico de adaptación al ambiente vínico es la mayor tolerancia que tienen las levaduras vínicas al SO_2, principal antimicrobiano y antioxidante utilizado en Enología. Se han descrito diferentes mecanismos de tolerancia de las levaduras vínicas al SO_2, pero el más importante viene determinado por una mayor actividad transcripcional del gen *SSU1*, que codifica una bomba de sulfito para excretar el SO_2 del interior de la célula. Las levaduras vínicas presentan una mayor eficiencia de esta bomba de sulfito como consecuencia de diferentes translocaciones del gen *SSU1* a otros cromosomas, aumentando su actividad transcripcional, al colocarse bajo el control de promotores de mayor actividad que su propio promotor [1] (**Figura 1**). Recientemente, hemos descrito una nueva recombinación genética, diferente de las anteriores translocaciones descritas. Se trata de una inversión de 38,5 Kb dentro del cromosoma XVI que igualmente aumenta la transcripción del gen SSU1 y su tolerancia al sulfito[2].

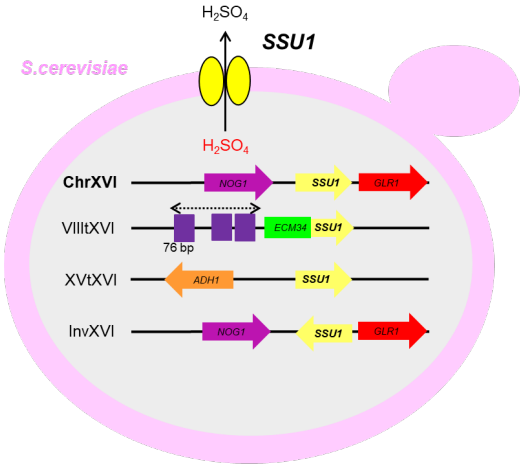


Figura 1: Vista esquemática de los reordenamientos cromosómicos identificados en las cepas resistentes a sulfito en *S. cerevisiae*

Otro de los mecanismos de adaptación en la que hemos estado trabajando es la adaptación de las levaduras vínicas a la baja temperatura. Las fermentaciones a baja temperatura (15-20 ºC) permiten obtener vinos con mayor riqueza aromática. Sin embargo, estas temperaturas están lejos de la temperatura óptima. Así, la baja temperatura tiene un efecto masivo en la fisiología celular (**Figura 2**). Estos efectos incluyen la disminución de la fluidez de la membrana, el aumento de la estabilización de la estructura secundaria del ADN y el ARN, la reducción de la eficiencia de la traducción y el plegamiento de las proteínas, el aumento de la desnaturalización de las proteínas y la disminución de la actividad enzimática.

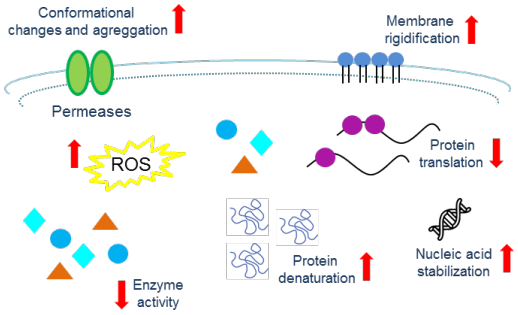


Figura 2: Efectos fisiológicos en las células de levadura durante el estrés por baja temperatura

En un trabajo reciente[3], utilizando un análisis de QTLs entre cepas con distintos grados de adaptación a la baja temperatura, hemos detectado regiones del genoma claves para la adaptación a la baja temperatura, especialmente en la zona de los telómeros, que son zonas de alta actividad recombinante, y relacionadas con el metabolismo lipídico y el estrés oxidativo, así como determinados genes implicados en la biogénesis y correcto funcionamiento de la mitocondria.

Toda esta información que relaciona determinadas características industriales, adaptación al ambiente enológico y los mecanismos moleculares que hay detrás de los mismos, son de enorme utilidad para llevar a cabo mejoras genéticas de levaduras. En nuestro grupo, hemos utilizado diferentes estrategias de mejora, basadas en técnicas no consideradas GMO, puesto que las cepas modificadas son más fácilmente aceptadas por la industria enológica, muy reticente al uso de levaduras recombinantes. Un ejemplo de ello es la hibridación entre cepas de diferentes especies del género *Saccharomyces*. Siguiendo con la adaptación a la baja temperatura, algunas especies del género, tales como *S. kudriavzevii* y *S. uvarum*, se caracterizan por tener una temperatura óptima de crecimiento muy inferior a *S. cerevisiae*, por lo que se consideran cepas criotolerantes. En nuestro laboratorio, hemos construido una cepa híbrida proveniente de un parental *S. cerevisiae* y un parental *S. uvarum*, que se caracteriza por tener una buena actividad fermentativa a baja temperatura y una buena tolerancia al etanol[4], reuniendo las mejores propiedades de ambos parentales.

AGRADECIMIENTOS

Algunos de los trabajos mecionados se han desarrollado dentro del contexto del proyecto PID2019-108722RB-C31 y del proyecto europeo ERA-IB "YeastTempTation" (PCIN-2015-143)

REFERENCIAS

[1] Pérez-Ortín, J.E.; Querol, A.; Puig, S.; Barrio, E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. Genome Res. 2002, 12, 1533–9, doi:10.1101/gr.436602

[2] García-Ríos, E.; Nuévalos, M.; Barrio, E.; Puig, S.; Guillamón, J.M. A new chromosomal rearrangement improves the adaptation of wine yeasts to sulfite. Environ. Microbiol. 2019, 21, 1771–1781, doi:10.1111/1462-2920.14586.

[3] García-Ríos E, Morard M, Parts L, Liti G, Guillamón JM (2017) The genetic architecture of low-temperature adaptation in the wine yeast Saccharomyces cerevisiae. BMC Genomics 18:159

[4] García-Ríos E, Guillén A, de la Cerda R, Pérez-Través L, Querol A and Guillamón JM (2019) Improving the Cryotolerance of Wine Yeast by Interspecific Hybridization in the Genus *Saccharomyces*. Front. Microbiol. 9:3232

MICROBIOLOGÍA CERVECERA.
VISIÓN PRÁCTICA DE LAS FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS

Núria Feliu
Mahou S.A / Laboratorio central de microbiología/ Dirección de métodos de análisis y sistemas de control.
nfeliub@mahou-sanmiguel.com

La elaboración de cerveza es un proceso de origen ancestral que ha ido evolucionando y adaptándose a la evolución de la biotecnología, tanto para ofrecer mejora en la calidad del producto como en el proceso de elaboración. En microbiología cervecera hay que considerar dos grandes áreas, por un lado la levadura de cultivo y por el otro los microorganismos alterantes. Existen una gran variedad de técnicas de análisis que cada vez están más extendidas en el sector cervecero tales como citometría de flujo, PCR, electroforesis, secuenciación de ADN, MALDI-TOF, etc, para cubrir varios objetivos. En función de la cepa que utilicemos nos encontraremos con diferentes tipos de fermentación que nos producirán productos con diferentes perfiles.

INTRODUCCIÓN

La elaboración de cerveza se ha ido adaptando a lo largo de los años a los diferentes avances científicos y técnicos que se han ido produciendo. Así como también la microbiología cervecera a podido aprovecharse de los avances que se van produciendo en la microbiología en general.

MICROBIOLOGIA CERVECERA

En cervecería nos encontramos con diferentes tipos de microorganismos. El principal y con un papel muy importante es la levadura de cultivo, microorganismo totalmente necesario y deseado para que la fermentación se produzca y podamos obtener cerveza.

A parte de la levadura de cultivo, en la cervecería nos encontramos un grupo de microorganismos alterantes formado por bacterias y levaduras salvajes. Entre las bacterias alterantes, principalmente destacan las bacterias lácticas y especies anaerobias estrictas destacando los géneros *Lactobacillus, Pediococcus, Pectinatus y Megasphaera* como más alterantes. Entre las levaduras salvajes, las que se consideran más peligrosas son aquellas que tienen características fermentativas similares a las levaduras de cultivo destacando especialmente *Saccharomyces cerevisiae* var. d*iastaticus.*

Además, nos encontramos con un grupo de microorganismos que no son alterantes y tampoco se trata de levadura de cultivo y que principalmente nos dan información de higiene de proceso.

Finalmente, hay que destacar que en la cerveza no se encuentran patógenos debido a características propias del producto tales como pH bajo, presencia de gas carbónico, presencia de lúpulo, presencia de alcohol, pocos nutrientes disponibles, etc.

LEVADURA CERVECERA

Hay diferentes tipos de levadura de cultivo que suelen clasificarse en función de su comportamiento al final de la fermentación. Los principales grupos que encontramos son las levaduras de fermentación baja o levaduras *lager* pertenecientes al género *Saccharomyces pastorianus* y las de fermentación alta o levaduras *ale* pertenecientes a *Saccharomyces cerevisiae.*

Recientemente hay muchos estudios en los que se empieza a utilizar levaduras de cultivo de diferentes géneros para producir cervezas[2,3].

Es muy importante tener las cepas conservadas en bancos de levadura ya sean internos en las empresas o bien externos en centros especializados. El método de referencia[1] para la conservación de estas levaduras es la utilización de temperaturas ultra-bajas (habitualmente nitrógeno líquido a -196ºC) para garantizar la estabilidad de las levaduras durante un periodo largo de tiempo. Sin embargo, en muchos centros se siguen utilizando métodos tradicionales en medios de cultivo sólido o líquido.

Cuando se manejan diferentes levaduras en un centro, uno de los puntos más importantes es la correcta diferenciación de las levaduras. Hay algunos métodos tradicionales que te permiten diferenciar a grandes rasgos entre levaduras *lager* y *ale* modificando condiciones de incubación y tiempos. O también algunos kits comerciales de PCR que utilizan secuencias diferenciadas entre las dos especies. Sin embargo, si se quieren diferenciar cepas de levadura de una misma especie se recomienda utilizar métodos basados en ADN como cariotipado, elementos delta, ADN mitocondrial, secuenciación, etc.

La levadura en la cervecería pasa por diferentes fases tales como propagación, fermentación y recolección para utilizarse en siguientes fermentaciones. En cada una de ellas es muy importante evaluar que la levadura está en buenas condiciones para seguir con el proceso, principalmente se analiza viabilidad y recuento de células. Existen diferentes técnicas para evaluar dichos parámetros desde los más tradicionales como el microscopio hasta equipos más automáticos o en línea como los citómetros de flujo o equipos de capacitancia.

El sector cervecero europeo llego a un acuerdo de no utilizar levaduras modificadas genéticamente (OGM). Sin embargo, si pueden utilizarse programas de mejora clásica como la hibridación o la selección de clones para obtener levaduras mejoradas[4].

TÉCNICAS MICROBIOLOGICAS PARA DETECCIÓN ALTERANTES

La forma tradicional de análisis y detección de alterantes es utilizando métodos microbiológicos clásicos tales como la siembra en placa utilizando medios de cultivo selectivos según el microorganismo alterante a detectar. El principal inconveniente de los métodos clásicos es el tiempo de incubación necesario hasta obtener el resultado. Este es el principal motivo por el cual hoy en día se encuentran en el mercado varias propuestas de métodos alternativos, normalmente más rápidos y específicos para poder detectar alterantes en cervecería. La técnica más implementada es la PCR a tiempo real y hay varios proveedores que ofrecen kits de screening, detección e identificación de los principales alterantes en cervecería.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al grupo de Microbiologia de alimentos de la Sociedad Española de Microbiología por ofrecerme la oportunidad de compartir mi presentación en el Congreso Nacional de Microbiología de los alimentos de Jaén y en particular a Albert Bordons por pensar en Mahou como participante.

REFERENCIAS

[1] European Brewery Convention (2005). 3.4.1. Yeast storage at ultra-low temperatures, *Analytica Microbiologica*, Editorial Hans Carl.

[2] Gibson, B., *et al* (2017) New yeasts-news brews: modern approaches to brewing yeast design and development. FEMS Yeast Research (volu.17, nº4)

[3] Methner, Y., *et al* (2019) Screening for the brewing ability of different non-saccharomyces yeasts. Fermentation 2019,5,101

[4] Orive, M. (2079) Selección de clones de levadura para mejora del proceso cervecero, Cerveza y malta, 44 (176), 24-29.

EFECTO SINÉRGICO DE LA COMBINACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEF) CON DOSIS SUBLETALES DE SULFITOS (SO_2) EN LA INACTIACIÓN DE SACCHAROMYCES BAYANUS Y BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS EN VINO.

Carlota Delso, Ignacio Alvarez, Javier Raso

Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, Dpt. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. C/ Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza (España) jraso@unizar.es

La elaboración de vino es un proceso complejo en el que diferentes procesos químicos, enzimáticos y microbiológicos tienen presencia. Los microorganismos son esenciales en la elaboración de vino ya que son responsables de las etapas de fermentación esenciales en este proceso. Sin embargo, la proliferación de algunos microorganismos en momentos inadecuados puede provocar alteraciones sensoriales o incluso suponer un riesgo para la salud de los consumidores. A pesar de su bajo pH y de la presencia de etanol algunos microorganismos son capaces de multiplicarse en el vino. Las propias levaduras del género *Saccharomyces* responsables de la fermentación alcohólica pueden alterar vinos con azúcares residuales o la proliferación de *Brettanomyces bruxellensis* puede aportar cambios sensoriales muy desagradables. Actualmente, la adición de sulfitos (SO_2) es la principal estrategia utilizada en las bodegas para el control microbiano. Sin embargo, su uso está siendo cuestionado debido a su efecto sintomatológico en personas alérgicas. En 2009, la Organización Mundial de la Salud recomendó la reducción de su uso en alimentos [1]. Por ello, la industria vitivinícola se encuentra en la búsqueda de alternativas para poder reducir o eliminar el uso de sulfitos en bodega.

La capacidad de los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) para inactivar células vegetativas de microorganismos a temperaturas no letales podría resultar una alternativa al SO_2. Aunque algunos estudios han mostrado el gran potencial de la tecnología PEF para la inactivación microbiana en vino [2]–[5], todavía son necesarios estudios básicos que sienten las bases de conocimiento para poder ser aplicado en un proceso real de vinificación.

En este estudio se evaluó la resistencia de *S. bayanus* y *B. bruxellensis* suspendidas en vino (obtenido sin sulfitos) a distintos tratamientos PEF (10-25 kV/cm; 25-1000 µs; 40-170 kJ/kg) combinados con concentraciones subletales de SO_2 (10, 25 y 50 ppm). El recuento de supervivientes se monitorizó inmediatamente tras los tratamientos PEF y la adición de SO_2 y tras 24 y 96 h. Los resultados mostraron que incluso los tratamientos PEF menos intensos (10 kV/cm) inactivaron hasta 4,0 ciclos logarítmicos en ambas levaduras inmediatamente tras el tratamiento (Figure 1A). La posterior incubación durante 24 horas en vino de las levaduras tratadas incrementó la inactivación observada en hasta 3,0 ciclos logarítmicos (Figure 1B). De este modo, mediante la aplicación de tratamientos de poca energía (< 50 kJ/kg) y campos eléctricos bajos (10 y 15 kV/cm) se pudieron alcanzar (tras 24 horas) niveles de inactivación similares a tratamientos del doble de energía (>100 kJ/kg). La combinación de un tratamiento PEF moderado con dosis subletales de SO_2 tuvo un efecto sinérgico en la letalidad de ambas levaduras tras 24 y 96 horas de incubación en el vino obteniéndose recuentos por debajo del límite de detección (> 6.5 ciclos log) (Figure 2). Este efecto sinérgico se atribuyó a la existencia de un porcentaje de

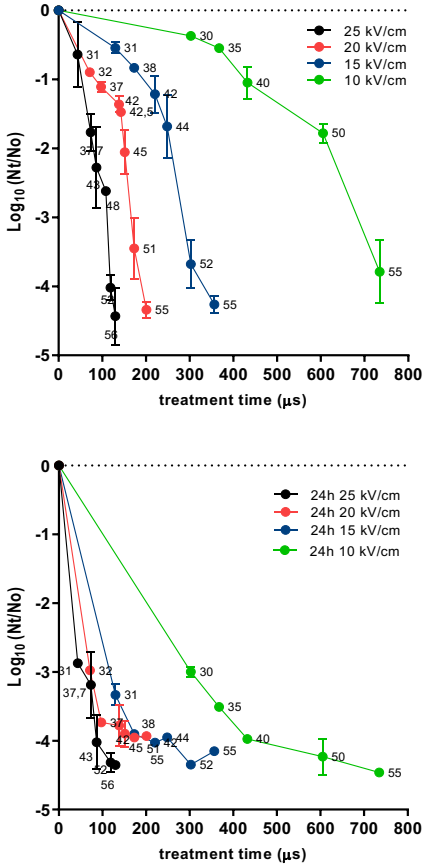


Figura 1. Inactivación de *S. bayanus* en vino tinto mediante tratamientos con PEF a 10, 15, 20 y 25 kV/cm. (A) Curvas de supervivencia obtenidas vino después del tratamiento PEF; (B) Curvas de supervivencia obtenidas al sembrar las muestras de vino después de 24 h de incubación a 25 °C. Los números juntos a los gráficos corresponden a las temperaturas de salida después del tratamiento PEF.

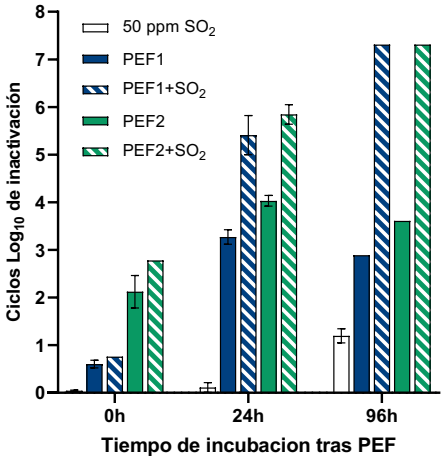


Figura 2. Inactivación de *S. bayanus* en vino tinto tras la aplicación de los tratamientos PEF_1 (15kV/cm, 130µs, 30°C), PEF_2 (15kV/cm, 220µs, 45°C) y combinados con SO_2 (50 ppm). Niveles obtenidos inmediatamente después del tratamiento y tras 24 y 96 horas de incubación.

población dañada subletalmente por los PEF en las que el SO_2 podría penetrar más fácilmente en el citoplasma de estas células.

Estos resultados revelan la capacidad de tratamientos muy moderados de PEF en combinación con dosis subletales de SO_2 para la inactivación de levaduras en vino. Por ello, se demuestra el gran potencial de la tecnología PEF para el control microbiano de levaduras alterantes en vino pudiendo ser una alternativa para eliminar o reducir los niveles de SO_2 durante el proceso de elaboración de vino.

REFERENCIAS

[1] WHO, "Evaluation of certain food additives. WHO Technical Report 952. Sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 17-26 June 2008," *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, no. 974, 2009, [Online]. Available: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_952_eng.pdf

[2] E. Puértolas, N. López, S. Condón, J. Raso, and I. Álvarez, "Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 130, no. 1, pp. 49–55, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.035.

[3] L. González-Arenzana *et al.*, "Inactivation of wine-associated microbiota by continuous pulsed electric field treatments," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 29, pp. 187–192, May 2015, doi: 10.1016/j.ifset.2015.03.009.

[4] C. Delsart *et al.*, "Comparison of the effect of pulsed electric field or high voltage electrical discharge for the control of sweet white must fermentation process with the conventional addition of sulfur dioxide," *Food Res. Int.*, vol. 77, pp. 718–724, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.foodres.2015.04.017.

[5] L. González-Arenzana, I. López-Alfaro, A. R. Gutiérrez, N. López, P. Santamaría, and R. López, "Continuous pulsed electric field treatments' impact on the microbiota of red Tempranillo wines aged in oak barrels," *Food Biosci.*, vol. 27, pp. 54–59, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.FBIO.2018.10.012.

¿SUPONE ASPERGILLUS FLAVUS UN RIESGO EN LOS VIÑEDOS?

Berguices S., Melguizo C , Gil-Serna J., Vázquez C., Patiño, B.

Universidad Complutense /Facultad de Ciencias Biológicas/Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología/ C/ José Antonio Novais, 12. 28040 Madrid. belenp@ucm.es

Las aflatoxinas (AF) son micotoxinas producidas principalmente por hongos pertenecientes a la sección Flavi del género *Aspergillus* destacando *A. flavus* como principal especie productora. Entre ellas, la AFB1 es la micotoxina más común en alimentos y piensos estando su contenido máximo regulado en diferentes alimentos [1]. La AFB1 está clasificada como agente carcinógeno del Grupo 1 por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer y se considera el carcinógeno natural más potente que existe.

Aunque hasta el momento los hongos más frecuentemente detectados en uvas han sido *Aspergillus* de la sección Nigri productores de ocratoxina A [2], algunos autores [2, 3] han descrito la presencia de *A. flavus* en este producto. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado el riesgo potencial que puede suponer.

Los patrones climáticos que parecen regir la distribución de *A. flavus* están cambiando y en el sur de Europa se espera un clima más cálido y seco [4]. Estas condiciones, históricamente, se asocian a una mayor prevalencia de *A. flavus* (y una mayor contaminación de los cultivos por AF [5]. Se espera que *A. flavus*, típico de regiones templadas y áridas, se vuelva gradualmente más problemático hacia los polos [4].

Es por eso que este estudio se enfocó en la caracterización de cepas de *A. flavus* aisladas de uvas provenientes de distintas regiones españolas. Para ello, se aisló *A. flavus* de muestras de uvas y se llevó a cabo una caracterización morfológica en seis medios de cultivo: AFPA, YES, MEA, CREA, CYA así como medio base uva realizándose una caracterización morfológica en base [6] [6]. Así mismo, se realizó una extracción de aflatoxinas en los medios CYA, YES y base uva analizándose la presencia de aflatoxina B1 mediante una cromatografía de capa fina (TLC). Para confirmar su correcta identificación y la distinción de otros *Aspergillus* de la sección Flavi similares se extrajo ADN de los aislados y se amplificó y secuenció una región parcial del gen de la beta-tubulina [7]. Por otra parte, se confirmó mediante PCR la presencia en su genoma de los genes aflQ y aflD implicados en la síntesis de aflatoxinas.

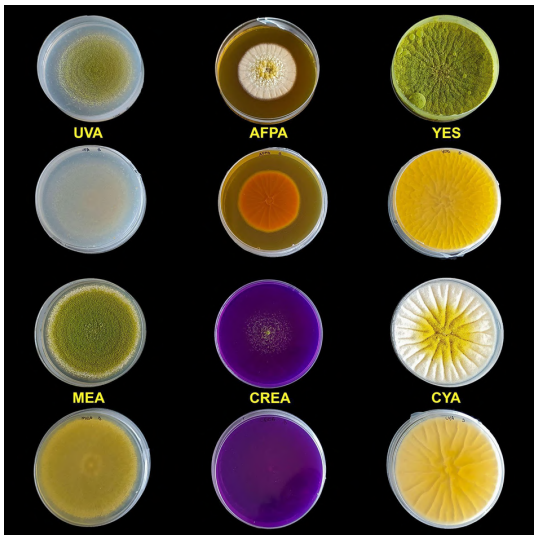


Figura 1: Crecimiento de una cepa de A. flavus en los 6 medios de cultivo evaluados, vistas en anverso y reverso.

Tras una semana de incubación, las 11 cepas aisladas crecieron en los 6 medios de cultivo (Figura 1). La morfología de todas ellas fue prácticamente idéntica y se correspondía con la descrita para *A. flavus*. Mediante secuenciación de la región parcial del gen de la beta-tubulina, se confirmó que se trataban de *A. flavus* y que tal y como se muestra en la figura 2 obtuvimos bandas de ampliación específica de los genes *alfQ* y

aflD, implicados en la ruta de síntesis de aflatoxinas.

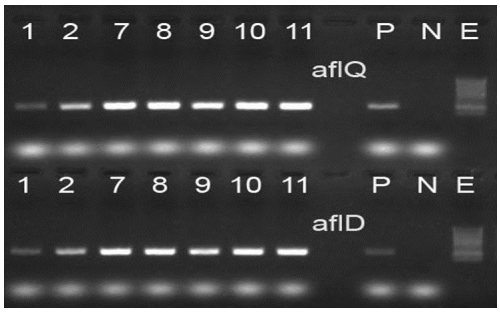


Figura 2: gel de agarosa en el que se observa la amplificación por PCR de los genes aflQ y aflD. Los números representan los aislados de *A. flavus*, P: control positivo, N: control negativo, E: patrón de peso molecular 100 pb.

Como se puede ver en la figura 3, de los tres medios analizados se detectó producción de AFB1 en CYA y YES, considerados medios de cultivo idóneos para detectar producción de micotoxinas, no siendo así en el medio base uva (UVA) en ninguna de las cepas analizadas.

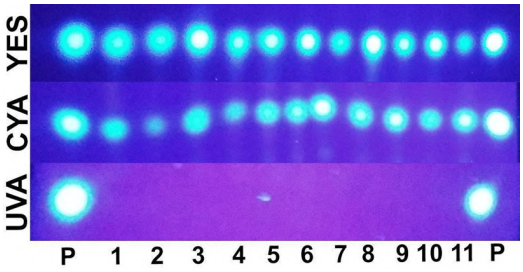


Figura 3: AFB1 detectada por TLC en distintos medios de cultivo, de arriba a abajo: YES, CYA, UVA. A ambos laterales se encuentran los patrones de movilidad (P), y entre ellos las toxinas extraídas de los cultivos de cada aislado (1, 2, 3…).

Aunque las AF no están descrita como las micotoxinas más frecuentes en el vino, no podemos ignorar el hecho de que en los últimos años *A. flavus* es cada vez más frecuente en uvas, incluso por encima de los *Aspergillus* de la sección Nigri. Como se puede observar a partir de los resultados obtenidos, todas las cepas de *A. flavus* caracterizadas, tienen la capacidad de producir de aflatoxina B1 y aunque en las condiciones ensayadas *A. flavus*, no parece producir en medio base uva parece, no se debe ignorar que estudios previos han detectado AFB1 en productos derivados de la uva como vino o mosto [8]. Actualmente, estamos analizando la producción de estos aislados directamente sobre uvas y pasas para comprobar si son capaces de producir aflatoxinas en esas condiciones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, proyecto RTI 2018-097593-B-C21R.

REFERENCIAS

[1] European Commission, OJEU, 2006, 364, 5-24.

[2] Esther García-Cela, Ana Crespo-Sempere, Jéssica Gil-Serna, Aleix Porqueres, Sonia Marin, J. sci. food agric., **2014**, 95, 1716-1729.

[3] Rita Serra, Ana Braga, Armando Venâncio, Res Microbiol, **2005**, 156, 515-521.

[4] Ángel Medina, Alicia Rodríguez, Yousef Sultan, Naresh Magan, World Mycotoxin J., **2015**. 8, 171-179.

[5] ICMSF, **1996**, 5, 347-381. Academic Press. Londres.

[6] Janos Varga, Jens C. Frisvad, Robert A. Samson, Stud Mycol, **2011,** 69, 57-80.

[7] María B. Pildain, Jens C Frisvad, Graciela Vaamonde, Daniel Cabral, Janos Varga, Robert A. Samson, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **2008**. 58: 725-735.

[8] André El Khoury, Toufic Rizk, Roger Lteif, Hayat Azouri, Marie Line Delia, Ahmed Lebrihi, Food Chem. Toxicol. **2008**, 46, 2244-2250.

RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS DESDE EL ENFOQUE ONEHEALTH. EL CASO DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA.

Carmen Torres, Carmen Lozano, Laura Ruiz-Ripa, Rosa Fernández-Fernández, Idris N Abdullahi, Sara Ceballos, Olouwafemi M Mama, Javier Latorre-Fernández, Allelén Campaña-Burguet, Paula Eguizábal, Myriam Zarazaga

Universidad de la Rioja, Facultad de Ciencia y Tecnología, Área de Bioquímica y Biología Molecular, Grupo de Investigacion OneHealth-UR, Madre de Dios 53, 26006 Logroño (carmen.torres@unirioja.es)

La Resistencia a los Antibióticos (RA) es un problema de dimensión mundial, que preocupa enormemente a las autoridades científicas y sanitarias y que compromete el tratamiento efectivo de los procesos infecciosos, así como tambien el éxito de muchos de los avances de la medicina moderna que necesitan los antibióticos como profilaxis. Este problema está íntimamente asociado al amplio uso (y en muchas ocasiones abuso) de los antibióticos no solo en clínica humana sino también en sanidad y producción animal, y en menor media en la agricultura. El uso de antibióticos no solo afecta a las bacterias patógenas, sino tambien a las bacterias comensales de la microbiota intestinal (o de otras localizaciones) de personas y de animales, ejerciendo una presión selectiva para la emergencia y diseminación de mecanismos de resistencia a los antibióticos. A través de las heces las bacterias multirresistentes pasan al ambiente y pueden contaminar las aguas, alimentos, suelos, etc. La RA es un grave problema de salud pública que incluye la sanidad humana y animal asi como la seguridad de los alimentos y la sanidad ambiental. Por ello, debe abordarse desde el enfoque OneHealth.

Staphylococcus aureus es un microrganismo comensal de la microbiota nasal de personas y de muchos animales, pero asimismo es un patógeno oportunista muy relevante. *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) es un problema de gran importancia clínica ya que implica la resistencia a la mayor pare de los antibióticos beta-lactámicos, muy relevantes en terapia humana y animal.

Las cepas SARM del linaje genético CC398 fueron descritas por primera vez en 2005 asociadas al ganado porcino y a personas ligadas al sector ganadero y la evolución de dicho linaje en la interfaz animal-hombre en los últimos 15 años es un claro ejemplo del concepto OneHealth, y constituye una línea de investigación prioritaria del grupo OneHealth-UR, de la Universidad de la Rioja. Las cepas del linaje SARM-CC398 se caracterizan por presentar un fenotipo de multiresistencia (que generalmente incluye diferentes familias de antibióticos), aunque generalmente contienen pocos factores de virulencia, pero esto no impide que pueda colonizar al ser humano y causar distinto tipo de infecciones.

Las cepas del linaje SARM-CC398 han sido detectadas en nuestro país con elevada prevalencia en animales de producción (especialmente en ganado porcino)[1] y en alimentos, especialmente en productos derivados del cerdo,[2] aunque tambien en otros derivados cárnicos. Por otro lado, SARM-CC398 se ha detectado colonizando trabajadores del sector ganadero,[3] y asimismo se ha descrito un numero creciente de infecciones causadas por cepas de este linaje.[4] Se ha demostrado que existe una correlación (estadísticamente significativa) entre la densidad de ganado porcino de una determinada región en

España y la frecuencia de detección de SARM-CC398 en los hospitales localizados en el entorno.[5] Se ha podido detectar cepas SARM-CC398 en el aire que rodea las granjas porcinas y existe la liberación de dichas cepas al medioambiente, detectándose tanto en aguas residuales como en animales de vida libre.[6,7]

Por otro lado, existe una evolución de esta línea genética SARM-CC398 en la interfaz animal-hombre con la adquisición o pérdida de determinados determinantes genéticos que le permiten la adaptación a distintas huéspedes, incluido el hombre.[8] Recientemente se ha observado que existen dos clados del linaje CC398: a) asociado al ganado (AG-SARM-CC398), que en el caso del sector porcino pertenece frecuentemente al *spa* tipo t011 y que las cepas son resistentes a tetraciclina y portan el gen *tetM;* b) clado independiente del ganado, que generalmente son sensibles a meticilina (IG-SASM-CC398) y pertenecen generalmente al *spa* tipo t571 y son sensibles a tetraciclina pero frecuentemente resistentes a eritromicina. Existen marcadores tanto fenotípicos como genotípicos que diferencian a ambos clados y demás presentan diferencias epidemiológicas de relevancia en salud pública.[8,9]
El análisis de la evolución del linaje SARM-CC398 en los diferentes ecosistemas constituye un excelente escenario para visualizar la relevancia del concento OnHealth en el ámbito de la RA.

AGRADECIMIENTOS

La investigación ha sido financiada por el proyecto MCIN/AEI /10.13039/501100011033.

REFERENCIAS

1. Gómez-Sanz E, Torres C, Lozano C, Fernández-Pérez R, Aspiroz C, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. Foodborne Pathog Dis. 2010, 7:1269-77.
2. Mama OM, Morales L, Ruiz-Ripa L, Zarazaga M, **Torres C.**High prevalence of multidrug resistant *S. aureus*-CC398 and frequent detection of enterotoxin genes among non-CC398 *S. aureus* from pig-derived food in Spain. Int J Food Microbiol. 2020, 320:108510.
3. Abdullahi IN, Lozano C, Ruiz-Ripa L, Fernández-Fernández R, Zarazaga M, Torres C. Ecology and Genetic Lineages of Nasal *Staphylococcus aureus* and MRSA Carriage in Healthy Persons with or without Animal-Related Occupational Risks of Colonization: A Review of Global Reports. Pathogens. 2021, 10:1000.
4. Lozano C, Aspiroz C, Ezpeleta AI, Gómez-Sanz E, Zarazaga M, Torres C**.** Empyema caused by MRSA ST398 with atypical resistance profile, Spain. Emerg Infect Dis. 2011, 17:138-40.
5. Ceballos S, Aspiroz C, Ruiz-Ripa L, Reynaga E, Azcona-Gutiérrez JM, Rezusta A, Seral C, Antoñanzas F, Torres L, López C, López-Cerero L, Cercenado E, Zarazaga M, Torres C and Study Group of clinical LA-MRSA. Epidemiology of MRSA CC398 in hospitals located in Spanish regions with different pig-farming densities: a multicentre study. J Antimicrob Chemother. 2019, 74:2157-61.
6. Gómez P, Lozano C, Benito D, Estepa V, Tenorio C, Zarazaga M, Torres C. Characterization of staphylococci in urban wastewater treatment plants in Spain, with detection of methicillin resistant ***S.*** *aureus* ST398. Environ Pollut. 2016, 212:71-6.
7. Ruiz-Ripa L, Gómez P, Alonso CA, Camacho MC, de la Puente J, Fernández-Fernández R, Ramiro Y, Quevedo MA, Blanco JM, Zarazaga M, Höfle U, Torres C. Detection of MRSA of Lineages CC130-*mecC* and CC398-mecA and *Staphylococcus delphini-lnu(A)* in Magpies and Cinereous Vultures in Spain. Microb Ecol. 2019, 78:409-15.
8. Zarazaga M, Gómez P, Ceballos S and Torres C. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* lineages in the animal-human interface. In Staphylococcs aureus Ed. A. Flech, 2018, American Press. *S. aureus*. http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00010-3.
9. Mama OM, Aspiroz C, Ruiz-Ripa L, Ceballos S, Iñiguez-Barrio M, Cercenado E, Azcona JM, López-Cerero L, Seral C, López-Calleja AI, Belles-Belles A, Berdonces P, Siller M, Zarazaga M, Torres C and study group of clinical *S. aureus* CC398. Prevalence and genetic characteristics of *Staphylococcus aureus* CC398 isolates, from invasive infections in Spanish hospitals, focusing on the Livestock-Independent CC398-MSSA Clade. Front Microbiol. 2021 12:623108.

PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS, ANTIOXIDANTES Y ANTI-INFLAMATORIAS DE EXTRACTOS DE HOJA DE OLIVO FRENTE A CEPAS DE *HELICOBACTER PYLORI* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Silván J.M.[1], Guerrero-Hurtado E.[2], Gutiérrez-Docio A.[2], Alarcón-Cavero T.[3], Prodanov M.[2], Martínez-Rodríguez A.J.[1]

1 Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM), Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, Grupo MICROBIO. C/ Nicolás Cabrera 9, Campus de Cantoblanco, 28049, Madrid.

2 Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM), Departamento de Producción y Caracterización de Nuevos Alimentos, Grupo INGREEN. C/Nicolás Cabrera 9, Campus de Cantoblanco, 28049, Madrid.

3 Hospital Universitario de la Princesa, Departamento de Microbiología. C/ Diego de León 62, 28006, Madrid.

jm.silvan@csic.es

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es uno de los principales patógenos humanos que afecta aproximadamente al 50% de la población mundial [1]. Durante la infección por *H. pylori* tiene lugar un proceso inflamatorio crónico que puede derivar en un agravamiento de los síntomas asociados a la infección. Habitualmente para su tratamiento se utiliza una terapia basada en el uso combinado de al menos dos antibióticos diferentes. Sin embargo, en los últimos años se han incrementado las cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos [2], por lo que se requieren nuevas alternativas sostenibles para su tratamiento.

Las hojas de olivo son el mayor subproducto obtenido durante la poda del olivo, recolección y limpieza de la aceituna, y que pueden representar un importante problema medioambiental cuando no se procesan correctamente. Sin embargo, este subproducto de la industria olivarera se caracteriza por su alto contenido en compuestos bioactivos, como el hidroxitirosol y la oleuropeína, de gran interés por sus potenciales propiedades antibacterianas, antioxidantes y anti-inflamatorias [3]. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antibacteriano, antioxidante y anti-inflamatorio de dos extractos de hojas de olivo frente a diferentes cepas de *H. pylori* resistentes a antibióticos.

Como se observa en la Tabla 1, ambos extractos mostraron, en mayor o menor grado, actividad antibacteriana frente a las diferentes cepas de *H. pylori*.

Cepas	Control de crecimiento	Extracto 1	Extracto 2
Hp44	7,8 ± 0,1^{b}	< 1,5*^{a}	< 1,5*^{a}
Hp48	7,6 ± 0,1^{c}	< 1,5*^{a}	5,5 ± 0,1^{b}
Hp53	7,4 ± 0,1,^{c}	< 1,5*^{a}	6,8 ± 0,1^{b}
Hp58	6,6 ± 0,3^{b}	< 1,5*^{a}	< 1,5*^{a}
Hp59	7,7 ± 0,1^{c}	< 1,5*^{a}	5,9 ± 0,3^{b}
Hp61	7,5 ± 0,3^{b}	< 1,5*^{a}	7,5 ± 0,1^{b}

Tabla1: Actividad antibacteriana de los extractos de hoja de olivo (2 mg/mL) frente a diferentes cepas de *H. pylori* tras 24h de tratamiento. Los resultados se expresan como log UFC/mL ± DS (n=3). ^{a,b,c} Valores dentro de una misma fila marcados con diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA) ($p<0,05$). *Límite de detección 1,5 log UFC/mL.

El extracto 1, constituido principalmente por compuestos muy hidrófilos, como el

hidroxitirosol y sus glucósidos, fue bactericida frente a todas las cepas estudiadas. Sin embargo, el extracto E2, constituido principalmente por compuestos moderadamente hidrófilos, como la oleuropeína, mostró una actividad cepa-dependiente, siendo bactericida para dos de las cepas estudiadas (*Hp44* y *Hp58*).

En cuanto a la actividad antioxidante (Tabla 2), ambos extractos mostraron una capacidad similar para inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células gástricas (AGS) infectadas por *H. pylori*. No se observaron diferencias significativas (p>0,05) en el porcentaje de inhibición de ROS entre ambos extractos para una misma cepa, excepto para la cepa *Hp48*. Tampoco se observaron diferencias significativas (p>0,05) en la inhibición de producción de ROS mostrada por un mismo extracto con las diferentes cepas infectivas.

Cepas	% inhibición de producción ROS	
	Extracto 1	Extracto 2
Hp44	18,1 ± 3,3[a]	22,4 ± 5,5 [a]
Hp48	16,7 ± 1,7 [a,*]	29,8 ± 3,9 [a,*]
Hp53	25,9 ± 4,8 [a]	33,8 ± 2,3 [a]
Hp58	23,0 ± 2,1 [a]	29,9 ± 2,0 [a]
Hp59	22,1 ± 3,9 [a]	25,7 ± 1,8 [a]
Hp61	25,9 ± 2,2 [a]	30,5 ± 5,0 [a]

Tabla2: Efecto de los extractos de hoja de olivo (2 mg/mL; pretratamiento 2h) en la producción de ROS intracelular en células gástricas infectadas por *H. pylori* (3h). Los resultados se expresan como % inhibición en la producción de ROS (media ± DS) (n=3). [a]Valores de una misma columna marcados con diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA) (p<0,05). *Valores de una misma fila marcados con asterisco indican diferencias significativas entre tratamientos (*t*-test) (p<0,05).

Por último, como se observa en la Tabla 3, todas las cepas de *H. pylori* estimularon significativamente (p<0,05) la producción de IL-8 en células gástricas, siendo las cepas *Hp58*, *Hp59* y *Hp53* las que presentaron un carácter más pro-inflamatorio. Sin embargo, ambos extractos redujeron significativamente (p<0,05) la producción de IL-8 en las células gástricas infectadas por *H. pylori*, independientemente de la cepa utilizada. El extracto 2 presentó un mejor potencial anti-inflamatorio, disminuyendo hasta un 90% la producción de citoquinas IL-8 en células gástricas infectadas por *H. pylori*.

Cepas	Producción IL-8 (pg/mL)	% reducción en la producción de IL-8	
		Extracto 1	Extracto 2
Control	225,0 ± 21,2[a]	-	-
Hp44	1.119,4 ± 112,3[c]	71,5%	81,0%
Hp48	3.116,3 ± 49,5[f]	30,6%	94,9%
Hp53	2.413,8 ± 30,1[d]	74,4%	90,7%
Hp58	733,1 ± 6,2[b]	42,5%	77,3%
Hp59	2.825,6 ± 94,6[e]	32,3%	93,4%
Hp61	955,0 ± 24,7[b,c]	60,8%	71,5%

Tabla3: Efecto de los extractos de hojas de olivo (2 mg/mL; pretratamiento 2h) en la producción de IL-8 en células gástricas infectadas por *H. pylori* (24h). Los resultados se expresan como % de reducción en la producción de IL-8 (media ± DS) (n=3). [a-f] Valores de producción de IL-8 marcados con diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA) (p<0,05).

Estos resultados demuestran la importancia de estandarizar la composición del extracto de acuerdo con las bioactividades a potenciar. La utilización de las hojas de olivo como fuente de compuestos bioactivos para la elaboración de extractos eficaces frente a *H. pylori* podría contribuir al desarrollo de nuevas y sostenibles estrategias de valorización de los subproductos de la industria olivarera contribuyendo a su reciclado y revalorización.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado en el marco del proyecto HELIFOOD (AGL2017-89566-R) financiado por el MINECO. Esperanza Guerrero-Hurtado agradece a la Consejería de Educación e Investigación de la Comunidad de Madrid el contrato IND2019/BIO-17238.

REFERENCIAS

[1] J.G. Kusters, A.H.M. van Vliet, E.J. Kuipers. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 449-490.

[2] A. Savoldi, E. Carrara, D.Y. Graham, M. Conti, E. Tacconelli. *Gastroenterology*, **2018**, *155*, 1372-1382.

[3] A. Karkovic, J. Toric, M. Barbaric, C. Jakobušic, C. *Molecules*, **2019**, *24*, 2001.

CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA Y RESISTOMA DE INDUSTRIAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADOS.

Cobo-Díaz J.F.[1], Barcenilla C.[1], Puente A.[1], Valentino V.[2], De Filippis F.[2], Ercolini D.[2], Alvarez-Ordóñez A.[1]

1 Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. C\ Campus de Vegazana s/n, 24007 León (España)

2 Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Agraria, Via Università, 100 - 80055 - Portici (Napoli, Italia)

jcobd@unileon.es

El microbioma y resistoma de 7 industrias de embutidos fermentados (chorizo y salchichón) fueron analizados mediante secuenciación metagenómica. Se tomaron un total de 119 muestras, obteniendo una media de 25 millones de lecturas pareadas por muestra. Tanto en la masa cárnica como en el producto recién embutido, previo a su maduración, se observaron patrones similares de abundancia relativa de especies bacterianas, si bien se apreciaron diferencias entre industrias, con altas abundancias de *Photobacterium carnosum*, *Clostridioides difficile*, *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus* y *Brochothrix thermosphacta*. Por el contrario, en el producto final *Latilactobacillus sakei* fue la especie dominante en todas las fábricas excepto en dos, en las que las especies más abundante fueron *Dellaglioa algida* (anteriormente *Lactobacillus algidus)* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente (Figura 1).

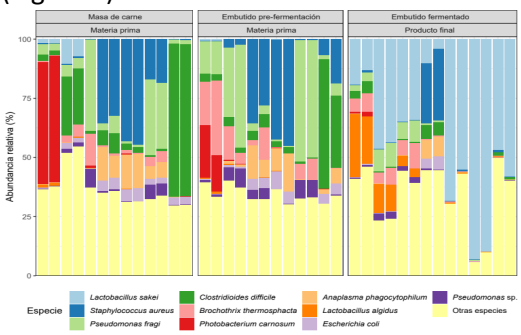


Figura 1: Abundancia relativa de las 10 especies bacterianas más abundantes encontradas en materia prima y producto final.

Según un análisis por *SourceTracker2*, *L. sakei* puede provenir de las materias primas o de los ambientes de procesado de alguna de las salas de la industria (cámara frigorífica, salas de envasado o maduración, según la empresa), mientras que *D. algida* y *S. aureus* parecen proceder de la carne usada como materia prima (Figura 2).

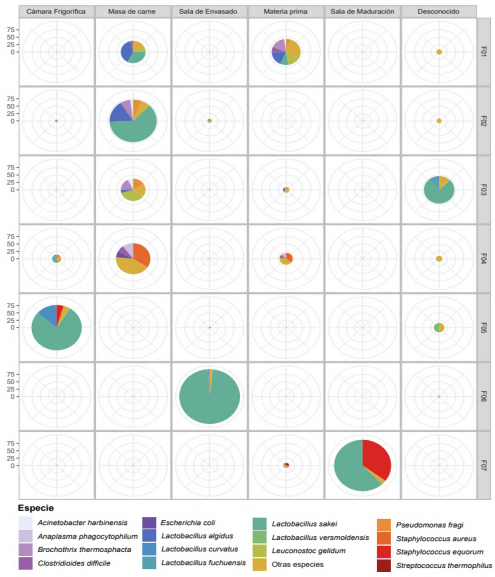


Figura 2: SourceTracker análisis. En cada fila se muestra el producto final de cada industria, mientras que cada columna presenta la superficie "origen" del microbioma del producto final. Los gráficos circulares para cada "origen" y producto final respresenta cómo de influyente (según tamaño del círculo) es la superficie "origen" (columna) en la microbiota del producto final (fila), y el porcentaje de influencia de cada especie (color y tamaño de las fracciones del círculo).

En los ambientes de la industria no se observó una dominancia marcada, excepto para las superficies de contacto de las salas de maduración donde, en la mayoría de los casos, *Staphylococcus equorum* superó el 50% de abundancia relativa. En otras salas abundaron diferentes especies adaptadas a las bajas temperaturas, como algunos miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Psychrobacter* y *Acinetobacter*, entre otras (Figura 3).

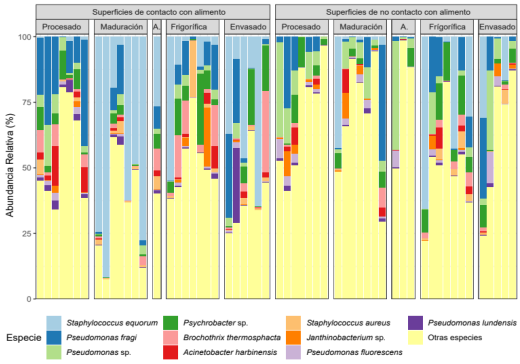


Figura 3: Abundancia relativa de las 10 especies bacterianas más abundantes encontradas en superficies de las industrias. A. = Sala de ahumado.

Se observó un incremento significativo de la abundancia de genes de resistencia a antibióticos durante la maduración de los productos cárnicos. Asimismo, las superficies de contacto con el alimento fueron las muestras con una mayor abundancia de genes de resistencia a antibióticos. Las mismas tendencias se observaron para genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (genes *qac*), un grupo de desinfectantes comúnmente usados en industria alimentaria (Figura 4).

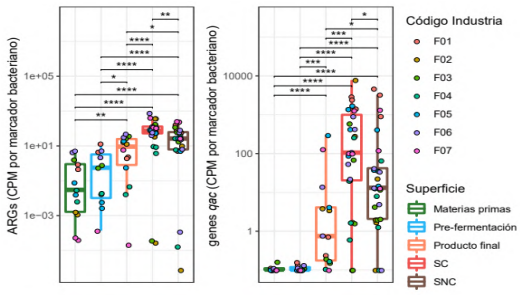


Figura 3: Abundancia de ARGs (genes de resistencia a antibióticos) y de genes *qac* . SC = Superficie de contacto; SNC = Superficie de no contacto (con el alimento). P-valores indicados por rangos: 0 **** 0.0001 *** 0.001 ** 0.01 * 0.05

Las especies mayoritarias tanto de las materias primas (*P. carnosum, C difficile, P. fragi, S. aureus* y *B. thermosphacta*) como de las superficies de no contacto (Pseudomonas sp., Psychrobacter sp., y Acinetobacter sp.) son típicas espcies bacterianas alterantes de productos cárnicos (Doulgeraki et al., 2012).

Por otro lado, tanto *L. sakei* como *S. equorum*, especies dominantes en producto final y superfies de contacto de salas de maduración, son 2 especies muy explotadas como cultivo iniciador debido a sus capacidades de adaptación y de control de especies características del deterioro de la carne (Dias et al., 2022).

A pesar de la poca importancia dada hasta ahora de la industria alimentaria como foco de propagación de resistencias a antibióticos, recientes estudios corroboran los resultados aquí expuestos de la acumulación de genes de resistencia a antibióticos en ambientes de producción cárnica (Cobo-Díaz et al., 2021).

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por la Comisión Europea a través del Proyecto MASTER, demtro «European Union's Horizon 2020 research and Innovation program» con el número de proyecto 818368.

REFERENCIAS

[1] AI Doulgeraki, D Ercolini, F Villani, G-JE Nychas. *Int J Food Microbiol,* **2012***, 157(2), 130-141.*

[2] I Dias, M Laranjo, ME Potes, AC Aguiheiro-Santos, S Ricardo-Rodrigues, MJ Fraqueza, M Oliveira, M Elias. *Fermentation*, **2022**, *8(2)*, 49.

[3] JF Cobo-Díaz, A Álvarez-Molina, EA Alexa, CJ Walsh, O Mencía-Ares, P Puente-Gómez, E Likotrafiti, P Fernández-Gómez et al. *Microbiome,* **2021***, 9, 204.*

PREVALENCIA Y FACTORES ASOCIADOS A LA COLONIZACIÓN DE ENTEROBACTERALES PRODUCTORES DE BETA-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO EN LA PROVINCIA DE TARRAGONA (ESPAÑA).

Moral Parras P.[1], Pérez Moreno M.O.[2], Centelles M.J.[2], Picó Plana E.[3], Esquinas Rychen G.[4], Machado Solanas M.P.[5], Naranjo Orihuela M.A.[6]

1 Laboratorio Clínico del Hospital Alto Guadalquivir, Avda. Blas Infante s/n, 23740 Andújar (Jaén).
2 Laboratori Clínic ICS Terres de l'Ebre del Hospital de Tortosa Verge de la Cinta, C/ Esplanetes s/n, 43500 Tortosa (Tarragona).
3 Laboratori Clínic ICS Camp de Tarragona del Hospital Universatari Joan XXIII, C/ Dr. Mallafré Guasch 4, 43005 Tarragona.
4 Línea pediátrica del Centro de Atención Primaria del Baix Ebre, Avda. Cristòfol Colom, 20, 43500 Tortosa (Tarragona).
5 Línea pediátrica del Centro de Atención Primaria Torreforta-La Granja, C/ Gomera, 10, 43006 Tarragona.
6 Línea pediátrica del Centro de Atención Primaria de Montblanc, Avda. Jaume Llecha, s/n, 43400 Montblanc (Tarragona).
pedro.moral.parras.sspa@juntadeandalucia.es

La emergencia y diseminación de bacterias con resistencia a múltiples antibióticos es reconocida en la actualidad como uno de los problemas de salud pública más preocupantes a nivel global. Este problema es particularmente acuciante en las infecciones ocasionadas por gramnegativos, cuyo mecanismo de resistencia más relevante es la producción de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) puesto que compromete la efectividad de antibióticos de elección en el tratamiento empírico de infecciones graves, como son las cefalosporinas de amplio espectro. Se trata de resistencias susceptibles de ser transmitidas horizontalmente, al estar ubicados los genes responsables en elementos genéticos movilizables, y que suelen acompañarse de resistencia a otros grupos de antimicrobianos, lo que contribuye a complicar el tratamiento de las infecciones en que están involucrados. (1)

Las primeras BLEE se identificaron en Europa a principios de la década de los 80 del pasado siglo y derivaban de las β-lactamasas plasmídicas clásicas TEM y SHV (2). El escenario cambió drásticamente a principios del presente siglo con la irrupción y expansión de las BLEE de tipo CTX-M. (3)

El tracto digestivo es el principal reservorio de los enterobacterales que causan infecciones y, además, es un nicho extraordinariamente favorable para el intercambio de genes de resistencia a los antimicrobianos entre bacterias y para la selección de bacterias resistentes ante la presión ejercida por la exposición a antibióticos. En España se han publicado algunos estudios que situaban la prevalencia de portadores intestinales comunitarios de EP-BLEE entre un 4,5 y un 8% (4).

Las infecciones producidas por enterobacterales productoras de BLEE (EP-BLEE) son cada vez más frecuentes en pacientes de la comunidad y sin ninguno de los factores de riesgo clásicos, lo que ha llevado a especular que los portadores intestinales asintomáticos (humanos y animales), la cadena alimentaria y el medio ambiente pueden desempeñar un papel importante como reservorios y transmisores (5).

En este estudio, determinamos la prevalencia de los portadores asintomáticos intestinales de EP-BLEE en la provincia de Tarragona e identificamos los principales factores de riesgo asociados al estado de portador.

Se trata de un estudio epidemiológico observacional de cohortes retrospectivo. Se analizaron las heces de 402 individuos sanos residentes en el área de estudio pertenecientes a 110 unidades familiares, durante los años 2019 y 2021. Las muestras fueron sembradas en medios de agar selectivos para el crecimiento y aislamiento de enterobacterales multirresistentes. La

identificación y estudio de sensibilidad de los aislados se realizó por MALDI-TOF® BruckerDaltonik y el sistema de microdilución automatizado MicroScan Walkway (Siemens®). Las variables demográficas y clínico-epidemiológicas de interés se obtuvieron a partir de un cuestionario que se les facilitó a los participantes. Se aplicó la razón de momios e intervalo de confianza al 95% para la asociación de factores riesgo a la colonización por EP-BLEE, atribuyéndole significación estadística si este intervalo no contiene el valor 1 y un p<0,05.

De las muestras de heces estudiadas se aislaron 30 EP-BLEE, lo que supone una tasa de colonización intestinal del **7,21%**; (95% CI: 4,88-10,20%). Para identificar posibles factores de riesgo asociados a la colonización por estos microorganismes multirresistentes, los analizamos tanto en individuos portadores como en aquellos donde no se aisló ninguna EP-BLEE. En la siguiente tabla se analiza dicho análisis.

FACTORES DE RIESGO	**Colonizados con EP-BLEE**	**No colonizados con EP-BLEE**	**OR (95% IC)**	**P**
Consumo de pollo	86,21%	92,68%	0,49 (0,15-2,10)	0,18
Consumo de cerdo	41,38%	74,25%	0,25 (0,10-0,57)	**0,003**
Personal sanitario	3,45%	7,24%	0,46 (0,01-3,00)	0,38
Convivencia con personal sanitario	3,45%	7,24%	0 (0,01-3,01)	0,38
Personal laboral en centro sociosanitaio	0%	1,07%	0 (0-12,65)	0,74
Convivencia con personas colonizadas por EP-BLEE	65,62%	2,95%	62,53 (21,35-185,50)	**<0,001**
Convivencia con animales	20,69%	52,01%	0,24 (0,08-0,63)	**0,001**
Viaje o contacto con persones que hayan viajado a países de alta prevalencia de EP-BLEE.	44,83%	37,70%	1,34 (0,57-3,08)	0,28
Origen en paises con mayor prevalencia de EP-BLEE	41,38	16,35	3,61 (1,49-8,46)	**0,002**
Hospitalización	31,03%	19,01%	1,92 (0,73-4,63)	0,10
Cirugía	4,00%	9,37%	0,40 (0,01-2,64)	0,32
Infección urinaria	12,00%	14,57%	0,80 (0,15-2,81)	0,50
Consumo de antibióticos	24,00%	30,56%	0,72 (0,23-1,95)	0,33
Heridas en la piel	0%	5,35%	0 (0-2,77)	0,27
Sondaje urinario	4,00%	3,06%	1,32 (0,03-9,79)	0,56
Infección prèvia por EP-BLEE	0%	0,56%	0 (0-28,13)	0,87
Diabetes	0%	1,39%	0 (0-11,37)	0,72
Otras enfermedades crónicas	12,00%	13,02%	0,91 (0,17-3,21)	0,59

Tabla1: Análisis de los factores de riesgo entre individuos colonizados y no colonizados por Ep-BLEE.

Se observa una mayor colonización por EP-BLEE en individuos originarios de países con una mayor prevalencia de estos multirresistentes y cuando hay convivencia con individuos ya colonizados en la misma unidad familiar. El consumo de carne de cerdo y derivados y la pertenencia de animales constituirían un factor que no predispone a la colonización por EP-BLEE.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la Beca Estudio Multicéntrico 2019 concedida por la Fundación José Luis Castaño-SEQC.

REFERENCIAS

[1] Peleg AY, et al. Hospital-acquired Infections due to Gram-Negative bacteria. N Engl J Med. 2010; 362:1804-1813.

[2] Kliebe C et al . Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins.Antimicrob Agents Chemother. 1985; 28: 302-307.

[3] Cantón R et al . CTX enzymes: origin and diffussion. Front Microbiol. 2012; 3:110.

[4] Vinue L et al. Prevalence and diversity of extended spectrum B-lactamases in faecal Escherichia coli isolates from healthy humans in Spain. Clin Microbiol Infect 2009; 15: 954–957.

[5] Rodríguez-Baño J et al. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. J Antimicrob Chemother. 2008;62:1142-1149.

ENTEROBACTER CLOACAE COMPLEX PRODUCTORES DE BETA-LACTAMASAS PROCEDENTES DE VEGETALES DE CONSUMO DIRECTO Y SU ENTORNO DE PRODUCCIÓN.

Alegría Á.[1] , Pintor-Cora A.[1] , Martins J.C.L.[1] , López-Díaz T.M.[1] , Rodríguez-Calleja J.M.[1]

1 Universidad de León/Facultad de Veterinaria/Departamento de Higiene y Tecnología de los alimentos/Área de Nutrición y Bromatología. Av. Emilio Hurtado, 3, 24007, León.
a.alegria@unileon.es

El "*Enterobacter cloacae* complex" (ECC) es un grupo formado por varias especies bacterianas ampliamente distribuidas en la naturaleza y capaces de producir una gran variedad de infecciones humanas. Pueden comportarse como patógenos oportunistas y son causantes de numerosos brotes de carácter nosocomial, ocasionalmente muy graves [1]. La detección cada vez más frecuente de bacterias del ECC resistentes a antibióticos es de preocupación creciente [2].

La presencia de alimentos contaminados con estas bacterias resistentes, especialmente en productos crudos, implica un doble riesgo sanitario por la potencial integración de estas bacterias en la microbiota del consumidor y por su transmisión a través de la cadena alimentaria [3]. Por tanto, la posible presencia y diseminación de estas bacterias (y sus genes) en los alimentos y su entorno de producción requiere ser estudiada.

En este trabajo se investigaron 235 muestras: 145 de vegetales frescos listos para el consumo (lechuga, escarola, tomate, pimiento, pepino, zanahoria, perejil y cilantro) y 90 de su entorno de producción (agua de riego, suelo de cultivo y trabajadores).

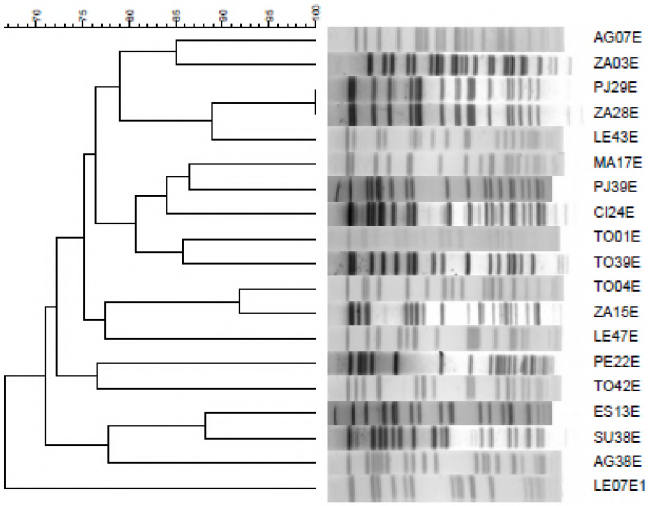
Para aislar microorganismos del ECC productores de β-lactamasas tipo AmpC se utilizaron medios de cultivo selectivos (Chromagar ESBL y MacConkey suplementado con 16 µg/mL de cefoxitina). Los aislados fueron identificados mediante MALDI-TOF. Su perfil de resistencia a antibióticos se determinó mediante antibiogramas de difusión en disco (MAST D72C) y fue ampliado con 15 antibióticos más (penicilina, penicilina con inhibidores, monobactámicos, carbapenémicos, cefalosporinas hasta 4ª generación, cefamicinas, cloranfenicol, sulfonamidas, aminoglucósidos, y fluoroquinolonas). Mediante PCR se detectaron los genes pertenecientes a las 6 familias de beta-lactamasas AmpC más comunes (MOX, CIT, ACC, DHA, EBC y FOX). Finalmente, tras una digestión del ADN cromosómico con la enzima *XbaI* se estudiaron sus pulsotipos mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

En total se reunieron, identificaron y caracterizaron 24 aislados del ECC (18 *Enterobacter cloacae*, 4 *Enterobacter ludwigii*, 1 *Enterobacter kobei* y 1 *Enterobacter asburiae*). Todos ellos presentaron un fenotipo productor de β-lactamasas tipo AmpC, de los cuales 7 (procedentes de tomate, perejil, cilantro, lechuga y agua de riego) corresponden con el fenotipo AmpC constitutivo. Además, uno (aislado de tomate) es coproductor de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y otro (de agua de riego) coproductor de carbapenemasas.

La presencia de multirresistencias se estudió con el panel de antibióticos ampliado y se detectaron

multirresistencias atípicas en un 46% de los aislados: gentamicina (6), cloranfenicol (1), ciprofloxacina (1), trimetroprim-sulfametoxazol (1), imipenem (1), además de 2 aislados resistentes a todas las categorías de beta-lactámicos excepto los carbapenémicos.

Los resultados de la PCR mostraron que 11 de los aislados portaron genes AmpC pertenecientes a la familia EBC, 1 a la DHA y 12 no pudieron adscribirse a ninguna de las familias investigadas. También, se detectaron los genes BLEE *bla*CTX y carbapenemasa *bla*GES en dos aislados distintos, en consonancia con sus fenotipos ESBL y productor de carbapenemasas,



respectivamente.

Figura 1: Dendrograma UPGMA construido con el software Gelcompar II mediante la comparación de perfiles de bandas de los aislados ECC. Similaridad calculada con el coeficiente de Dice.

Mediante el estudio de PFGE se pudieron tipificar 19 de los aislados (**Figura 1**), mostrando la presencia de dos aislados con el mismo pulsotipo en dos vegetales diferentes recogidos en el mismo muestreo (perejil y zanahoria), lo que sugiere la propagación de estas cepas, al menos dentro de una misma explotación.

A pesar de no detectarse relación genética entre aislados procedentes del agua de riego y de los vegetales frescos, la identificación de dos aislados, con uno o varios de los mecanismos de resistencia estudiados, sugeriría al agua como un probable vehículo de transmisión como ya se ha indicado en otros estudios [3].

Así pues, este trabajo demuestra la presencia y potencial diseminación de cepas del ECC resistentes a antibióticos, productoras de β-lactamasas AmpC y frecuentemente multirresistentes, en productos vegetales para consumo directo en fresco. Por tanto, es importante reforzar las buenas prácticas agrícolas para disminuir el riesgo de transmisión de estas bacterias y/o sus genes de resistencia a lo largo de la cadena alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el "Proyecto PID2019-107870RB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación – Agencia Estatal de Investigación/10.13039/ 501100011033" y la Universidad de León a través del "Programa de ayudas para la realización de estudios de doctorado de la Universidad de León" del que disfruta el investigador predoctoral Alberto Pintor-Cora.

REFERENCIAS

[1] ML Mezzatesta, F Gona, S Stefani, Future Microbiol, **2012**, 7(7), 887-902

[2] PD Tamma, Y Doi, RA Bonomo , JK Johnson, PJ Simner Clin Infect Dis., **2019**, 69(8), 1446-1455

[3] W Chelaghma, L Loucif, M Bendahou, JM Rolain, Microorganisms, **2021**, 9(12), 2534.

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE *Enterococcus* spp. EN CANALES DE POLLO

Gómez-Limia, L.[1,2], Cid-Aguilera, S.[1,2], Serrano-Galán, V.[1,2], Alonso-Calleja, C.[1,2], Capita, R.[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

lgoml@unileon.es; rosa.capita@unileon.es

En las últimas décadas se está produciendo un marcado incremento en la prevalencia de resistencia a los antibióticos, estimándose que en el año 2050 las infecciones provocadas por bacterias resistentes serán la principal causa de muerte en el mundo, con unos 10 millones de fallecimientos anuales, cifra sustancialmente superior a las 700.000 defunciones atribuibles a la resistencia a los antibióticos ocurridas en 2014. Las infecciones por bacterias resistentes incrementan, respecto a las provocadas por cepas sensibles, el tiempo de hospitalización y el riesgo de muerte. Además, estas infecciones suponen un coste para los sistemas de salud de los EEUU y la UE de aproximadamente 1.100 millones de euros cada año [1].

Las especies del género *Enterococcus* son bacterias Gram-positivas que se encuentran en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y la mayoría de los animales, por lo que pueden utilizarse como indicadores de contaminación fecal en agua y alimentos. Además, estos microorganismos son una causa frecuente de infecciones, tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad, dada su elevada capacidad para adquirir factores de virulencia [2].

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a muchos antimicrobianos y, además, han desarrollado mecanismos muy eficientes para la adquisición de genes de resistencia a antibióticos. Por ello, se consideran microorganismos centinela o indicadores de resistencia y a menudo se usan para monitorizar este problema de Salud Pública en diferentes ambientes [3].

La carne de pollo es la más consumida en España, por delante de la carne de vacuno y cerdo [4]. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido realizar una caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de carne de pollo.

Se analizaron 37 canales de pollo adquiridas inmediatamente después del sacrificio en dos mataderos del noroeste de España: matadero A (24 muestras) y matadero B (13 muestras). Para el aislamiento de las cepas objeto de este estudio se utilizó el medio selectivo kanamicina esculina azida (KAE, Oxoid). Se identificó un aislamiento de cada muestra (37 cepas) mediante PCR convencional (Tabla 1).

Primers	Secuencia (5' a 3')	Tª	pb
ddl *E. faecalis*-F	ATCAAGTACAGTTAGTCT	54	941
ddl *E. faecalis*-R	ACGATTCAAAGCTAACTG		
ddl E. *faecium*-F	TAGAGACATTGAATATGCC	54	550
ddl *E. faecium*-R	TCGAATGTGCTACAATC		
E. gallinarum -F	GGTATCAAGGAAACCTC	54	822
E. gallinarum -R	CTTCCGCCATCATAGCT		
E. *casseliflavus*-F	CTCCTACGATTCTCTTG	54	439
E. casseliflavus-R	CGAGCAAGACCTTTAAG		
E. hirae (murG)-F	GGCATATTTATCCAGCACTAG	60	521
E. hirae (murG)-R	CTCTGGATCAAGTCCATAAGTGG		

Tabla1: *Primers* utilizados para la identificación mediante PCR de *Enterococcus* spp.

Se examinó la susceptibilidad de las cepas (difusión por disco) frente a 14 antibióticos de importancia clínica: ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, quinupristina-dalfopristina, gentamicina (discos de alta carga, 120 µg), gentamicina, kanamicina, linezolid, fosfomicina, tetraciclina, tigeciclina, nitrofurantoína, rifampicina y teicoplanina. Para la clasificación de las cepas en resistentes, con susceptibilidad reducida y susceptibles, se siguieron los criterios propuestos por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) [5] y el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [6]. Se estudió la presencia de genes de resistencia en aquellas cepas resistentes a kanamicina (utilizando como diana el gen *aph(3')-IIIa*), tetraciclina (*tet(L)* y *tet(M)*) y eritromicina (*erm(B)*) (Tabla 2).

Primers	**Secuencia (5' a 3')**	**Tª**	**pb**
aph(30)-IIIa-F	GCCGATGTGGATTGCGAAAA	60	292
aph(30)-IIIa-R	GCTTGATCCCCAGTAAGTCA		
tet(L)-F	CATTTGGTCTTATTGGATCG	50	456
tet(L)-R	ATTACACTTCCGATTTCGG		
tet(M)-F	GTTAAATAGTGTTCTTGGAG	55	576
tet(M)-R	CTAAGATATGGCTCTAACAA		
erm(B)-F	GAAAAGGTACTCAACCAAATA	52	639
erm(B)-R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC		

Tabla 2: *Primers* utilizados para la detección de los genes de resistencia estudiados.

Se encontraron cepas de *Enterococcus* spp. en todas las muestras, con niveles superiores ($P < 0,001$) en el matadero A (6,41 ± 1,96 $\log_{10}$ ufc/g) que en el matadero B (3,64 ± 0,21 $\log_{10}$ ufc/g). Los aislamientos se adscribieron a las especies *Enterococcus hirae* (32 cepas, 86,49 % del total), *Enterococcus faecalis* (4 cepas, 10,81 %) y *Enterococcus gallinarum* (1 cepa, 2,70 %).
Un total de 25 aislamientos (67,57 %) presentaron resistencia a al menos a un antibiótico, siendo 12 de ellos (32,43 %) multirresistentes (con resistencia a 3 o más compuestos). Además de a la kanamicina, se observó una alta prevalencia de resistencia a la tetraciclina (11 cepas resistentes y 5 con susceptibilidad reducida) y la eritromicina (8 cepas resistentes y 8 con susceptibilidad reducida). Se detectó el gen *aph(3')-IIIa* en el 26,32 % de los aislamientos resistentes y con susceptibilidad reducida a la kanamicina, los genes *tet(L)* y *tet (M)* en el 50,00 % y el 62,50 % de las cepas resistentes y con susceptibilidad reducida a la tetraciclina, respectivamente, y el gen *erm(B)* en el 75,00 % de las cepas resistentes y con susceptibilidad reducida a la eritromicina.

La elevada prevalencia de resistencia a antibióticos observada pone de manifiesto la importancia de garantizar unas buenas prácticas higiénicas durante el sacrificio y manipulación de la carne de pollo. Este alimento es, según los datos obtenidos en el presente estudio, un reservorio de enterococos con genes de resistencia que pueden ser transferidos a otras bacterias patógenas a lo largo de la cadena de producción de alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Junta de Castilla y León (LE018P20), Universidad de León (18BB282) y Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-098267-R-C33). Lucía Gómez-Limia es beneficiaria de un contrato posdoctoral de la Junta de Castilla y León.

REFERENCIAS

[1] A. Castaño-Arriba, C. González-Machado, G. Igrejas, P. Poeta, C. Alonso-Calleja, R. Capita, *Pathogens*, **2020**, *9*, 1021.

[2] E. Guerrero-Ramos, J. Cordero, D. Molina-González, P. Poeta, G. Igrejas, C. Alonso-Calleja, R. Capita, *Food Microbiol.*, **2016**, *53*, 156-164.

[3] R. Capita, C. Alonso-Calleja, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2013**, *53(1)*, 11-48.

[4] Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, https://www.mapa.gob.es/app/consumo-en-hogares/resultado1.asp. Fecha del último acceso: 29/06/2022.

[5] EUCAST, "Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0" European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2021.

[6] CLSI, "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 30th ed." Clinical Lab. Standards Institute, 2020.

ESTIMACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DEL PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA TRAS EL TRATAMIENTO CON TETRACICLINA EN CÉLULAS DE *Listeria monocytogenes* PREVIAMENTE EXPUESTAS O NO EXPUESTAS A DOSIS BAJAS DE BIOCIDAS

Rodríguez-Melcón, C.[1,2], Serrano-Galán, V.[1,2], Alonso-Calleja, C.[1,2], Capita, R. [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

Listeria monocytogenes es uno de los principales microorganismos patógenos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria. Durante el año 2020 se registraron 1.876 casos de listeriosis invasiva en seres humanos en la Unión Europea, con una tasa de notificación de 0,42 casos por 100.000 habitantes y una tasa de letalidad del 13,0 %, la más elevada del conjunto de enfermedades transmitidas por los alimentos [1].

Los biocidas son compuestos comúnmente utilizados como aditivos, descontaminantes o desinfectantes [2]. La tolerancia de las bacterias a dichos compuestos puede representar un problema importante de Salud Pública, ya que podría contribuir a una mayor persistencia de los microorganismos patógenos en la cadena de producción de alimentos. Además, se ha sugerido que la adaptación de las bacterias a los biocidas podría estar asociada con un aumento de la resistencia a los antibióticos, hecho que se ha observado concretamente para algunas cepas de *L. monocytogenes*, bacteria que tradicionalmente ha tenido una baja prevalencia de genes de resistencia [3].

El objetivo de este estudio ha sido conocer el efecto de concentraciones subinhibitorias de tres desinfectantes de amplio uso en la Industria Alimentaria (cloruro de benzalconio, CB; hipoclorito sódico, HS; ácido peracético, AP) en la resistencia a la tetraciclina (TE) de una cepa de *Listeria monocytogenes* del serotipo 4b (LM, NCTC 11994).

Los cultivos se expusieron a concentraciones crecientes subinhibitorias de los desinfectantes, comenzando por la mitad de la concentración mínima inhibitoria (MIC) e incrementando 1,5 veces la concentración de biocida cada 24 horas hasta que dejó de observarse crecimiento, consiguiendo así la adaptación de la cepa.

Posteriormente, se examinó la susceptibilidad de LM a la tetraciclina, empleando 1.250 ppm del antibiótico y diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas). Tras el tratamiento se determinó el porcentaje de supervivencia de *L. monocytogenes* mediante la cuantificación de las células vivas e inactivadas por citometría de flujo, utilizando para ello el kit LIVE/DEAD™ (BacLight™ Bacterial Viability) que incluye los colorantes fluorescentes SYTO9 (fluorescencia verde) y yoduro de propidio (fluorescencia roja) (PI) para distinguir las células vivas de las inactivadas.

El HS fue el biocida que requirió las concentraciones más altas para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* tras 48 h de incubación a 37 °C (3.500 ppm, lo que

equivale a 350 ppm de cloro libre). Los valores MIC para el ácido peracético (AP) se sitúan en 1.050 ppm, llegando a una concentración final de crecimiento de 1.125 ppm en la cepa adaptada. El CB fue el compuesto que produjo la inhibición del crecimiento bacteriano a las concentraciones más bajas, concretamente a 2 ppm. Sin embargo, también fue el biocida al que más se adaptó la cepa en comparación con HS y AP, pudiendo crecer, tras la adaptación, a concentraciones de 8,5 ppm (valor 4,25 veces superior a la MIC).

Biocida	MIC (ppm)[a]	Adaptación (ppm)[b]
CB[c]	2,0	8,5
HS[d]	3.500,0	3.935,5
AP[e]	1.050,0	1.125,0

Tabla 1: Concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y concentraciones máximas de biocidas que permitieron el crecimiento microbiano tras la adaptación para *L. monocytogenes* NCTC 11994. [a]Concentración mínima inhibitoria; [b]concentración máxima de biocida que permitió el crecimiento microbiano tras la adaptación; [c]cloruro de benzalconio; [d]hipoclorito sódico; [e] ácido peracético.

La adaptación previa de LM a los desinfectantes, especialmente AP, incrementó la supervivencia de la cepa tras la exposición a 1.250 ppm de TE durante 24 horas, encontrándose un porcentaje (%) de células vivas del 52,85 ± 34,65 en el caso de LM adaptada a AP, frente a un 21,04 ± 34,23 para LM control (no expuesta a biocidas), un 12,87 ± 9,62 para LM adaptada a CB y un 5,30 ± 2,07 para LM adaptada a HS (Figura 1).

Tanto a las 48 horas como a las 72 horas de exposición al antibiótico, se ha observado una marcada disminución de las células vivas de *L. monocytogenes*, especialmente en el caso de los cultivos control (no adaptados a biocidas) y en los expuestos a HS. Sin embargo, el mayor porcentaje de células vivas, al igual que a las 24 horas de exposición a TE, lo mostraron las células de LM adaptadas a AP, con porcentajes (%) de supervivencia de 22,61 ± 28,75 y 16,31 ± 19,08 a las 48 y 72 horas, respectivamente.

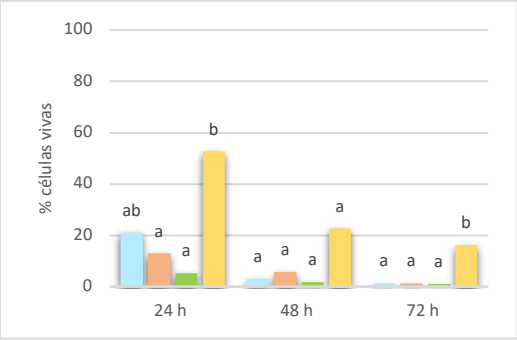


Figura 1: Porcentajes de supervivencia de *L. monocytogenes* (LM) adaptada a cloruro de benzalconio (CB), ácido peracético (AP), hipoclorito sódico (HS) o no adaptada (control) tras la exposición a 1.250 ppm de tetraciclina (TE) durante 24 h, 48 h o 72 h a 30 °C.

Estos hallazgos sugieren que el empleo de biocidas a concentraciones subinhibitorias podría contribuir a la emergencia de resistencia a antibióticos en cepas de *L. monocytogenes*. Por ello, debe evitarse el uso de desinfectantes a dosis bajas en los entornos de procesado de alimentos. Se requieren investigaciones adicionales para determinar los mecanismos responsables del incremento de resistencia fenotípica a los antibióticos tras el contacto con los desinfectantes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación ha sido subvencionado por la Junta de Castilla y León (LE018P20), la Universidad de León (18BB282) y el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-098267-R-C33).

REFERENCIAS

[1] EFSA and ECDC, *EFSA J.*, **2021**, *19(12)*, 6971 (324 pp.).

[2] R. Capita, C. Alonso-Calleja, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2013**, *53(1)*, 11–48.

[3] A. Alonso-Hernando, R. Capita, M. Prieto, C. Alonso-Calleja, *J. Microbiol.*, **2009**, *47*, 142–146.

LA ADAPTACIÓN A HIPOCLORITO SÓDICO SE ASOCIA CON MODIFICACIONES EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS Y EN EL PERFIL PROTEÓMICO EN *Salmonella* Enteritidis

González-Machado, C.[1,2], Alonso-Calleja, C.[1,2], Poeta, P.[3], Igrejas, G.[4], Capita, R.[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 Ciências Veterinárias, Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-811-Vila Real, Portugal

[4] Departamento de Genética e Biotecnologia, Escola de Ciências da Vida e do Ambiente, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 5000-811-Vila Real, Portugal

mgonm@unileon.es; rosa.capita@unileon.es

Salmonella enterica es la bacteria Gram-negativa responsable de la salmonelosis, una zoonosis que ocupa el segundo puesto, tras la campilobacteriosis, en cuanto al número de casos confirmados de enfermedad humana en la Unión Europea, con 52.702 casos registrados en 2020. Además, *S. enterica* es el principal agente etiológico de los brotes de enfermedad transmitida por alimentos [1].

El desarrollo de resistencia a los antibióticos es un gran problema para la Salud Pública mundial, y es prioritario adoptar medidas que limiten su desarrollo [2]. Las infecciones por bacterias resistentes se relacionan, respecto a las provocadas por cepas sensibles, con un mayor número de fallecimientos, una mayor duración de las hospitalizaciones y un mayor coste económico [3]. En estudios previos se ha observado que la adaptación de los microorganismos a los biocidas (aditivos, descontaminantes o desinfectantes), se asocia con la emergencia de resistencia a antibióticos [4].

La proteómica ha logrado un progreso significativo en la caracterización de las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia y ha contribuido a identificar nuevos objetivos farmacológicos. En general, el análisis global de los cambios en la composición de proteínas de las células bacterianas en respuesta al tratamiento con desinfectantes ha permitido construir una base de datos de proteínas involucradas en el proceso de resistencia [5]. Actualmente se utilizan diferentes técnicas de proteómica para evaluar estos cambios, principalmente la técnica de electroforesis en gel bidimensional, que es un método analítico que permite separar miles de proteínas simultáneamente en un solo gel [6].

El objetivo de este trabajo ha sido comprobar si la adaptación de *S. enterica* serotipo Enteritidis al hipoclorito sódico (HS), un desinfectante de uso común en la Industria Alimentaria, se asocia con modificaciones en el perfil de resistencia a antibióticos y en el proteoma bacteriano.

S. Enteritidis se expuso progresivamente a concentraciones crecientes subinhibitorias de HS hasta la máxima concentración con la que se observó crecimiento bacteriano (1,4 veces la concentración mínima

inhibitoria). Se ensayó, mediante la técnica de difusión por disco, la susceptibilidad de la cepa (antes y después de la adaptación al HS) a un panel de 15 antibióticos de importancia clínica: aminoglucósidos (estreptomicina-10 µg, gentamicina-10 µg y kanamicina-30 µg), carbapenos (meropenem-10 µg), cefalosporinas y cefamicinas (cefotaxima-30 µg, cefoxitina-30 µg y ceftazidima-30 µg), fenicoles (cloranfenicol-30 µg), fluoroquinolonas (ciprofloxacina-5 µg), inhibidores de beta-lactamasa (amoxicilina/ácido clavulánico-30 µg), inhibidores de folatos (trimetoprim-sulfametoxazol-25 µg), monobactámicos (aztreonam-30 µg), penicilinas (ampicilina-10 µg), quinolonas (ácido nalidíxico-30 µg) y tetraciclinas (tetraciclina-30 µg).

Para detectar las proteínas que sufrieron modificaciones tras la adaptación al biocida se utilizó la técnica de electroforesis en gel bidimensional (2-DE), procesándose los geles con el programa SameSpots.

Se ha observado que la adaptación de la cepa a HS se asocia con una disminución de la susceptibilidad a la tetraciclina (la cepa pasa de la categoria susceptible a la de resistente) y, en menor medida, a la cefotaxima y kanamicina (pasa de susceptible a intermedia). La reducción en la susceptibilidad a antibióticos tras el contacto con dosis bajas de biocidas ha sido previamente detectada [7].

Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) para un total de 26 spots de proteínas, que se analizaron para su identificación (Figura 1).

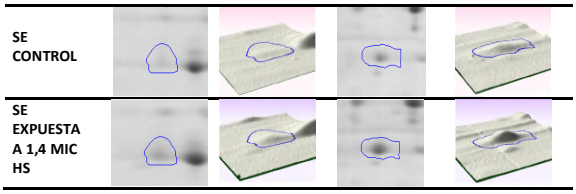


Figura 1. Comparación de los spots de proteínas de *Salmonella* Enteritidis, adaptada y sin adaptar a hipoclorito sódico (HS). Cada conjunto de paneles muestra la región del gel analizado (izquierda) y la lectura de SameSpots correspondiente (derecha).

El hipoclorito sódico es un biocida muy utilizado en la Industria Alimentaria, por lo que la caracterización de su capacidad para generar resistencia a diferentes antibióticos y las bases proteómicas de estos cambios es esencial para dilucidar su mecanismo de acción, a la vez que puede contribuir a generar biocidas más efectivos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación ha sido subvencionado por la Junta de Castilla y León (LE018P20), el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-098267-R-C33) y la Universidad de León (18BB282). Camino González-Machado es beneficiaria de un contrato predoctoral de formación del profesorado universitario (FPU, Ministerio de Universidades, España).

REFERENCIAS

[1] EFSA and ECDC, *EFSA J.*, **2021**, *19(12)*, 6971 (324 pp.).

[2] R. Capita, C. Alonso-Calleja, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2013**, *53(1)*, 11-48.

[3] S.M. Jajere, *Vet. World*, **2019**, *12(4)*, 504.

[4] A. Alonso-Hernando, R. Capita, M. Prieto, C. Alonso-Calleja, *J. Microbiol.*, **2009**, *47*, 142–146.

[5] T.B. Lima, M.F.S. Pinto., S.M. Ribeiro, L.A. de Lima, J.C. Viana, N.G. Júnior, E. de S. Cândido, S.C. Dias, O.L. Franco, *FASEB J.*, **2013**, *27(4)*, 1291-1303.

[6] S. Correia, M. Hébraud, P. Poeta, J.L. Capelo, G. Igrejas, *Future Microbiol.*, **2018**, *13(4)*, 403-406.

[7] D. Molina-González, C. Alonso-Calleja, A. Alonso-Hernando, R. Capita, *Food Control,* **2013**, *40*, 329-334.

ESTUDIO PROSPECTIVO DEL PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN LA CADENA ALIMENTARIA ANDALUZA

Díaz-Martínez C.[1], Bolívar A.[1], Romero-Reina A.[1], Possas A.[1], Pérez-Rodríguez F.[1]

[1] Departamento de Bromatología y Tecnología de Alimentos, Facultad de Veterinaria, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14014, Córdoba, España

t12bocaa@uco.es

La resistencia a los antibióticos es una amenaza sanitaria que afecta de manera generalizada a países desarrollados y en vías de desarrollo. Según la OMS, anualmente fallecen 700.000 personas en el mundo, a causa de enfermedades derivadas por bacterias que presentan resistencias a los antibióticos, siendo un problema social y económico del que derivan numerosas pérdidas [1]. Para poder abordar correctamente el problema es necesario dar un enfoque multidisciplinar [2], considerando que la cadena alimentaria es un factor determinante en la diseminación de resistencias [3]. Entre los factores clave en la transmisión de resistencias destacan el uso de antibióticos en los animales productores de alimentos, la microbiota de los alimentos como reservorios de genes de resistencia, y los procesos alimentarios como pueden ser los fermentativos producidos en los productos cárnicos crudo-curados.

El objetivo de este trabajo fue investigar el perfil fenotípico de resistencia de la microbiota de productos cárnicos crudo-curados de cerdo, dado los patrones de consumo e importancia económica en Andalucía. Se realizó un muestreo estratificado de los productos más consumidos en Andalucía, consistiendo en lomo embuchado (n = 30), fuet (n = 60), salchichón (n = 54), chorizo (n = 54) y jamón curado (n = 142). Se aislaron aquellos grupos microbianos más relevantes, incluyendo bacterias ácido lácticas empleadas como iniciadores de la fermentación, alterantes como *Pseudomonas* spp., enterobacterias y coliformes; *Escherichia coli* como indicador de higiene, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* como patógenos. Para su aislamiento se emplearon métodos dependientes de cultivo siguiendo las normas ISO.

Los aislados obtenidos fueron sometidos a un estudio de la susceptibilidad a antibióticos empleando el método de difusión en disco siguiendo las directrices del CLSI [4]. Los antibióticos probados y sus concentraciones fueron ampicilina 10 µg, cloranfenicol 30 µg, ciprofloxacino 5 µg, clindamicina 2 µg, eritromicina 15 µg, gentamicina 10 µg, penicilina 10 unidades, quinupristina/dalfopristina 15 µg, tetraciclina 30 µg, vancomicina 30 µg, aztreonam 30 µg, cefepime 30 µg, ceftazidima 30 µg, imipenem 10 µg, kanamicina 30 µg, levofloxacino 5 µg, trimethoprim/sulfamethoxazole 1,25/23,75 µg, cefotaxima 5 µg, estreptomicina 10 µg, cefoxitina 30 µg, rifampicina 5 µg. Como control de calidad se emplearon las cepas *S. aureus* ATCC 25923 *y P. aeruginosa* ATCC 27853.

Los resultados del estudio fenotípico de resistencias se muestran en la Tabla 1.

	% Pseudomonas spp.	% Bacterias ácido-lácticas	% Coliformes	% Enterobacterias	% E. coli	% S. aureus
AMP	0	2	49	36	18	-
ATM	76	-	-	-	-	-
FEP	26	-	-	-	-	-
CTX	-	-	15	20	35	-
FOX	-	-	-	-	-	56
CAZ	48	-	9	16	14	-
C	1	4	1	1	0	2
CIP	5	61	1	8	20	0
DA	-	17	-	-	-	56
E	-	10	48	50	5	22
S	-	-	0	0	0	-
CN	0	8	8	0	3	0
IPM	1	-	-	-	-	-
K	16	-	-	-	-	30
LEV	1	-	-	-	-	-
NOR	-	-	-	-	-	-
OX	-	-	-	-	-	-
P	-	15	-	-	-	59
QD	-	8	-	-	-	17
RD	-	-	-	-	-	29
TEC	-	-	-	-	-	-
TE	20	53	14	9	12	35
SXT	3	-	15	11	0	3
VA	0	80	-	-	-	-

Tabla 1: Porcentaje de aislados resistentes a antibióticos.

Coliformes y enterobacterias fueron los grupos microbianos que mayor resistencias presentaron a antibióticos de primera línea, siendo superior al 35% en el caso de ampicilina. Este resultado coincide con el observado en otros trabajos donde la resistencia de este grupo a ampicilina cifra en un 46% [5]. *Pseudomonas* spp. también mostró resistencia a este tipo de antibióticos, presentando un 50% aprox. de resistencia a la ceftazidima. No se han encontrado trabajos que referencien la resistencia a antibióticos de *Pseudomonas* spp. aislados de productos fermentados. En comparación con otros estudios, se observa una discrepancia en la resistencia [6]. Esto se debe a que los alimentos estudiados no son fermentados, lo que indica la importancia de estudiar este tipo de proceso en la adquisición de resistencias. Respecto a los aislados de *Staphylococcus* coagulasa positivos, más del 50% fueron resistentes a los antibióticos de primera línea para *S. aureus*, entre los que se encuentra la cefoxitina. Este antibiótico se usa en el estudio de aislados resistentes a la meticilina. Aunque el riesgo alimentario de *S. aureus* se debe a la producción de enterotoxinas, y no a un mecanismo infectivo [7], su presencia en este tipo de productos de cepas resistentes manifiesta la importancia de los alimentos en la posible transmisión y diseminación de resistencias. Por último, las bacterias ácido lácticas presentaron el porcentaje de resistencia más bajo a los antibióticos de primera línea testados.

En conclusión, la situación actual de bacterias resistentes a los antibióticos en los productos cárnicos crudo-curados estudiados no presenta un problema grave respecto a los antibióticos de primera línea, ya que presentan sensibilidad a solo uno de los empleados en dicho tratamiento, como es el caso de *Pseudomonas* spp., enterobacterias y coliformes que son sensibles a la gentamicina. A pesar de ello, es importante desarrollar medidas de control adecuadas para evitar un aumento de las resistencias a través de la cadena alimentaria y la diseminación a humanos y medio ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto P18-RT-1386 (Resistali) de la Junta de Andalucía (España),

REFERENCIAS

[1] World Health Organization. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance. Accessed: 27 June 2022.

[2] K Kvint, M Palm, & A Farewell, *FEMS Microbiol. Lett,* **2020**, *367*(14).

[3] M Bacanli, & N Basaran, *FCT,* **2019**, *125*, 462-466.

[4] CLSI. “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing” (Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022).

[5] R Capita, A Castaño-Arriba, C Rodríguez-Melcón, G Igrejas, P Poeta, & C Alonso-Calleja, *Microorganisms*, **2021**, *8*(8), 1226.

[6] E Heir, B Moen, A. W Asli, M Sunde, & S Langsrud, *Microorganisms*, **2021**, *9*(2), 207.

[7] T Gelbíčová, K Brodíková, & R Karpíšková, *Int. J. Food Microbiol*, **2022**, *34*, 109727.

INTOXICACIONES Y TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS. SU IMPORTANCIA EN LA SALUD PÚBLICA Y LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA EN ANDALUCÍA.

Rafael Martínez Nogueras.

Hospital Universitario de Jaén. Avenida del Ejército Español, 10. Servicio de Medicina Preventiva y Salud Pública.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen más de 200 enfermedades que son causadas por el consumo de alimentos contaminados por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas, como metales pesados.

Estas enfermedades, suponen un importante problema de Salud Pública en todos los países del mundo, aunque como reconoce la OMS, la carga recae de manera desproporcionada sobre los países de ingresos bajos y medianos y sobre los pacientes menores de 5 años.

En nuestro país, las intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias, aunque tienen un menor impacto en la morbilidad y mortalidad de la población, también tienen su gran repercusión en la Salud Pública, una atracción mediática importante y además, conllevan un impacto socioeconómico considerable.

Como uno de los pilares básicos de la Salud Pública en la Comunidad Autónoma de Andalucía, disponemos del Sistema de Vigilancia Epidemiológico de Andalucía (SVEA)[1] . Este Sistema de Vigilancia, ha alcanzado un alto nivel de madurez y se encuentra consolidado. A esto ha ayudado, el que recientemente ha sufrido dos test de estrés importantes y que, de ellos, ha salido más reforzado y mejorado.

SVEA, nos permite detectar, seguir, medir y relacionar las diferentes enfermedades de declaración obligatoria, para finalmente definir estrategias de prevención y control, o establecer medidas sobre los contactos o el medio. Un Sistema de Vigilancia, en base a la información correctamente recogida y analizada, fundamentalmente, nos debe ayudar a la toma de decisiones para el control de los problemas de salud en la población.

Por otra parte, un Sistema de Vigilancia Epidemiológica, debe responder con anticipación y eficacia en la investigación y control de emergencias en salud pública, incluido el riesgo de propagación de nuevas enfermedades.

En un mundo globalizado como es el nuestro, que facilita los movimientos de poblaciones, es fácil la propagación de enfermedades transmisibles, con una rapidez no conocida en siglos anteriores. Esto obliga a disponer un sistema de alerta precoz y respuesta rápida ante crisis de salud pública por enfermedades y riesgos emergentes.

En España, el Sistema Nacional de Alerta Precoz y Respuesta Rápida, está formado por una red de centros de enlace autonómicos, coordinados por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES). El CCAES, también tiene la responsabilidad de la coordinación a nivel internacional.

Esta coordinación entre Centros, nos debe permitir conocer y establecer posibles actuaciones ante los riesgos del mundo globalizado actual, como por ejemplo, los riesgos asociados a eventos masivos. En la Peregrinación anual a La Meca, se vienen describiendo en los últimos años, brotes de Cólera (1984, 1986 y 1989) y otras enfermedades diarreicas, con una prevalencia estimada entre los peregrinos, alrededor del 2%. En el año 2019, peregrinaron 2 millones y medio de personas, siendo 1.800 de ellos, residentes en España.

El Festival Kumbh Mela (India), es la mayor peregrinación de la humanidad. Es un festival religioso/espiritual, con un número de asistentes en aumento progresivo, de 400.000 en 1903 a 130 millones en 2019. La prevalencia de enfermedades diarreicas en este encuentro, es del 8-9 % [26% en 2016]. Es posible que, en 1817, a través de peregrinos que regresaban a Europa y Asia Oriental, se produjera la primera pandemia de cólera (asiática) de 1817-1824.

En España, tenemos ejemplos recientes de actuaciones ejemplares, por su adecuada coordinación y respuesta rápida, como la ocurrida en la crisis de la Listeria en el año 2019. SVEA notificó al CCAES, un brote de toxiinfección alimentaria por Listeria monocytogenes, asociado al consumo de carne mechada industrial. A partir de la declaración e investigación epidemiológica de pequeños brotes intrafamiliares de listeriosis, se pudo asociar el consumo de carne mechada con la enfermedad. Posteriormente, se confirmó la contaminación con Listeria monocytogenes de productos elaborados de carne mechada.

La investigación epidemiológica, también puede ser útil para descartar el origen alimentario de un brote, como es el caso del reciente brote de Hepatitis A en Andalucía. Desde el mes de Junio de 2016 hasta junio del 2017, se observó un aumento del número de casos de hepatitis A, con 1184 casos declarados en toda Andalucía en este periodo. La investigación y el análisis de datos, evidenció que la carga de enfermedad en la población estaba supeditada a la incidencia en un colectivo determinado. Así, se descartó la transmisión alimentaria y se confirmó la transmisión asociada a prácticas sexuales de riesgo.

La Microbiología y la Epidemiología, también fueron determinantes en la investigación y aclaración del origen del brote del síndrome urémico hemolítico de 2011. Fue un brote epidémico causado por la toxi-infección de un serotipo de la bacteria Escherichia coli, el O104:H4, que produjo en Alemania alrededor de 3.500 infecciones y la muerte de unas 50 personas. Este brote provocó una crisis alimentaria conocida popularmente como crisis del pepino. Un primer análisis, relacionó sin pruebas suficientes, a los pepinos españoles de llevar esta bacteria al mercado central de Hamburgo. Análisis posteriores, demostraron que no había contaminación por E. coli en los cultivos españoles de pepinos. Las pérdidas económicas para la huerta española, se calcularon en 200 millones de Euros.

Estas actuaciones, se pueden llevar a cabo, gracias a la estructura existente y la normativa que la ampara. Como la Ley 16/2011, de 23 de diciembre, de Salud Pública de Andalucía [2].

Pero esta estructura se ha demostrado insuficiente, principalmente en este momento, en que la respuesta de los servicios de salud pública durante la pandemia ha evidenciado la necesidad de un modelo con mayor capacidad anticipatoria y de máxima coordinación en la recolección, el manejo y el análisis inmediato y adecuado de datos.

Así, se ha vuelto a evidenciar la necesidad de disponer de un Centro Estatal de Salud Pública [3], que parece en breve será una realidad.

AGRADECIMIENTO:
A Mar Faraco, por sus valiosas aportaciones.

REFERENCIAS:

[1] Boja número 35. Página 2731. Sevilla, 19 de marzo de 1996. https://www.juntadeandalucia.es/boja/1996/35/d6.pdf

[2] LEY 16/2011, de 23 de diciembre, de Salud Pública de Andalucía https://www.juntadeandalucia.es/boja/2011/255/d4.pdf

[3] La Agencia Estatal de Salud Pública: una oportunidad para el sistema de Salud Pública en España. Daniel G. Abiétar, Juan Luis Beltrán Aguirre, Ana M. García, Sandra García-Armesto, Iñaki Gutiérrez-Ibarluzea, Andreu Segura-Benedicto, Manuel Franco, Ildefonso Hernández-Aguado. Gaceta Sanitaria. Vol. 36. Núm. 3. Páginas 265-269 (Mayo - Junio 2022).

SUPERVIVENCIA DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN SALMUERA DE ACEITUNAS DE MESA VERDES ESTILO ESPAÑOL O SEVILLANO

Valero, A.[1]; Posada-Izquierdo, G.[1]; Aldehuela, R.[1]; Arroyo-Lopez, F.[2]; Garcia-Gimeno,R.[1]

[1]Dep. de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, UIC Zoonosis y Enfermedades Emergentes desde la Perspectiva de Una Salud ENZOEM, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeiA3 , Universidad de Córdoba, Rabanales, 14014 Córdoba, España

[2] Food Biotechnology Department,Instituto de la Grasa (IG-CSIC), University Campus Pablo de Olavide. Building 46. 41013, Sevilla, Spain

bt2poizg@uco.es

La aceitunas de mesa (AM) es uno de los alimentos fermentados más importante de los países mediterráneos, con una producción mundial <3 millones de toneladas/año. Existen diferentes estilos de procesamiento para producir este vegetal fermentado. Por lo general, se aplican tratamientos con lejía, la salmuera/ salazón (en salmuera directa y en salmuera maduras), la acidificación, la fermentación o coción. Con el fin, de iniciar una fermentación dirigida, las bacterias ácidolácticas (LAB) y las levaduras se encuentran entre los microorganismos más importantes que impulsan adecuadamente las fermentaciones, determinando el sabor, la calidad y la seguridad del producto final. Especialmente, las LAB juegan un papel esencial al transformar los azúcares presentes en la aceituna y lo cual conduce a una rápida acidificación de las salmueras [1]. Las AM tienen un largo historial de seguridad microbiana. Sin embargo, a pesar de que las condiciones fisicoquímicas no son favorables para el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos (pH bajo, altas concentraciones de sal y presencia de compuestos antimicrobianos como los polifenoles), se han reportado algunos brotes de enfermedades [2].

En los últimos años las investigaciones se han centrado en identificar y conocer la supervivencia de patógenos en envases de AM comercial [3] y más específicamente la posible presencia de *L. monocytogenes* en AM verdes. Las BAL pueden inhibirse en las aceitunas debido a los cambios producidos en el medio en presencia de otros microorganismos. *L. monocytogenes* es un patógeno que su presencia en AM no es muy característico ya que sus condiciones de pH y concentración de sal, no son las más apropiadas, pero hay ocasiones en que el proceso de elaboración (fermentación) de en AM al ser principalmente artesanal y unido a la variabilidad propia del fruto puede generar condiciones físico-químicas en las salmueras que permitan el crecimiento y/o supervivencia del patógeno durante el proceso. Por ello, el propósito del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de *L. monocytogenes* y de bacterias acido lácticas en muestras de AM "Sevillana" inoculadas en diferentes condiciones, a lo largo de 55 días y con un pH inicial de 9 en una salmuera a 11% de sal en diferentes condiciones: de salmuera estéril o no y muestras inoculadas en co-cultivo con BAL y *L. monocytogenes*.

Cada muestra estaba en un frasco de cristal con rosca con 60 g de aceituna y 60g en un total 168 y las siguientes condiciones: AM en salmuera **estéril** + *L. monocytogenes* **(LS);** AM en salmuera **no estéril** + *L. monocytogenes* **(L);** AM en salmuera **estéril**+ BAL **(BS)**; AM en salmuera **estéril**+ *L. monocytogenes* +BAL **(BLS);** Posteriormente fueron mantenidas a temperatura ambiente (25°C)

La inoculación fue una concentración final de 10^6UFC/g para *L. monocytogenes* con cepas de la Colección Española de Cultivo Tipo (CECT) 935, 4030, 5366, 5725 y una concentración final de

10^7UFC/g para las BAL, las **c**epas fueron cedidas por EBT "Tafis" del Instituto de la Grasa (Sevilla) constituida por 3 cepas de *Lactobacillus pentosus:* 13B4 (1/10), 119(4/10), LPG1 (5/10); se inoculó con 0,1 ml de cada una según la condición estudiada. Se monitorizó el comportamiento microbiano de ambas especies y la evolución del pH durante todo el estudio en la salmuera y en el caso del fruto se realizó en tres tiempos a lo largo del estudio. Para la medición de pH se utilizaron las tiras reactivas Labbox (Madrid), cada día de análisis en las muestras (L, LS, BLS) y un phmetro Hanna (Madrid) en las muestras (BS). El análisis de microbiológico se realizó por triplicado, las diluciones fueron agua de peptona al 0,1% y se sembraron mediante el sembrador automático en espiral y en el recuento de colonias en placa se utilizó un Flash & Go (ambos de IUL Instrumentos, Barcelona). El recuento de BAL fue en MRS agar, las placas fueron incubadas con 10% CO_2 por 24h/33°C; para el recuento de *L. monocytogenes en agar* OCLA, OXFORD, y PALCAM todos los medios fueron de OXOID (UK), se incubaron a 24-48h/37°C. En el análisis estadístico se estudiaron las diferencias significativas entre las condiciones estudiadas con IBM SPSS v25. Se emplearon los modelos predictivos para describir el comportamiento observado a través de DMfit y GINafit y por último, se empleó el software ComBase.

Dentro de los resultados más relevantes tenemos que las BAL presentan un comportamiento inusual a diferencia de otros estudios realizados en aceituna de mesa. En nuestro estudio se produce un decrecimiento de las BAL durante la fase de fermentación en todas las condiciones estudiadas, lo cual provoca que no se modifique el pH a lo largo del tiempo y por tanto se mantenga de entre 9 y 7 durante todo el estudio (1320 h). Algunos autores han recogido en sus estudios que el pH inicial en la fermentación suele estar próximo a un valor de 10 unidades y final de 3-3,5. Esto puede ser debido a que como las BAL no se desarrollaron como se esperaba, la producción de ácido láctico fue menor y el valor de pH no disminuyó. En el caso de *L. monocytogenes* según la datos bibliográficos se esperaba que sobreviviera aproximadamente 100h (según las condiciones del producto de bajo pH y alta concentración de sal, junto al aumento de la población de BAL) pero los resultados demostraron la capacidad de supervivencia, con una tasa de crecimiento de 0,16 y posterior tasa de inactivación -0,11; para las aceituna (LS), dichos resultados se ajustan a un modelo de crecimiento de Gompertz (R^2=0,96) y al modelo de inactivación de Geeraerd Shoulder+tail (R^2=0,89). Mientras que para BLS, solo presento un comportamiento descripto por el modelo de inactivación de Albert con un R^2=0,92. Los resultados obtenidos de *L. monocytogenes* **(L), (LS) y (BLS)** en función del tiempo son muy similares con los obtenidos en ComBase con las simulaciones: a 28°C para *L. monocytogenes* en BHI con una concentración de NaCl: 6,3 % y un pH: 7,3 y conservantes nitrato sodico o potasio 15ppm. Y Los parámetros cinéticos y del ajuste fueron semejantes a nuestros resultados: ERROR: 0,46; K_{max}: 0,01 y DMP: 8,78

CONCLUSIÓN: Se ha puesto en manifiesto la gran capacidad de supervivencia de *L. monocytogenes*. Se podría afirmar que las BAL al no desarrollarse inicialmente, no han ejercido un efecto antagonista frente a patógeno, este presentó un incremento en los primeros puntos de análisis para luego decrecer; el ajuste de la predicción es adecuado.

AGRADECIMIENTOS: investigación financiada por proyecto TOBE (RTI2018-100883-B-I00, MCIU/AEI/FEDER, UE) y (Proyecto AT 2017-5686) fondos FEDER. Realizado por AGR170HIBRO

REFERENCIAS: [1] Hurtado, A.; Requant, C.; Bordons, A.& Rozes, N. (2012) Lactic acid bacteria from fermented olives. Food Microbiol. 31, 1-8. 393 . [2]Medina-Pradas, E. & Arroyo-López, F.N. (2015). Presence of toxic microbial metabolites in table olives. Frontiers Microbiol. 395 6, 873. [3]Romero-Gil, V.; Media, E.; Garrido-Fernández, A.& Arroyo-López, F.N. (2018). Foodborne pathogen survival in comercial 427 Aloreña de Málaga table olive packaging. Frontiers Microbiol., 9, Art 2471.

CITOTOXICIDAD EN AISLADOS DE *Aeromonas* PROVENIENTES DE PRODUCTOS VEGETALES FRESCOS Y AGUA DE RIEGO

Alberto Pintor- Cora[1], Olga Tapia [2], María Elexpuru [2], Ángel Alegría [1], Jose M. Rodríguez-Calleja [1], Jesús A. Santos [1] and José Ramos-Vivas [2]

[1] Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León.

[2] Grupo de Investigación en Alimentos, Bioquímica Nutricional y Salud. Universidad Europea del Atlántico, 39001 Santander.

apintc@unileon.es

El género bacteriano *Aeromonas* ha recibido constante atención en diferentes áreas, desde la acuicultura y la medicina veterinaria, hasta la seguridad alimentaria. En los últimos años, el número de publicaciones científicas que han investigado la presencia de cepas de *Aeromonas* en productos frescos o listos para el consumo, como verduras y mariscos, ha aumentado ligera pero constantemente. Algunas cepas de este género, dado su potencial virulento y su implicación en brotes de enfermedades de transmisión alimentaria, han sido etiquetadas como "patógenos emergentes" en este contexto. Además, la elevada prevalencia de aislados de *Aeromonas* resistentes a antibióticos procedentes de alimentos añade una especial relevancia a este género.

Las especies de *Aeromonas* producen múltiples factores de virulencia que han sido solo básicamente estudiados y parcialmente caracterizados en varias especies del género, siendo el desconocimiento de los mecanismos a través de los cuales provocan enfermedades un aspecto complejo en el estudio de estas bacterias. Al parecer, algunas toxinas podrían ser el origen de las patologías que causan. Lo intrincado de la taxonomía de este género sumado a la escasa caracterización de dichas toxinas y al aislamiento cada vez más frecuente de especies distintas a *A. hydrophila* y *A. caviae* hacen necesaria una reevaluación de su virulencia en distintos modelos *in vitro* e *in vivo*.

En el presente trabajo se estudió una colección de 8 cepas del género *Aeromonas* productoras de β-lactamasas; 6 de ellas aisladas de vegetales de consumo en fresco y 2 provenientes del agua de riego de explotaciones agrícolas. Para estudiar su capacidad citotóxica se empleó microscopía confocal tras infectar distintas líneas celulares: HT-29 (epitelio de colon humano), vero (epitelio renal de mono verde africano, *Chlorocebus sp.*), J7774.1 (macrófagos de ratón) y fibroblastos primarios de embrión de ratón (MEFs). Las células de colon humanas, junto con las células de mono y de ratón fueron infectadas con una multiplicidad de infección de 100 bacterias por células (100:1) hasta 3 horas. Posteriormente, se realizó una tinción con moléculas fluorescentes para estudiar la morfología celular. El análisis de la interacción se realizó un microscopio NIKON AJ-1 a 400 aumentos.

Cepa	Origen	Especie
LE20E	Lechuga	*A. veronii*
ES19E	Escarola	*A. hydrophila*
ES20E	Escarola	*A. veronii*
ES42E	Escarola	*A. hydrophila*
AG26E	Agua	*A. hydrophila*
CI20E	Cilantro	*A. salmonicida*
CI21E	Cilantro	*A. salmonicida*
AG29E1	Agua	*A. hydrophila*

Tabla 1: Cepas de *Aeromonas* utilizadas en el presente trabajo.

Posteriormente, se realizó un ensayo de virulencia *in vivo* empleando como modelo animal larvas de *Galleria mellonella*. Para ello, se emplearon inóculos decrecientes de suspensiones bacterias en solución salina (0,85 % NaCl) para inocular lotes de 10 larvas por cada dosis bacteriana estudiada, monitorizando las muertes durante 4 días.

En la figura 1 se pueden observar varios ejemplos del efecto de la interacción de una cepa aislada de lechuga (LE20E, **figuras 1-A y 1-C**) y una cepa aislada de cilantro (CI21E, **figuras 1-B y 1-D**) sobre distintas líneas celulares. La cepa aislada de cilantro (CI21E) destruyó totalmente la monocapa celular (células de colon humanas HT-29) en tan solo 90 minutos de infección *in vitro* (**figura 1-B**) y fue capaz de lisar todas las líneas celulares estudiadas con gran eficacia mostrando un poder citotóxico muy elevado incluso en los macrófagos de ratón (**figura 1-D**). Este patrón pudo ser asimismo observado, en una cepa aislada de agua de riego (AG29E1).

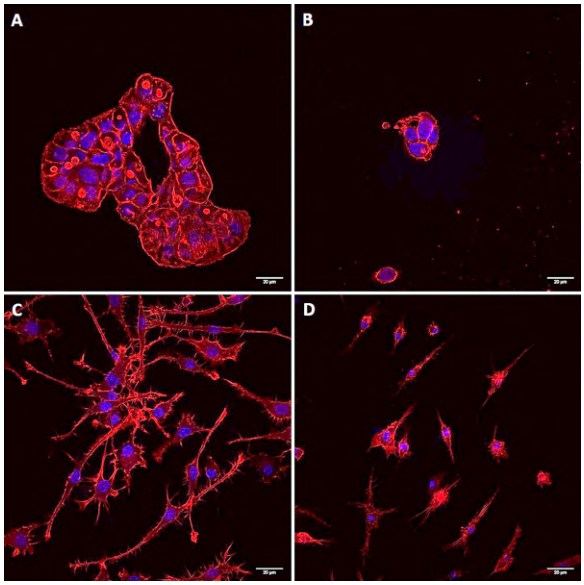


Figura 1: Citotoxicidad de cepas de *Aeromonas* en célula de colon humanas (A, B) y macrófagos de ratón (C, D). Cepa 1 (A, C); Cepa 7 (B, D). En las células, el citoesqueleto está marcado en rojo (faloidina) y el ADN en azul (DAPI). Magnificación ×400. Barra = 20 µm.

En el estudio *in vivo* con larvas de *Galleria mellonella*, las cepas CI21E y AG29E1, alcanzaron una DL_{50} de 1.000 UFCs, muy inferior a la observada en el resto de cepas, con valores superiores a 10.000 UFCs.

Dos de los ocho aislados estudiados (CI21E y AG29E1) mostraron una elevada citotoxicidad *in vitro* en células epiteliales, fibroblastos y macrófagos, mostrando, asimismo, un perfil virulento *in vivo* en *Galleria mellonella*, lo que ilustra el potencial patógeno de algunas cepas de *Aeromonas* presentes en productos vegetales frescos y el ambiente de producción agrícola. Este hecho, unido al incremento de la resistencia antimicrobiana en el género *Aeromonas* es indicativo de la necesidad de la realización de estudios para evaluar la relevancia de este género bacteriano en el contexto de la seguridad alimentaria y la potencial amenaza que supone para la salud del consumidor.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el "Proyecto PID2019-107870RB-I00 financiado por Ministerio de Ciencia e Innovación – Agencia Estatal de Investigación/10.13039/501100011033" y la Universidad de León a través del "Programa de ayudas para la realización de estudios de doctorado de la Universidad de León" del que disfruta el investigador predoctoral Alberto Pintor-Cora.

REFERENCIAS

[1] Stratev, D. y Odeyemi, O. A., *J. Infect. Public Health*, **2016**, *9(5)*, pp. 535-544.

[2] Fernández-Bravo, A. y Figueras, M. J., *Microorganisms 2020,* **2020**, *8(1)*, p. 129.

[3] Hoel, S., Vadstein, O. y Jakobsen, A. N., *Microorganisms 2019,* **2019**, *7(3)*, p. 91.

[4] Janda, J. M. y Abbott, S. L, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2010**, *23(1)*, pp. 35-73.

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS DE *Staphylococcus aureus* OBTENIDOS A PARTIR DE LECHE Y QUESO

Aitor Atxaerandio-Landa[1], Adam Tafad-Arriaga[1], Lorena Laorden[1], Nerea Etayo[2], Manuela Presto[2], Ilargi Martinez-Ballesteros[1], Irati Martinez-Malaxetxebarria[1]

1 Universidad del País Vasco (UPV/EHU)/Facultad de Farmacia/Dpto. de Inmunología, Microbiología y Parasitología/ Grupo Investigación MikroIker. Pº de la Universidad, 7, 01006 Vitoria-Gasteiz, Álava, España.

2 Instituto Lactológico de Lekumberri. C/ Plazaola 23, 31870 Lekunberri, Navarra, España.

aitor.achaerandio@ehu.eus

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista capaz de producir una variedad de enterotoxinas termoestables (SE) que, cuando están presentes en los alimentos, pueden causar brotes de intoxicación alimentaria [1]. Pese a que actualmente solo se pueden detectar las toxinas clásicas en alimentos, otros métodos como la secuenciación del genoma completo (WGS) posibilita la caracterización genómica de *S. aureus* con mucho más detalle, permitiendo la identificación *in silico* de genes de enterotoxinas tanto clásicas (A-E) como no-clasicas (G-Z) [2]. Hasta el momento se han descrito 27 SE [3] que se localizan principalmente en elementos genéticos móviles, como plásmidos o islas de patogenicidad. Detectar las SE en los alimentos de forma rápida y eficaz, e identificar las posibles cepas de *S. aureus* que las producen, es de vital importancia para la seguridad alimentaria.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue caracterizar aislamientos de *S. aureus* procedentes de muestras de leche y queso de diversas ganaderías de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) mediante WGS, y determinar la presencia de genes relacionados con la producción de enterotoxinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se analizaron un total de 90 cepas de *S. aureus* aisladas durante el año 2021 en el Instituto Lactológico de Lekunberri (ALVO) procedentes de muestras de leche y queso. La extracción de ADN de las cepas se realizó con el kit NucleoSpin Tissue y posteriormente se secuenciaron mediante Illumina NextSeq. El procesamiento de los datos de la secuenciación se realizó según lo descrito en Merda *et al.* (2020) [3]. La calidad de las lecturas recibidas se comprobó con Trimmomatic y se realizó el ensamblaje *de novo* de las lecturas mediante SPAdes. Para el proceso de *scaffolding* se utilizó MeDuSa y se realizó un último paso con GMcloser para completar los genomas. Posteriormente se evaluó la calidad de los genomas con QUAST. Los aislamientos se tipificaron mediante MLST y la detección de genes de enterotoxinas, clásicas y no-clásicas, se realizó con NAuRA. Se realizó la búsqueda del *enterotoxin gene cluster* (*egc*) en las cepas analizadas, mediante el mismo programa. Por otro lado, se determinó la capacidad de producción de enterotoxinas clásicas *in vitro* de los aislamientos mediante el test VIDAS SET2.

RESULTADOS

Se identificaron un total de 16 perfiles de MLST, de los cuales 8 STs fueron nuevos: ST 6978, ST 6979, ST 6980, ST 6981, ST 6984, ST 7308, ST 7313 y ST 7315 (Figura 1), bien por identificación de nuevos alelos o bien por combinación nueva de ellos.

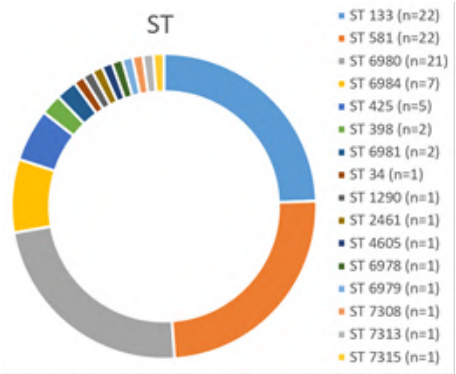


Figura 1. Perfiles MLST identificados en el estudio.

Se identificaron nueve perfiles distintos de genes de enterotoxina en los aislamientos analizados (Tabla 1). El perfil más abundante fue el VI (n=41), seguido del VII (n=19), mientras que los perfiles II, III y IX se detectaron en menor número (un aislamiento en cada caso). El *egc* se detectó únicamente en un aislamiento, siendo este *egc* del tipo 3, constituido por los genes de enterotoxinas *seO, seM, seI, seU, seN* y *seG*. Se detectaron genes de enterotoxinas clásicas (*seA, seB* y/o *seC*) y no-clásicas (*seH, seL, seS, seX, seY* y/o *tsst*) en el 70% y 100% de los aislamientos analizados respectivamente.

Tabla 1. Perfiles de genes enterotoxina encontrados en el estudio.

Detección de genes de enterotoxina *in silico*			
Clasicas	**No-clásicas**	**Perfil**	**Cantidad de aislamientos**
seA	*seX*	I	10
seA	*seX- seS*	II	1
seA-seB-seC	*seX- seL-tsst*	III	1
seA-seC	*seX- seL-tsst*	IV	6
seB-seC	*seX- seL-tsst*	V	3
seC	*seX- seL-tsst*	VI	41
-	*seX*	VII	19
-	*seX-seY*	VIII	8
-	*seX-seH-seO-seM-seI-seU-seN-seG-tsst*	IX	1

De los 66 aislamientos positivos en el sistema VIDAS, 62 presentaban genes de enterotoxinas clásicas *seA, seB* y/o *seC*. Sin embargo, en los 4 aislamientos restantes no se detectaron genes de enterotoxinas clásicas, hecho que es incongruente ya que el sistema VIDAS detectó enterotoxina clásica en esos aislamientos. Este fenómeno puede tener su explicación en que los genes de enterotoxinas estén incompletos o a que las toxinas detectadas sean variantes similares a las ya descritas. En los 24 aislamientos en los que no se detectó toxinas mediante el sistema VIDAS, se detectaron genes de enterotoxinas no-clásicas, siendo los perfiles VII (n=19) y VIII (n=8) los únicos que se identificaron.

CONCLUSIONES

S. aureus es un patógeno ampliamente distribuido en las explotaciones ganaderas de la CAPV que posee una gran diversidad genómica, demostrado por la variedad de genes de enterotoxinas encontrados entre las cepas y por los distintos (además de nuevos) perfiles de MLST encontrados.

AGRADECIMIENTOS

A.A. es beneficiario de una beca predoctoral concedida por el Gobierno Vasco. El trabajo está financiado por los proyectos PA21/02 y PA22/04 de Gobierno Vasco.

REFERENCIAS

[1] L Schwendimann, D Merda, T Berger, S Denayer, C Feraudet-Tarisse, AJ Kläui, S Messio, MY Mistou, Y Nia, JA Hennekinne, HU Graber. *Appl. Environ. Microbiol.* 2021, 87,5.

[2] V Fusco, GM Quero, M Morea, G Blaiotta, A Visconti. *Int J Food Microbiol,* 2011, 144, 528-537

[3] D Merda, A Feltenm N Vingadassalon, S Denayer, Y Titouche, L Decastelli, B Hickey, C Kourtis, H Daskalov, MY Mistou, JA Hennekinee. *Front. In Microbiology,* 2020, 111483.

PREVALENCIA Y CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE *Salmonella* spp. DE DIFERENTES ESTADOS FISIOLÓGICOS PRESENTES DE FORMA NATURAL EN CARNE DE AVE

Panera-Martínez, S.[1,2], Rodríguez-Melcón, C.[1,2], González-Machado, C.[1,2], Casado-Leal, S.[1,2], Alonso-Calleja, C.[1,2], Capita, R.[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

spanm@unileon.es; rosa.capita@unileon.es

La detección y cuantificación de *Salmonella* spp. en alimentos se ha basado tradicionalmente en métodos de cultivo en medios selectivos [1]. También pueden utilizarse métodos rápidos basados en técnicas moleculares, como la q-PCR, que permite un menor tiempo de obtención de resultados, una mayor especificidad y, además, posibilita la determinación de células viables pero no cultivables [2]. Sin embargo, su uso para la cuantificación de microorganismos patógenos no está ampliamente distribuido, porque puede sobreestimar la concentración celular debido a la presencia y detección de ADN de células inactivadas [3, 4].

Si se utilizan estas técnicas de q-PCR en combinación con un marcador de viabilidad (v-PCR) y los métodos tradicionales, es posible cuantificar los microorganismos en distintos estados fisiológicos: células viables cultivables, células viables no cultivables y células inactivadas [5]. En este contexto se ha planteado el presente estudio, cuyo objetivo fue conocer la prevalencia y la concentración de células de *Salmonella* spp. en alguno de estos tres estados fisiológicos presentes de forma natural en carne de ave.

Se analizaron un total de 52 canales de pollo obtenidas en dos mataderos diferentes (A y B) del noroeste de España. De cada muestra se homogenizaron, en bolsas estériles, 25 g de piel en 225 ml de agua de peptona tamponada durante 2 minutos. Se separaron 3 alícuotas de 1 ml cada una y el resto del homogeneizado se utilizó para la detección de *Salmonella* spp. (UNE-EN ISO 6579-1:2017), utilizando los medios de cultivo y las condiciones de incubación detallados en la Tabla 1.

Medio de cultivo	Incubación	
Agua de peptona tamponada (Oxoid)	37 °C	24 h
Rappaport-Vassiliadis (Oxoid)	42 °C	24 h
Salmonella Chromogen Agar (Sigma-Aldrich)	37 °C	24 h

Tabla 1: Condiciones y medios de cultivo utilizados para la detección y enumeración de *Salmonella* spp.

La cuantificación se realizó, a partir de las alícuotas separadas previamente, gracias a la combinación de métodos dependientes e independientes de cultivo. Se utilizó una de las alícuotas para calcular los niveles de células totales y otra para determinar las células viables mediante técnicas de q-PCR, usando, en el segundo caso, el marcador de viabilidad monoacida de propidio (PMAxx) a una concentración de 25 µM. La alícuota restante se sembró en superficie en placas de medio cromogénico (Tabla 1) y se enumeraron las colonias con morfología típica de *Salmonella* spp., que después fueron identificadas por PCR convencional. Los niveles de células inactivadas y de

células viables no cultivables se calcularon por diferencia.

Considerando conjuntamente los métodos dependientes e independientes de cultivo (Figura 1), se detectó *Salmonella* spp. en algún estado fisiológico en el 65,0 % de las muestras (18 muestras del matadero A y 16 del B). Utilizando técnicas tradicionales de cultivo se obtuvieron células viables cultivables en 22 muestras (42,3 %), siendo los recuentos de 2,0 ± 0,4 $\log_{10}$ ufc/g en 10 muestras, e inferiores al límite de detección (1 $\log_{10}$ ufc/g) en las 12 canales restantes (en las que no se detectó *Salmonella* spp. por siembra directa pero sí utilizando pasos previos de enriquecimiento).

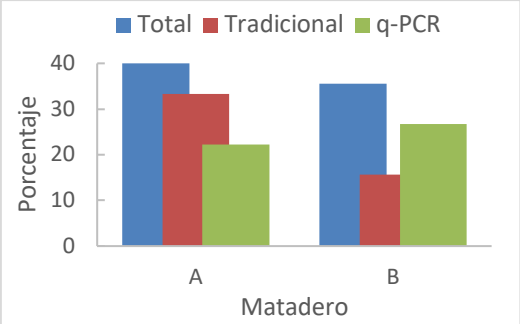


Figura 1: Porcentaje de muestras con *Salmonella* spp. en función del tipo de técnica utilizada.

Mediante q-PCR se detectó *Salmonella* spp. en 22 canales, con niveles de células totales de 3,3 ± 0,5 $\log_{10}$ ufc/g, de células viables de 2,6 ± 0,6 $\log_{10}$ ufc/g y de células viables cultivables de 2,1 ± 0,5 $\log_{10}$ ufc/g, observándose ligeras variaciones de estos valores entre ambos mataderos (Tabla 2).

		Total	Viable	VC
MA	**Media**	3,52	2,72	2,33
	DE	0,74	0,78	0,02
MB	**Media**	3,18	2,48	1,60
	DE	0,24	0,28	0,85

Tabla 2: Niveles promedio y desviación estándar (DE), expresados en $\log_{10}$ ufc/g, de células totales, viables y viables cultivables (VC) en las 22 canales positivas a *Salmonella* spp. por q-PCR. MA: matadero A; MB: matadero B.

Atendiendo a los porcentajes promedio para ambos mataderos, el 25,9 ± 22,0 % de las células de *Salmonella* spp. se encontraban en estado viable, el 74,1 ± 22,0 % eran células inactivadas, el 3,4 ± 7,6 % células viables cultivables y el 22,5 ± 22,6 % células viables no cultivables (Figura 2).

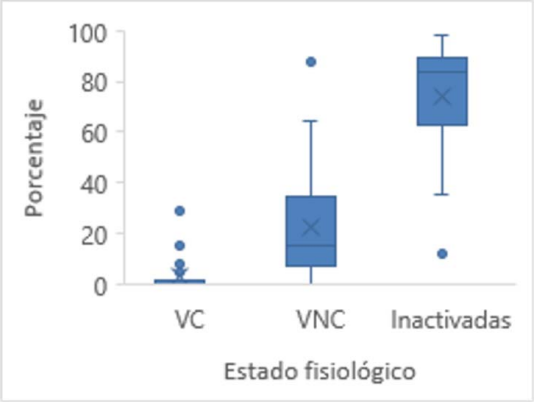


Figura 2: Gráfico de cajas y bigotes en el que se muestran los porcentajes de células en cada uno de los estados fisiológicos estudiados. VC: viables cultivables, VNC: viables no cultivables, e inactivadas.

La elevada prevalencia de células viables no cultivables subraya la importancia de utilizar técnicas independientes de cultivo para el estudio de *Salmonella* spp. en carne de ave.

AGRADECIMIENTOS

Junta de Castilla y León (LE018P20), Universidad de León (18BB282) y Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-098267-R-C33). Sarah Panera-Martínez es beneficiaria de un contrato predoctoral de la Junta de Castilla y León.

REFERENCIAS

[1] P. Vassiliadis, D. Trichopoulos, E. Pateraki, N. Papaiconomou, *Zentralbl Bakteriol Orig B*, **1978**, *166(1)*, 81-86.

[2] G. Ferrentino, S. Tamburini, K. Bath, P. Foladori, S. Spilimbergo, P. Jousson, *Process Biochemistry*, **2015**, *50(2)*, 188-193.

[3] K.L. Josephson, C.P. Gerba, I. Pepper, *Applied Environ. Microbiol.*, **1993**, *59(10)*, 3513-3515.

[4] D. Klein, *Trends Mol. Med.*, **2002**, *8(6)*, 257-260.

[5] N.E. Wideman, J.D. Oliver, P.G. Crandall, N.A. Jarvis, *Microorganisms*, **2021**, *9(1)*, 194-205.

DETECCIÓN DE GENES POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DE CELULOSA MEDIANTE ANÁLISIS DEL PANGENOMA EN AISLAMIENTOS DE *Arcobacter butzleri*

Salazar-Sánchez A.[1], Baztarrika Uria I.[1], Bayón A.[1], Bikandi J.[1,2], Laorden L.[1,2] y Martinez-Malaxetxebarria I.[1,2]

1 Universidad del País Vasco UPV/EHU, Facultad de Farmacia, Dpto. de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Grupo de investigación MikroIker. Paseo de la Universidad 7, 01006, Vitoria-Gasteiz

2 Bioaraba - Microbiología, Enfermedades Infecciosas, Antimicrobianos y Terapia Génica. Jose Atxotegi Kalea s/n, 01006, Vitoria-Gasteiz

adrian.salazar@ehu.eus

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La celulosa es el polisacárido más abundante del planeta y tanto plantas como bacterias son capaces de sintetizarlo. Sus propiedades difieren en función del tipo de organismo productor y las ventajas que presenta la celulosa bacteriana para algunas aplicaciones biotecnológicas han promovido su estudio [1].

Numerosas bacterias patógenas de transmisión alimentaria como *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica, Escherichia coli* o *Listeria monocytogenes* poseen la capacidad de formar *biofilms* tanto sobre matrices alimentarias como sobre superficies empleadas en la industria alimentaria, lo que supone un riesgo por favorecer su supervivencia y transmisión [1,2]. Estas estructuras de resistencia están constituidas, de manera general, en un 15% por células y en un 85% por una matriz extracelular (ME) compuesta por agua, polisacáridos, proteínas y ADN [3]. La celulosa y sus derivados se han identificado como componentes de la ME del *biofilm* de numerosas bacterias [1].

Arcobacter butzleri es una bacteria Gram negativa de amplia distribución medioambiental y frecuentemente presente en alimentos [4], clasificada como patógeno alimentario debido a su asociación con cuadros gastrointestinales en humanos. Es la especie más prevalente de su género y ha demostrado tener la capacidad de formar *biofilms* sobre diferentes superficies [4]. La composición de la ME del *biofilm* formado por esta especie no ha sido caracterizada, pero un estudio reciente apunta a la celulosa como posible componente del mismo [3]. Al contrario que en otros patógenos alimentarios como *E. coli, S. entérica* o *Pseudomonas aeruginosa* [1], la capacidad de producción de celulosa no ha sido descrita en *A. butzleri* ni en otras campilobacterias

Investigar la capacidad *A. butzleri* de producir celulosa contribuirá al conocimiento de este patógeno. Identificar los posibles mecanismos subyacentes, además, aportará datos que pudieran ser interesantes para el diseño de estrategias para su control en la industria agroalimentaria. Así, los objetivos de este estudio fueron determinar la capacidad de producción de celulosa de 44 aislamientos de *A. buzleri*, e intentar identificar genes asociados a su producción mediante comparación de genomas en base al fenotipo.

MATERIALES Y MÉTODOS

En primer lugar, se testó la capacidad de formación de celulosa de 44 cepas de *A. butzleri* con diferente capacidad demostrada de adherirse a poliestireno [4,5] mediante el método indirecto de unión al rojo Congo en placa de agar (CRA) según Salazar-Sánchez *et al.* [3], clasificando los crecimientos rojos como productores de

celulosa y los blancos como no productores Estas cepas fueron previamente aisladas de alimentos, aguas y muestras clínicas [4,6,7]. Posteriormente, el genoma de las cepas fue secuenciado mediante tecnología Illumina. Las secuencias fueron procesadas y ensambladas mediante el SPAdes y la anotación de los genomas se realizó utilizando el *software* bioinformático Prokka. Para realizar el análisis comparativo de secuencias en base a los fenotipos de producción de celulosa, se determinó en un primer paso el pangenoma de los aislamientos estudiados con el *software* Roary y posteriormente se empleó el programa Scoary utilizando 1000 permutaciones. Solo se consideraron genes relacionados con la capacidad de producción de celulosa aquellos que obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el análisis. Los genes que cumpliendo este criterio mostraron un Odds ratio (OR) > 1 se consideraron favorecedores del fenotipo productor de celulosa, y los que mostraron un OR < 1, del fenotipo no productor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bajo las condiciones testadas (37 ºC/48 horas) 19 (43%) de las 44 cepas estudiadas mostraron crecimiento de color rojo sobre CRA (fenotipo productor de celulosa). Las otras 25 (57%) mostraron un fenotipo no productor (color blanco).

El análisis del pangenoma reveló 135 genes (143 alelos) posiblemente implicados en la producción de celulosa en *A. butzleri* ($p < 0,05$). En base a los valores OR, 72 (53%) de estos genes favorecerían el fenotipo productor (OR > 1) y 63 (47%) el no productor (OR < 1). Se obtuvieron 12 *clusters* o grupos de genes, uno de ellos compuesto por 29 genes. Aunque este *cluster* se asoció con la no producción de celulosa, su estudio puede ser de interés al agrupar un gran número de genes, pudiendo estos trabajar de manera conjunta. De los 135 genes 94 (70%) se anotaron como proteínas hipotéticas y 41 (30%) se asociaron a funciones descritas (Tabla 1). Solo uno de los 29 genes que conforman el mayor *cluster* pudo ser identificado: *yrbL*.

Función (Nº genes)	Genes
Adquisición de hierro (7)	*cirA, fatA, fecI, fhuE, fyuA, pupA, pupB*
Resistencia microbiana (3)	*arsC, expZ, mdtB*
División celular (3)	*pal, recD2, xerC*
Transposición (3)	*tnsB, group_771, haeIIIM*
Regulación PhoP/PhoQ (2)	*phoP, yrbL*

Tabla1: Principales funciones de los genes potencialmente ligados a producción de celulosa.

Entre los genes identificados, ninguno ha sido asociado con la producción de celulosa ni presenta homología con genes previamente asociados a dicha función (p. ej. operones *bcs*). Este hecho va en línea con la diversidad de genes descritos asociados a la producción de celulosa, incluso entre cepas de la misma especie [1].

Estudios adicionales podrían ser resolutivos en la asociación de genes con la capacidad de producción de celulosa, cambiando las condiciones del ensayo de CRA con el fin de concluir si las cepas no productoras lo son por la ausencia de algún gen o grupo de genes o simplemente no eran las condiciones óptimas para presentar fenotipo productor. El análisis funcional de los genes estudiados, así como estudios transcripcionales podrían ayudar a esclarecer los objetivos de este estudio.

CONCLUSIONES

Aunque el ensayo de CRA indica que algunas cepas de *A. butzleri* son capaces de sintetizar celulosa, la comparación de genomas en base al fenotipo visualizado no ha resultado resolutivo hasta el momento.

REFERENCIAS

[1] U. Römling, *et al.*, *Trends Microbiol*, **2015**, *23, 545-557*.

[2] S. Galié *et al.*, *Front. Microbiol.*, **2018**, *9, 898*.

[3] A. Salazar-Sánchez *et al.*, *Microorganisms* **2022**, *10*, 1280.

[4] I. Martinez-Malaxetxebarria *et al.*, *Int. J. Food Microbiol.*, **2022**, *373*, *109712*.

[5] C. Girbau *et al.*, *J. Food Prot.* **2017**, *80*, *758–762*.

[6] B. Nieva-Echevarria *et al.*, *J. Food Prot.* **2013**, *76*, *1447–1450*.

[7] R. Alonso *et al.*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *7*, 9.

EL DOBLE SIGNIFICADO DE LOS PROBIÓTICOS

Fernández L.
Universidad Complutense de Madrid/Facultad de Veterinaria/Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid
leonides@ucm.es

En 2001 un comité de expertos de la FAO y la OMS definió los probióticos como "*microorganimos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador*" [1], revisándose y confirmándose unos años más tarde [2]. Desde esta primera definición ha habido un aumento exponencial de las publicaciones y la comercialización de probióticos, siendo un mercado con grandes expectativas de crecimiento. Sin embargo, a lo largo de los años, el uso del término probiótico ha sido bastante ambiguo y confuso, generando un cierto desconcierto, escepticismo y desconfianza sobre su utilidad real para mejorar nuestra salud.

La definición de probiótico es amplia, e incluye una gran cantidad de microorganismos y aplicaciones que deben cumplir los siguientes requisitos: a) el microorganimo tiene que ser viable y estar en la concentración adecuada en el momento de su consumo; b) tener una correcta identificación taxonómica, ya que algunos efectos son específicos de cepa; y c) su efecto beneficioso debe estar demostrado en ensayos bien diseñados. Por lo tanto, no se consideran probióticos las preparaciones con microorganismos inactivados (*parabióticos*) ni con partes de dichos microorganismos o sustancias por ellos producidas (*postbióticos*), aunque existan evidencias de que su consumo tiene un impacto positivo en la salud. En Europa, y para su empleo en alimentación humana y animal, los microorganismos deben tener el estatus de presunción cualificada de seguridad (QPS, por sus siglas en inglés), que se revisa y actualiza regularmente en base a la evidencia científica disponible.

Los efectos beneficiosos atribuidos a los probióticos van desde contribuir al equilibrio de la microbiota intestinal y potenciar el sistema inmunológico hasta mejorar la salud mental y la función cognitiva [3]. Cabe mencionar que algunos mecanismos de acción son muy comunes entre los probióticos estudiados, como por ejemplo la exclusión competitiva de patógenos, mientras que otros son específicos de cepa, como la producción de algunos compuestos bioactivos [2].

Los principales probióticos empleados en la industria alimentaria pertenecen al grupo de las bacterias lácticas, especialmente varias especies pertenecientes antiguamente al género *Lactobacillus*, que recientemente se ha dividido en 25 géneros, y miembros del género *Bifidobacterium*. La preferencia por estos microorganismos se atribuye a la relación taxonómica con los utilizados como cultivos iniciadores para la elaboración de productos lácteos fermentados, a la seguridad confirmada por su consumo continuado a lo largo del tiempo sin el desarrollo de enfermedades o infecciones en individuos sanos y a ser miembros habituales del ecosistema gastrointestinal. También se han utilizado como probióticos otras bacterias lácticas (como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*), otras bacterias Gram-positivas (*Bacillus*), algunas bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* Nissle 1917) y levaduras (*Saccharomyces*).

Aparte de las leches fermentadas, también sirven de vehículo a los probióticos otros productos lácteos, como helados y queso, fórmulas infantiles, zumos de fruta, chocolate o alimentos elaborados a base de cereales (cereales de desayuno, galletas, barritas energéticas). Es importante tener en cuenta las propiedades de la matriz alimentaria utilizada como vehículo para que el alimento probiótico al final de su vida útil contenga la dosis mínima de microorganismos viables que aseguren el efecto beneficioso deseado en el consumidor, sin que las características sensoriales del producto se vean comprometidas.

Es preciso distinguir entre alimentos probióticos y alimentos fermentados, objeto de renovada atención en los últimos años, en cuya elaboración intervienen muy frecuentemente las bacterias lácticas. Los productos fermentados se elaboran mediante el crecimiento de microorganismos (seleccionados por sus características tecnológicas) y la transformación enzimática de los componentes del alimento, aunque no se requiere que los microorganismos mantengan su viabilidad o estén presentes en el momento de su consumo. Además, en la elaboración de muchos alimentos fermentados intervienen consorcios indefinidos de microorganismos, en cuanto a su composición y concentración, sin que se haya demostrado fehacientemente que su consumo tiene un efecto beneficioso para el consumidor [4].

Los probióticos también se comercializan como suplementos alimenticios en muy diversos formatos (pastillas, cápsulas, preparación líquida), estando sujetos en este caso a una legislación bastante laxa que tan solo requiere que los microorganismos tengan estatus QPS [5].

Por otro lado, los probióticos tienen un gran interés en el ámbito médico y numerosos ensayos clínicos correctamente diseñados han demostrado la eficacia de algunas cepas probióticas para aplicaciones profilácticas y terapéuticas específicas. En este caso, estos probióticos, en ocasiones denominados *farmabióticos*, están estrictamente regulados y sometidos a controles para comprobar su calidad, eficacia y seguridad. Conocer en profundidad la microbiota humana y su impacto en la salud, junto con el reciente desarrollo de poderosas técnicas analíticas, permitirá en un futuro próximo diseñar formulaciones probióticas exitosas que tengan en cuenta tanto el individuo como la aplicación terapéutica específica. En este sentido, se debe mencionar el desarrollo de los denominados *probióticos de nueva generación* para aplicaciones farmaceúticas, diseñados para enfermedades específicas y con un propósito preventivo y/o terapeútico. Entre ellos cabe mencionar algunas especies presentes en el tracto gastrointestinal humano, como *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii, Bacteroides* spp. o *Eubacterium hallii*, que han demostrado ser eficaces en el tratamiento y prevención de distintas enfermedades metabólicas e inflamatorias, y los probióticos modificados genéticamente para aumentar su eficacia frente a una determinada enfermedad [6].

REFERENCIAS

[1] FAO/OMS. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Available online: https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf. Accessed: July 18th, 2022.

[2] Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein D, Pot B, et al. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514.

[3] Khalesi S, Bellissimo N, Vandelanotte C, Williams S, Stanley D, Irwin C. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2019**, 73, 24-37.

[4] Marco ML, Sanders ME, Gänzle M, Arrieta MC, Cotter PD, De Vuyst L, et al. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, 18, 196-208.

[5] Zawistowska-Rojek A, Zaręba T, Tyski S. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **2022**, *19*, 5701.

[6] Satokari R. *Nutrients*. **2019**, 11, 1921.

MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL A TRAVÉS DE LA DIETA

del Campo R.

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid. rosacampo@yahoo.com

El principal factor modulador de la microbiota intestinal es la dieta. La composición y funcionalidad de este ecosistema está fuertemente asociada a nuestra salud, por lo que las intervenciones dietéticas deberían estar recomendadas en aquellas patologías en las que la microbiota se ha mostrado como un determinante. La alta variabilidad individual tanto de la composición de la microbiota y como de los gustos alimentarios añade un grado importante de complejidad para establecer unas guías comunes que puedan ser aplicadas a enfermos concretos en situaciones concretas.

Los estudios de la microbiota intestinal en relación a la salud humana se han centrado habitualmente en describir su composición taxonómica, determinando las diferencias estadísticas entre grupos de pacientes respecto de sujetos sanos. Si bien estos estudios son imprescindibles para descifrar la complejidad, en este momento necesitamos estudios funcionales que nos permitan demostrar el impacto de las intervenciones dietéticas. Así mucho más que la genómica, necesitamos herramientas basadas en proteómica y sobre todo en metaboloma. Estas herramientas aún tienen importantes limitaciones para poderlas aplicarlas de forma masiva y sacar conclusiones sólidas. Se necesita optimizar el proceso, así como incorporar análisis bioinformáticos combinados con herramientas bioestadísticas. Por último, además de considerar a los microorganismos como potencial agentes fermentadores y a los alimentos como el fermento, debemos incorporar en el estudio las variables humanas de respuestas inflamatorias frente a antígenos alimentarios o componentes de la dieta.

Además de la alimentación, la respiración es otro factor clave de los microorganismos y que condiciona el metabolismo. Las bacterias respiran a través del balance de NADH/NAD+ y las actividades enzimáticas están sujetas a una adecuada respiración. Este aspecto ha sido muy poco explorado en el intestino humano pero quizás sea un factor limitante para la digestión de los alimentos.

Una importante limitación del conocimiento actual en Microbiología es que todos los experimentos se han realizado con microorganismos genéticamente puros y en condiciones de laboratorio ideales para su cultivo. Sin embargo, el ecosistema intestinal está compuesto de multitud de microorganismos que además tienen una distribución espacial determinada y que están organizados en formas de biofilm mixtos, con lo que el metabolismo de un microorganismo nada tiene que ver con el resultado global, es por tanto necesario integrar el estudio de un sistema complejo.

Necesitamos también comprender la dinámica de producción de los metabolitos bacterianos respecto de la ingesta. Por ejemplo, aún no se conoce la curva de producción de ácidos grasos de cadena corta en relación con la ingesta. La mayor parte de los estudios realizan las mediciones en heces, pero se desconoce su relación con la concentración sérica. En los últimos años el TMAO como metabolito bacteriano directamente derivado de la

colina, habitualmente presente en carnes rojas. Una mayor concentración de este metabolito se ha relacionado con un mayor riesgo de arterioesclerosis y accidentes vasculares. Sin embargo, estas correlaciones no son siempre acertadas, personas con alto consumo de carnes rojas también tienen niveles bajos de TMAO. Son muchas las dudas que nos quedan por resolver en este aspecto. También debemos explorar la producción de metabolitos tóxicos para el ser humano a partir de ciertos alimentos, como la producción de aminas biógenas o de toxinas con actividad neuronal.

La incorporación de herramientas de análisis masivo basadas en *machine learning* permite realizar predicciones a largo plazo de la posibilidad de desarrollar enfermedades. En el caso de la dieta, se podría llegar a predecir el efecto de consumir algunos alimentos, aunque siempre debemos tener en cuenta que las bacterias tienen capacidad de encender y apagar sus rutas metabólicas, casi siempre en relación con mecanismos de *quorum sensing*.

Las últimas tendencias alimentarias incorporan dietas restrictivas que en muchas ocasiones no están totalmente justificadas. La restricción de alimentos también conlleva una reducción de la diversidad bacteriana, especialmente cuando las restricciones se mantienen un largo plazo de tiempo. Si bien dietas como la FODMAP pueden tener sentido durante exacerbaciones de enfermedades inflamatorias intestinales, comer variado debería ser una meta de toda alimentación saludable, y por tanto una recomendación de todo el personal sanitario.

Hoy en día, gracias a la cadena alimentaria podemos disponer de una gran variedad de alimentos en cualquier época del año. Para poder abastecer adecuadamente a toda la población, muchos de estos alimentos llevan conservantes y aditivos que alargan su vida útil. La mayor parte de estos aditivos tienen un potente efecto antimicrobiano o antifúngico, y a pesar de que se ha certificado su seguridad respecto de las células eucariotas humanas, no se ha evaluado su posible efecto negativo en la microbiota del tracto digestivo.

En resumen, aún son muchos los aspectos que no conocemos sobre como la dieta y los microorganismos intestinales determinan nuestra salud. En esta sesión trataremos de actualizar los últimos datos publicados a este respecto.

AGRADECIMIENTOS

Todo el grupo del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal ha contribuido a estas investigaciones, en particular mi agradecimiento más profundo al Dr. Fernando Baquero, por obligarme siempre a pensar. Al Dr. Rafael Gómez-Lus y a la Dra. Carmen Torres por el enseñarme el maravilloso mundo de la Microbiología.

REFERENCIAS

[1] Baquero F, Del Campo R, Martínez JL. Front Mol Biosci. **2022**; 9:861603. doi: 10.3389/fmolb.2022.861603.

[2] Martínez-Cuesta MC, Del Campo R, Garriga-García M, Peláez C, Requena T. Front Cell Infect Microbiol. **2021**; 11:598093. doi: 10.3389/fcimb.2021.598093.

[3] Ponce-Alonso M, García-Hoz C, Halperin A, Nuño J, Nicolás P, Martínez-Pérez A, Ocaña J, García-Pérez JC, Guerrero A, López-Sanromán A, Cantón R, Roy G, Del Campo R. Front Immunol. **2021**; 12:683387. doi: 10.3389/fimmu.2021.683387.

[4] Alia-García E, Ponce-Alonso M, Saralegui C, Halperin A, Cortés MP, Baquero MR, Parra-Pecharromán D, Galeano J, Del Campo R. Diagnostics (Basel). **2021**; 11(5):835. doi: 10.3390/diagnostics11050835.

[5] Ponce-Alonso M, García-Fernández S, Del Campo R. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). **2021**; 39(4):165-167. doi: 10.1016/j.eimc.2021.02.001.

INTERACCIONES BACTERIOCINA-BACTERIÓFAGO EN *LACTOCOCCUS*

Rendueles C., Escobedo S., Rodríguez A., Martínez B.

Grupo DairySafe, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), CSIC.
Paseo del Río Linares, s/n. 33300 Villaviciosa, Asturias
claudia.rendueles@ipla.csic.es

La presencia de bacteriófagos que infectan a los cultivos iniciadores supone un gran problema en la industria láctea, donde constituyen una de las principales causas de fermentaciones fallidas o de mala calidad, ocasionando graves pérdidas económicas [1].

Por otra parte, el uso de bacteriocinas o cultivos protectores que producen estas sustancias es una práctica cada vez más habitual en bioconservación de alimentos, incluidos los productos lácteos fermentados [2].

Se desconoce, sin embargo, si, al igual que ocurre en el caso de algunos antibióticos y bacteriocinas que favorecen la infección fágica en bacterias patógenas [3,4] existe algún tipo interacción bacteriocina-bacteriófago en bacterias iniciadoras, que pueda desencadenar fermentaciones fallidas.

Con este objetivo, analizamos la evolución de cultivos en medio líquido de *Lactococcus cremoris* MG1363 en presencia del fago sk1 y concentraciones subinhibitorias de tres bacteriocinas con distinto modo de acción: lactococina 972 (Lcn972), que inhibe la síntesis de pared celular; lactococina A (LcnA), una bacteriocina formadora de poros; y nisina, que comparte ambos modos de acción. Mientras que no se observó ningún tipo de interacción en el caso de la LcnA, la presencia de Lcn972 favoreció la lisis de los cultivos provocada por el bacteriófago, observándose un efecto sinérgico con distintas concentraciones de fago y bacteriocina (Fig. 1). En el caso de nisina, esta interacción positiva se observó únicamente cuando se combinó una concentración de 30ng/mL de nisina con 10^2ufp/mL.

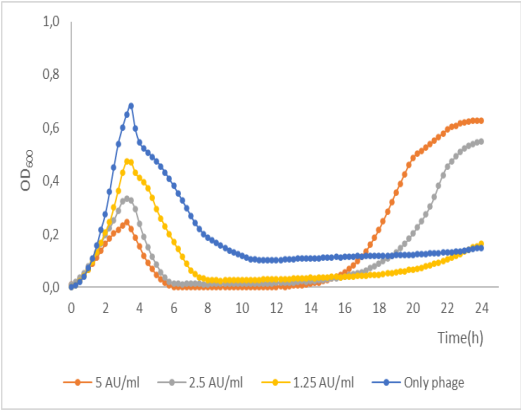


Figura 1: Evolución a lo largo del tiempo de la densidad óptica de cultivos de *L. cremoris* MG1363 en presencia del fago sk1 (10^2ufp/mL) y distintas concentraciones de Lcn972.

Resultados similares se observaron en medio sólido, donde se analizó el tamaño de las placas de lisis a las que da lugar el fago en presencia de distintas concentraciones de bacteriocinas, considerando una interacción positiva cuando el aumento en el tamaño de placa fue superior al 30% (Fig. 2). Así, mientras que LcnA no provocó dicho aumento, Lcn972 dio lugar a incrementos de hasta un 200%. Aunque menos notable, este efecto se observó también en el caso de nisina, donde se alcanzaron aumentos de hasta un 75%.

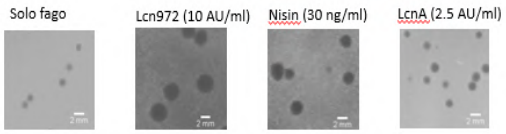


Figura 2: Placas de lisis de *L. cremoris* MG1363 en presencia de varias concentraciones de las distintas bacteriocinas empleadas.

A continuación, tratamos de determinar el posible mecanismo que explicase el efecto sinérgico Lcn972-sk1. Para ello, se analizaron diferentes parámetros que determinan la infección fágica en presencia de Lcn972. No se observaron cambios en el nivel de adsorción, ni en el periodo de latencia (tiempo transcurrido hasta la liberación de la progenie viral). Sin embargo, aumentó significativamente el tamaño de explosión (número de viriones liberados por célula infectada) en presencia de Lcn972. Este aumento, podría ser debido al particular modo de acción de esta bacteriocina, que permite que las células sigan metabólicamente activas durante un ciclo de división.

Por otra parte, se analizó la interacción Lcn972-sk1 en diversos mutantes de *Lactococcus* en función del tamaño de las placas de lisis observado. Se determinó que el efecto sinérgico es independiente del sistema SOS, así como del sistema de dos componentes CesSR, implicado en la respuesta al daño en la pared celular. Igualmente, se identificó un posible papel de la autolisina acmA ya que, en su ausencia la sinergia no ocurría.

Finalmente, se comprobó si este efecto ocurre igualmente con otros bacteriófagos examinando el tamaño de las placas de lisis de distintos fagos y sobre cepas de *Lactococcus* diferentes. Se observó un aumento en el tamaño de placa en presencia del fago P2, perteneciente al mismo género y muy similar al fago sk1. En el caso de fagos del grupo c2, este incremento se observo en el caso del fago CHPC1183 pero no con el fago C2, del mismo género. Por último, se observó también un incremento en el tamaño de placa de bIL170, que infecta a *Lactococcus lactis* IL1403.

Concluimos, por tanto, que la presencia de Lcn972 y, en menor medida, de nisina, favorece la lisis celular provocada por los bacteriófagos, pudiendo agravar el problema ya existente de la contaminación por fagos en fermentaciones en las que se emplean cultivos protectores que producen bacteriocinas.

Actualmente estamos evaluando el impacto real de este efecto sinérgico en la acidificación de la leche en el caso de contaminaciones fágicas, tratando de determinar si la presencia de cultivos productores de bacteriocinas supone un riesgo addicional.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PID2020-119697RB-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033 y AYUD/2021/52120 (FICYT and FEDER EU, Principado de Asturias, Spain)

Programa de Ayudas Severo Ochoa (Gobierno del Principado de Asturias, Beca BP20 006)

REFERENCIAS

[1] A.M. Comeau, F. Tétart, S.N. Trojet, M.F. Prère, H.M. Krisch. PLoS 324 One 2, **2007**, e799.

[2] L. Fernandez, S. Escobedo, D. Gutierrez, S. Portilla, B. Martinez, P. Garcia, A. Rodriguez. Antibiotics-Basel, **2017**,6.

[3] C.C.G. Silva, S.P.M. Silva, S.C. Ribeiro. Front Microbiol, **2018**, 9: 594.

[4] C. Rendueles, A.C Duarte, S. Escobedo, L. Fernández, A. Rodríguez, P. García, B. Martínez B. Int J Food Microbiol, **2022,** 368:109611.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS AISLADAS DE ANIMALES SALVAJES

Pérez-Etayo L.[1], Torchitti G.[2], Gutiérrez J.[3], González D.[1] , Vitas A.I.[1]

1 Universidad de Navarra, Departamento interfacultativo de Microbiología y Parasitología. C/Irunlarrea s/n, 31008, Pamplona

2 Universita'degli study di Milano, Human Nutrition and Food Science, Via Festa del Perdono 7, 20122, Milano. Italy

3 University of Surrey, Department of Nutritional Sciences, School of Biosciences and Medicine. Guildford, United Kingdom, GU2 7XH

lpereze@unav.es

INTRODUCCIÓN

La ausencia de nuevos antimicrobianos y la progresiva expansión de bacterias multirresistentes está acelerando la búsqueda de compuestos alternativos a los antibióticos. Una de las principales apuestas es el desarrollo de terapias basadas en el uso de péptidos antimicrobianos, por su origen natural y su potencial producción a escala industrial y económica. En este contexto, nuestra hipótesis es que las bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de estos péptidos podrían ser utilizadas como probióticos para prevenir el riesgo de infecciones causadas por bacterias resistentes. Así, el objetivo de este trabajo ha sido analizar si tres BAL aisladas de animales salvajes (jabalíes y tejón) producen bacteriocinas efectivas contra cepas de *E. coli* productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE). En estudios previos de secuenciación del genoma de estas bacterias (*Enterococcus faecalis* C34, *E. faecalis* A1 y *Lactobacillus plantarum* C1) se han encontrado genes compatibles con la producción de péptidos antimicrobianos (sactipéptido y lassopéptido en las cepas de *E. faecalis* y plantaricina en *L. plantarum*)[1].

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron dos cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos β-lactámicos (C58, de origen clínico; A8 aislada de río) y una cepa sensible (*E. coli* ATCC 25922). Las BAL fueron cultivadas en agar y/o caldo MRS (Oxoid, 37ºC-24h) y los sobrenadantes se extrajeron mediante centrifugación (12.000 X g, Fisher MicroCentrifuge). La actividad antimicrobiana de estos sobrenadantes se evaluó mediante *disk difussion test*[2] practicando pocillos en placas de Mueller Hinton cationes ajustados (MH, Becton Dickinson, 37ºC-24h) y mediante la metodología *agar spot assay*[3] con ambas cepas vivas, usando agar MRS (37ºC-24h) y una sobrecapa de MH con el inóculo ajustado de *E. coli*. También se realizaron estudios de viabilidad celular de *E. coli* marcada con GFP en co-cultivos con las BAL, utilizando el lector de fluorescencia CLARIOstar Plus (BMG Labtech) y por último, curvas de crecimiento de *E. coli*-BLEE en presencia de extractos de distintos sobrenadantes extraídos a partir del crecimiento de las BAL en MRS (Oxoid, 37ºC-24h), mediante el empleo de Bioscreen C® (Lab System).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el *agar spot assay* mostraron que los tres aislados son capaces de inhibir el crecimiento de cepas de *E. coli*-BLEE, siendo más activa la cepa de *L. plantarum* (C1), que generó halos de inhibición de 25 mm, mientras que los halos producidos por *E. faecalis* A1 y C34 oscilaron entre 15-17 mm (Figura 1).

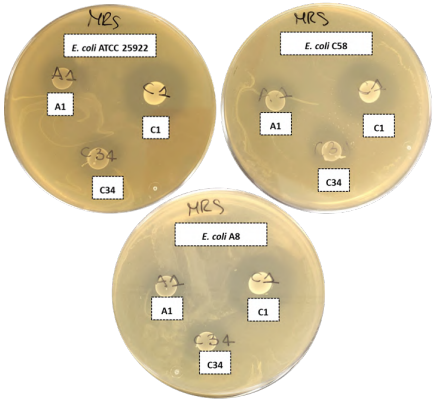


Figura 1: Antibiogramas realizados con la metodología *agar spot assay,* para evaluar la inhibición de *E. coli* ATCC 29522, *E. coli* C58 y *E. coli* A8 cuando crecen en presencia de las bacterias lácticas C1, A1 y C34.

Posteriormente, se realizó una monitorización de la viabilidad bacteriana realizando un co-cultivo de *E. coli*-GFP con cada una de las BAL. Los resultados mostraron que estos tres aislados de BAL reducen la viabilidad celular de *E. coli*, observándose una disminución de la fluorescencia y un retraso en la fase de crecimiento en los tres co-cultivos (GFP-C34, GFP-C1 y GFP-A1) en comparación con el control positivo (*E. coli*-GFP). Los tres monocultivos de BAL que actuaban como controles no emitieron fluorescencia (Figura 2).

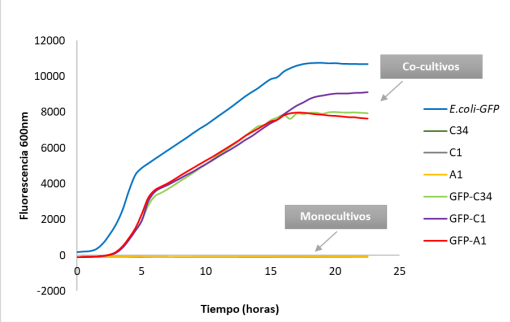


Figura 2: Curvas de fluorescencia de los co-cultivos *E. coli*-GFP y las BAL.

Finalmente, se confirmó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes obtenidos del crecimiento de las bacterias lácticas en medio MRS, frente a *E. coli*-BLEE C58 (Figura 3). Las curvas obtenidas en el Bioscreen mostraron la inhibición total de la cepa C58 en presencia de los tres sobrenadantes sin diluir (Figura 3A), mostrando de nuevo mayor actividad el sobrenadante de C1, que incluso diluido a la mitad (C1-M/2) seguía inhibiendo la cepa resistente de *E. coli* (Figura 3B).

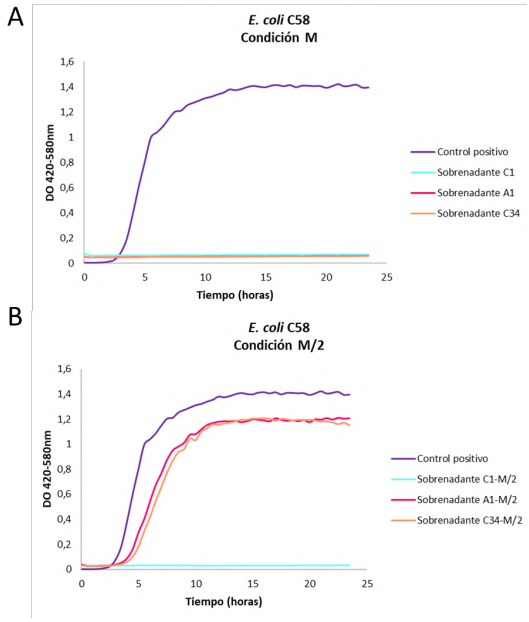


Figura 3: Curvas de crecimiento de *E. coli* C58 en presencia de los sobrenadantes de monocultivos de C1, A1 y C34. (A) Sobrenadante sin diluir y (B) Sobrenadante diluido a la mitad.

CONCLUSIONES

Las bacterias lácticas evaluadas han mostrado su actividad bactericida frente a cepas de *E. coli* BLEE, siendo *L. plantarum* C1 el candidato más prometedor. Pero para continuar con el posible uso de estas cepas como probióticos, sería necesaria una completa caracterización *in vitro* de forma que se pueda validar la seguridad antes de considerar su aplicación *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

A la " Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra y Obra Social La Caixa" por las becas predoctorales y de movilidad concedidas.

REFERENCIAS

[1] Stedman, A., van Vliet, A. H. M., A. Chambers, M., and Gutierrez-Merino, J. (2020). Gut commensal bacteria show beneficial properties as wildlife probiotics. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1467, 112–132. doi:10.1111/nyas.14302.

[2] Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45, 493–496. doi:10.1093/ajcp/45.4_ts.493.

[3] Fijan, S. (2016). Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens. Probiotics Prebiotics Hum. Nutr. Heal. 10, 1-17, doi:10.5772/63141.

DESARROLLO DE QUESOS FUNCIONALES CON EXTRACTO DE ALCACHOFA Y *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* INIA P132

Rodríguez-Mínguez E., Calzada J., Vázquez M., Ávila M., Garde S. y Picon A.
INIA (CSIC), Dpto. Tecnología de Alimentos, Carretera de la Coruña Km 7, 28040 Madrid
apicon@inia.csic.es

INTRODUCCIÓN

El queso forma parte de nuestra dieta desde tiempos ancestrales. En su elaboración intervienen microorganismos cuyos productos metabólicos proporcionan beneficios para la salud (Sanlier et al., 2019). La dieta tiene un papel determinante en la microbiota intestinal (Carmody et al., 2019). La incorporación de bifidobacterias de origen humano en queso, permitiría "resembrar" el ecosistema intestinal humano afectado por la industrialización (Sonnenburg y Sonnenburg, 2019). Las características sensoriales de los quesos elaborados con algunas cepas de bifidobacterias de origen humano no difirieron significativamente de las del queso control (Langa et al., 2020).

Bifidobacterium longum INIA P132 fue aislado de heces de lactantes (Rodríguez et al., 2012). Produce heteropolisacáridos, que confieren actividad protectora en un modelo animal de enterocolitis (Llamas-Arribas et al., 2019), y posee características tecnológicas adecuadas para su empleo en productos lácteos.

La alcachofa es un producto típico de la dieta Mediterránea y con potente actividad antioxidante. Se ha demostrado su efecto beneficioso en varias enfermedades: diabetes, hipertensión, enfermedad cardiovascular, cáncer e hiperlipidemia, entre otras (López-Hortas et al., 2019).

En ensayos previos, el extracto vegetal (EV) de alcachofa produjo una estimulación del metabolismo de la cepa INIA P132.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un queso semicurado funcional con EV de alcachofa y la cepa INIA P132.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del EV de alcachofa

Se homogenizaron unos 200 g de alcachofas cocidas con 600 ml de agua destilada estéril. Tras 90 min. a 4°C, se centrifugó el homogenizado (9.000 rpm, 30 min.), se filtró por gasa estéril, prefiltro de fibra de vidrio y filtro de celulosa acetato de 0,22 µm (Corning Inc., Nueva York, EE.UU.). El EV se mantuvo congelado a -34°C, y fue liofilizado antes de su uso.

Elaboración de quesos

Se realizaron 2 fabricaciones en diferentes días. El queso control se elaboró a partir de 1,5 L de leche de oveja a 31°C, a la que se le añadió 3 ml de $CaCl_2$ al 10% y 15 ml del cultivo iniciador MA016 (cepas de *Lactococcus lactis*, Rhodia, Dangé-Saint-Romain, Francia), crecido en leche estéril (25°C, 18 h). Tras 20 min., se añadió 1,5 ml de solución de cuajo al 10% (1.700 IMCU/g, Laboratorios Arroyo S.A., Santander). A los 40 min., se procedió al corte de la cuajada, calentamiento a 38°C, lavado con 600 ml de agua estéril a 37°C, desuerado, y moldeado. En cada fabricación, se elaboraron 3 quesos experimentales (EV, INIA P132 y EV+INIA P132) de forma similar al queso control. El EV se añadió a la cuajada desuerada. La cepa INIA P132 se añadió como adjunto al cultivo iniciador, a niveles próximos a 6 log UFC / ml de leche.

Analisis microbiológicos[1]

Los recuentos de microorganismos aerobios totales (MAT) y bifidobacterias se realizaron a los 1, 14 y 28 días de maduración (Langa et al., 2020).

Análisis fisicoquímicos[1]

Se midió el pH, y se determinaron el extracto seco y las coordenadas de color en

el espacio CIE-LAB (del Olmo et al., 2018). Los compuestos volátiles se extrajeron mediante SPME y se analizaron mediante GC-MS (Gómez-Torres et al., 2016).
[1]Todos estos análisis se realizaron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en los niveles de MAT, o de pH, entre el queso control y los quesos experimentales (Tabla 1). Se obtuvieron resultados similares en quesos elaborados con cepas de bifidobacterias de origen humano (Langa et al., 2020).

Variable	Días	Queso control	Quesos experimentales		
			+ EV alcachofa -	- + INIA P132	+ EV alcachofa + INIA P132
MAT	1 d	9,65 ± 0,16 $^{a\,A}$	9,64 ± 0,10 $^{a\,A}$	9,64 ± 0,17 $^{a\,A}$	9,62 ± 0,16 $^{a\,A}$
	14 d	9,59 ± 0,10 $^{a\,A}$	9,69 ± 0,10 $^{a\,A}$	9,60 ± 0,13 $^{a\,A}$	9,71 ± 0,03 $^{a\,A}$
	28 d	9,35 ± 0,02 $^{a\,B}$	9,38 ± 0,15 $^{a\,B}$	9,42 ± 0,40 $^{a\,A}$	9,33 ± 0,10 $^{a\,B}$
Bif	1 d	n.d.	n.d.	5,22 ± 0,52 $^{a\,A}$	5,19 ± 0,41 $^{a\,A}$
	14 d	n.d.	n.d.	4,85 ± 0,67 $^{a\,A}$	4,50 ± 0,76 $^{a\,A}$
	28 d	n.d.	n.d.	4,44 ± 0,44 $^{a\,A}$	4,17 ± 0,90 $^{a\,A}$
pH	1 d	5,14 ± 0,14 $^{a\,B}$	5,09 ± 0,16 $^{a\,A}$	5,24 ± 0,16 $^{a\,A}$	5,12 ± 0,06 $^{a\,B}$
	14 d	5,41 ± 0,13 $^{a\,A}$	5,30 ± 0,08 $^{a\,A}$	5,37 ± 0,11 $^{a\,A}$	5,29 ± 0,07 $^{a\,A}$
	28 d	5,46 ± 0,07 $^{a\,A}$	5,32 ± 0,13 $^{a\,A}$	5,46 ± 0,01 $^{a\,A}$	5,34 ± 0,05 $^{a\,A}$
L*	1 d	85,60 ± 2,13 $^{a\,A}$	85,42 ± 0,89 $^{a\,A}$	86,19 ± 1,19 $^{a\,A}$	85,36 ± 0,71 $^{a\,A}$
	14 d	80,51 ± 3,50 $^{a\,AB}$	76,88 ± 3,16 $^{a\,B}$	80,87 ± 0,94 $^{a\,B}$	79,25 ± 0,75 $^{a\,B}$
	28 d	75,72 ± 1,82 $^{a\,B}$	72,57 ± 2,45 $^{a\,B}$	77,40 ± 1,91 $^{a\,C}$	74,01 ± 3,15 $^{a\,C}$
a*	1 d	-1,77 ± 0,29 $^{b\,A}$	-1,06 ± 0,14 $^{a\,A}$	-1,21 ± 0,21 $^{a\,A}$	-0,95 ± 0,31 $^{a\,A}$
	14 d	-2,75 ± 0,50 $^{a\,B}$	-2,27 ± 0,76 $^{a\,B}$	-1,98 ± 0,47 $^{a\,AB}$	-1,57 ± 0,79 $^{a\,A}$
	28 d	-2,85 ± 0,11 $^{b\,B}$	-2,18 ± 0,08 $^{ab\,B}$	-2,35 ± 0,46 $^{ab\,B}$	-1,89 ± 0,43 $^{a\,B}$
b*	1 d	12,85 ± 1,82 $^{b\,B}$	15,54 ± 1,10 $^{a\,B}$	13,29 ± 0,76 $^{ab\,C}$	15,03 ± 0,75 $^{ab\,C}$
	14 d	15,88 ± 1,81 $^{a\,AB}$	18,26 ± 1,27 $^{a\,AB}$	16,28 ± 0,66 $^{a\,B}$	18,12 ± 0,70 $^{a\,B}$
	28 d	17,63 ± 1,22 $^{b\,A}$	20,23 ± 1,78 $^{a\,A}$	18,31 ± 0,16 $^{ab\,A}$	20,27 ± 0,57 $^{a\,A}$

Tabla 1. Recuentos (MAT = microorganismos aerobios totales; Bif = bifidobacterias), valores de pH y características de color durante la maduración de los quesos.
Medias con diferente superíndice (en minúsculas, en la misma fila, y en mayúsculas entre tiempos) difieren significativamente ($P < 0,05$).

Los niveles de la cepa INIA P132 (Tabla 1) se mantuvieron estables durante los 28 días de maduración (~ 5 log UFC / g). Dos de las tres cepas de bifidobacterias utilizadas como cultivos adjuntos en la elaboración de queso también mantuvieron niveles estables durante 60 días (Langa et al., 2020).
Los quesos con EV (Tabla 1) obtuvieron valores significativamente ($P < 0,05$) inferiores de a* (más verde) y superiores de b* (más amarillo). De forma similar, se observaron modificaciones de color en quesos elaborados con algas deshidratadas (del Olmo et al., 2018).

En el perfil de compuestos volátiles de los quesos se detectaron 76 compuestos: 8 ácidos, 19 alcoholes, 4 ésteres, 4 aldehídos, 7 cetonas, 12 alcanos, 5 compuestos azufrados, 12 compuestos bencénicos y 5 otros compuestos. En los quesos con EV, se observó la presencia de niveles significativamente ($P < 0,05$) superiores de 8 alcoholes, 3 alcanos y 2 compuestos azufrados. Se obtuvieron resultados similares en quesos elaborados con algas deshidratadas (del Olmo et al., 2019). Los quesos elaborados con la cepa INIA P132 obtuvieron niveles más elevados de 2-heptanona y 2,4-dimetilhepteno. La 2-heptanona fue detectada en 51 de las 56 cuajadas elaboradas con cepas individuales de bacterias lácticas aisladas de leche de cabra (Picon et al., 2019).

AGRADECIMIENTOS

Proyecto RTI2018-099271-R-I00.

REFERENCIAS

[1] RN Carmody, JE Bisanz, BP Bowen, MF Maurice, S Lyalina, KB Louie, et al. Nat. Microbiol. **2019**, 4, 2052–2063.
[2] A del Olmo, A Picon, M Nuñez. Int. Dairy J. **2018**, 84, 36-45.
[3] A del Olmo, A Picon, M Nuñez. Int. Dairy J. **2019**, 90, 104-113.
[4] N Gómez-Torres, M Ávila, D Delgado, S Garde. Int. J. Food Microbiol. **2016**, 232, 103-110.
[5] S Langa, A Peirotén, P Gaya, S Garde, JL Arqués, M Nuñez, et al. J Dairy Sci. **2020**, 103, 7695-7706.
[6] MG Llamas-Arriba, A Peirotén, AI Puertas, A Prieto, P López, MA Pardo, et al. LWT - Food Sci. Technol. **2019**, 102, 295–303.
[7] L López-Hortas, E Conde, E Falqué, H Domínguez, MD Torres. Food Bioprocess Technol. **2019**, 12, 1304–1315.
[8] A Picon, O López-Pérez, E Torres, S Garde, M Nuñez. Int. J. Food Microbiol. **2019**, 299, 8-22.
[9] E Rodríguez, JL Arqués, R Rodríguez, A Peirotén, JM Landete, Medina. J. Funct. Foods **2012**, 4, 542-551.
[10] N Şanlier, BB Gökcen, AC Sezgin. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **2019**, 59, 506-527.
[11] ED Sonnenburg, JL Sonnenburg. Nat. Rev. Microbiol. **2019**, 17, 383-390.

APLICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS SELECCIONADAS PARA EL BIOCONTROL DE *Listeria monocytogenes* EN QUESOS "TORTA DEL CASAR"

Martín I.[1], Rodríguez A.[1], Pulido J.C.[1], Gómez F. [1], Córdoba J.J. [1]

1 Universidad de Extremadura, Instituto Universitario de Investigación de Carnes y Productos Cárnicos, Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Higiene de los Alimentos. Avda. de la Universidad, s/n. 10003 Cáceres, España

iremartint@unex.es

Introducción

Listeria monocytogenes es el microorganismo patógeno más preocupante en alimentos madurados siendo los quesos elaborados con leche cruda uno de los productos lácteos más frecuentemente contaminados con esta bacteria patógena [1]. La ausencia de un proceso térmico estandarizado, sumado a los diferentes procesos de ordeño y manejo, y las condiciones higiénicas que prevalecen en las granjas, suponen un peligro de contaminación con *L. monocytogenes* [2]. Entre los quesos madurados con leche cruda está la "Torta del Casar" que es un producto tradicional español de alta calidad, comercializado bajo el Registro de la Denominación de Origen Protegida (DOP) "Torta del Casar" y que dado que está elaborado con leche cruda puede presentar el peligro de la presencia de *L. monocytogenes*.

Por todo esto, es necesario desarrollar estrategias de control de esta bacteria patógena en este tipo de productos. Entre estas estrategias están los protocolos de biocontrol basados en la utilización de cultivos protectores de microorganismos autóctonos no patógenos como las bacterias ácido-lácticas (BAL), aislados de los propios quesos madurados. Sin embargo, está poco extendido la utilización de cultivos protectores en quesos tradicionales elaborados con leche cruda, como es el caso de "Torta del Casar"

Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antagonista de cultivos protectores seleccionados de frente a *L. monocytogenes* y otros microorganismos alterantes a lo largo de la maduración del queso de pasta blanda "Torta del Casar".

Material y métodos

Para la realización de este estudio se utilizaron un total de 185 quesos "Torta del Casar" recién cuajados y salados, divididos en 8 lotes inoculados con *L. monocytogenes* a dos concentraciones (4 log UFC/g y 7 log UFC/g), *Lacticaseibacillus casei* y *Lactococcus garvieae* y un lote control sin inocular. Los aislados de BAL utilizados fueron aislados de quesos madurados y previamente seleccionados de su actividad anti-*L. monocytogenes* en medio elaborado con queso [3]. Los quesos se maduraron a condiciones habituales del procesado para este tipo de producto: 35 días a 6°C y 90% humedad relativa (HR), 10 días a 8ºC y 80 % HR, 10 días a 9ºC y 80 % HR y 35 días a 10°C y 80% HR. A los 0, 45, 60 y 90 día de maduración se tomaron muestras de 5 quesos para el análisis microbiológico, pH, actividad de agua (a_w) y humedad.

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS IBM v.22.

Resultados y discusión

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos (humedad y a_w) en los lotes inoculados con BAL y el lote control (Figura 1) se encontraron dentro de los valores habituales para este tipo de productos. La a_w y la humedad disminuyeron desde valores de 0,975 hasta 0,938 y de 88 % hasta 43%, respectivamente, sin observarse diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los

lotes al final de la maduración. Con respecto al pH no hubo diferencias relevantes entre los lotes inoculados con BAL y el lote control sin inocular. Solo el lote en el que se inoculó *Lc. casei* (7B1) mostró un pH significativamente ($p \leq 0,05$) mayor que el encontrado en el lote control (lote C) al final de la maduración.

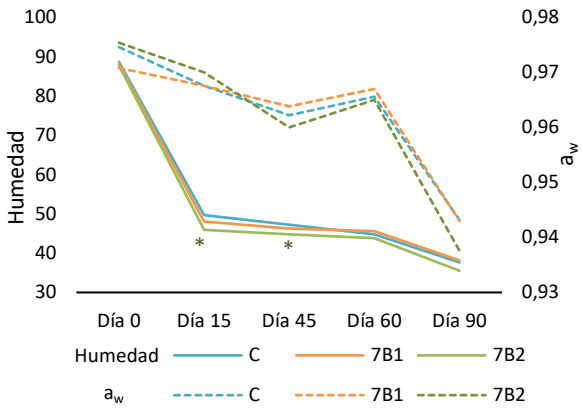


Figura 1: Contenido de humedad (%) y actividad de agua (a_w) en el lote sin inocular (C), lote inoculado con *Lc. casei* (7B1), y lote inoculado con *Lco. garvieae* (7B2) de los quesos durante el proceso de maduración. *Diferencias respecto al lote control ($p \leq 0,05$)

Los recuentos de enterobacterias disminuyeron significativamente durante el proceso de maduración en todos los lotes estudiados, aunque los valores finales siguen siendo muy altos (6,5-5,5 log UFC/g). La presencia de altos niveles de enterobacterias es habitual en los quesos de pasta blanda elaborados con leche cruda [4], pero probablemente la presencia de las BAL evita que haya un mayor desarrollo de este grupo microbiano. Los recuentos de BAL fueron superiores a 8 log UFC/g durante la maduración, sin variabilidad entre lotes. Con respecto a los recuentos de *L. monocytogenes* cuando esta bacteria fue inoculada a alta concentración (7 log UFC/g), se observó una reducción significativa ($p \leq 0,05$) en los lotes inoculados con BAL. La reducción fue más notoria en el lote en el que se inoculó *Lc. casei* 116 llegando a reducirse 2 log UFC/g. Esta reducción unida a la provocada por la disminución de la a_w y el pH durante la maduración de los quesos provoca que la reducción de *L. monocytogenes* sea de hasta 5 log UFC/g al final de la maduración.

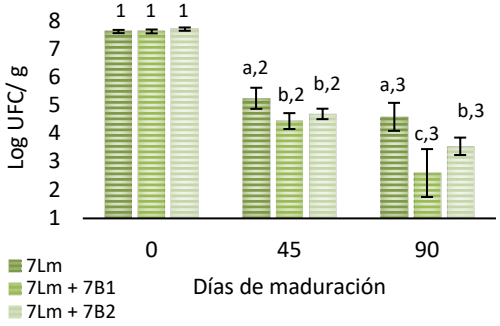


Figura 2: Recuentos de *Listeria monocytogenes* a lo largo de la maduración en los lotes inoculados a alta concentración (7 log UFC/g)**:** sólo *L. monocytogenes* (7Lm), *L. monocytogenes* y *Lc. casei* 116 (7Lm+ 7B1), *L. monocytogenes* y *Lco. garvieae* (7Lm+ 7B2). Números como subíndices indican diferencias significativas entre días de maduración dentro del mismo lote, mientras las letras indican diferencias entre lotes dentro del mismo día.

Resultados similares se obtuvieron en los lotes en los que se inoculó *L. monocytogenes* a baja concentración (4 log UFC/g). Por tanto, la utilización de cualquiera de ambas cepas, *Lc. casei* 116 y *Lco. garvieae* 151, como cultivo protector podría ser recomendable para asegurar y mejorar la calidad higiénico-sanitaria de quesos de maduración blanda no tratados térmicamente como el queso "Torta del Casar".

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por proyectos RTA-2017-00027-C03-03 MCIN/AEI/10.13039/50110001103. Junta de Extremadura- Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital-, Fondo Europeo de Desarrollo Regional- "Una manera de hacer Europa" (IB16149 y GR18056).

REFERENCIAS

[1] Morandi, S., Silvetti, T., Vezzini, V., Morozzo, E., Brasca, M. Food Microbiol., **2020,** 90,103488.

[2] Pereira, C.I., Graça, J.A., Ogando, N.S., Gomes, A.M.P., Malcata, F., Food Microbiol. **2010**, 27(3) 339-346.

[3] Martín, I., Rodríguez, A., Alía, A., Martínez, R., Córdoba, J.J. LWT, **2022**, 163, 113579.

[4] Crespo, A., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Benito, M.J., Rufo, M., Paniagua, J.M., Jiménez, A., **2020**, 103(10) 8808-8821.

HACIA UN NUEVO PARADIGMA EN LA CONCEPCIÓN DEL USO DE MODELOS PREDICTIVOS EN LA GESTIÓN DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

Valero, A.

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Campus de Rabanales s/n. Edif. Darwin Anexo C1. 14014, Córdoba.
avalero@uco.es

El avance constante en el conocimiento de los factores que afectan al desarrollo microbiano en matrices alimentarias junto con las técnicas computacionales ha hecho posible el desarrollo de modelos de microbiología predictiva y herramientas informáticas que han mejorado de forma ostensible las políticas de seguridad alimentaria. Dentro del contexto de evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico en alimentos, la utilización de modelos predictivos está reconocida como un elemento principal para la determinación del grado de exposición hacia patógenos de transmisión alimentaria, siendo a su vez de gran utilidad en el proceso de toma de decisiones para la mitigación del riesgo (Sin embargo, la información necesaria, así como el formato e interpretación de los modelos no siempre permite su utilización de forma directa ya que depende entre otros factores, del conocimiento de la ecología microbiana del alimento y las operaciones que tienen lugar a lo largo de la cadena producción-consumo. En este sentido, gracias a los repositorios y bases de datos existentes (RASFF, CDC & EFSA FoodBorne Outbreaks, Combase, Pathogens In Foods, RAKIP etc.) junto con la aparición de metodologías de análisis de Big Data, ha sido posible la mejora de las políticas en la UE, favoreciendo la interoperabilidad entre los distintos actores de la cadena alimentaria (Allende y col., 2022). Recientemente se han publicado diversas opiniones científicas acerca del uso de herramientas de microbiología predictiva para dar respuesta a problemas existentes de seguridad alimentaria por parte de EFSA y AESAN (Tabla 1), así como al diseño de estrategias para un adecuado uso de la información existente.

Tabla 1. Ejemplos de uso de herramientas de microbiología predictiva en diversas opiniones de carácter científico aprobadas por AESAN y EFSA.

Institución	Año	Etapa	Matriz
AESAN	2019	Industria-consumo	Alimentos RTE
AESAN	2022	Punto de venta	Frutas cortadas
AESAN	2006	Restauración	Comidas preparadas
EFSA	2014	Transporte	Carne
EFSA	2015	Punto de venta	Productos pesqueros
EFSA	2015	Industria	Moluscos bivalvos

Muchas de las aplicaciones de la microbiología predictiva se encaminan hacia la flexibilización de las condiciones de proceso de forma que se pueda garantizar la seguridad alimentaria. Uno de los primeros ejemplos publicados por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) estuvo orientado hacia la eliminación de la refrigeración en los establecimientos de comidas preparadas de cara al riesgo de crecimiento de *Listeria monocytogenes* (AESAN, 2006). Posteriormente, se procedió al establecimiento de guías para la determinación de vida útil en alimentos listos para el consumo, en base al cumplimiento de los criterios microbiológicos para *L. monocytogenes* (AESAN, 2019) y, por último, en el caso de la fruta cortada, se ha aprobado recientemente una opinión donde se flexibilizan las condiciones de

almacenamiento en punto de venta debido a que no existen evidencias de que puedan comprometer la seguridad alimentaria (AESAN, 2022).

En relación con las Opiniones publicadas por la autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), destacan la aplicación de temperaturas alternativas de transporte de la carne en combinación con tiempos de duración para evitar la posible proliferación de patógenos de transmisión alimentaria durante su almacenamiento posterior (EFSA, 2014). Relacionado con el mantenimiento de temperaturas, se incluyó una Opinión acerca de la aplicación de posibles rangos alternativos de temperaturas de transporte y almacenamiento en productos pesqueros pre-envasados a nivel de punto de venta cuando el almacenamiento en hielo no es posible (EFSA, 2015a). Por último, a nivel de transformación, EFSA publicó una Opinión sobre el uso de temperaturas y tiempos de inactivación que podían implementarse para la eliminación de patógenos en moluscos bivalvos (EFSA, 2015b).

La utilización de los modelos predictivos como herramientas que asistan en la toma de decisiones por parte de los asesores y gestores del riesgo microbiológico debe contribuir a la necesaria armonización de las políticas de inocuidad alimentaria. El desarrollo de aplicaciones informáticas de fácil uso (ej. aplicaciones en R Shiny) puede promover la adecuada utilización de la información existente. No obstante, se antoja importante orientar los esfuerzos a la compatibilización de los formatos en los que se presentan los modelos y los datos encontrados en dichos repositorios (Possas y col., 2022).

A pesar de las ventajas en la aplicación de los modelos predictivos, existe una componente de incertidumbre que debe ser explicada y cuantificada de forma apropiada para la correcta determinación del resultado final de la evaluación del riesgo. Por tanto, se hace necesario aplicar los principios de transparencia y el análisis de la incertidumbre en los resultados de cara a la gestión del riesgo microbiológico en alimentos.

La caracterización de las dinámicas de poblaciones, así como la integración de información de tipo multidisciplinar (cambio climático, información molecular, recursos energéticos etc.) en modelos de evaluación del riesgo continúan siendo los grandes retos por abordar en los próximos años.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento al Comité Organizador del congreso por haberme invitado a impartir esta ponencia. Asimismo, el grupo HIBRO (PAIDI AGR-170) de la Universidad de Córdoba ha contribuido al desarrollo de mi trayectoria docente e investigadora.

REFERENCIAS

[1] AESAN, **2006**. ISSN 1885-6586, Nº 3, págs. 34-45.

[2] AESAN, **2022**. ISSN 1885-6586, Nº 35, págs. 115-138.

[3] AESAN, **2019**. ISSN 1885-6586, Nº 29, págs. 11-17.

[4] Allende, A., Bover-Cid, S., Fernández, P. **2022**. Cur. Opinion Food Sci., 44:100814.

[4] EFSA, **2014**. EFSA Journal;12(7):3783.

[5] EFSA, **2015a**. EFSA Journal;13(7):4162

[6] EFSA, **2015b**. EFSA Journal;13(12):4332

[7] Possas, A., Valero, A., Pérez-Rodríguez, F. **2022**. Cur. Opinion Food Sci., 44:100814.

LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y LA ACTIVIDAD DE AGUA AFECTAN SIGNIFICATIVAMENTE A LA GERMINACIÓN DE *B. CINEREA* EN LA FRESA

Rabasco-Vílchez, L[1]., Porras-Pérez, E[2]., Possas, A[1]., Morcillo-Martín, R[3]., Pérez-Rodríguez, F[1].

[1] Universidad de Córdoba, Facultad de Veterinaria, Departamento de Bromatología y Tecnología de los alimentos, Grupo HIBRO. Campus de Rabanales, Ed. Darwin, Anexo. Córdoba, España, 14014.

[2] Universidad de Córdoba, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, Unidad de Lípidos y Arterioesclerosis, Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba, España, 14014.

[3] Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química, Grupo Bioprem. Campus de Rabanales, Ed. Marie Curie. Córdoba, España, 14014.

t62ravil@uco.es

En la actualidad ha aumentado el interés por productos frescos y mínimamente procesados como son frutas y vegetales. En este contexto, el consumo, y por tanto la producción de fresas se han visto incrementados debido a sus propiedades beneficiosas para la salud ya que son fuente de compuestos bioactivos con actividad anticancerígena, antioxidante y antiinflamatoria (1).

El incremento de la producción de frutas y vegetales genera a su vez un aumento de los residuos generados como consecuencia principalmente de la contaminación por hongos (2). En el caso de la fresa, *Botrytis cinerea* es el principal hongo responsable del 25-55% de las pérdidas antes de la cosecha y hasta el 89% después de esta (3).

B. cinerea es un hongo patógeno filamentoso necrotrófico capaz de infectar distintas partes de la planta durantes las diferentes etapas del desarrollo de esta (4). Durante la etapa de precosecha, *B. cinera* comienza infectando las flores lo que permite el crecimiento de las hifas en el receptáculo y como consecuencia la alteración postcosecha del fruto, cubriéndose por completo de un color grisáceo. Sin embargo, también afecta a otras partes anatómicas como son los tallos y las raíces (5).

El control precosecha de este hongo se ha realizado tradicionalmente mediante el uso de fungicidas químicos pero la presencia de genes de resistencia ha provocado que esta estrategia no sea efectiva. En el caso del control postcosecha, se han aplicado en el sector de las frutas y vegetales tanto tratamientos químicos como físicos. Sin embargo, en el caso de la fresa estos no son viables ya que es un producto que se presenta fresco al que no se le aplica ninguna de estas estrategias de mitigación (2). Más recientemente, se ha estudiado el uso de agentes de control microbianos (BCAs por sus siglas en inglés) que aún requiere un mayor desarrollo para su aplicación.

Los modelos matemáticos son una herramienta de gran valor en la industria alimentaria. A través de estudios in vitro o *in situ* se pueden construir funciones

matemáticas que describen las relaciones y efectos de factores intrínsecos y extrínsecos sobre la respuesta microbiana en los alimentos. Además, su integración en software como MicroHibro, permite predecir qué condiciones son limitantes para el crecimiento y desarrollo del microorganismo a controlar, así como el tiempo necesario para alcanzar una determinada densidad microbiana (6).

Por tanto, el objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo de germinación *in vitro* de *B. cinerea* evaluando la influencia sobre esta de distintas temperaturas (5, 10, 15, 20 y 25 °C) y actividades de agua (a_w, 0,920 a 0,998).

Para ello, se desarrolló un medio modelo de fresa basado en Potato Dextrose Agar al que se le añadieron los ácidos presentes de forma natural en la fruta (cítrico, tartárico, málico, shikímico y fumárico) y estableciendo un valor de pH=3,7. La germinación del hongo se evaluó al microscopio (x100) durante un máximo de 30 días, tras la inoculación del medio modelo con una suspensión de conidios de *B. cinerea* (10^5 conidios/mL). Los datos se utilizaron para construir un modelo de probabilidad asimétrico (P_t) en función del tiempo (t), estimándose el porcentaje máximo de esporas viables (P_{max}, %) y el tiempo de germinación en que P_t $P_{max}/2$ (τ, días).

La a_w afectó significativamente a la germinación de *B. cinerea* a todas las temperaturas estudiadas. Según el modelo desarrollado, P_{max} varió de 0,45 (T=5°C, a_w=0,932) a 1,0 (condiciones múltiples). Se observó un relación lineal entre Log(τ) y a_w de manera que el primero disminuyó a medida que la a_w aumentó. Al reducir la temperatura de almacenamiento de 15 a 5°C se registró un aumento en el tiempo de germinación, mientras que el aumento de las temperaturas de 15 a 25°C no afectó significativamente sus valores a una a_w fija. En general, los valores τ oscilaron entre 0,4 días (T=25°C; a_w=0,998) y 10,2 días (T=5°C, a_w=0,932).

Los modelos desarrollados serán base para la creación de sistemas online de monitorización y control de la vida útil de estos productos. Seleccionando los valores adecuados de temperatura y a_w en cada momento se consigue retrasar la germinación de *B. cinerea*. Además, con estos procesos de optimización *in silico*, se contribuirá a la reducción del desperdicio postcosecha asociado a este tipo de alteración fúngica.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PRIMA-S2-2019-PCI2020-112015 (Biofreshcloud) de la Unión Europea.

REFERENCIAS

1. Nile SH, Park SW. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. Vol. 30, Nutrition. 2014. p. 134–44.
2. Davies CR, Wohlgemuth F, Young T, Violet J, Dickinson M, Sanders JW, et al. Evolving challenges and strategies for fungal control in the food supply chain. Vol. 36, Fungal Biology Reviews. Elsevier Ltd; 2021. p. 15–26.
3. Vanti GL, Leshem Y, Masaphy S. Resistance response enhancement and reduction of Botrytis cinerea infection in strawberry fruit by Morchella conica mycelial extract. Postharvest Biology and Technology. 2021 May 1;175.
4. de Moura GGD, de Barros AV, Machado F, Martins AD, Silva CM da, Durango LGC, et al. Endophytic bacteria from strawberry plants control gray mold in fruits via production of antifungal compounds against Botrytis cinerea L. Microbiological Research. 2021 Oct 1;251.
5. Petrasch S, Knapp SJ, van Kan JAL, Blanco-Ulate B. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen Botrytis cinerea. Molecular Plant Pathology. 2019.
6. García-Gimeno RM, Sanz-Martínez C, García-Martos KM, Zurera-Cosano G. Modeling Botrytis Cinerea Spores Growth in Carbon Dioxide Enriched. Food Microbiology and Safety. 2002;67(5):1904–7.

EVALUACIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS QUE CONSIDERAN LA VARIABILIDAD DE CEPAS DE SALMONELLA SPP. EXPUESTAS A TRATAMIENTOS TÉRMICOS DINÁMICOS

Georgalis L.[1], Palop, A. [1], Periago P.M.[1], Aznar A.[1], Fernández P.S. [1], Garre A.[1]

1 Universidad Politécnica de Cartagena/Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica/Dpto. Ingeniería Agronómica. Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena (Spain)

alberto.garre@upct.es

Introducción

Salmonella spp. es un importante patógeno alimentario, responsable de un elevado número de toxiinfecciones alimentarias en la Unión Europea y en el mundo. Para establecer una seguridad alimentaria adecuada en alimentos conservados por calor es necesario establecer correctamente los tratamientos térmicos, para lo que las herramientas de modelización predictiva son claves. Los modelos matemáticos cuantitativos se pueden integrar en una evaluación de riesgos para establecer condiciones seguras.

Materiales y métodos

En este trabajo se ha estudiado la inactivación térmica de dos cepas de Salmonella (*Salmonella* Enteritidis CECT4300 y *Salmonella* Senftenberg CECT4565) en condiciones isotérmicas (clásicas) y dinámicas (similares a las de procesado en la industria). Para ello se han sometido a tratamiento térmico a distintas temperaturas (entre 55 y 65ºC, en función de sus resistencias al calor) en un termorresistómetro Mastia (Conesa et al., 2009) en condiciones isotérmicas y dinámicas (programando un aumento de temperatura entre 0,5 y 10ºC/min seguido de un mantenimiento a temperatura constante). Se ha llevado a cabo el recuento de los supervivientes mediante recuento en placa en medio de cultivo tras diluciones seriadas e incubación a 37ºC durante 48 h.

Los datos experimentales en condiciones isotérmicas se han modelizado mediante los modelos de Bigelow y Weibull, mientras que para las condiciones dinámicas se han utilizado los modelos de Bigelow, tres modelos Weibulianos y el modelo de aclimatación/adaptación de Garre et al. (2018).

Resultados y discusión

Se han observado grandes diferencias en la resistencia térmica de ambas cepas, tanto cuantitativas como cualitativas. Como era de esperar basados en resultados anteriores, la cepa de *S.* Senftenberg fue mucho más resistente que la de *S.* Enteritidis, con un incremento de 10ºC causando inactivación similar (Figuras 1 y 2).

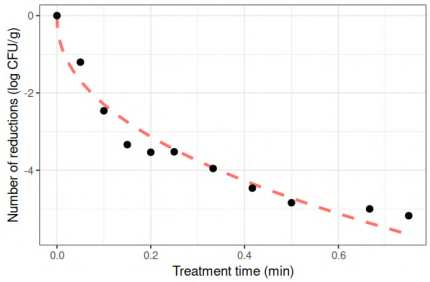


Figura 1: Inactivación térmica de *S.* Senftenberg CECT4565 durante tratamiento térmico a una de las temperaturas estudiadas (67.5ºC). (·) concentración microbiana observada, - - ajuste del modelo de Weibull

Además, las diferencias entre ambas cepas también fueron cualitativas. En los estudios isotérmicos, *S.* Senftenberg dio lugar a curvas de supervivencia no lineales (Figura 1), mientras que S. Enteritidis siguió una cinética log-linear (Figura 2). Por ello, se usaron modelos de inactivación distintos para cada cepa. En el caso de *S.*

Senftenberg, se utilizó un modelo de tipo Weibull, mientras que para *S.* Enteritidis se utilizó un modelo de Bigelow.

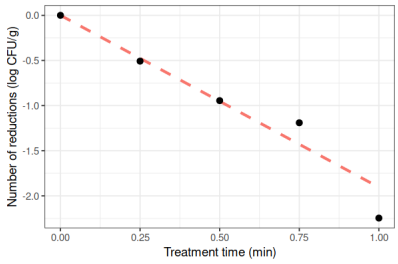


Figura 2: Inactivación térmica de *S.* Enteritidis CECT4300 durante tratamiento térmico a una de las temperaturas estudiadas (57.5ºC). (·) concentración microbiana observada, - - ajuste del modelo de Weibull

Estas diferencias tanto cualitativas como cuantitativas también se observaron bajo condiciones dinámicas. En el caso de *S.* Senftenberg, el modelo basado en condiciones isotermas fue capaz de predecir la respuesta microbiana bajo todas las condiciones dinámicas estudiadas (Figura 3).

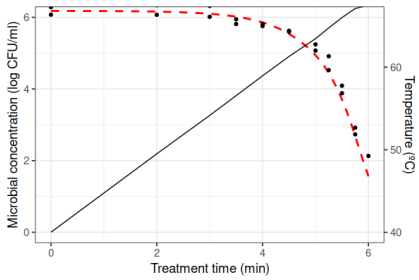


Figura 3: Inactivación térmica de Senftenberg CECT4565 durante tratamiento térmico bajo una de las condiciones dinámicas estudiadas (·) concentración microbiana observada, – perfil de temperatura, - - predicción del modelo de Weibull basado en condiciones isotermas.

Por el contrario, para la cepa de *S.* Enteritidis, las predicciones del modelo basados en datos isotermos subestimaron los recuentos microbianos obtenidos. Por tanto, se ajustó un modelo dinámico desarrollado con anterioridad en el grupo, que considera como un factor adicional la aclimatación ante el estrés. El modelo ajustado a uno de los perfiles de calentamiento fue capaz de predecir la respuesta microbiana al resto de perfiles estudiados (Figura 4).

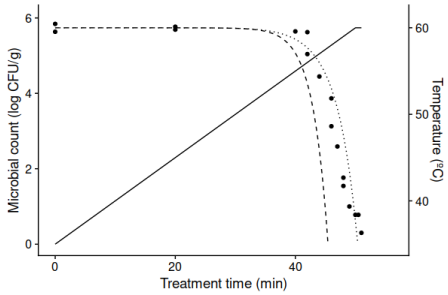


Figura 4: Inactivación térmica de *S.* Enteritidis CECT4300 durante tratamiento térmico bajo condiciones dinámicas. (·) concentración microbiana observada, – perfil de temperatura,

Conclusiones

El impacto cuantitativo de la variabilidad en la respuesta microbiana es sobradamente conocido. Nuestros resultados ponen de manifiesto que la variabilidad entre cepas de especies bacterianas puede dar lugar también a diferencias cualitativas en la inactivación. Este resultado es de gran relevancia para el desarrollo de modelos de análisis de riesgo que deben incluir la variabilidad en la respuesta microbiana.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo se ha financiado con el proyecto del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (España), referencia PID2020-116318RB-C32 y con fondos FEDER. El Dr. Garre ha obtenido financiación mediante un contrato María Zambrano.

REFERENCIAS

[1] Garre, A., Huertas, J. P., González-Tejedor, G. A., Fernández, P. S., Egea, J. A., Palop, A., & Esnoz, A., **2018**, Mathematical quantification of the induced stress resistance of microbial populations during non-isothermal stresses. International Journal of Food Microbiology, 266, 133–141.

[2] Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P. S., Esnoz, A., & Palop, A., **2009**, Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. Journal of Applied Microbiology, 107(2), 506–513.

CONTROL DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A DE *Aspergillus westerdijkiae* EN JAMÓN CURADO MEDIANTE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS

Cebrián E.[1], Roncero E.[1], Núñez F.[1], Delgado J.[1], Rodríguez M.[1]

[1]Universidad de Extremadura/Facultad de Veterinaria/Instituto Universitario de Investigación de Carne y Productos Cárnicos/Higiene y Seguridad Alimentaria/Avda. de las Ciencias, s/n. 10003 Cáceres, España.

evcebrianc@unex.es

INTRODUCCIÓN

Las condiciones ecológicas que se alcanzan durante la maduración del jamón curado favorecen la selección en su superficie de una microbiota constituida principalmente por levaduras, cocos gram + catalasa + (CGC+) y especialmente, por mohos. Algunos de ellos tienen la capacidad de producir micotoxinas como *Aspergillus westerdijkiae*, productor de ocratoxina A (OTA). Según el Panel de Contaminantes en la Cadena Alimentaria de la EFSA, la carne y los productos cárnicos se encuentran entre los principales contribuyentes de la exposición humana a la OTA [1]. Esta micotoxina es nefrotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena, teratógena y neurotóxica, y ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer en la categoría 2B como posible carcinógeno humano [2]. La legislación italiana establece una concentración máxima permitida de OTA de 1 µg/kg en carne de cerdo y derivados [3], y es esperable que se establezca un nivel similar por parte de la Unión Europea. Por todo ello, es necesario implantar estrategias para controlar este peligro. Una de ellas es la utilización, como cultivos protectores, de microorganismos que se desarrollan habitualmente en jamón curado [4–6].

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de *Debaryomyces hansenii* FHSCC 253H y *Staphylococcus xylosus* FHSCC Sx8 aislados de jamón curado sobre el crecimiento y la producción de OTA por *A. westerdijkiae* MUM 16.142

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó *A. westerdijkiae* 16.142 productor de OTA procedente de la Micoteca da Universidade do Minho (Braga, Portugal) Como agentes de biocontrol (BCAs) se utilizaron *S. xylosus* Sx8 y *D. hansenii* 253H procedentes de la colección de cultivos del Grupo de Investigación de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Extremadura, todos ellos aislados de jamón curado.

Se prepararon cuatro lotes diferentes de porciones de jamón curado estériles: el lote control inoculado sólo con *A. westerdijkiae* (Aw), un lote inoculado con *A. westerdijkiae* y *S. xylosus* (Aw-Sx), otro inoculado con *A. westerdijkiae* y *D. hansenii* (Aw-Dh) y, por último, un lote inoculado con los tres microorganismos (Mix). Se mantuvieron durante 14 días a 20 °C en recipientes estériles con una humedad relativa del 94%. El experimento se realizó por quintuplicado. Trascurrido el tiempo de incubación, el crecimiento de los microorganismos se determinó mediante recuento en placa. Los CGC+ en agar manitol salado (MSA) y las levaduras y los mohos en agar dicloran glicerol 18 % (DG18). La OTA fue extraída utilizando un método QuEChERS y cuantificada mediante uHPLC-MS/MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que se apreció un leve aumento de CGC+ y levaduras en los lotes en los que

fueron inoculados *S. xylosus* Sx8 y *D. hansenii* 253H respectivamente, ninguno de los BCAs redujo el crecimiento de *A. westerdijkiae*, obteniéndose recuentos superiores a 8 log ufc/g en todos los lotes de estudio (Tabla 1). Resultados similares han sido obtenidos utilizando estos BCAs frente a *Penicillium nordicum* en salchichones [6].

Lotes	CGC+	Levaduras	Mohos
Aw	7.87 ± 0.34	6.96 ± 0.35	8.67 ± 0.13
Aw-Sx	7.87 ± 0.23	-	8.55 ± 0.09
Aw-Dh	-	7.79 ± 0.41	8.47 ± 0.30
Mix	8.25 ± 0.11	7.95 ± 0.39	8.72 ± 0.14

Tabla1: Recuentos de CGC+, levaduras y mohos (log ufc/g) (media ± D.E) en los lotes de estudio tras 14 días a 20 °C en jamón curado. Aw: *A. westerdijkiae*, Aw-Sx: *A. westerdijkiae* + *S. xylosus*, Aw-Dh: *A. westerdijkiae* + *D. hansenii*, Mix: *A. westerdijkiae* + *S. xylosus* + *D. hansenii*.
-: No analizado

En la figura 1 se muestra el efecto de los BCAs sobre la producción de OTA por *A. westerdijkiae*. La cantidad de OTA en el lote control ascendió hasta valores de 160000 µg/kg. A pesar de que la reducción de OTA por los BCAs inoculados de manera individual no fue significativa, su inoculación conjunta ocasionó una reducción significativa del 77.8%. En este sentido, la utilización conjunta de otros BCAs ha probado ser efectiva para el control de la OTA en jamón curado [5].

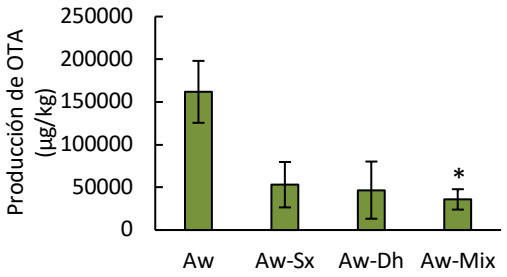


Figura 1: Efecto de los BCAs sobre la producción de OTA (µg/kg) de *A. westerdijkiae* tras 14 días a 20 °C en jamón curado. Aw: *A. westerdijkiae*, Aw-Sx: *A. westerdijkiae* + *S. xylosus*, Aw-Dh: *A. westerdijkiae* + *D. hansenii*, Mix: *A. westerdijkiae* + *S. xylosus* + *D. hansenii*. * $p \leq 0.05$.

En conclusión, *S. xylosus* Sx8 y *D. hansenii* 253H podrían ser útiles para su utilización como cultivo protector mixto para el control del peligro que supone la OTA en jamón curado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte del proyecto PID2019-104260GB-I00 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y de la ayuda GR21130 financiada por la Consejería de Economía, Ciencia y Agencia Digital de la Junta de Extremadura y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional de la Unión Europea.
Eva Cebrián es beneficiaria de la ayuda PRE2020-093605 financiada por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por "El FSE invierte en tu futuro".

Gracias al soporte técnico del Servicio de Innovación en Productos de Origen Animal (SiPA) de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura (SAIUEx).

REFERENCIAS

[1] EFSA CONTAM Panel y col. *EFSA Journal.* **2020**, *18*, 6113.

[2] IARC Ochratoxin A. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. to Humans*. **1993**, *56*, 489–521.

[3] Ministero della Sanità. Circolare 09/06/1999, n. 10. *Gazz. Uff. della Repubb. Ital.* **1999**, *135*, 52–57.

[4] M.J. Andrade, L. Thorsen, A. Rodríguez, J.J. Córdoba, L. Jespersen, *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *170*, 70–77.

[5] E. Cebrián, M. Rodríguez, B. Peromingo, E. Bermúdez, F. Núñez. *Toxins.* **2019**, *11*, 710.

[6] E. Cebrián, F. Núñez, F.J. Gálvez, J. Delgado, E. Bermúdez, M. Rodríguez. *Microorganisms* **2020**, *8*, 793.

[7] E. Cebrián, F. Núñez, M. Álvarez, E. Roncero, M. Rodríguez. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, *375*, 109744.

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOCRATOXIGÉNICO DE *Debaryomyces hansenii* Y *Staphylococcus xylosus* FRENTE A *Penicillium nordicum* EN JAMÓN CURADO

Elia Roncero[1], Josué Delgado[1], Eva Cebrián[1], Micaela Álvarez[1], María Jesús Andrade[1]

1 Universidad de Extremadura/Instituto Universitario de Investigación de la Carne y Productos Cárnicos (IProCar), Facultad de Veterinaria/Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Unidad de Higiene y Seguridad Alimentaria/ Avda. de las Ciencias, s/n. 10003 Cáceres, España.

eroncerob@unex.es

Introducción

Las condiciones ecológicas propias del proceso de maduración del jamón curado favorecen el crecimiento de mohos en su superficie, destacando la presencia de especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium.* La presencia de estos mohos en la superficie puede tener efectos negativos, como la producción de micotoxinas, entre las que destaca la ocratoxina A (OTA). Esta micotoxina, sintetizada por especies como *Penicillium nordicum*, *Penicillium verrucosum* y *Aspergillus westerdijkiae*, es categorizada por la IARC dentro del grupo 2B, y le caracteriza su capacidad nefrotóxica, hepatotóxica, carcinogénica y teratogénica, entre otras. En 2020, la EFSA publicó una Opinión Científica en la que se expone la contribución significativa de los derivados cárnicos curado-madurados a la exposición humana a la OTA [1].

Se han descrito diferentes estrategias para el control del peligro asociado a la presencia de OTA en el jamón curado, siendo hasta el momento la más eficaz aquella basada en el uso de la población microbiana autóctona, como mohos no toxigénicos, cocos gram positivos catalasa positivos, bacterias ácido-lácticas y levaduras [2,3,4]. El fin de esta estrategia es que estos agentes de biocontrol (BCAs) sean capaces de competir frente al moho ocratoxigénico disminuyendo la producción de la micotoxina.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de *Debaryomyces hansenii* y *Staphylococcus xylosus* como BCAs frente a la producción de OTA por *P. nordicum* en jamón curado.

Material y métodos

Para el desarrollo del presente trabajo se emplearon dos cepas ocratoxigénicas de *P. nordicum*: FHSCC Pn15 (Pn15), de la colección de cultivos de Higiene y Seguridad Alimentaria (FHSCC) de la Universidad de Extremadura (Cáceres, España), y BFE 856 (Pn856), del *Max Rubner-Institut* (Karlsruhe, Alemania). Las cepas de BCAs fueron *D. hansenii* FHSCC 253H (Dh) y *S. xylosus* FHSCC Sx8 (Sx8), ambos de la colección FHSCC, con capacidad antiocratoxigénica conocida.

Se inocularon porciones estériles de jamón curado con 10^6 esporas /mL de *P. nordicum* junto a los BCAs (10^6 células/mL de *D. hansenii* y 10^6 ufc/mL de *S. xylosus*). Estos últimos se inocularon individual y conjuntamente. Como control, se inocularon cada una de las dos cepas ocratoxigénicas de forma individual. Al finalizar la incubación durante 14 días a 20 ºC, se tomaron muestras por quintuplicado para la extracción de OTA por un método QuEChERS [5] y su posterior cuantificación utilizando uHPLC-MS/MS.

Resultados y discusión

Cuando se analizó la cantidad de OTA producida en el control de cada una de las

dos cepas, se observaron grandes diferencias, siendo la producción de Pn15 (1420,66 ng/g) el doble de la de Pn856 (706,885 ng/g). Estos resultados coinciden con estudios previos en los que también se obtuvieron diferencias en la producción de OTA entre cepas de la misma especie [6].
Además, se observó que en ambos mohos ocratoxigénicos se produjo una disminución significativa en la cantidad de OTA producida, siendo del 98,5% para Pn15 y 90,5% para Pn856, cuando se aplicó el tratamiento que combinó los dos BCAs (Pn + Dh + Sx) respecto al control (Figura 1). Estos resultados coinciden con otros obtenidos anteriormente en los que ambos BCAs fueron capaces de reducir la presencia de OTA por debajo del límite de cuantificación en embutidos curado-madurados [7].

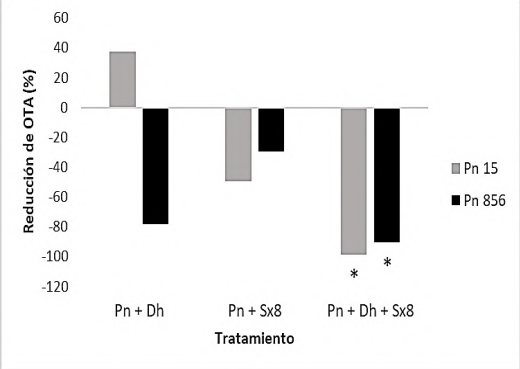


Figura 1: Reducción de ocratoxina A (OTA) producida por *Penicillium nordicum* FHSCC Pn15 (Pn15) y BFE 856 (Pn856) a 20 ºC a los 14 días de incubación en presencia de agentes de biocontrol. Tratamientos: Control (Pn15 o Pn856; valor 0), Pn + Dh (Pn15 o Pn856 + *Debaryomyces hansenii* FHSCC 253H), Pn + Sx8 (Pn15 o Pn856 + *Staphylococcus xylosus* FHSCC Sx8) y Pn + Dh + Sx (Pn15 o Pn856 + *D. hansenii* FHSCC 253H + *S. xylosus* FHSCC Sx8). Diferencias significativas representadas por un asterisco (*).

De igual manera, en estudios previos se ha demostrado la actividad antiocratoxigénica de *D. hansenii* inoculada individualmente en productos cárnicos como el jamón curado [2,4]. Por otra parte, *S. xylosus,* en un estudio realizado previamente en medio de cultivo agar-jamón, fue capaz de disminuir la cantidad de OTA producida en las tres cepas de *P. nordicum* empleadas en el desarrollo de este trabajo [3].

Conclusión

D. hansenii FHSCC 253H y *S. xylosus* FHSCC Sx8 son capaces de reducir la producción de OTA de *P. nordicum*, pudiendo llegarse a proponer su uso combinado como estrategia eficaz durante el proceso de maduración del jamón curado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por el proyecto PID2019-104260GB-I00/AEI/10.130. 39/501100011033.

La presente comunicación ha sido posible gracias a la financiación concedida por la Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital de la Junta de Extremadura y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional de la Unión Europea a través de la ayuda con referencia GR21130. El análisis mediante uHPLC-MS/MS fue realizado gracias al apoyo de Servicio de Innovación en Productos de Origen Animal (SiPA) de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura (SAIUEx).

REFERENCIAS

[1] EFSA CONTAM Panel y col. *EFSA Journal.* **2020**, *18*, 6113.

[2] M.J. Andrade, L. Thorsen, A. Rodríguez, J.J. Córdoba, L. Jespersen. *Int. J. Food Microbiol*. **2014**, *170*, 70–77.

[3] E. Cebrián, F. Núñez, F.J. Gálvez, J. Delgado, E. Bermúdez, M. Rodríguez. *Microorganisms* **2020**, *8*, 793.

[4] L. Iacumin, M. Manzano, D. Andyanto, G. Comi. *Food Microbiol*. **2017**, *62*, 188–195.

[5] J. Delgado, L. da Cruz Cabral, M. Rodríguez, A. Rodríguez. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *272*, 22–28.

[6] A. Rodríguez, A. Medina, J.J. Córdoba, N. Magán. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *178*, 113–119.

[7] E. Cebrián, F. Núñez, M.M. Álvarez, E. Roncero, M. Rodríguez. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, *375*, 109744.

EFECTO DE AGENTES DE BIOCONTROL SOBRE LA CALIDAD DE LOS EMBUTIDOS CURADO-MADURADOS

Álvarez M., Andrade M.J., Martín I., Rodríguez M., Núñez F.

Universidad de Extremadura/Facultad de Veterinaria/Instituto de Investigación en Carne y Productos Cárnicos/Higiene y Seguridad Alimentaria. Av. de las Ciencias s/n 10003 Cáceres
maalvarezr@unex.es

Introducción

Los microorganismos *Debaryomyces hansenii* FHSCC 253H (Dh), *Staphyloccus xylosus* FHSCC Sx8 (Sx) y *Enterococcus faecium* SE920 (Ef) han sido descritos como agentes de biocontrol (BCAs) frente a mohos productores de ocratoxina A (OTA) en derivados cárnicos curado-madurados [1, 2, 3]. Para ser utilizados como cultivos protectores en embutidos, su presencia no debe perjudicar las características sensoriales del producto. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de estos BCAs sobre los parámetros fisicoquímicos, la textura y el color en embutidos curado-madurados, así como sobre los compuestos volátiles asociados a su flavor.

Material y métodos

Se elaboraron tres lotes de salchichones inoculados con Dh, Sx o Ef en la masa antes del embutido y un lote control sin BCAs. Los embutidos se maduraron siguiendo un procesaso habitual: 3 días a 5 °C y 85 % de humedad relativa (HR), 1 día a 13 °C y 84 % de HR y 17 días a 12 °C y 84 % de HR. Al finalizar la maduración se tomaron muestras para el análisis de pH, actividad de agua (a_w) y humedad. También se obtuvieron rodajas de 1 cm para el análisis de los parámetros relacionados con la textura (dureza, adhesividad, elasticidad, cohesividad y masticabilidad), según el método del análisis de perfil de textura (TPA). El color del interior del embutido se evaluó empleando el espacio CIE L*a*b*. Los compuestos volátiles se extrajeron mediante microextracción en fase sólida (SPME) con una fibra de divinilbenceno-carboxeno-polidimetilsiloxano, se analizaron en un cromatógrafo de gases con detector de masas y se identificaron mediante la biblioteca NIST y patrones de referencia. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS IBM v.22.

Resultados y discusión

Los valores de los parámetros fisicoquímicos en los lotes inoculados (Figura 1) se encontraron dentro de los habituales para los embutidos curado-madurados: pH entre 5 y 6, a_w entre 0,8 y 0,9 y humedad entre el 20 y 45% [4]. Cada microorganismo provocó cambios poco acentuados en alguno de los parámetros de textura y color (Tabla 1), aunque los valores observados se encontraron dentro del rango normal que se alcanza durante la elaboración del salchichón [4,5,6].

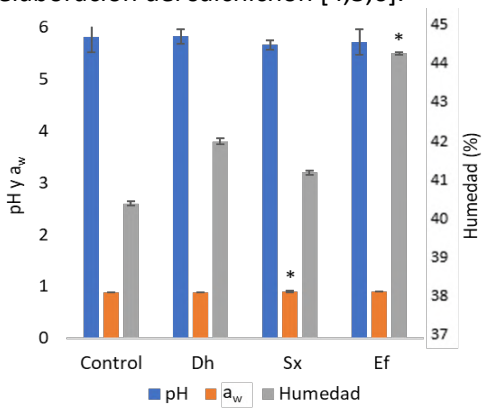


Figura 1: Valores de pH, actividad de agua (a_w) y humedad de los embutidos curado-madurados del lote control sin inocular y los inoculados con *Debaryomyces hansenii* (Dh), *Staphylococcus xylosus* (Sx) y *Enterococcus faecium* (Ef)*Diferencias respecto al lote control ($p \leq 0.05$).

Parámetro		Control	Dh	Sx	Ef
Dureza (N)		122.90 ± 20.70	127.35 ± 8.34	133.39 ± 12.64	82.87 ± 3.67*
Adhesividad (N/s)		-3.39 ± 2.31	-4.9 ± 1.61	-7.80 ± 0.09*	-4.23 ± 0.38
Elasticidad		0.60 ± 0.04	0.66 ± 0.02*	0.79 ± 0.01*	0.55 ± 0.08
Cohesividad		0.59 ± 0.01	0.63 ± 0.01*	0.64 ± 0.02*	0.61 ± 0.02
Masticabilidad (N)		41.36 ± 17.70	53.95 ± 0.23	68.58 ± 2.93*	28.19 ± 6.44
Color	*L**	49.23 ± 3.78	46.57 ± 5.02	45.53 ± 1.07	50.86 ± 5.70
	*a**	18.98 ± 1.30	20.13 ± 1.92	21.44 ± 0.94*	20.69 ± 4.99
	*b**	7.47 ± 0.67	8.16 ± 1.36	9.22 ± 0.56*	9.20 ± 2.19

Tabla1: Resultados del análisis de los parámetros de textura y color de los embutidos curado-madurados del lote control sin inocular y de los inoculados con *Debaryomyces hansenii* (Dh), *Staphylococcus xylosus* (Sx) y *Enterococcus faecium* (Ef). *Diferencias respecto al lote control ($p \leq 0.05$).

Todos los compuestos volátiles detectados se encuentran habitualmente en embutidos curado-madurados, sin detectarse ningún compuesto considerado como no deseable. Los lotes inoculados presentaron concentraciones superiores de compuestos volátiles derivados de la fermentación de los carbohidratos (Figura 2). Dh y Sx disminuyeron la abundancia de compuestos procedentes de la oxidación lipídica, lo que podría contribuir a reducir el enranciamiento de los embutidos. En el lote Dh se observó una mayor cantidad de los relacionados con el catabolismo de los aminoácidos (Figura 2), destacando el aumento significativo de 3-metilbutanol y 3-metilbutanal, a los que se atribuye un gran impacto en la formación del aroma típico de los productos cárnicos curados [7,8]. En conclusión, aunque es necesario confirmar estos resultados con la evaluación sensorial mediante un panel de cata, la actividad de los tres BCAs estudiados no produce una alteración de las características propias de los embutidos, pudiendo esperarse en algunos casos una disminución del enranciamiento y una potenciación de su aroma, no existiendo inconveniente para su posible adición como cultivos protectores para el control de OTA en estos productos.

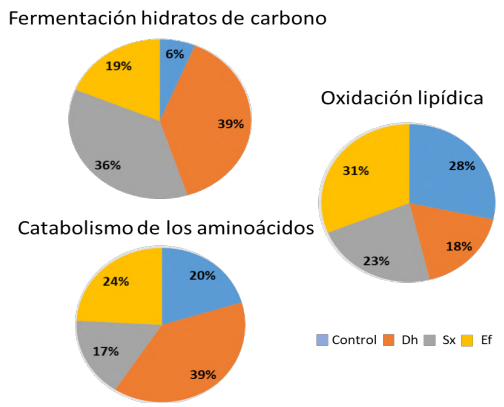


Figura 2: Resultados (%) del análisis de los compuestos volátiles de los embutidos del lote control sin inocular y los lotes inoculados con *Debaryomyces hansenii* (Dh), *Staphylococcus xylosus* (Sx) y *Enterococcus faecium* (Ef).

AGRADECIMIENTOS

Soporte técnico: Servicio de innovación en productos de origen animal (SiPA). Este trabajo es parte del proyecto de I+D+i PID2019-104260GB-I00 financiado por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033. La presente publicación ha sido posible gracias a la financiación concedida por la Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital de la Junta de Extremadura y por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional de la Unión Europea a través de la ayuda con referencia GR21130. M. Álvarez es beneficiaria de la ayuda BES-2017-081340 financiada por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 y "FSE Invierte en tu futuro".

REFERENCIAS

[1] M. Álvarez, A. Rodríguez, B. Peromingo, F. Núñez, M. Rodríguez, *Mycotoxin Res.*, **2020**, *36*, 137-145.

[2] M. Álvarez, J. Delgado, F. Núñez, E. Roncero, M. J. Andrade. *Food Control*, **2022**, *137*, 103695.

[3] E. Cebrián, F. Núñez, M. Álvarez, E., Roncero, M. Rodríguez. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, *375*, 109744.

[4] M. Álvarez, M. J. Andrade, C. García, J. J. Rondán, F. Núñez. *Foods*, **2020**, *9*, 1505.

[5] A. M. Herrero, J. A. Ordóñez, R. de Ávila, B. Herranz, L. de la Hoz, M. I. Cambero. *Meat Sci.*, **2007**, *77*, 331-338

[6] S. Corral C. Belloch, J. J. López-Díez, A. Salvador, M. Flores. *Meat Sci.*, **2017**, *123*, 1-7.

[7] M. J. Andrade, J. J. Córdoba, E. M. Casado, M. G. Córdoba, M. Rodríguez. *Meat Sci.*, **2010**, *85*, 256-264.

[8] J. Ruiz, J. Ventanas, R, Cava, A. Andrés, C. García. *Meat Sci.*, **1999**, *55*, 19-27.

BIOCONSERVANTES DERIVADOS DE BACTERIÓFAGOS Y ENDOLISINAS

García P.

Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC. Paseo Río Linares sn, 33300, Villaviciosa. Asturias

pgarcia@ipla.csic.es

La industria alimentaria requiere de técnicas de conservación inocuas para el consumidor y para el medio ambiente, que sean sostenibles y que permitan la obtención de alimentos sanos y seguros. Por otra parte, la seguridad alimentaria del futuro está comprometida por la necesidad de una gran cantidad de alimentos y por la repercusión que esto tendrá en el suelo, el suministro de agua y en la emisión de gases que podrían acelerar el cambio climático.

Entre las técnicas de conservación de alimentos, la bioconservación se distingue porque utiliza compuestos naturales o microorganismos, y más recientemente, ha incorporado a los bacteriófagos y las proteínas fágicas con actividad lítica (endolisinas).

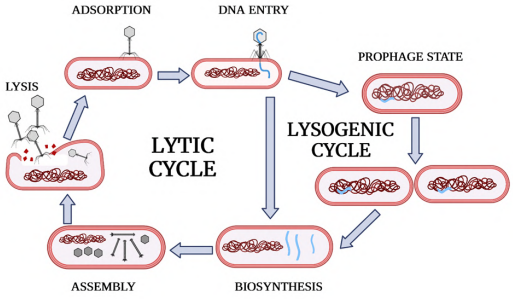


Figura 1. Ciclos de vida de un bacteriófago

Los bacteriófagos forman parte de todos los ecosistemas naturales, incluidos los alimentos y nuestra microbiota. Por lo tanto, son inocuos para los humanos, los animales y las plantas. La capacidad lítica de los bacteriófagos está ligada a la naturaleza de su ciclo de vida lítico (Figura 1) en el que la bacteria huésped se lisa para dar lugar a la progenie viral.

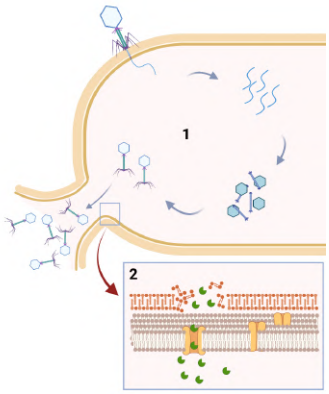


Figura 2. Papel de las endolisinas en el ciclo de vida de un bacteriófago

Las endolisinas son las proteínas fágicas (Figura 2) encargadas de llevar a cabo el último paso del ciclo lítico (liberación de la progenie viral). Tienen capacidad de degradar el peptidoglicano de la pared celular cuando actúan desde el exterior de la bacteria, lo que provoca la lisis osmótica.

Las ventajas que ofrecen los productos fágicos son su inocuidad, especificidad y versatilidad, de modo que se pueden eliminar bacterias patógenas o alterantes de los alimentos sin modificar las características organolépticas ni tampoco su microbiota habitual [1].

Sin embargo, a pesar de la gran eficacia ya demostrada en múltiples sectores, y a la disponibilidad de varios productos fágicos

comerciales, la falta de legislación en la Unión Europea sobre el uso de los mismos, junto con la necesidad de ser aceptados por los consumidores, son factores que están afectando negativamente a su implantación como bioconservantes. Además, existen algunas desventajas que es preciso tener en cuenta, como son la estabilidad en el alimento, o la aparición de bacterias resistentes a los fagos, las cuales pueden ser solventadas sin dificultad en la mayoría de los casos.

Desde el punto de vista de sus aplicaciones, es de destacar las que afectan a los primeros eslabones de la cadena alimentaria. Así, en el sector ganadero y con objeto de evitar la transferencia de bacterias zoonóticas al sistema de producción de alimentos, los productos fágicos podrían sustituir en gran medida a los antibióticos y otros biocidas, dada la acuciante necesidad de reducir el uso de estos compuestos en la cadena alimentaria (One Health approach). La administración oral de productos fágicos a los animales de granja disminuye la carga microbiana intestinal de algunos patógenos y consecuentemente, la posibilidad de contaminación de las materias primas derivadas de ellos. En agricultura y en acuicultura también tienen gran utilidad para evitar el uso de pesticidas y antibióticos nocivos para el medio ambiente y los consumidores. Otra de las posibles aplicaciones es en la descontaminación de frutas y verduras, o en general de alimentos listos para el consumo que no pueden someterse a tratamientos por calor.

El trabajo del grupo DairySafe (IPLA-CSIC) se ha centrado en evitar la contaminación por *Staphylococcus aureus* en productos lácteos utilizando bacteriófagos y endolisinas como bioconservantes. Nuestros resultados mostraron la eficacia de la mezcla de dos fagos para eliminar al patógeno de leche y queso [2,3]. Más recientemente, hemos demostrado la utilidad de las endolisinas para mantener la seguridad alimentaria de queso fresco [4]. La endolisina modificada LysRODIΔAmi constituye un buen aditivo para la leche con riesgo de contaminación por *S. aureus*, ya que elimina a esta bacteria durante el proceso de elaboración de queso.

De cara al futuro inmediato es preciso reforzar ciertos aspectos como un mejor conocimiento de posibles efectos secundarios a nivel inmunológico o mejorar los sistemas de producción de estos productos para que resulten más rentables. En definitiva, es preciso disponer de datos adicionales que disipen cualquier duda que las autoridades competentes puedan tener para aprobar la aplicación de este tipo de antimicrobianos.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo fue financiado por el proyecto PID 2019-105311 RB-I00 (MICIU/AEI/FEDER, EU, Spain501100011033) and AYUD/2021/52120 (Program of Science, Technology and Innovation,2021–2023 and FEDER EU, Principado de Asturias, Spain).

REFERENCIAS

[1] Rendueles C, Duarte AC, Escobedo S, Fernández L, Rodríguez A, García P, Martínez B. Combined use of bacteriocins and bacteriophages as food biopreservatives. A review. *Int J Food Microbiol.* **2022** 2;368:109611.

[2] Obeso JM, García P, Martínez B, Arroyo-López FN, Garrido-Fernández A, Rodriguez A. Use of logistic regression for prediction of the fate of *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk in the presence of two lytic phages. *Appl Environ Microbiol.* **2010** 76(18):6038-46.

[3] Bueno E, García P, Martínez B, Rodríguez A. Phage inactivation of Staphylococcus aureus in fresh and hard-type cheeses. *Int J Food Microbiol.* **2012** 1;158(1):23-7.

[4] Agún S, Fernández L, Rodríguez A, García P. Deletion of the amidase domain of endolysin LysRODI enhances antistaphylococcal activity in milk and during fresh cheese production. *Food Microbiol.* **2022** 107:104067.

ENSAYOS DE EVOLUCIÓN DAN LUGAR A CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTES A ACEITE ESENCIAL DE NARANJA

Berdejo D., Pagán E., Merino N., Pagán R., García-Gonzalo D.
Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, Zaragoza, España.
berdejo@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La aparición de resistencias bacterianas ha cuestionado la seguridad de los aceites esenciales (AE) y sus constituyentes individuales (CI) como posibles conservantes alimentarios. Recientes estudios han demostrado la aparición de resistencias genotípicas en *Staphylococcus aureus* frente a algunos CI mediante una exposición prolongada a estos compuestos naturales[1]. Sin embargo, el desarrollo de resistencias genotípicas frente a AE complejos, compuestos por múltiples CI, todavía no ha sido evidenciado[2].

Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar la aparición de variantes resistentes de *S. aureus* mediante la exposición prolongada a dosis subletales de AE de naranja (*Citrus sinensis*) (AEN) de la cepa parental (SaWT), y caracterizar las variantes aisladas de forma fenotípica y genotípica.

MATERIAL Y MÉTODOS

En primer lugar, se realizaron los ensayos de evolución de *S. aureus* USA300 frente AEN (Figura 1) para la obtención de variantes resistentes (SaRAEN).

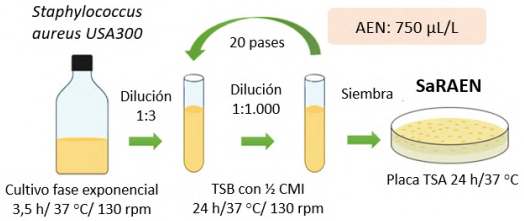


Figura 1: ensayo de evolución de *S. aureus* USA300 (SaWT) frente AEN para el aislamiento de variantes resistentes (SaRAEN). TSA (agar tripticasa soja), TSB (caldo tripticasa soja).

Tras 20 ciclos de evolución, se aisló la cepa SaRAEN y se evaluó su resistencia fenotípica que consistió en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida, en estudios de cinética de crecimiento en presencia del AEN y en la evaluación de la supervivencia frente a tratamientos letales de AEN[3].

Finalmente, se llevó a cabo la secuenciación genómica de SaRAEN mediante tecnología Illumina Mid-seq, con lecturas pareadas (150 pb x 2). Posteriormente, mediante análisis bioinformático se identificaron las mutaciones presentes en SaRAEN con respecto a SaWT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida reveló un incremento de resistencia de SaRAEN al AEN superior al 100% respecto a la cepa parental (SaWT), de 1.500 µL/L a >5.000 µL/L y de 2.500 µL/L a >5.000 µL/L, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) de AEN para *S. aureus* USA300 (SaWT) y su variante aislada (SaRAEN).

Cepas	**CMI** (µL/L)	**CMB** (µL/L)
SaWT	1.500	2.500
SaRAEN	>5.000	>5.000

El estudio de cinética de crecimiento también reflejó un aumento de resistencia de SaRAEN a todas las concentraciones testadas de AEN (Figura 2). En presencia de 1.250 µL/L de AEN la fase latencia de

SaRAEN fue de 7,5 h, 10 h menos que la observada en SaWT; y la tasa máxima crecimiento se vio aumentada de 0,1668 (SaWT) a 0,2395 DO_{595}/h (SaRAEN).

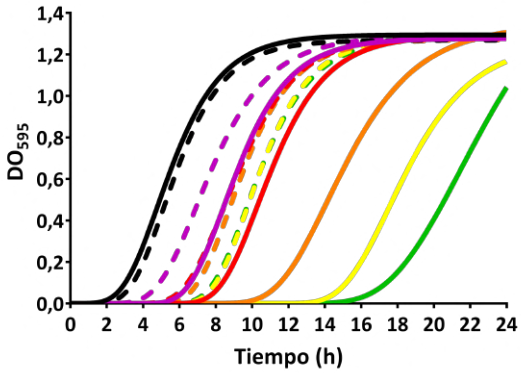


Figura 2: curvas de crecimiento (DO_{595}) de SaWT (—) y SaRAEN (---) modelizadas mediante ecuación de Gompertz modificada, en presencia de 0 (■), 250 (■), 500 (■), 750 (■), 1000 (■) y 1250 (■) µL/L de AEN.

Además, la cepa SaRAEN mostró una mayor supervivencia frente a tratamientos letales (2.000 µL/L / 37°C / pH 4,0): a las 5 h de tratamiento se alcanzaron 3 ciclos log_{10} de inactivación de SaWT, mientras que sólo se logró 1,5 ciclos log_{10} de SaRAEN (Figura 3).

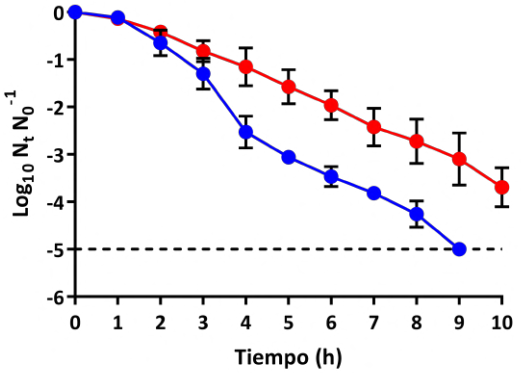


Figura 3: gráfica de inactivación de *S. aureus* USA300 (SeWT; •) y su variante aislada (SaRAEN; •) frente a tratamientos letales de AEN (2.000 µL/L / 37°C / pH 4,0).

A continuación, se secuenció su genoma para conocer el origen genético del incremento de resistencia. Se detectaron un total de 4 polimorfismos de nucleótido único (SNP) en el genoma de SaRAEN (Figura 4), entra las que destacan los dos SNP en los genes *hepT* y *accA*, codificantes de enzimas implicadas en la síntesis de lípidos de la membrana celular.

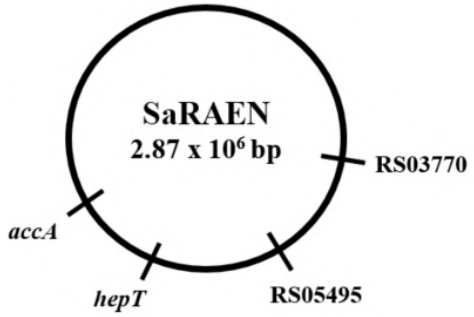


Figura 4: mapa genético de la variante de *S. aureus* aislada (SaRAEN) con las anotaciones de los genes mutados con respecto a SaWT.

Estos resultados revelan el importan papel de las membranas celulares en la resistencia celular frente a estos antimicrobianos naturales, y apunta a esta estructura como una de las principales dianas de los AE y CI. De igual modo, se evidencia que modificaciones genéticas en enzimas implicadas en la síntesis de las envolturas celulares puede dar lugar a variantes resistentes frente a estos compuestos.

CONCLUSIONES

Este estudio evidencia la aparición de cepas resistentes de *S. aureus* frente a AEN tras la exposición prolongada a este compuesto; estas variantes pueden crecer por encima de concentraciones inhibitorias, más rápido, y sobrevivir a dosis letales de AEN. Las mutaciones detectadas permiten relacionar la membrana celular con el incremento de resistencia, y apuntan a esta estructura como principal diana del AEN.

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por la Agencia Estatal de Investigación (España) (Proyecto Nº. PGC2018-093789-B-I00), por el Fondo Social Europeo y el Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento del Gobierno de Aragón.

REFERENCIAS

[1] D Berdejo, B Chueca, E Pagán, A Renzoni, WL Kelley, R Pagán, D García-Gonzalo, *Molecules,* **2019,** 24, 170.

[2] E Leite de Souza, Trends Food Sci. Technol., **2016**, 56, 1-12.

[3] D Berdejo, E Pagán, N Merino, R Pagán, D García-Gonzalo, *Pharmaceuticals,* **2020,** 13, 239.

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LEVADURAS DEL GÉNERO *HANSENIASPORA* PARA CONTROLAR EL DESARROLLO DE *B. CINEREA* MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES

Tejero, P.[1,2], Hernández, A.[1,2], Moraga, C.[1,2], Hidalgo, C.[1,2], Rodríguez, A[1,2]

1 Universidad de Extremadura/Escuela de Ingenierías Agrarias/Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Nutrición y Bromatología. Avd. Adolfo Suárez s/n, 06007, Badajoz.

2 Universidad de Extremadura/Instituto Universitario de Investigación de Recursos Agrarios (INURA). Avd. de la Investigación s/n, 06006, Badajoz

aliciarj@unex.es

Durante los últimos años, *Botrytis cinerea* ha provocado pérdidas importantes en numerosos cultivos, tanto antes como después de la cosecha, de ahí la necesidad de buscar nuevas estrategias alternativas al uso de fungicidas químicos utilizados habitualmente para hacer frente a hongos patógenos en frutas. El biocontrol es una alternativa prometedora y amigable con el medio ambiente ya que están basados en el uso de microorganismos antagonistas. Dentro de los microorganismos que pueden ser utilizados como estrategia de biocontrol frente a este moho alterante, las levaduras productoras de compuestos orgánicos volátiles pueden ser una buena alternativa. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia del género *Hanseniaspora* (24 cepas; Tabla 1) para controlar el desarrollo de *B. cinerea* mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles.

Para determinar esta actividad, se llevaron a cabo distintas confrontaciones moho:levadura en sistema de doble placa [1] y se incubaron a 25ºC durante 5 días. Posteriormente, se realizaron estudios de crecimiento (determinación de la velocidad de crecimiento y fase de latencia) y se evaluó el efecto producido por la presencia de las distintas cepas de levadura a nivel celular (tanto a nivel macroscópico, como microscópico, así como el análisis de la expresión del gen *Rho 1* mediante PCR en tiempo real, que está relacionado con la pared celular [2]). En el mismo sentido se identificaron aquellos compuestos volátiles implicados en los efectos antagonistas de las cepas estudiadas. Se llevó a cabo un análisis de componentes principales y un estudio de coeficientes de correlación de Pearson.

Especie	Códigos de cepa
H. vineae	H2, H3
H. uvarum	H4, H5, H6, H7, H8 L793
H. valbyensis	H9, H10
H. guillermondii	H12, H13
H. osmophila	H14, H15
H. occidentalis	H16, H17, H19
H. guillermondii	H18
H. opuntiae	H20
H. lachancei	H21
H. singularis	H23
H. thailandica	H24
H. jakobsenii	H25
H. mollemarum	H26
Metschnikowia pulcherrima	L672

Tabla 1: cepas de *Hanseniaspora* utilizadas en este estudio. La cepa L672 fue utilizada como control.

Los resultados de este trabajo mostraron que el 72% de las levaduras implicadas provocaron una reducción estadísticamente significativa en la velocidad crecimiento de *B. cinerea*, además un 52% de ellas

aumentaron la fase de latencia de *B. cinerea*, siendo las cepas *Hanseniaspora osmophila* (H15) y *Hanseniaspora occidentalis* (H16) las más eficaces. La eficacia de un agente de biocontrol en cuanto a los parámetros de crecimiento se mide evaluando conjuntamente la velocidad de crecimiento y la fase de latencia del moho alterante en presencia de dicho microorganismo antagonista. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria y económico del productor, se busca que el antagonista sea capaz de enlentecer la velocidad de crecimiento del moho y de prolongar la fase de latencia de su crecimiento, para que así sea mayor el tiempo que necesita el moho para provocar la alteración indeseable en la fruta.

Respecto a los compuestos volátiles orgánicos identificados, sobresale el grupo de los ésteres, destacando de forma mayoritaria la presencia de 2-feniletil acetato (32,76%) y etil acetato (20,88%). A partir del análisis de componentes principales se puede concluir que este grupo se asocia con la reducción de la velocidad de crecimiento de *B. cinérea* (Figura 1). Además, mediante el análisis de correlación de Pearson, se determinó que 14 compuestos se relacionaron con este parámetro, destacando el 2-feniletil acetato; cuatro compuestos se relacionaron con el aumento de la fase lag y un único compuesto, 3-etil-2,5-dimetilpyrazina, estuvo correlacionado con la expresión del gen *Rho 1*.

Respecto al estrés producido por los compuestos volátiles se aprecian alteraciones a nivel macro y microscópico en el caso de la mayoría las cepas utilizadas, provocando modificaciones en la pared celular, en los septos y en el citoplasma. En el caso de la expresión relativa del gen *Rho*, se observó que su expresión se activaba en la mayoría de las cepas a excepción de las levaduras *Hanseniaspora singularis* (H23) y *Hanseniaspora uvarum* (L793).

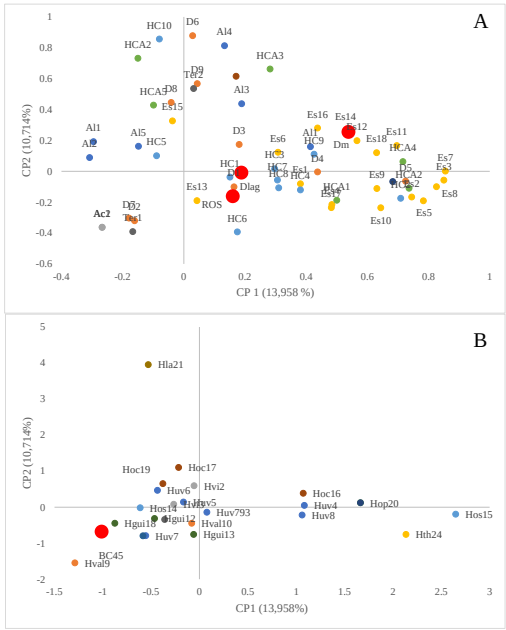


Figura 1. Análisis de componentes principales dónde se representa la componente principal 1 (13,958%) y la componente principal 2 (10,714%) en la que se muestra A: relación de los compuestos volátiles, el valor negativo del diferencial de crecimiento, fase de latencia y gen Rho 1. B: relación de los tratamientos con las cepas de levaduras empleadas y el control.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que el género *Hanseniaspora* presenta una elevada tasa de cepas con potencialidad antagonista frente a mohos alterantes en la pre y post-cosecha de frutas como *B. cinerea* mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Extremadura y los Fondos Feder (GR21180) y el proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación RTI2018-096882-B-100..

REFERENCIAS

[1] Ruiz-Moyano, Santiago, Hernández, A., Galvan, A. I., Córdoba, M. G., Casquete, R., Serradilla, M. J., & Martín, A. *Food Microbiol.* **2020**, 92, 103556.

[2] da Cruz Cabral, L., Delgado, J., Andrade, M.J., Rodríguez, M. & Rodríguez A. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, 275, 17-23.

EFECTO DE LA SAL SOBRE EL METABOLISMO DE LA LEVADURA DE ALIMENTOS *Debaryomyces hansenii*

Ruiz-Pérez F.[1], Ruiz-Castilla F.J.[1], Chacón-Navarrete H.[1], Goméz-Rodriguez M.[1], Calero F.[1], Aguilar-Gavilán J.J.[1], Martínez J.L[2]., Ramos J.[1]

1 Universidad de Córdoba /Departamento Química Agrícola, Edafología y Microbiología/ Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, España.

2 Technical University of Denmark, Department of Biotechnology and Biomedicine, Søltofts Plads Building 223, Kgs. Lyngby, 2800, Denmark.

franruiz1996@gmail.com

Debaryomyces hansenii es una levadura halotolerante, aunque algunos autores la consideran halófila [1], es capaz de colonizar ambientes salinos como agua marina y lagos salinos y es la levadura más abundante en productos cárnicos curados principalmente embutidos, en los cuales participa en el desarrollo de propiedades organolépticas características [2] . El efecto de la sal sobre el metabolismo de esta levadura está poco estudiado, aunque diversos grupos han demostrado el efecto beneficioso del NaCl a concentraciones relativamente altas (0,5-1 M) sobre el crecimiento y la tolerancia a distintos tipos de estrés [3]. Por otra parte, se ha descrito que la presencia de sodio produce la activación del ciclo de glioxilato, una variación del ciclo del ácido tricarboxilico que permite producción de energía a partir de dos unidades de carbono, y de algunas de las enzimas básicas de este ciclo, aunque no se ha profundizado suficientemente en este tema [4]. En este trabajo se ha realizado una aproximación multidisciplinar empleando tanto NaCl como LiCl para obtener detalles sobre las adaptaciones a la presencia de sales por parte de *D. hansenii*. En este sentido se han realizado experimentos para cuantificar la tolerancia a sal (**Figura 1**), se ha analizado el contenido intracelular de sodio y litio (**Figura 2**). Se han medido los niveles de metabolitos secundarios relacionados con el ciclo de Krebs/glioxilato y se ha determinado tanto la expresión génica como las actividades de las principales enzimas implicadas.

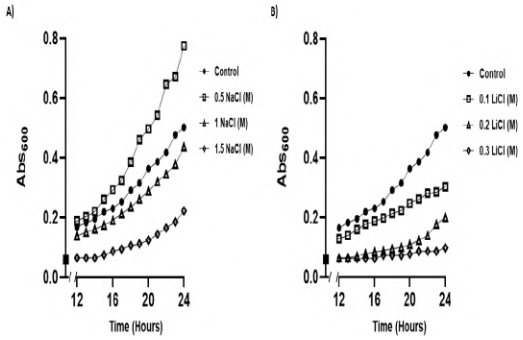


Figura 1 Crecimiento en medio líquido de *Debaryomyces hansenii* en diferentes concentraciones de Na^+ (A) y Li^+ (B).

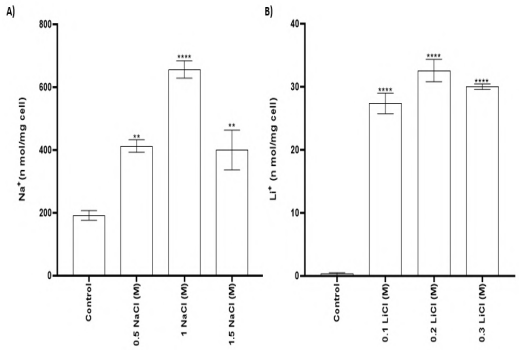


Figura 2 Análisis del contenido intracelular de los cationes Na^+ (A) y Li^+ (B) en diferentes condiciones de crecimiento.

Los resultados obtenidos confirman el efecto beneficioso del sodio sobre el crecimiento y la estimulación del ciclo del glioxilato. Por el contrario, el litio actúa siempre como un catión tóxico y no induce estimulación de dicho ciclo (**Figura 3**).

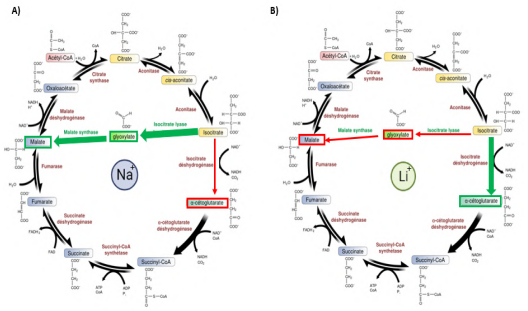


Figura 3 Efecto del Na^+ (A) y del Li^+ (B) sobre los metabolitos y las enzimas clave del ciclo de Krebs/ Glioxilato en *Debaryomyces hansenii*.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo ha sido realizado gracias al Plan Propio de Investigación 2022 de la Universidad de Córdoba y el Proyecto FEDER (1380653-R).

REFERENCIAS

[1] J.C. González-Hernández, A. Peña, Rev. Lationam. Microbiol., 44 (3-4), 137-56

[2] L. Ramos-Moreno, F. Ruiz-Pérez, E. Rodríguez-Castro , Ramos J., Microorganisms,9(7),1512.

[3] C. Prista, A. Almagro, M.C. Loureiro-Días., J. Ramos, ASM.,63(10),4005-09.

[4] N.S. Sánchez., R. Arreguin, M. Calahorra, A. Peña, FEMS Yeast Res.,8(8) 1303-1312.

Debaryomyces hansenii, UNA LEVADURA CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO REAL EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA DE EMBUTIDOS Y PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS.

Francisco J. Ruiz-Castilla[1], Francisco Ruiz-Pérez[1], Helena Chacón-Navarrete[1], Laura Ramos-Moreno[1], Elisa Rodríguez-Castro[1], Fernando Calero[1], José J. Aguilar[1], José Ramos[1].

1 Universidad de Córdoba /Departamento Química Agrícola, Edafología y Microbiología/ Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, España.
fjruizcastilla@hotmail.com

La microbiota de los embutidos y los productos cárnicos curados juega un importante papel en las características finales de este tipo de productos. Por lo general, esta microbiota se encuentra compuesta por una gran diversidad de microorganismos procariotas (bacterias ácido lácticas, micrococos y estafilococos) y eucariotas (hongos y levaduras), siendo en estos últimos, *Debaryomyces hansenii*, una de las especies más abundantes en este tipo de productos [1-2].

Producto	Origen
Cacholeira	Portugal
Chorizo	España
Jamón Iberico	España
Jamón	España
Lacón	España
Lomo embuchado	España
Salame di senise	Italia
Salchichón	España
Salsicca sarda	Italia
Soppressata of Vallo di Diano	Italia
Dry-cured Parma ham	Italia
Sucuck	Turquía
Greek dry salami	Grecia
Fermented sausage	Noruega, Dinamarca, España, Italia, Reino Unido
Llama meat sausage	Argentina
Mianning ham	China
Panxian ham	China
Laowo dry-cured ham	China
Vienna sausage	Austria

Tabla 1: Selección de embutidos y productos cárnicos curados de los que se ha aislado *Debaryomyces hansenii*.

D. hansenii es una levadura perteneciente a los Hemiascomycetes, caracterizada por ser capaz de crecer en condiciones extremas, como niveles altos de sal o pH relativamente alcalino. Sin embargo, aunque se ha demostrado que esta levadura se encuentra presente en muchos tipos de embutidos y productos cárnicos curados, su papel específico en las características finales de este tipo de productos no ha sido completamente esclarecido. Por una parte, la existencia de resultados controvertidos en la literatura y por otra, el hecho de que es imposible predecir, sin un estudio previo, el efecto que una cepa determinada tendrá sobre un producto específico han dificultado conclusiones generalizadas.

A pesar de lo comentado, la mayoría de los resultados publicados indican que *D. hansenii* parece ser un microorganismo con aplicaciones prometedoras en la industria alimentaria. Existe un acuerdo general sobre la generación significativa de compuestos volátiles y aromáticos causados por las actividades metabólicas de esta levadura en productos cárnicos, lo que en consecuencia proporciona una tendencia a una mejor aceptación del producto final por parte del consumidor [3-5]. Además, algunas cepas de este microorganismo son capaces de degradar aminas biogénicas y producir toxinas, inocuas para el ser humano, que inhiben el crecimiento de

hongos indeseables en este tipo de productos. Como resultado, el uso de *D. hansenii* como agente bioconservante y de biocontrol [6, 7] abre líneas de investigación prometedoras en la búsqueda de una disminución de las concentraciones de conservantes químicos empleados y en la obtención de nuevos productos más aceptados por el consumidor (**Figura 1**).

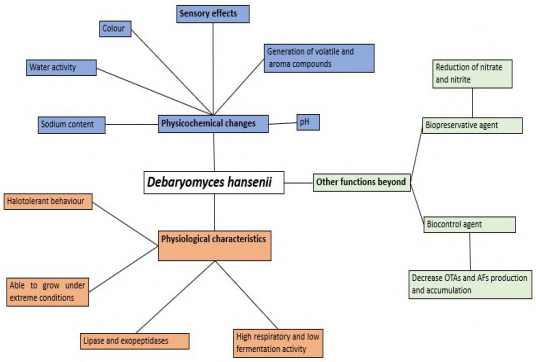


Figura 1: Relevancia biológica de *Debaryomyces hansenii* en las características finales de embutidos y embutidos.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo ha sido realizado gracias al Plan Propio de Investigación 2022 de la Universidad de Córdoba y el Proyecto FEDER (1380653-R).

REFERENCIAS

[1] F. Leroy, J. Verluyten, L. De Vuyst. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. Int. *J. Food Microbiol*. ***2006***, *106*, 270–285.

[2] L. Ramos-Moreno, F. Ruiz-Pérez, E. Rodríguez-Castro, J. Ramos. *Debaryomyces hansenii* Is a Real Tool to Improve a Diversity of Characteristics in Sausages and Dry-Meat Products. *Microorganisms*, ***2021***, *9*, 1512.

[3] M. Flores, M. A. Durá, A. Marco, F. Toldrá. Effect of *Debaryomyces spp*. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Sci.* ***2004***, 68, 439–446.

[4] J. M. Lorenzo, M. Gómez, L. Purriños, S. Fonseca. Effect of commercial starter cultures on volatile compound profile and sensory characteristics of dry-cured foal sausage. *J. Sci. Food Agric.* ***2016***, 96, 1194–1201.

[5] L. Ramos-Moreno, F. J. Ruiz-Castilla, C. Bravo, E. Martínez, M. Menéndez, R. Dios-Palomares, J. Ramos. Inoculation with a terroir selected *Debaryomyces hansenii* strain changes physico-chemical characteristics of Iberian cured pork loin. *Meat Sci.* ***2019***, 157, 107875.

[6] H. S. Kim, S. Y. Lee, H. J. Kang, S. T. Joo, S. J. Hur, S. J. Effects of Six Different Starter Cultures on Mutagenicity and Biogenic Amine Concentrations in Fermented Sausages Treated with Vitamins C and E. *Food Sci. Anim. Resour*. ***2019***, 39, 877–887.

[7] A. Alía, J. J. Córdoba, A. Rodríguez, C. García, M. J. Andrade. Evaluation of the efficacy of *Debaryomyces hansenii* as protective culture for controlling *Listeria monocytogenes* in sliced dry-cured ham. *LWT*. ***2020***, 119, 108886.

ANÁLISIS DE CEPAS AUTÓCTONAS DE LA LEVADURA *Debaryomyces hansenii* COMO AGENTES DE BIOCONTROL ANTE HONGOS INDESEADOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS

Helena Chacón-Navarrete [1], Francisco Ruiz-Pérez [1], Francisco J. Ruiz-Castilla [1], Gabriel Caro[1], Marcos A. Gómez-Rodríguez[1], José Ramos[1]

1 Universidad de Córdoba/Facultad de Ciencias/Departamento Química Agrícola, Edafología y Microbiología/Bio202. Campus de Rabanales, 14014, Córdoba.
mi1raruj@uco.es

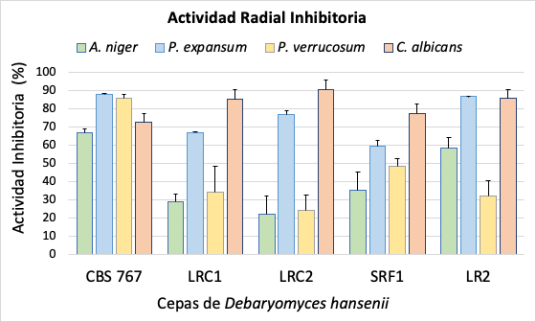
Ante la preocupación por el uso de "conservantes químicos" están surgiendo multitud de medidas en relación con su disminución, hecho que afecta de manera directa a la producción de productos curados como son los embutidos entre otros. Durante su maduración es habitual la colonización por mohos en su superficie, cuya presencia suele tener un efecto positivo que ayuda a potenciar las cualidades organolépticas del producto. No obstante, algunos de estos mohos tienen un potencial dañino para el consumidor debido a su capacidad para producir micotoxinas [1]. *Debaryomyces hansenii* es una levadura no convencional que se localiza de manera natural estos productos y que se emplea en estudios de control biológico ante hongos y otros microorganismos indeseados [2],[3] con lo que se presenta como una alternativa con gran potencial para paliar los efectos de la reducción de conservantes como son la sal o los nitritos. A partir de una colección previamente biotipada de 24 cepas de *D. hansenii,* aisladas de embutidos ibéricos del Valle de los Pedroches (Córdoba) [4](Tabla 1), se realizó un estudio del potencial de dichas cepas como agente de biocontrol y se estudiaron posibles mecanismos posiblemente implicados en la inhibición.

Origen de aislamiento	Cepas de *D. hansenii*
Cepa comercial	**CBS 767**
Chorizo Ibérico	**CB 1**
	CB 2
	CRC 1
	CRC 2
	CRF 1
	CRF 2
	CRF 3
Lomo Ibérico	**LB 1**
	LB 2
	LB 3
	LR 1
	LR 2
	LRB 1
	LRB 2
	LRB 3
	LRB 4
	LRC 1
	LRC 2
	LRF 1
	LRF 2
Salchichón Ibérico	**SRC 1**
	SRC 2
	SRF 1

Tabla1: Colección de cepas levadura usadas en el estudio y su origen de aislamiento.

El estudio se dividió en dos partes, en una primera aproximación se determinó cuales de las cepas disponibles presentaban un mayor potencial como agentes de biocontrol ante hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Trichoderma* y *Candida.* De las 24 cepas disponibles se seleccionaron las 4 con mejores resultados, junto a la cepa control de laboratorio, y se les realizó un segundo cribado por medio de ensayos de inhibición

por estrías en diferentes condiciones de concentración de NaCl en medios sólidos de YPD (Yeast extract 1%, Peptone 2%, Dextrose 2%, Agar 2%). Finalmente se llevaron a cabo una serie de experimentos para comprobar si los mecanismos de inhibición radial y por producción de compuestos volátiles se veían implicados en la actividad inhibitoria de las cepas en estudio y con qué eficacia lo hacían. En los ensayos realizados se utilizaron concentraciones de 10^8 células/mL de levadura y 10^6 esporas/mL de los mohos en estudio. Para el cálculo de la actividad y potencial inhibitoria relativas se utilizó la fórmula (%) = [(C-T)/C] 100 donde "C" se corresponde a medidas de las placas control en ausencia de *D. hansenii* y "T" (tratamiento) a medidas de las placas placas



cocultivadas.

Figura 1: Representación de la actividad inhibitoria de *D. hansenii* ante hongos indeseados por inhibición radial.

Aunque el resto de resultados serán presentados durante el congreso, podemos afirmar que, acorde a la bibliografía preexistente, las cepas en estudio de *D. hansenii* presentan actividad antagonista para hongos potencialmente patógenos de la industria cárnica, lo que refuerza la idea de que el uso de esta levadura como agente de biocontrol es una línea de investigación potencialmente útil en la mejora de los embutidos de la zona.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a *Navalpedroche S.L., al Instituto de la Carne y Productos Cárnicos (Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura), al Plan Propio de Investigación 2022 de la Universidad de Córdoba, a su programa "VII Becas Semillero de Investigación" y al Proyecto FEDER UCO 1380653-R por colaborar en la realización del presente proyecto.*

REFERENCIAS

[1] B. Peromingo, F. Núñez, A. Rodríguez, A. Alía, M. Andrade. Potential of yeasts isolated from dry-cured ham to control ochratoxin A production in meat models. Int. J. Food Microbiol. ***2018****, 268, 73-80.*

[2] S N. Medina-Córdova, R. López-Aguilar, F. Ascencio, T. Castellanos, A. Campa-Córdova, C. Angulo. Biocontrol activity of the marine yeast Debaryomyces hansenii against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (Zea mays L.). Biol. Control ***2016****, 97, 70-79.*

[3] F. Núñez, M.S. Lara, B. Peromingo, J.Delgado, L. Sánchez-Montero, M.J. Andrade. Selection and evaluation of Debaryomyces hansenii isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages., Food Microbiol. ***2015****, 46, 114–120.*

[4] J. Ramos, Y. Melero, L. Ramos-Moreno, C. Michán, L. Cabezas, J. Ramos, Y. Melero, L. Ramos-Moreno, C. Michán, L. Cabezas. Debaryomyces hansenii Strains from Valle De Los Pedroches Iberian Dry Meat Products: Isolation, Identification, Characterization, and Selection for Starter Cultures. J. Microbiol. Biotechnol. ***2017****, 27, 1576-1585.*

APLICACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE COMO ALTERNATIVA AL MÉTODO TRADICIONAL PARA LA PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS DE LEVADURA

Berzosa A., Delso C., Sanz J., Sánchez-Gimeno C. y J. Raso
Universidad de Zaragoza/ Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2/Departamento de P.A.C.A./ Tecnología de los Alimentos. Miguel Servet 177
aberzosa@unizar.es

El extracto de levadura constituye la fracción soluble de las levaduras una vez retiradas las envolturas celulares. Su riqueza en compuestos bioactivos tales como aminoácidos, péptidos, carbohidratos, vitaminas y minerales hacen que este extracto presente una gran variedad de aplicaciones en la industria alimentaria, biotecnológica o farmacéutica (1).

Aunque se han propuesto diferentes métodos para la obtención de este extracto de lavadura (molino de bolas homogenización por alta presión, tratamientos enzimáticos, etc), (2) el procedimiento tradicional consiste en la autólisis de la biomasa de levaduras a temperaturas entre 45-50 °C durante 15 a 60 horas.

La tecnología de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF) se basa en la aplicación de pulsos de muy corta duración (µs) de un voltaje muy elevado (kV) a un producto situado entre dos electrodos. Como consecuencia de la aplicación de este voltaje se genera un campo que da lugar a un fenómeno denominado electroporación, el cual consiste en la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células facilitando la salida de compuestos de su interior.

En este estudio se comparó la eficacia de la electroporación, con la del procedimiento tradicional basado en la autólisis para la obtención del extracto de levadura.

Una suspensión de *Saccharomyces cerevisiae* 3D Viniferm se trató por PEF (15 kV/cm, 180 µs, 101 kJ/kg) para electroporar el 98% de la población. Las células electroporadas se incubaron a 25 °C, 35 °C y 50°C y se comparó tras 1, 6, 24 y 48 horas de incubación la concentración de glutatión, polifenoles, proteínas y aminoácidos presentes en el sobrenadante de estas suspensiones con la de una suspensión sin tratar incubada a 50 °C (control).

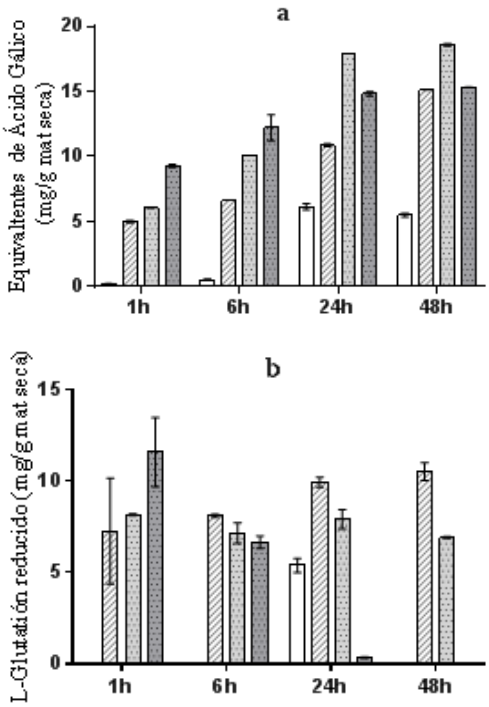


Figura 1: Concentración de polifenoles (**a**) y glutatión (**b**) en el sobrenadante con células control (50 °C) (▭) y tratadas con PEF incubadas a 25 (▨), 35 (▭) y 50 °C (▬).

En la **figura 1a** se puede observar que 1 hora de incubación a cualquier temperatura fue suficiente para obtener un sobrenadante de las células tratadas

con PEF, con una concentración de polifenoles igual o superior a la del control tras 48 horas de incubación (5,1 mg/g de extracto seco).

Tras 1 hora de incubación a 50 °C se detectó la máxima concentración de glutatión (12 mg/g de extracto seco) en el sobrenadante de la suspensión tratada por PEF (**figura 1b**). La electroporación de las células permitió que, tras 1 hora de incubación a 35 °C, se consiguiera extraer la misma concentración de proteínas que en la muestra control tras 48 horas de incubación (100 mg/g de extracto seco) (**figura 2a**).

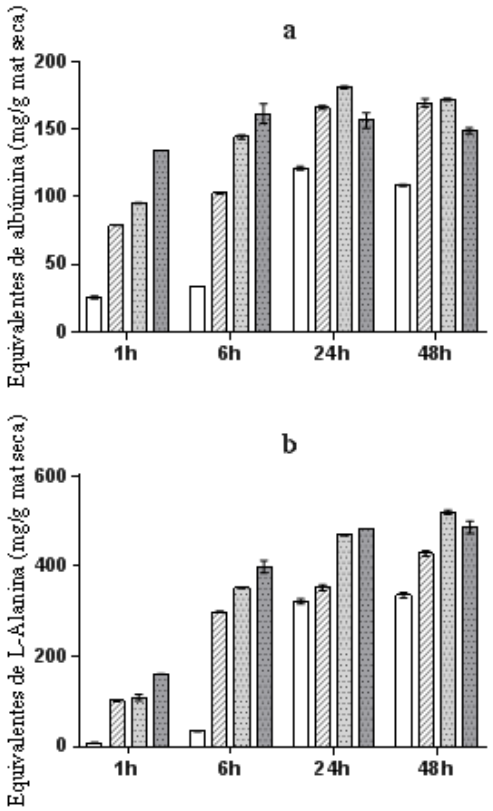


Figura 2: Concentración de proteínas (**a**) y aminoácidos (**b**) en el sobrenadante con células control (50 °C) (▭) y tratadas con PEF incubadas a 25 (▨), 35 (▭) y 50 °C (▬).

Finalmente, 6 horas de incubación a 25 °C fueron suficientes para extraer de la muestra tratada por PEF la misma cantidad de aminoácidos que de la muestra control tras 48 horas de incubación (**figura 2b**).

En vista de los resultados obtenidos, la electroporación causada por la aplicación de PEF acelera significativamente la extracción de compuestos presentes en el interior celular observándose que, con la metodología tradicional (48 horas a 50 °C) la concentración de componentes de interés en el extracto de levadura fue inferior a la de los extractos obtenidos a partir de las levaduras tratadas por PEF. Es conocido que el método de extracción además de afectar a la composición, afecta a las propiedades sensoriales y funcionales de dichos extractos (3).

Los resultados obtenidos muestran la eficacia del tratamiento PEF para reducir el tiempo y/o la temperatura en el proceso de obtención de extracto de levadura. Sin embargo, se requiere realizar más investigaciones con objeto de evaluar las propiedades como ingrediente de los extractos de levadura obtenidos a partir de levaduras 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 FPU concedida a A. B. por el Ministerio de Universidades.

REFERENCIAS

1. Milić TV, Rakin M, Šiler-Marinković S. Utilization of baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae) for the production of yeast extract: Effects of different enzymatic treatments on solid, protein and carbohydrate recovery. Journal of the Serbian Chemical Society. **2007**,*72(5)*,451–7.
2. Liu D, Ding L, Sun J, Boussetta N, Vorobiev E. Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — A review. Innovative Food Science & Emerging Technologies. **2016**, *36*,181–92.
3. de Iseppi A, Curioni A, Marangon M, Vincenzi S, Kantureeva G, Lomolino G. Characterization and emulsifying properties of extracts obtained by physical and enzymatic methods from an oenological yeast strain. Journal of the Science of Food and Agriculture. **2019**,*99(13)*, 5702–10.

DESARROLLO DE UN SISTEMA BASADO EN IMPEDANCIA PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS ANTIBIÓTICOS EN CARNE Y ANIMAL VIVO

Gómara P., Novalbos L., Condón S., Gayán E., Serrano M.J.
Universidad de Zaragoza - Instituto Agroalimentario de Aragón IA2. C/ Miguel Servet 177, C.P. 50013, Zaragoza, España.
mjserran@unizar.es

La tendencia actual en producción animal va hacia reducción en la administración de antibióticos con objeto de evitar su entrada en la cadena alimentaria, debido al grave impacto que pueden tener sobre la salud humana: reacciones alérgicas, AMR, etc. Es por ello que se implementan estrictos controles veterinarios en un proceso secuencial en el que, tras un cribado, productos como la carne sospechosos de contener residuos antibióticos son sometidos a un análisis confirmatorio (Reg. 2021/808), que al llevarse a cabo *post mortem*, no evitan el impacto económico y medioambiental ligado al decomiso de canales. Frecuentemente, los test de cribado se basan en la inhibición del crecimiento microbiano [1], que se detecta por cambios en el pH o potencial redox, evidenciados por técnicas colorimétricas. Sin embargo, estos test adolecen de problemas como quelaciones del colorante e incluso cambios directos de potencial. Puesto que existen otras técnicas como la impedancia directa que se utilizan para registrar el crecimiento microbiano, se pretendió desarrollar un test basado en esta técnica para detectar residuos antibióticos no sólo en carne sino también en animal vivo.

Tras el estudio de varios medios y especies y cepas microbianas, *G. stearothermophilus* ATCC 10149 y CECT 43 en TSB mostraron el mejor comportamiento para la implementación del test [2], que ofreció el resultado en 5-6h. Para registrar los cambios en impedancia se utilizó un equipo BioTrac 4250 (Sy-Lab, Neupurkersdorf, Austria), que incubó a diferentes temperaturas en función del microorganismo estudiado. En concreto, *G. stearothermophilus* se incubó a 60°C.

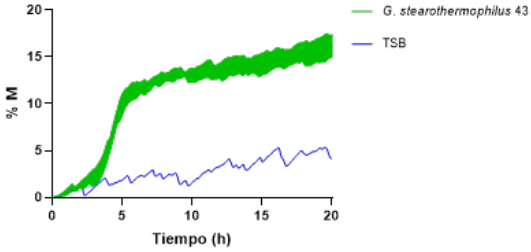


Figura 1. Cambios de impedancia asociados al crecimiento de *G. stearothermophilus* CECT 43 en TSB.

Una vez seleccionadas las cepas y condiciones del ensayo, se optimizó el medio de detección para incrementar la sensibilidad a las sulfamidas. Tras estudiar diversas concentraciones, se decidió adicionar el medio con 15 µg/L de trimetropim ya que esta concentración permitió la detección de concentraciones tan bajas como 50 µg/kg sin producir retrasos importantes en el tiempo de viraje (Figura 2).

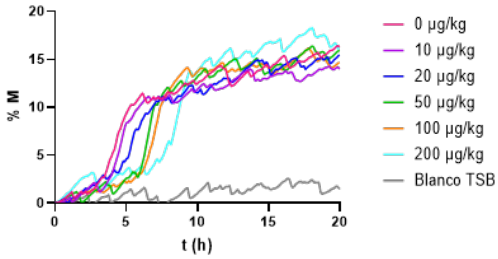


Figura 2. Curvas que muestran el % de descenso en impedancia asociado al crecimiento de *G. stearothermophilus* CECT 43 en presencia de sulfametoxipiridazina.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de ensayo, se testó la sensibilidad del microorganismo a diversos antibióticos representativos de las familias más comúnmente utilizadas en medicina veterinaria (sulfametoxipiridazina, enrofloxacina, oxitetraciclina, doxiciclina y amoxicilina). La Tabla 1 muestra los límites de detección (LDs) de la técnica.

Tabla 1. Límites de detección de la técnica impedanciométrica en TSB. Con fines comparativos, se incluyen los LMRs fijados para músculo (Reg. 37/2010).

Antibiótico	LD (µg/kg)	LMR
Sulfametoxipiridazina	50	100
Oxitetraciclina	20-50	100
Doxiciclina	20	100
Amoxicilina	1	50
Enrofloxacina	> 500	100

La técnica mostró una buena sensibilidad a todas las familias de antibióticos excepto a quinolonas, ya que *G. stearotherpophilus* es poco sensible a compuestos de esta familia [1]. Puesto que el objetivo del estudio fue no sólo establecer un nuevo protocolo de detección de residuos antibióticos en carne sino desarrollar una nueva metodología para investigar residuos antibióticos en animal vivo, se estudió la sensibilidad en diversas matrices: músculo, suero sanguíneo y orina. La orina y el suero sanguíneo procedían de animales no tratados y se doparon con diversas concentraciones de antibióticos por encima y por debajo del Límite Máximo de Residuos marcado por la legislación (Reg. 37/2010). La Figura 3 muestra la sensibilidad de la técnica a sulfametoxipiridazina y amoxicilina en sangre y orina.

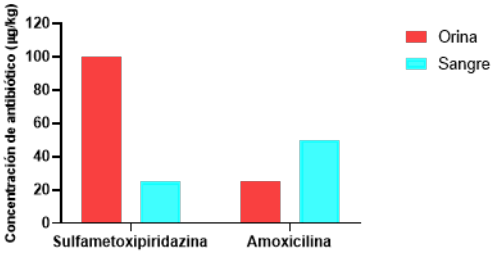


Figura 3. Sensibilidad del método en suero sanguíneo y orina.

Como se observa en la Figura, los límites de detección para la sulfamida en orina fueron marcadamente superiores a los descritos en suero sanguíneo, mientras que la situación para la amoxicilina fue la contraria, aunque de menor magnitud. La baja sensibilidad a las sulfamidas en orina podría estar relacionada con la composición de la orina, que podría inhibir el crecimiento de *G. stearothermophilus.*

El músculo contaminado con antibióticos se obtuvo de un animal tratado con amoxicilina, que se sacrificó previamente y que era positiva a otro test de base biológica (Explorer®, Zeulab SL, Zaragoza, España). La Figura 4 muestra la curva obtenida a partir de la muestra de carne, que ilustra la aptitud de la técnica para detectar amoxicilina en carne.

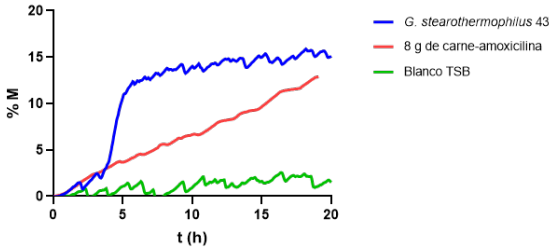


Figura 4. Cambios en impedancia asociados al crecimiento de *G. stearothermphilus* CECT 43 en presencia de carne con amoxicilina. (en rojo).

Aunque son necesarias más exploraciones, el prototipo de test biológico resultó un método rápido, fiable y de fácil manejo para el cribado de residuos antibióticos, no sólo en carne sino en animal vivo.

AGRADECIMIENTOS

El estudio se ha desarrollado en el marco del proyecto con código PID2019-104712RA-I00: financiado por la Agencia Estatal de Investigación.

REFERENCIAS

[1] M. G. Pikkemaat. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical and Bioanal. Chem.* **2009**, *395,* 893-905.

[2] P. Gómara, L. Novalbos, S. Condón, E. Gayán, M. J. Serrano. **2022**. Bases para el desarrollo de un test biológico, basado en impedanciometría (…). Comunicación CyTa-Cesia 2022, Zaragoza.

ESTUDIO DE LA APLICACIÓN EN SEGURIDAD ALIMENTARIA DE EXTRACTOS DE PLANTAS COMUNES EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA: UNA EVALUACIÓN META-ANALÍTICA.

Olga María Bonilla-Luque[1], Arícia Possas[1], Beatriz Nunes Silva[2], Vasco Cadavez[2], Antonio Valero[1], Úrsula Gonzales-Barron[2]

[1] Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales s/n, Departamento de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria. Ctra. Madrid-Cádiz km 396A, 14014 Córdoba, España

[2] Centro de Investigação de Montanha (CIMO), Instituto Politécnico de Bragança. Campus de Santa Apolónia, 5300-253 Bragança, Portugal

v32boluo@uco.es

La contaminación microbiana en alimentos durante sus diferentes etapas de producción supone un reto para las industrias alimentarias. Como pilar importante en seguridad alimentaria, la preservación de alimentos se ha llevado a cabo mediante diferentes conservantes sintéticos tradicionales. Sin embargo, el interés en aceites esenciales como bio-preservativos es recientemente visible, dada su mayor sostenibilidad medioambiental y seguridad [1]. Bajo esta perspectiva, entre 2000-2020 se ha llevado a cabo una prolífica labor de investigación relativa a la aplicación de aceites esenciales en alimentos.

Herramientas analíticas como los estudios de meta-análisis permiten sintetizar e integrar la información publicada sobre los efectos antimicrobianos de aceites esenciales y su aplicación en el alimento. La relación entre las variables y su distribución probabilística permiten generar valiosa información con evidencia cuantitativa para su aplicación [2].

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad antimicrobiana *in vitro* de extractos procedentes de plantas de los géneros *Ocimum* y *Thymus* spp., comunes en la región Mediterránea, a través de un enfoque meta-analítico.

El estudio se ha llevado a cabo a través de una metodología básica de revisión sistemática [3]. Un total de 742 entradas fueron recopiladas, extraídas de un total de 63 estudios primarios (artículos científicos). Los datos compilados consistieron en información relativa a la extracción del aceite esencial (e.g., método, solvente, fuente vegetal) así como su efectividad inhibitoria sobre varios microorganismos de relevancia para la seguridad alimentaria según los métodos de difusión en agar y macro/micro dilución en agar o caldo. Para cada partición se evaluó el efecto de variables continuas como nivel de inóculo (log ufc/mL), volumen de extracto (µL) y dosis de extracto (%). Por último, se evaluó el efecto de la concentración mínima inhibitoria (MIC), dosis de extracto y grupo microbiano sobre el diámetro de inhibición a partir de un modelo de meta-regresión.

Bacillus cereus (28,90±2,39mm) y *Listeria monocytogenes* (23,14±2,82mm) resultaron los microorganismos más sensibles al extracto de *Thymus* spp. (100mg/mL), de acuerdo con el método de difusión en agar. En el caso de *Ocimum* spp., no se encontraron diferencias significativas entre

los diámetros de inhibición presentados por *Escherichia coli*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp.. Para ambos extractos, la dosis de extracto presentó de forma recurrente un efecto significativo. Sin embargo, sólo el volumen de extracto fue significativo en el género *Ocimum* spp..

B. cereus y *S. aureus* presentaron los valores más bajos de MIC, 0,075[0,015-0,900] y 0,263[0,014- 4,745] mg/mL o µL/mL para los géneros *Thymus* y *Ocimum* spp., respectivamente. Para ambos extractos, el logaritmo de la MIC mostró una relación inversamente proporcional al diámetro de inhibición de los microorganismos evaluados (Figura 1).

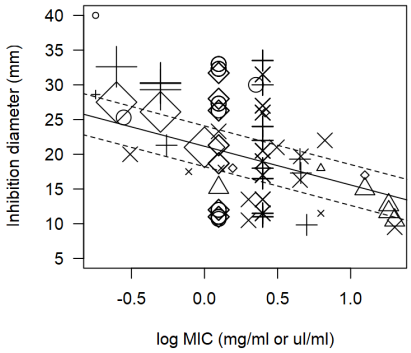


Figura 1: Gráfico de dispersión que representa el efecto (p>0.001) del logaritmo de la MIC de extractos de plantas de *Thymus* sobre los diámetros de inhibición de cada grupo bacteriano. Marcadores: ○= *C. jejuni*, Δ= *E. coli*, += *L. monocytogenes*, ×= *S. aureus*, ◊= *Salmonella*; el tamaño del marcador es proporcional al tamaño del estudio.

Parameter	Estimate	p-value	Heterogeneity analysis
Intercept	7.525	0.408	
Log MIC	-3.858	<.0001	$s^2 = 54.15$
Log Dose	31.75	<.0001	$\tau^2 = 47.87$
Bacterium			I^2=46.9%
C. jejuni	-9.757[b]	<.0001	$\tau^2_{res} = 16.00$
E. coli	-11.29[c]	<.0001	$R^2 = 66.5\%$
L. monoc	-7.509[a]	<.0001	
S. aureus	-8.102[a]	<.0001	Publication bias
Salmonella	-8.303[a]	<.0001	p = 0.283

Tabla1: Modelo de meta-regresión sobre el diámetro de inhibición producido por extractos de *Thymus* y *Ocimum* spp.

El modelo de meta-regresión (R=0,906) (Tabla 1) para el diámetro de inhibición reveló que los microorganismos más sensibles a los extractos de *Thymus* y *Ocimum* son *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella* spp., siendo *E. coli* el más resistente (Figura 2).

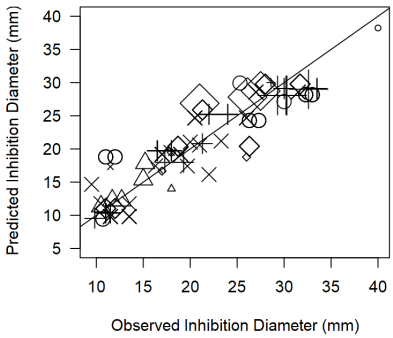


Figura 2: Gráfico de dispersión de los diámetros de inhibición observados por la aplicación de extractos de plantas de *Thymus* (n=145) y *Ocimum* (n=5) frente a los valores predichos por el modelo de meta-regresión, con línea de referencia de 45º. Marcadores: ○= *C. jejuni*, Δ= *E. coli*, += *L. monocytogenes*, ×= *S. aureus*, ◊= *Salmonella*; el tamaño del marcador es proporcional al tamaño del estudio.

Los resultados de este estudio aclaran la eficiencia inhibitoria in vitro sobre los principales grupos patógenos a través de la incorporación de aceites esenciales de gran aplicación en productos alimentarios en la región Mediterránea. Las conclusiones obtenidas contribuyen al avance tecnológico para su aplicación efectiva en distintos productos alimenticios.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto PCI-2019-103453 "ArtiSane Food" por el apoyo financiero brindado para la realización de este estudio.

REFERENCIAS

[1] Maurya, A., Prasad J., Das, S., Dwivedy, A. K. Essential Oils and Their Application in Food Safety. *Front. Sustain. Food Syst*, **2021**, *5*, 653420.

[2] Nunes Silva, B., Cadavez, V., Teixeira, J.A., Gonzales-Barron, U. Effects of Essential Oils on Escherichia coli inactivation in Cheese as Described by Meta-Regression Modelling. *Foods*, **2020**, *9*, 716.

[3] Gonzales-Barron, U., Butler, F. The use of meta-analytical tools in risk assessment for food safety. *Food Microbiology*, **2010**, *28*, 823-827.

EL SOFTWARE CIENTÍFICO DE CÓDIGO ABIERTO - UNA HERRAMIENTA PARA PONER MÉTODOS MATEMÁTICOS COMPLEJOS AL ALCANCE DE L@S MICROBIÓLOG@S DE ALIMENTOS

Alberto Garre[1], Pablo S. Fernandez[1], Jose A. Egea[2]

[1] Universidad Politécnica de Cartagena/Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica/Dpto. Ingeniería Agronómica. Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena (Spain)

[2] Departamento de Mejora Vegetal, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Campus Universitario de Espinardo S/N, 30100 Murcia (Spain)

alberto.garre@upct.es

Introducción

Los métodos matemáticos se han convertido en una herramienta esencial para los microbiólogos de alimentos. Sin embargo, los modelos utilizados en microbiología de alimentos suelen ser relativamente complejos (ecuaciones diferenciales, modelos estocásticos…), lo que supone una barrera para su aplicación en un gran número de casos.

El software científico es una herramienta eficaz para salvar esta barrera, proporcionando una interfaz amigable que evita la necesidad de implementarlos [1]. Esto aumenta la difusión de nuevos modelos matemáticos y metodologías, facilitando su implementación tanto en la industria alimentaria como en proyectos de investigación.

bioinactivation & biogrowth

Las herramientas *bioinactivation* y *biogrowth* facilitan la implementación y aplicación de modelos de inactivación y crecimiento de acuerdo a los principios de la microbiología predictiva. Ambas se han implementado en el lenguaje de programación R [2], compilando las funciones necesarias para los cálculos en sendos paquetes de R. Esto incluye funciones para el ajuste de modelo y para el cálculo de predicciones. Los paquetes de R se han subido al repositorio CRAN, poniéndolos a disposición del público en Código Abierto.

El software implementa varios modelos comunes en microbiología predictiva (Baranyi, Bigelow, Ratkowsky…) [3], dando al usuario la posibilidad de elegir entre ellos. Ambos paquetes, incluyen funciones para el ajuste de modelos y el cálculo de predicciones (tanto discreta como intervalos de predicción). Estos cálculos se pueden realizar tanto en condiciones estáticas como dinámicas.

Sin embargo, el uso de estos paquetes requieren que el usuario tenga conocimientos de programación. Por lo tanto, se desarrolló una interfaz amigable usando el paquete de R *shiny* [4]. Se diseñó en forma de *dashboard*, donde cada tipo de cálculo está dividido en diferentes módulos. Esta metodología modular se ve reflejada en la estructura del código; cada operación se ha implementado como un *shinyModule* independiente. Por lo tanto, las tareas de mantenimiento de módulos existentes o de desarrollo de nuevas funciones se pueden realizar independientemente, sin necesidad de editar la aplicación en su conjunto.

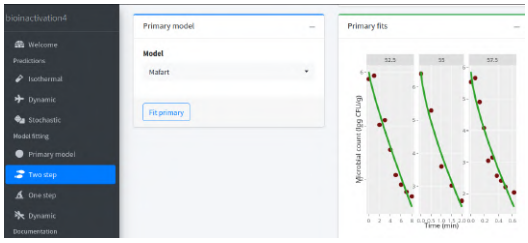


Figura 1: Ejemplo de la interfaz de *bioinactivation4*

Las aplicaciones están disponibles gratuitamente a través de una página web (https://foodmicrowur.shinyapps.io/biogrowth/; https://foodlab-upct.shinyapps.io/bioinactivation4/) e incluyen diversas funciones para la visualización y el postprocesado de los resultados (Fig. 1). Además, ambas aplicaciones están disponibles en código abierto a través de GitHub.

BIOQURA

La herramienta BIOQURA es un ejemplo de herramienta de software con un público objetivo muy diferente de *biogrowth* o *bioinactivation*. Mientras que estas están orientadas a científicos centrados en el desarrollo y aplicación de modelos matemáticos, BIOQURA pretende facilitar la interpretación y aplicación de las recomendaciones para el cálculo de vida útil de AESAN [5]. En concreto, incorpora herramientas para analizar la prevalencia microbiana, y las propiedades fisicoquímicas del alimento.

Pese a tener una orientación diferente, BIOQURA también utiliza una arquitectura similar, basada en R y en el paquete *shiny*. Esta herramienta está a disposición del público a través de una página web (https://foodlab-upct.shinyapps.io/BIOQURA/), siendo de Código Abierto a través de GitHub.

Conclusiones

Los métodos matemáticos son hoy en día una parte esencial de la microbiología de los alimentos. En este sentido, *bioinactivation*, *biogrowth* y *BIOQURA* son un buen ejemplo de cómo las herramientas de software facilitan su implementación y aplicación por parte de los científicos, evitando la necesidad de implementar métodos y modelos existentes. A parte de su utilidad, estas herramientas utilizan una arquitectura innovadora (módulos, Código Abierto), que aumenta su difusión y su transparencia.

AGRADECIMIENTOS

El Dr. Garre ha obtenido financiación mediante una Marie Sklowdowska-Curie Individual Fellowship, una beca postdoctoral de la Fundación Séneca y un contrato María Zambrano. La herramienta BIOQURA se desarrolló gracias al trabajo de la red BIOQURA, integrada por varias universidades del territorio nacional.

REFERENCIAS

[1] Possas, A., Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., 2022. New software solutions for microbiological food safety assessment and management. Current Opinion in Food Science 100814. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100814

[2] R Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

[3] Perez-Rodriguez, F., Valero, A., 2012. Predictive Microbiology in Foods. Springer, New York.

[4] Chang, W., Cheng, J., Allaire, J.J., Xie, Y., McPherson, J., 2017. shiny: Web Application Framework for R.

[5] Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), 2019. Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo.

BIOINFORMATIC INVESTIGATION OF MICROBIOTA AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OCCURRENCE FROM FARM TO HUMANS BY USING HIGH-THROUGHPUT DNA SEQUENCING APPROACHES

Quijada N. M.[1,2,3,4]

1 Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), Valladolid, España

2 Área de Microbiología, Departmento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Burgos, Burgos, España

3 Unit of Food Microbiology, Institute of Food Safety, Food Technology and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, Viena, Austria (afiliación actual)

4 Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety and Innovation, FFoQSI GmbH, Tulln an der Donau, Austria (afiliación actual)

Narciso.M.Quijada@vetmeduni.ac.at

Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva de ADN ("high-throughput DNA sequencing", HTS), han revolucionado el campo de la microbiología, pues permiten investigar, con un gran nivel de profundidad y detalle y a un coste sin precedentes, las comunidades microbianas presentes en distintos ambientes, así como la información genética que contienen. La principal limitación de esta metodología radica en el análisis bioinformático de la gran cantidad de información que generan las plataformas de HTS, lo que requiere de conocimientos avanzados de programación y de un gran poder computacional.

El trabajo de esta comunicación corresponde al desarrollado durante mi Tesis Doctoral, en la que se siguieron distintas aproximaciones de HTS y se usaron y desarrollaron distintas herramientas y pipelines bioinformáticos para el análisis de la microbiota y su "resistoma" (la presencia de genes que codifican resistencias a antimicrobianos) en distintos puntos de la granja al humano.

Para el estudio de las comunidades microbianas, se secuenciaron genes diana con interés taxonómico ("gene-targeted sequencing"), en concreto el 16S ARNr (Figura 1). Este gen es constitutivo en todas las bacterias y arqueas y posee suficiente variabilidad genética como para distinguir entre distintos taxones.

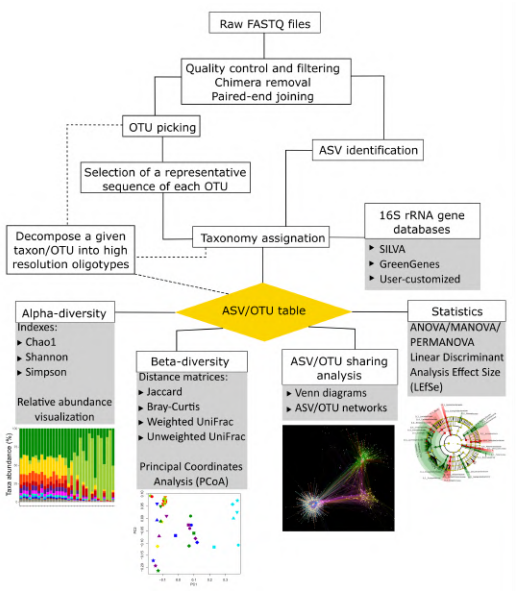


Figura 1: Esquema de trabajo bioinformático para el análisis de secuencias de 16S ARNr.

Mediante esta aproximación se estudiaron las comunidades bacterianas presentes a lo largo del proceso de fabricación del chorizo de León [1], y del queso austriaco Vorarlberger Bergkäse [2], así como distintas superficies presentes en las salas

de procesamiento. La microbiota presente en las distintas superficies a lo largo de la fabricación de estos productos tiene un papel crucial en el proceso fermentativo y de las características sanitarias y organolépticas de estos productos. Mediante esta técnica también se evaluó el efecto de un prebiótico (compuesto principalmente por fructooligosacáridos) sobre la microbiota intestinal de corderos lactantes y su ganancia de peso [3].

Para el estudio del resistoma de bacterias de interés aisladas de distintos puntos de la granja al humano, se secuenciaron genomas bacterianos mediante HTS, con el fin de revelar su contenido genético tras el posterior análisis bioinformático ("whole genome sequencing, WGS", Figura 2). La cadena alimentaria se comporta como un factor crítico de transmisión de bacterias y genes de resistencia a antibióticos, y WGS representa una aproximación idónea para profundizar en este campo.

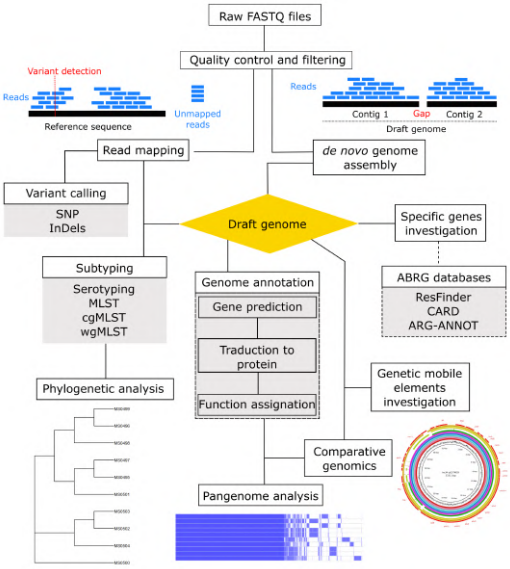


Figura 2: Esquema de trabajo bioinformático para el análisis de genomas bacterianos mediante WGS.

Mediante WGS se evaluó la resistencia a colistina (un antibiótico considerado como de último recurso) en aislados de *Escherichia coli* procedentes de heces de ternera, cerdo y pavo que mostraron resistencia *in vitro* [4]. Esta resistencia estaba asociada a diversos genes de resistencia a colistina asociados a elementos genéticos móviles (*mcr-1, mcr-3*), así como a diversas mutaciones puntuales. Muchos de los aislados mostraron a su vez un perfil de multi-resistencia confirmado mediante WGS.

WGS también se utilizó para el estudio del genoma de una cepa de *Staphylococcus aureus* aislado de queso que mostró sensibilidad a oxacilina a pesar de portar el gen de resistencia *mecA* [5].

La optimización de un protocolo de análisis para estudios de WGS, requirió una evaluación exhaustiva de una gran cantidad de software diseñados para el desarrollo de cada una de las fases del análisis y su posterior integración en pipelines con el fin de paralelizar y automatizar los procesos. Como resultado, desarrollamos un software bioinformático, llamado TORMES, que permite realizar un análisis de WGS completo de un set de bacterias (sin importar el número, especie ni origen) partiendo directamente desde los datos sin tratar procedentes de la plataforma de HTS [6]. Una vez terminado el análisis, TORMES resume e integra los resultados en un archivo interactivo tipo web, lo que facilita el análisis, la comparación y la transferencia de los resultados. TORMES es un software "user-friendly", ya que para su ejecución requiere sólo unas instrucciones muy sencillas, y está disponible gratuitamente en sus repositorios web [7].

REFERENCIAS

[1] Quijada, *et al*. **2018**. Food Microbiol 70, 94-102.

[2] Quijada *et al*., **2018**. Int J Food Microbiol 267, 54-61

[3] Quijada *et al*., **2020**. Biomolecules 10 (8), 1179

[4] Hernández *et al*., **2017**. Eurosurveillance 22 (31), 30586

[5] Quijada *et al*., **2019**. Food Microbiol 82, 107-110

[6] Quijada *et al*., **2019**. Bioinformatics 35 (21), 4207-4212

[7] Repositorios web de TORMES: https://github.com/nmquijada/tormes https://anaconda.org/nmquijada/tormes

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS BACTERIANAS RESISTENTES COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO PARA LA MEJORA DE LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

Berdejo D.

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

berdejo@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La mejora e implementación de los métodos de conservación de los alimentos en la industria agroalimentaria precisa del conocimiento detallado de sus mecanismos de inhibición e inactivación microbiana. La aparición de cepas resistentes en la cadena alimentaria puede comprometer la inocuidad y estabilidad de los alimentos. Sin embargo, éstas también pueden utilizarse como una herramienta de estudio que permita la mejora de las actuales estrategias de conservación como, por ejemplo, mediante el diseño de nuevos procesos combinados [1].

Por tanto, el principal **objetivo** de esta Tesis Doctoral fue la obtención de variantes genéticas bacterianas resistentes (VR), y su caracterización fenotípica y genotípica, como herramienta para estudiar los mecanismos de resistencia celular frente al uso de compuestos antimicrobianos y otros métodos de conservación de los alimentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

En primer lugar, se realizó la puesta a punto del protocolo para la realización de ensayos de evolución frente a aceites esenciales (AE) y sus constituyentes individuales (CI), mediante la exposición prolongada a concentraciones subinhibitorias o la aplicación de tratamientos letales cortos con el fin de obtener VR. Posteriormente, se realizó su caracterización fenotípica mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), bactericida (CMB) y estudios de cinética de crecimiento frente a AE y CI, así como la evaluación de resistencia cruzada frente a otras tecnologías de conservación y antibióticos. Finalmente, las VR fueron secuenciadas y comparadas con sus cepas parentales para identificar las mutaciones responsables del cambio del fenotipo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de CMI y CMB de las VR, y su comparación con las respectivas cepas parentales, demostraron la aparición de variantes resistentes y tolerantes frente a AE y CI tras los ensayos de evolución:

- *Staphylococcus aureus* frente a carvacrol, citral, óxido de limoneno y AE de naranja (*Citrus sinensis*) [2,4].
- *Listeria monocytogenes* frente a AE de tomillo (*Thymbra capitata*) [5].
- *Salmonella enterica* Typhimurium frente a carvacrol, y AE de tomillo [3,6].

No obstante, la aparición de VR no fue provocada por un aumento de la frecuencia mutagénica tras el uso de AE y CI, sino por su presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas que favoreció el crecimiento de aquellas variantes más resistentes.

El estudio de cinéticas de crecimiento en presencia de los AE y CI y las curvas de supervivencia tras tratamientos letales, permitió explicar cómo estas VR emergerían a lo largo de los ensayos de evolución. Por un lado, debido a una mayor velocidad de crecimiento en los ensayos a dosis subinhibitorias y, por otro lado, a causa de una mayor supervivencia bacteriana tras los tratamientos letales.

Además de presentar una mayor supervivencia frente a los agentes de selección, algunas de las VR revelaron el desarrollo de resistencia cruzada frente a otras tecnologías de conservación como los tratamientos térmicos, o frente a antibióticos como aminoglucósidos, betalactámicos, quinolonas y tetraciclinas.

La secuenciación genómica de las VR reveló las mutaciones seleccionadas a través de los ensayos de evolución frente a los AE y CI. Estas modificaciones genéticas fueron localizadas en reguladores transcripcionales relacionados con la respuesta celular al estrés oxidativo (*soxR*, *yfhP*), enzimas relacionadas con la síntesis y reparación de las membranas celulares *(accA*, lmo1647), proteínas receptoras y de transporte de membrana (*fepA*, *nirC*, *trkA*) y diversas enzimas metabólicas (*aroC*, *hepT*, *nirB*), entre otras (Figura 1).

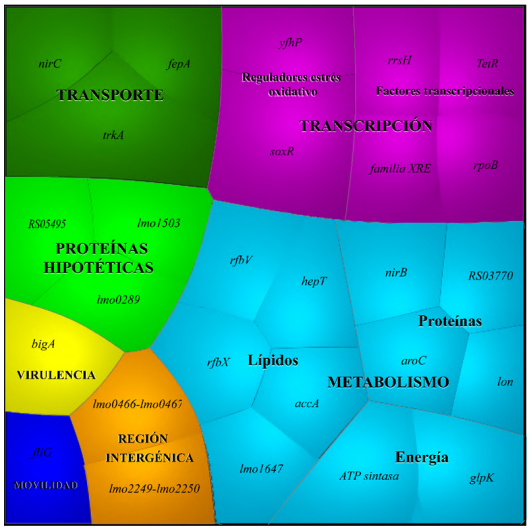


Figura 1. Diagrama de Voronoi que representa los genes mutados de las VR agrupados en base a su proceso biológico: metabolismo (●), movilidad (●), transcripción (●), transporte (●) y virulencia (●); o en regiones intergénicas (●) o proteínas hipotéticas (●).

Cabe destacar que las variaciones genéticas localizadas en *soxR* revelaron ser una de las principales causas del aumento de resistencia frente a los AE y CI, así como de la resistencia cruzada frente a antibióticos.

Por otro lado, el incremento de resistencia y tolerancia frente a AE se mantuvo, e incluso fue mayor, en un alimento modelo, leche desnatada, revelando el riesgo microbiológico que puede suponer la aparición de VR en la cadena alimentaria.

CONCLUSIONES

El empleo de AE y CI, tanto a concentraciones subinhibitorias como a dosis letales, dio lugar a la aparición de VR frente a antimicrobianos naturales y antibióticos que podrían suponer un riesgo para la seguridad alimentaria y la salud pública. El estudio de estas VR reveló el importante papel del estrés oxidativo en el mecanismo de inhibición e inactivación de los AE y CI e identificó a las envolturas celulares como una de las principales estructuras diana de estos antimicrobianos, así como de las tecnologías de conservación frente a las que se observó resistencia cruzada. Además, la puesta a punto de los ensayos de evolución para la obtención de VR puede resultar de utilidad para el estudio de los mecanismos de acción y resistencia bacteriana frente a otros sistemas de limpieza y desinfección y/o tecnologías de conservación de alimentos para los que esta metodología puede ser fácilmente implementada.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el MECD (FPU2016) y por la Agencia Estatal de Investigación (proyecto Nº. PGC2018-093789-B-I00), Fondo Social Europeo y el Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento del Gobierno de Aragón.

REFERENCIAS

[1] D Berdejo, E Pagán, D García-Gonzalo, R. Pagán, *Curr Opin Food Sci,* **2019**, 30, 14-20.

[2] D Berdejo, B Chueca, E Pagán, A Renzoni, WL Kelley, R Pagán, D García-Gonzalo, *Molecules*, **2019**, 24, 170.

[3] D Berdejo, N Merino, E Pagán, D García-Gonzalo, R. Pagán. *Microorganisms*, **2020**, 8, 937.

[4] D Berdejo, E Pagán, N Merino, R Pagán, D García-Gonzalo, *Pharmaceuticals*, **2020**, 13, 239.

[5] D Berdejo, E Pagán, N Merino, D García-Gonzalo, R Pagán, *Food Res Int*, **2021**, 145, 110403.

[6] D Berdejo, E Pagán, N Merino, L Botello-Morte, R Pagán, D García-Gonzalo, *Int J Food Microbiol*, **2021**, 360, 109443.

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL EXTRACTO DE TÉ VERDE Y SU APLICACIÓN PARA LA MEJORA DE LA SEGURIDAD

Falcó I.[1, 2]

1. Universitat de Valencia / Facultad de farmacia / Depto. medicina preventiva y salud pública / Av. Vicent Andrés Estellés, s/n, 46100 Burjassot, Valencia

2. Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC / Instituto de agroquímica y tecnología de alimentos-IATA / Depto. de tecnologías de conservación y seguridad alimentaria / C. catedrático Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia.

ferrando.falco@uv.es

Los norovirus, el virus de la hepatitis A (HAV) y el virus de la hepatitis E son algunos de los principales riesgos sanitarios relacionados con el consumo de alimentos teniendo un alto impacto en la seguridad alimentaria y siendo responsables de diversas patologías en los consumidores. Los virus entéricos se transmiten principalmente por la vía fecal-oral, por lo que su presencia en alimentos puede deberse principalmente a que se hayan contaminado de forma directa por malas prácticas higiénicas o mediante el uso de agua contaminada. Los alimentos más implicados son los moluscos bivalvos, vegetales y ensaladas, bayas y productos listos para consumir los cuales se han contaminados por una incorrecta manipulación después de su preparación o cocinado. Como consecuencia del incremento de brotes de transmisión alimentaria, organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Autoridad Sanitaria de Seguridad Alimentaria (EFSA), proponen evaluar la eficacia de procesos alimentarios para la inactivación de virus. Además, la OMS está promoviendo el desarrollo de métodos alternativos para mejorar la seguridad alimentaria.

Con esta finalidad, la tesis doctoral se ha centrado en evaluar y caracterizar el efecto del extracto de té verde (GTE) frente a virus entéricos humanos y su potencial uso en aplicaciones alimentarias con el fin de mejorar la seguridad alimentaria. Inicialmente, la actividad virucida y la caracterización del GTE se evaluó frente al norovirus murino (MNV) y el HAV a diferentes temperaturas, tiempos de contacto y condiciones de pH, mostrando efectividad frente a estos dos virus en función del pH, observándose mayores reducciones en condiciones alcalinas y neutras. Al mismo tiempo, diferentes concentraciones del GTE (0,5 y 5 mg/mL) se mezclaron a partes iguales con la suspensión viral y fueron incubadas durante 2 y 16 horas a 4, 25 y 37°C. Se observó inactivación completa de ambos virus después de tratamientos a 37°C durante 16 horas y a 25°C para el HAV. En posteriores ensayos se observó que el GTE mejoraba su actividad cuando se preparaba 24 horas antes de su aplicación (aged-GTE). Por otro lado, los análisis mediante HPLC/MS demostraron que la mejora de la actividad virucida estaba relacionada con los cambios en la composición química del GTE debido a la formación de catequinas que se producía durante el periodo de 24 horas, principalmente a la epigalocatequina galato (EGCG) suponiendo alrededor de un 40-50% de la composición del GTE. Por otra parte, el efecto del GTE sobre norovirus humanos fue evaluado indirectamente mediante partículas pseudovíricas (VLPs) y ensayos con mucina gástrica porcina (PGM) unida a la técnica ELISA y microscopía electrónica de transmisión además de analizar el efecto en suspensiones de norovirus humanos por la técnica *in situ* capture-RT-qPCR. Además,

se realizaron ensayos de viabilidad por RT-qPCR tratando suspensiones de norovirus con EGCG combinadas con PMAxx como agente intercalante. Se mostraron reducciones cercanas al 50% en la capacidad de unión a la PGM. Sin embargo, los resultados de PCR de viabilidad indicaron que el tratamiento con ECGC no afecta a la cápside viral de manera considerable.

Con el objetivo de utilizar el GTE para mejorar la seguridad alimentaria, se evaluó su uso en diversas aplicaciones alimentarias. Inicialmente, se evaluó la estabilidad del GTE en condiciones gástricas simuladas (saliva, gástrica e intestinal) para dilucidar su eficacia como compuesto virucida terapéutico frente a virus entéricos después de la ingesta. Estos ensayos demostraron que los niveles de MNV se redujeron por debajo del límite de detección mientras que los del HAV se redujeron en 2 órdenes logarítmicos. Además, el GTE fue incorporado a diferentes bebidas (zumos de naranja y manzana, horchata y leche) que se trataron con GTE. Los resultados mostraron reducciones por debajo del límite de detección para MNV en zumo de manzana, mientras que para el HAV los mejores resultados se obtuvieron en zumo de manzana, con más de 2 órdenes logarítmicos de reducción cuando se trató con GTE a 5 mg/mL durante 16 horas a 37°C. Cuando las bebidas se trataron mediante tratamientos térmicos moderados combinados con la adición de GTE se observó un aumento de la inactivación del MNV. En cambio, este efecto sinérgico no se observó para el HAV. Posteriormente se evaluó el GTE como higienizante natural para la desinfección de superficies de contacto alimentario y vegetales. Estos ensayos se realizaron según la norma ISO 13697:2001, inoculando suspensiones de MNV y HAV sobre superficies de acero inoxidable y vidrio y añadiendo posteriormente la solución de GTE que se dejó actuar durante de 15 y 30 minutos. Una metodología similar se llevó acabo en ensayos de desinfección en hojas de lechuga y espinacas frescas. Los resultados obtenidos mostraron reducciones de 1,5 órdenes logarítmicos e inactivación total para MNV y HAV en acero inoxidable y vidrio tratados con GTE (10 mg/mL), respectivamente. Resultados similares se obtuvieron en los tratamientos de lechuga y espinacas bajo las mismas condiciones experimentales. Por último, el GTE fue incorporado a recubrimientos comestibles con el objetivo de minimizar la contaminación de virus en frutos tipo baya. La adición se efectuó a matrices de alginato/oleico y diferentes carragenatos aplicándose sobre arándanos y frambuesas resultando en la mejora de la actividad virucida tanto a temperatura ambiente como de refrigeración, siendo algo más efectivo para MNV.

Finalmente, en base a los resultados obtenidos durante la tesis, se puede concluir que el GTE es una opción natural y de bajo coste para la mejora de la seguridad alimentaria frente a virus entéricos.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo ha sido financiado por el Ministerio de economía y competitividad (MINECO) (RYC-2012-09950 y AGL2015-63855-C2-1) y por el Instituto nacional de investigación y tecnología agraria y alimentaria (INIA) cofinanciado por el fondo social europeo (Proyecto RTA2014-00024-C03).

REFERENCIAS

[1] I, Falco, W. Randazzo, L. Gomez-Mascaraque, R. Aznar, A. Lopez-Rubio, G. Sanchez, *LWT-Food Sci. Technol*, **2017**, 81, 250-257.

[2] I. Falco, W. Randazzo, L.G. Gomez-Mascaraque, R, Aznar, A. Lopez-Rubio, G., *Food control*, **2018**, 84, 485-492.

[3] I. Falco, W. Randazzo, J. Rodríguez-Díaz, R. Gozalbo-Rovira, D. Luque, R. Aznar, G. Sánchez, *Int. J. Food Microbiol*., **2019**, 292, 101-106.

[4] I. Falcó, W. Randazzo, G. Sánchez, A. López-Rubio, M.J. Fabra, *Food Hydrocolloids*, **2019**, 12, 74-85.

[5] I. Falco, P.L. Flores-Meraz, W. Randazzo, G. Sánchez, A. López-Rubio, M.J. Fabra, *Food Hydrocolloids,* **2019**, 87, 611-618.

[6] I. Falcó, A. Díaz-Reolid, W. Randazzo, G. Sánchez, *Int. J. Food Microbiol*., **2020**, 334, 108809.

PERSPECTIVAS Y RETOS EN LA MEJORA GENÉTICA DE LEVADURAS

Joaquín Bautista Gallego, Alberto Martínez, Patricia Gil, Luis Miguel Hernández, Manuel Ramírez

Departamento de Ciencias Biomédicas, Área de Microbiología, Universidad de Extremadura, Avda. de Elvas s/n. 06006 Badajoz, España

joaquinbg@unex.es

Aunque las levaduras son microorganismos muy versátiles y ubicuos, en determinados nichos ecológicos con condiciones restrictivas o estresantes, pueden tener dificultades para su desarrollo. Además, bajo ciertas circunstancias puede ser interesante incorporar alguna característica o propiedad deseable a nuestra levadura.

Para alcanzar ese objetivo, podemos recurrir a la mejora genética por métodos clásicos. Este objetivo es de especial interés con las levaduras no-*Saccharomyces* como *Tolulaspora* o *Lachancea* que muestran una capacidad fermentativa inferior a *Saccharomyces cerevisiae*.

Es por ello que el grupo de investigación Microeno_UEx lleva años realizando un profundo estudio de las diferentes estrategias para la mejora genética de levaduras. Entre todas esas estrategias podemos destacar:

i) Hibridación interespecífica. Hemos llevado a cabo la mejora genética de varias estirpes de *Torulaspora delbrueckii* (*Td*) mediante hibridación de sus esporas o de sus células vegetativas con *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo posibles híbridos interespecíficos con características morfológicas, fenotípicas y tecnológicas intermedias entre los 2 parentales. Se seleccionaron 6 posibles híbridos de la mezcla de células vegetativas de ambas levaduras en base a los marcadores genéticos de cada parental, resistencia a cicloheximida (cyhR) de Sc-EX85R4A y fenotipo killer Kbarr de Td-EX1180 (Fig. 1). La mayoría de ellos mostraron un perfil fermentativo mejorado tanto en mosto sintético como vino base sintético, destacando Sc x Td 1 y Sc x Td 3 (Fig. 1).

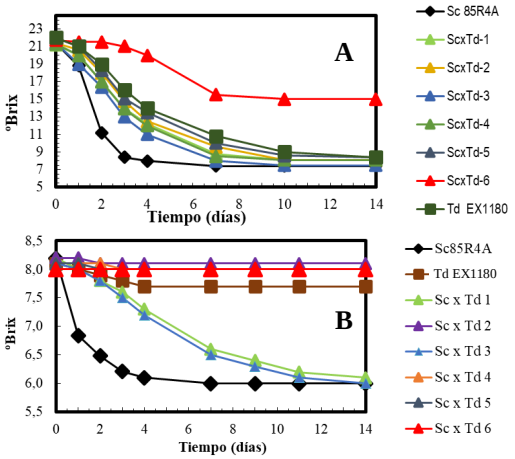


Figura 1: Cinéticas de fermentación de los parentales *Sc* y *Td*, y los híbridos Sc×Td inoculados en mosto sintético (A), o vino base sintético (B).

ii) Hibridación intraespecífica. En este caso, llevamos a cabo la mejora genética de varias estirpes de *Td* mediante hibridación de sus esporas o de sus células vegetativas. Se seleccionaron 6 posibles híbridos intraespecíficos a partir de cruces de células vegetativas de Td-EX1180-2K- (resistencia a cicloheximida-CYHR) y Td-EX1257 (fenotipo killer Kbarr). Todos los híbridos mostraron buena cinética de fermentación en mosto sintético, mejor que el parental Td EX1180 (Fig. 2). Con estos híbridos se volvieron a realizar microvinificaciones de vino base sintético incrementando la cantidad de etanol a 10% e inoculando tan solo dos horas después de añadir metabisulfito y etanol, que son condiciones muy tóxicas para las levaduras Td (Fig. 2). Solo Td×Td-3 acabó la fermentación consumiendo la

misma cantidad de azúcar que el control *S. cerevisiae*, y fue el que mejor cinética de fermentación mostró.

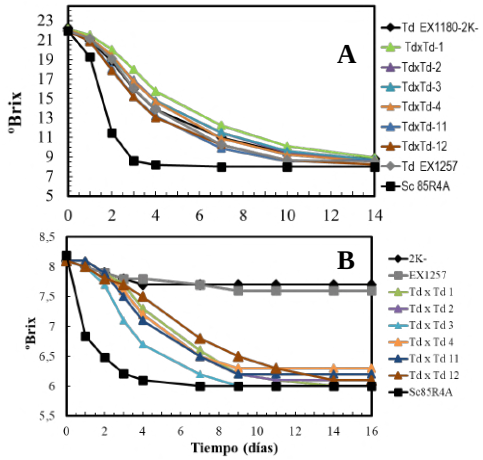


Figura 2: Cinéticas de fermentación de los parentales *Td*, y los híbridos Td×Td inoculados en mosto sintético (A) o vino base sintético (B).

iii) Obtención y selección de mutantes. Un primer ejemplo es el aislamiento de mutantes espontáneos de *Td* de medios suplementados con 500 mg/L SO_2 (SD-500SO_2) o 10% Etanol (YPD-10%EtOH). Para ello, se seleccionaron un mutante de cada tipo para elaborar cava en condiciones de bodega: Td Mut5B-SO2R (resistente a SO_2) y Td Mut6A-SO2R-EtOHR-33 (resistente a SO_2 y etanol). Se preseleccionaron un total de 40 colonias de *Td* para intentar obtener mutantes resistentes a alta presión de CO_2 (HPR). La mayoría de los mutantes HPR mostraron una mejora relevante en las fermentaciones de vino base sintético suplementadas con 30 mg/L de SO_2 (Fig. 3), llegando a terminar la fermentación solo 3 días después de Sc 85R4A.

A continuación, se elaboraron nuevos cavas con los dos mutantes seleccionados (Td MutHP41 y Td MutHP42), para repetir la estrategia anterior de selección de clones aún más resistentes a alta presión de CO_2. Los dos mutantes mostraron mejores cinéticas de fermentación y dominancia que su levadura parental, aunque ninguno de los dos pudo dominar y completar la fermentación dentro de la botella. Td MutHP41 fue claramente la mejor de las levaduras *T. delbrueckii* (Fig. 2). Estos resultados confirman que Td MutHP41 supone realmente una mejora para la fermentación de cava industrial sobre su levadura parental.

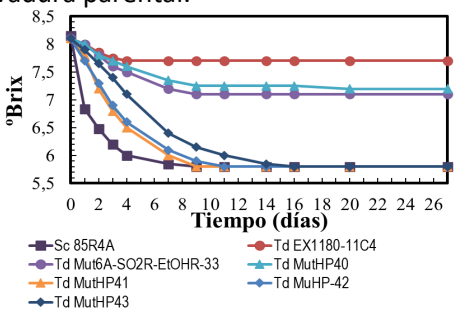


Figura 3: Cinética de fermentación de vino base sintético suplementado con 30 mg/L de SO_2.

Otro ejemplo es la selección de mutantes de *S. cerevisiae* en la síntesis de manoproteínas para el diseño de levaduras con un efecto determinado como la activación de la fermentación maloláctica (FML). Observamos que la adición de extractos puros de manoproteínas, tanto de mnn 6 como mnn 10, provocaron una FML más rápida por *Oenococcus oeni* PSU-1 respecto al control sin adición. Este efecto se puede relacionar con una estructura sin carga o con menor carga negativa por la falta de grupos fosfatos.

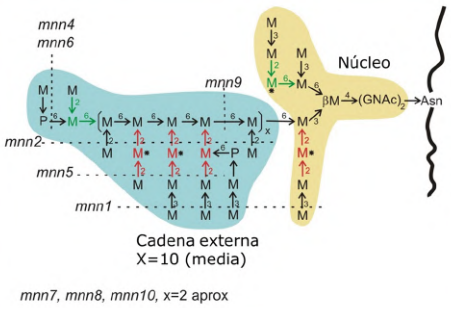


Figura 4: estructura de las manoproteínas de S. cerevisiae y sus alteraciones debidas a las mutaciones *mnn*.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto IB20069 y Ayuda GR21062 ambos financiados por la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional, proyecto TE-0011-21 financiado por la Junta de Extremadura, el Servicio Extremeño Público de Empleo y el Fondo Social Europeo. Además, Patricia Gil agradece su Ayuda a la contratación predoctoral PD18051 financiada por Junta de Extremadura cofinanciado el Fondo Social Europeo.

DESARROLLO DE RESISTENCIA A LAS ALTAS PRESIONES HIDRÓSTATICAS EN *Escherichia coli*

Gayán E.[1], Michiels C. W.[2], Aertsen A.[2]

[1]U. de Zaragoza - Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2)/F. de Veterinaria/Depto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. C/Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza
[2]KU Leuven/Centre for Food and Microbial Technology/Dept. of Microbial and Molecular Systems/Lab. of Food Technology. Kasteelpark Arenberg 22, 3001 Heverlee
elisago@unizar.es

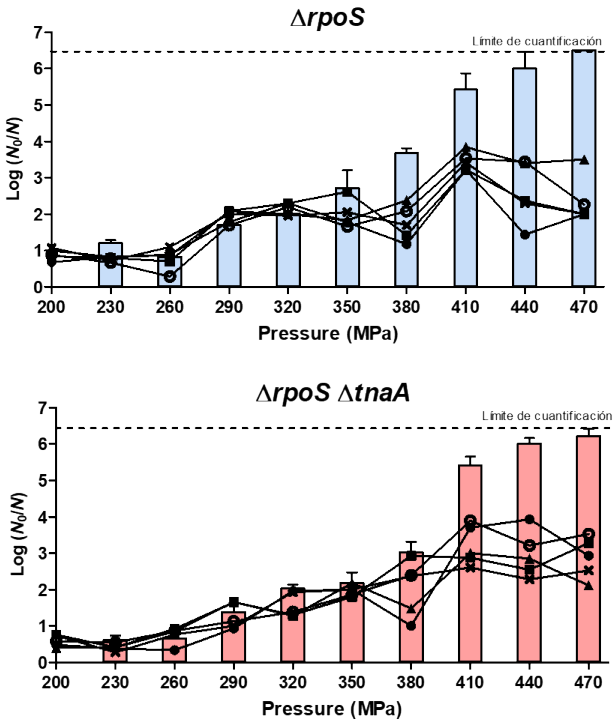
El tratamiento de alimentos por alta presión hidrostática (APH) es el método de procesado no térmico más implantado en la industria. Sin embargo, algunas bacterias son capaces de desarrollar resistencia a esta tecnología comprometiendo la seguridad de los productos presurizados[1]. Por ello, la identificación de las posibles rutas y mecanismos de desarrollo de resistencia a la APH es esencial para anticipar o prevenir la aparición de variantes resistentes.

En estudios previos observamos que algunas cepas de *E. coli*, incluyendo serovares shigatoxigénicas (ECST), adquirían resistencia tras ser sometidas a ciclos sucesivos de presurización de intensidad progresiva intercalados con una fase de recuperación de los supervivientes[1]. La mayoría de los mutantes seleccionados mostraban indicios de tener una mayor actividad de la respuesta al estrés mediada por el factor RpoS[2], lo que coincide con la importancia de este regulon en la supervivencia a la APH en la fase de crecimiento estacionaria. Además, la variabilidad en resistencia a la APH entre ECST se ha correlacionado con el nivel de actividad RpoS y el polimorfismo del alelo *rpoS*[3-4].

Debido a que muchos de los ECST aislados en la naturaleza presentan baja o nula actividad RpoS[5], estudiamos la capacidad de desarrolar resistencia a la APH de una cepa de *E. coli* MG1655 carente del gen *rpoS* (Δ*rpoS*). Sorprendentemente, a pesar de la hipersensibilidad de la cepa MG1655 Δ*rpoS* a la APH, todas las líneas evolutivas desarrollaron rápidamente resistencia (Fig. 1), alcanzando el mismo o mayor nivel de supervivencia que la cepa MG1655 "wild-type" (WT), dotada del gen *rpoS*[6].

La secuenciación genómica de los clones más resistentes de cada línea evolutiva desveló que todos ellos presentaban mutaciones en los genes *cyaA*, *crp* o *tnaA*[6-7]. Es más, al examinar exhaustivamente las poblaciones seleccionadas observamos que todos los clones presentaban mutaciones en uno de los tres genes y que los distintos tipos de mutantes co-existían dentro de la misma población (Fig. 1). En experimentos evolutivos previos con la cepa WT, no se encontraron o con muy poca frecuencia mutaciones en tales genes, lo que evidenciaba que la regulación RpoS impide la actuación de mecanismos evolutivos alternativos al aumento de la actividad de este factor sigma.

Todas las mutaciones de los genes *cyaA* y *crp*, los cuales dan lugar a los componentes del factor de transcripción cAMP/CRP, inhibían total o parcialmente su actividad[6]. Por el contrario, las mutaciones encontradas en el gen *tnaA*, el cual codifica la enzima triptofanasa (TnaA), a pesar de



Línea evolutiva	Tipo de mutante	Porcentaje
1 (●)	cAMP/CRP	100,0
	TnaA	ND
2 (■)	cAMP/CRP	10.8
	TnaA	89,2
3 (▼)	cAMP/CRP	46,3
	TnaA	53,7
4 (▲)	cAMP/CRP	26,8
	TnaA	57,9
5 (×)	cAMP/CRP	100,0
	TnaA	ND

Línea evolutiva	Tipo de mutante	Porcentaje
1 (●)	cAMP/CRP	93,5
2 (■)	cAMP/CRP	97,2
3 (▼)	cAMP/CRP	51,9
4 (▲)	cAMP/CRP	14,9
5 (×)	cAMP/CRP	3,7

Figura 1. Evolución de cinco linajes de MG1655 Δ*rpoS* y Δ*rpoS* Δ*tnaA* expuestos a tratamientos sucesivos de APH de intensidad progresiva intercalados con una fase de recuperación de los supervivientes. Las líneas indican la inactivación de los cultivos sometidos al proceso evolutivo y las barras representan la resistencia de la cepa parental. Las tablas indican la proporción de mutantes con alteraciones en regulación cAMP/CRP o con variantes de TnaA de cada población al final del proceso evolutivo.

inactivar total o parcialmente su actividad, requerían la expresión de la proteína para el desarrollo de resistencia. Tales variantes de TnaA se agregaban en el citoplasma de las células a la vez que incrementaban la expresión de las proteínas de shock térmico[7], las cuales son primordiales para la supervivencia a la APH.

Finalmente, investigamos si la inhibición del complejo cAMP/CRP o la adquisición de variantes de TnaA podían enmascarar otras rutas evolutivas, al igual que ocurría con la actividad RpoS. Para ello, sometimos a la cepa MG1655 Δ*rpoS* Δ*tnaA* al mismo proceso evolutivo (Fig. 1). A pesar de que todas las poblaciones seleccionadas estaban constituidas por una proporción importante de individuos con alteraciones en la regulacion cAMP/CRP (Fig. 1), conseguimos aislar mutantes que desarrollaron resistencia a la APH por mecanismes independents a RpoS, cAMP/CRP y TnaA. El análisis genómico de los clones mas resistentes reveló dos rutes evolutivas alternativas: la inactivación del regulador YegW y de la RNA pirofosfohidrolasa RppH.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por "Research Foundation - Flanders (FWO-Vlaanderen)" y "KU Leuven Research Fund".

REFERENCIAS

[1] D. Vanlint, N. Rutten, C.W. Michiels, A. Aertsen, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2012**, *78*, 3234-3241.

[2] D. Vanlint, N. Rutten, S.K. Govers, C. W. Michiels, A. Aertsen, *Int. J. Food Microbiol.*, **2013**, *163*, 28-33.

[3] M. Robey, A. Benito, R.H. Hutson, C. Pascual, S. F. Park, B.M. Mackey, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, *67*, 4901-4907.

[4] A. Álvarez-Ordóñez, O. Alvseike, M.K. Omer, E. Heir, L. Axelsson, A. Holck, M. Prieto, *Int. J. Food Microbiol.*, **2013**, *161*, 220-230.

[5] A.A. Bhagwat, J. Tan, M. Sharma, M. Kothary, S. Low, B.D. Tall, M. Bhagwat, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2006**, *72*, 4978-4986.

[6] J. Mortier, E. Gayán, ..., A. Aertsen, *mBio,* **2021**, e01129-01121.

IMPORTANCIA DEL CONTEXTO ECOLÓGICO EN EL FUNCIONAMIENTO DE COMUNIDADES FERMENTATIVAS DE LEVADURAS VÍNICAS

Ruiz J.[1,2], de Celis M.[1], Vila J.[3], Diaz-Colunga J.[3], Vicente J.[1], Santos A.[1], Sanchez A.[4], Belda I.[1]

1 Universidad Complutense de Madrid / Facultad de Biología / Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología. C/ José Antonio Nováis 12 (28040-Madrid)

2 Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) / Grupo de Sistemas Microbianos e Ingeniería de Proteínas (28040-Madrid)

3 Yale University / Department of Ecology & Evolutionary Biology (06516-New Haven, USA)

4 Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) / Departamento de Biotecnología Microbiana (28049-Madrid)

ignaciobelda@ucm.es

Las fermentaciones vínicas albergan varias decenas de especies de levaduras. Estas definen un patrón de sucesión poblacional durante la fermentación alcohólica, que culmina con la dominancia de *Saccharomyces cerevisiae.* La diversidad de levaduras presentes en un mosto determina el perfil sensorial de los vinos resultantes, liberando compuestos de impacto aromático y modulando el comportamiento fermentativo de *Saccharomyces*.

En este trabajo, caracterizamos el espectro esperable de fenotipos de interés enológico en una colección de 60 cepas vínicas de levadura, pertenecientes a 30 especies de 20 géneros distintos (Figura 1). Para ello, estudiamos sus preferencias ambientales (cinética de crecimiento en un panel de 28 condiciones físico-químicas), así como su contribución metabólica en fermentaciones vínicas (producción/consumo de metabolitos: azúcares, ácidos orgánicos, nitrógeno, etanol) en mosto sintético.

Se observó una correlación entre la distancia filogenética y la distancia fenotípica de las cepas analizadas (Figura 2).

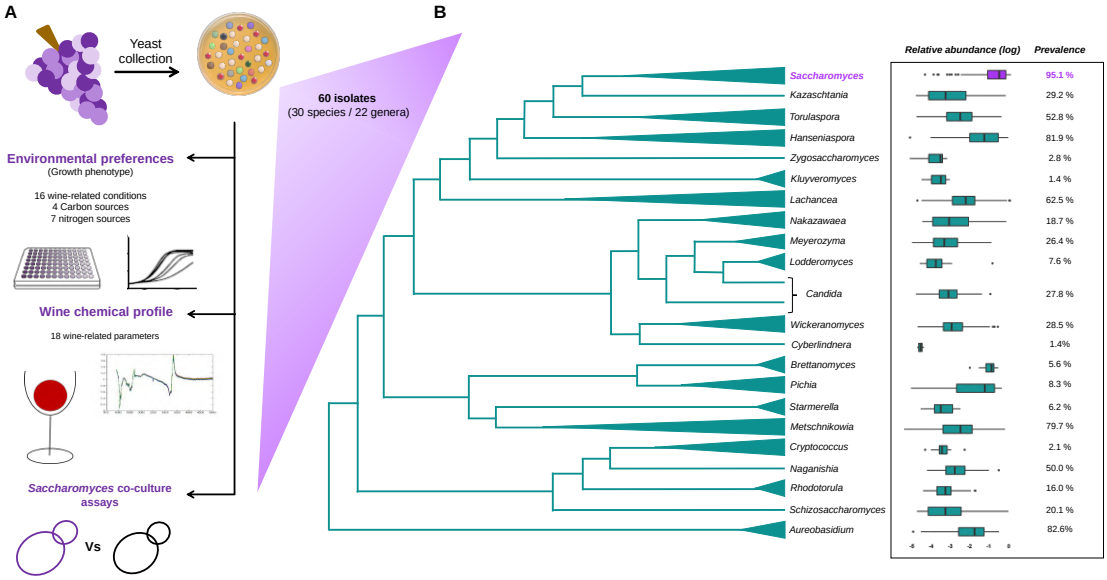


Figura 1: A) Esquema de la metodología empleada para la caracterización fenotípica de la colección de levaduras. **B)** Relación filogenética de los géneros de levadura incluidos en la colección y sus patrones de abundancia relativa y prevalencia en fermentación alcohólica.

Esta correlación sugiere la existencia de una fuerte señal filogenética entre la diversidad de levaduras vínicas que, de hecho, permite predecir una función concreta para cualquier cepa de levadura, exclusivamente atendiendo a su distancia filogenética frente a la colección de levaduras caracterizadas en este trabajo.

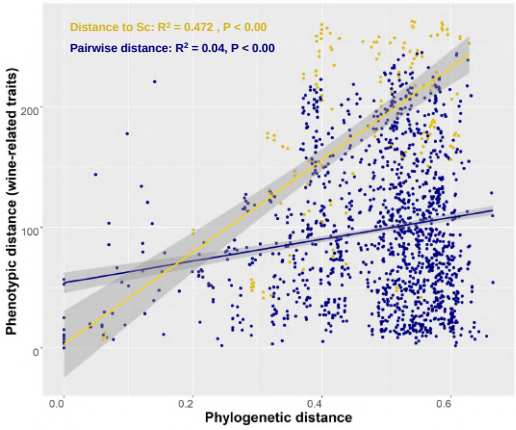


Figura 2: Correlación existente entre la distancia filogenética y la distancia fenotípica de levaduras vínicas (en términos de su contribución al perfil metabólico de los vinos) en fermentaciones en mosto sintético de uva.

Dentro de las distintas condiciones de crecimiento ensayadas, y como es esperable, se comprueba que *S. cerevisiae* presenta el mejor fenotipo de crecimiento en la mayoría de condiciones fermentativas, por encima de las demás especies no-*Saccharomyces*. Sin embargo, algunas condiciones (relacionadas con la disponibilidad de nutrientes nitrogenados, la temperatura, o el consumo de ciertos ácidos orgánicos) dan lugar a patrones de crecimiento mayores en algunas cepas no-*Saccharomyces*. Por ello, y aunque esto no ha sido aún demostrado en el marco de este trabajo, se hipotetiza que estas son las condiciones en las que el contexto ecológico puede tener un mayor impacto en el desarrollo de *S. cerevisiae* y, en último término, en su capacidad para dominar y llevar a término el proceso fermentativo.

Como primera aproximación para determinar la importancia del contexto de diversidad y definir el papel que juega cada especie no-*Saccharomyces* en el desarrollo del proceso fermentativo, se compusieron un total de 16 comunidades sintéticas de levaduras, derivadas de la combinación aleatoria de 10 especies (en consorcios de 2 a 6 especies). Sobre estas 16 comunidades *background,* se adicionaron, de forma individual, esas mismas 10 especies, para conocer la función de las comunidades en presencia y ausencia de una determinada especie. Asimismo, esas comunidades fueron ensayadas en presencia y ausencia de 2 cepas de *S. cerevisiae*, para conocer el impacto de los distintos consorcios en la capacidad de *S. cerevisiae* para llevar a término la fermentación. Este diseño experimental se esquematiza en la Figura 3, que representa de forma resumida el perfil de contribución de las distintas especies ensayadas en comunidades con mayor o menor función intrínseca.

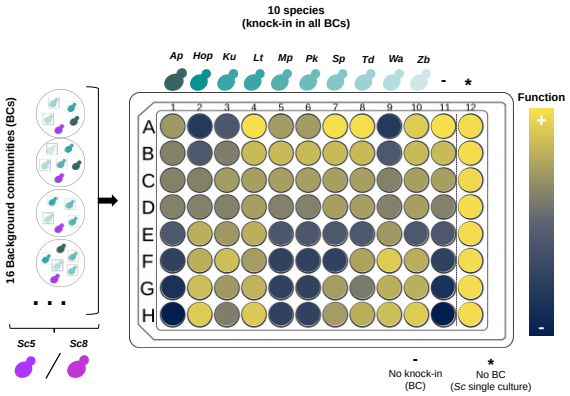


Figura 3: Esquema del diseño experimental para el estudio del impacto del contexto ecológico en la capacidad fermentativa de comunidades complejas de levaduras en mosto sintético de uva.

Concluimos que el contexto ecológico modifica el perfil de contribución de las distintas especies de levadura presentes en fermentaciones vínicas, y que determinadas combinaciones de especies reducen la capacidad de *S. cerevisiae* para llevar a término el proceso fermentativo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación (Ministerio de Ciencia e Innovación, España), a través del proyecto PID2019-105834GA-I00 (Wineteractions).

IMPACTO DE LOS FACTORES PERINATALES EN LA MICROBIOTA MATERNO-NEONATAL Y SU POSIBLE INFLUENCIA EN LA SALUD

Marta Selma-Royo[1,2]

[1]Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA), Departamento de Biotecnología, Grupo de Probióticos y Bacterias Lácticas. Av. Catedràtic Agustín Escardino, Paterna (46980), Valencia, España
[2]Università degli Studi di Trento, Centre for Integrative Biology (CIBIO), Laboratory of Computational Metagenomics. Polo Scientifico e Tecnologico Fabio Ferrari, Via Sommarive, Povo (38123), Trento, Italia (Afiliciacón Actual)
marta.selmaroyo@unitn.it

El gran impacto del microbioma humano sobre la salud es ampliamente reconocido. Se ha sugerido que alteraciones en la exposición microbiana durante la infancia podrían estar implicadas en el mayor riesgo de algunas enfermedades de base inmunológica[1]. Se han encontrado también asociaciones entre etas enfermedades con algunos factores perinatales que podrían afectar la colonización microbiana, como la cesárea, los antibióticos o la alimentación mediante leche de formula[2].
La interacción entre la microbiota inicial y el sistema inmunológico sería crucial para su maduración[3]; sin embargo, los mecanismos que mediarían en esta relación huésped-microbiota todavía se desconocen. Además, a pesar de la importancia de la microbiota materna para el inicio de la colonización, todavía es escasa la información sobre como el ambiente afecta a la microbiota materna. El objetivo de la tesis doctoral fue definir el impacto de los diferentes factores perinatales en la composición de la microbiota materno-neonatal y sus posibles implicaciones para la salud.

Los participantes del análisis son parte de un estudio longitudinal desarrollado en el área mediterránea entre 2015 y 2019[4]. Se utilizaron las muestras fecales recogidas al parto, a los 7 y 31 días, así como las muestras de saliva y líquido amniótico de un grupo reducido de estas participantes.

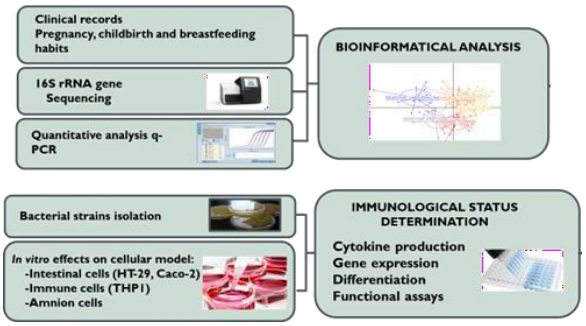


Figura 1: Metodología empleada en el proyecto.

El análisis de la microbiota intestinal se realizó mediante la secuenciación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA. Se determinó la concentración de moléculas relacionadas con el estado hormonal, metabólico e inmunológico de los participantes. Durante el proyecto, también utilizamos un modelo de co-cultivo celular para el estudio de posibles interacciones microbiota- huésped (Figura 1).

Nuestros resultados sugieren que la microbiota materna al parto está influenciada por diversos factores, como el estado inmunológico de la cavidad amniótica[5], la dieta[6,7], el tipo de parto y la localización geográfica[8]. En la cohorte analizada, el consumo materno de grasa estuvo positivamente relacionado con

Fimicutes spp. mientras que el consumo de carbohidratos y fibra se asociaron con mayores proporciones de Bacteroidetes y Proteobacteria. Algunas de estas relaciones fueron observadas también en la microbiota neonatal con un impacto en el desarrollo del niño[6,7].

Dos patrones microbianos fueron encontrados a lo largo de todos los análisis en la cohorte MAMI. El primero estaba compuesto por géneros asociados a la salud y productores de SCFA como *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Blautia* y asociado a un perfil de citoquinas caracterizado por IL-2, IL-5, IL-17 y TNF-α en la cavidad amniótica y a mayores niveles de cortisol en saliva[9]. El otro patrón microbiano se caracterizaba por los géneros *Finegoldia*, *Peptoniphilus*, *Porphyromonas* y *Campylobacter*. Estos muestran relación con un perfil de citoquinas dominado por IL-4, IL-13, IL-18 y IL-10 y una asociación negativa con la concentración de cortisol en saliva. Así, nuestros resultados sugieren que señales maternas hormonales e inmunológicas se asocian con la microbiota materna con implicaciones para la microbiota neonatal. Estudios centrados en la madre son claves para el desarrollo de estrategias moduladoras de la microbiota durante el embarazo; lo que evaluamos en la cohorte IMPACT del grupo BCNatal Research group del Hospital San Joan de Deu[10].

En nuestro siguiente trabajo, describimos el efecto del tipo de parto y el lugar en el proceso de colonización durante el primer mes de vida[11]. En nuestra investigación, propusimos un mecanismo molecular por el cual las diferencias en la composición microbiana de los niños nacidos por cesárea (Figura 2) podrían provocar una alteración en la maduración del sistema inmunológico. Así, las alteraciones en el proceso de colonización durante el primer mes de vida podrían tener consecuencias a largo plazo en la salud infantil debido a una alteración del desarrollo del sistema inmunológico durante este periodo.

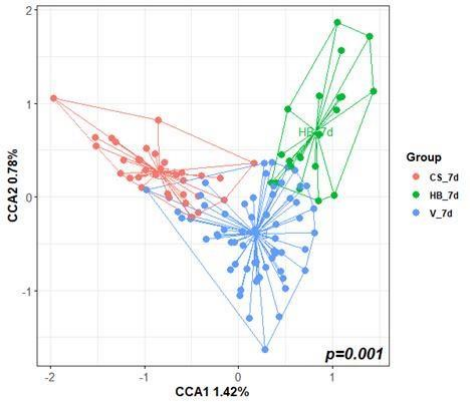


Figura 2: Diferencias en el perfil de microbiota asociadas al tipo de parto a los 7 días de vida[11].

Actualmente, trabajamos en el estudio de la transferencia de microbiota en el entorno materno-infantil mediante la secuenciación metagenómica, que permite observar esta transferencia a nivel de cepa y facilita el estudio de posibles diferencias funcionales entre cepas. Intentamos esclarecer el efecto que tendrían estos mismos factores perinatales, sobre la transferencia microbiana materno-infantil.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, M Carmen Collado; a las personas de su grupo que han contribuido en los trabajos de la tesis doctoral y al grupo de Bacterias Lácticas. A la GVA por la beca predoctoral que financió este periodo y a las participantes de la cohorte MAMI (ERC-StG).

REFERENCIAS

[1] LT tiemsma KB Michels. Pediatrics. 2018;141(4). **[2]** CA Mbakwa, L Scheres, J Penders, et al. J Pediatr. 2016;176:105-113.e2. **[3]** MC Arrieta, LT Stiemsma, PA Dimitriu, et al. Sci Transl Med. 2015;7(307). **[4]** I García-Mantrana, C Alcántara, M Selma-Royo, et al. BMC Pediatr 2019;19(1):140. **[5]** K Rio-Aige, I Azagra-Boronat, M Massot-Cladera, et al. Int J Mol Sci 2021;22(4):1778. **[6]** M Selma-Royo, I García-Mantrana, M Calatayud, et al. Eur J Nutr. 2021;60(3):1429-1442. **[7]** I García-Mantrana, M Selma-Royo, S González,et al. Gut Microbes; 2020 Mar 13. **[8]** Y Cheng, M Selma-Royo, X Cao, et al. Front Cell Infect Microbiol; 2022;11. **[9]** M Selma-Royo, I García-Mantrana , M Calatayud, et al. Nutr. 2020; 12(6), 1779. **[10]** F Crovetto, F Crispi, R Casas, et al. JAMA. 2021;326(21):2150–60. **[11]** M Selma-Royo, M Calatayud, I García-Mantrana, et al. Microbiome. 2020; 8 (167).

Pósteres

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *LACTOCOCCUS LACTIS* MP11 Y *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* MP14 FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN UN MODELO CÁRNICO

Fernández M.[1], Hospital X.F.[1], Caballero N.[1], Sánchez-Martín V.[2], Morales P.[2], Haza A.I.[2], Hierro E.[1]

1 Universidad Complutense de Madrid/Facultad de Veterinaria/ Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria. Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid

2 Universidad Complutense de Madrid/Facultad de Veterinaria/ Sección Departamental de Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Avda. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid

manuela@ucm.es

Las sales nitrificantes imparten el color rojo característico a los productos cárnicos fermentados y contribuyen a controlar el crecimiento de microorganismos patógenos como *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* [1]. Sin embargo, su uso es controvertido debido a su papel como precursores de la formación de N-nitrosaminas [2].

En este sentido, y ante la posibilidad de eliminar o reducir el contenido de sales nitrificantes en los productos cárnicos por limitaciones técnicas y/o restricciones legales, el uso de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas es objeto de creciente interés como estrategia de bioconservación en la industria cárnica.

La producción de bacteriocinas por las bacterias lácticas se caracteriza inicialmente *in vitro* en distintas condiciones, pero para su implementación en la industria, estos estudios deben ser confirmados en producto real. La realización de ensayos en modelos cárnicos, que imiten condiciones similares a las del producto, resultan de interés práctico como paso previo al escalado a condiciones reales de fabricación.

El objetivo de este estudio ha sido investigar la capacidad de dos especies de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas para el control de *S. aureus* en un modelo cárnico, a fin de determinar su potencial como cultivos protectores para su aplicación en embutidos curado-madurados.

Las cepas utilizadas fueron *Lactococcus lactis* MP11, productora de nisina, y *Pediococcus acidilactici* MP14, productora de pediocina PA-1, ambas proporcionadas por el grupo de investigación del Dr. Juan Miguel Rodríguez, de la Universidad Complutense de Madrid. Ambas cepas mostraron actividad antiestafilocócica en estudios previos en agar.

Se preparó un modelo cárnico de embutido con una proporción 70:30 (p:p) de magro de cerdo y papada. Después del picado y la mezcla, se añadió NaCl (2,5%), lactosa (3%), dextrosa (0,5%) y pimienta molida (0,25%). Se prepararon lotes con 0 y 75 mg/kg de nitrito sódico. *S. aureus* 2386 resistente a eritromicina se inoculó a una concentración de 10^3 ufc/g y los cultivos protectores a 10^8 ufc/g. También se prepararon modelos sin inocular con los cultivos protectores. Las mezclas se introdujeron en placas de Petri de 55 mm de diámetro que se llenaron hasta el borde y se cubrieron con la tapa para reducir al máximo la presencia de aire y favorecer así la fermentación. Las placas se incubaron a 20 ºC durante 72 h, seguidas de 24 h a 15 ºC y finalmente 72 h a 12 ºC. Se tomaron muestras los días 0, 3 y 7 de incubación para el análisis microbiológico y la determinación del pH. Se llevaron a cabo

dos experimentos independientes. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Los recuentos de bacterias lácticas alcanzaron 10^9 ufc/g a las 48 h, independientemente de la presencia de nitrito, manteniéndose constantes hasta el final de la incubación.

El pH inicial fue de 5,7 y los valores finales fueron de 4,8-4,9 en todos los lotes, cifras típicas de los embutidos fermentados.

S. aureus aumentó ligeramente durante la incubación (<0,3 log ufc/g) en ausencia de los cultivos protectores. Cuando estos se incorporaron a la mezcla, se observó una inhibición máxima de *S. aureus* en torno a 0,5 log ufc/g en el día 7 de incubación, tanto en ausencia como en presencia de nitrito (Figuras 1 y 2). En el caso de *P. acidilactici* MP14, esta inhibición ya se observó en el día 3 de incubación en el modelo sin nitrito (Figura 1), aunque los resultados en el día 7 fueron similares a los observados con *L. lactis* MP11.

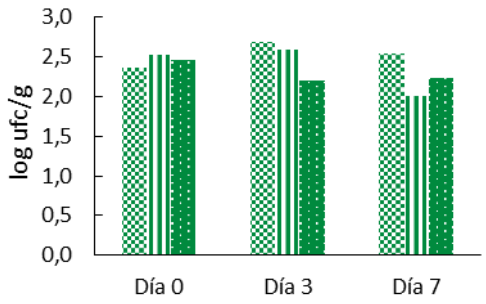


Figura 1: Recuentos de *S. aureus* en los modelos sin nitrito. Sin cultivos protectores, Modelo con *L. lactis* MP11, Modelo con *P. acidilactici* MP14.

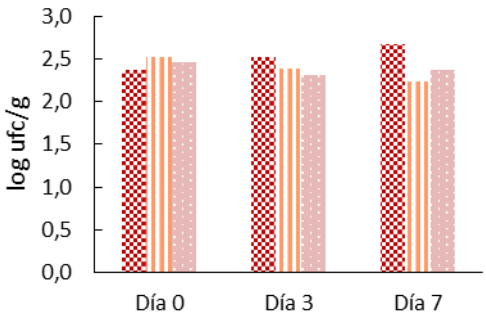


Figura 2: Recuentos de *S. aureus* en los modelos con 75 mg/kg de nitrito. Sin cultivos protectores, Modelo con *L. lactis* MP11, Modelo con *P. acidilactici* MP14.

En este trabajo se ha confirmado en un modelo cárnico la actividad antiestafilocócica que se había detectado *in vitro* en *Lactococcus lactis* MP11 y *Pediococcus acidilactici* MP14, aunque se necesitan ensayos adicionales en embutidos para evaluar dicha actividad en condiciones reales y/o investigar la necesidad de utilizar estrategias combinadas de conservación para aumentar su eficacia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTI2018-097549-B-I00 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades).

REFERENCIAS

[1] EFSA. Scientific Opinion on the re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *EFSA J.* **2017**, *15*, 4786.

[2] IARC. Red meat and processed meat. En: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC, Lyon, Francia, **2018**.

EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LEVADURAS CON PROPIEDADES TECNOLÓGICAS, A LAS PROPIEDADES SENSORIALES DE QUESOS DE PASTA BLANDA

Ruiz-Moyano S.[1,2], Merchán A.V.[1,2], Cabañas C.M.[1,2], Rodríguez A.[1,2]
Martín A.[1,2]

1 Universidad de Extremadura/Escuela de Ingenierías Agrarias/Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Nutrición y Bromatología. Avd. Adolfo Suárez s/n, 06007, Badajoz.
2 Universidad de Extremadura/Instituto Universitario de Investigación de Recursos Agrarios (INURA). Avd. de la Investigación s/n, 06006, Badajoz
amartin@unex.es

La falta de homogeneidad en la calidad final de los quesos tradicionales es una de sus principales problemáticas. La aplicación de un cultivo iniciador mixto autóctono podría contribuir a su estandarización. Las bacterias ácido lácticas han sido ampliamente estudiadas para este fin, sin embargo, en los últimos años se ha destacado el papel que otros microorganismos de la microbiota secundaria puedan tener en la propiedades sensoriales de los quesos [1]. Por lo tanto, estudios para la selección y aplicación de microorganismos de la microbiota secundaria en estos quesos son necesarios para el desarrollo de un cultivo iniciador mixto autóctono. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar en un queso experimental la contribución a las propiedades sensoriales de nueve levaduras seleccionadas por sus propiedades tecnológicas (Tabla 1).

Tabla 1:cepas de levadura utilizadas en el estudio [2].

Especies	Código de cepas
Kluyveromyces lactis	1507, 2287, 2725
Yarrowia alimentaria	1204, 2150
Pichia kudriazevii	373
Pichia jadinii	433, 1731
Yarrowia lipolytica	2495

Para ello, se elaboraron quesos experimentales con leche pasterizada de oveja y coagulante vegetal (*Cynara cardunculus* L.) con y sin inoculación de levaduras (Control) y se estudió su impacto en las propiedades sensoriales al final de la maduración. Las levaduras se inocularon en la leche pasterizada a $5x10^6$células/mL. Tras la coagulación de la Leche y corte, la cuajada se introdujo en moldes y se prensó durante 40 min para obtener quesos de aproximadamente 200 g que fueron madurados durante 15 días a 12ºC. Al final de la maduración de tomaron muestras de tres quesos diferentes por lote a las que se les determinó el pH, recuento de bacterias totales, bacterias acido-lacticas y levaduras, textura y anàlisis sensorial descriptivo.

Los resultados mostraron que las nueve cepas de levaduras utilizadas aumentaron significativamente durante la maduración, adaptándose adecuadamente a la matriz del queso. En relación con su impacto en las propiedades del queso, dos de las nueve cepas inoculadas, *Pichia kudriavzevii* L373 y *Yarrowia lipolytica* L2495 permitieron obtener una textura significativamente más blanda que el resto de los lotes elaborados ($P<0,05$). En el análisis sensorial no se observaron diferencias significativas para los parámetros análisis visual de la pasta, firmeza sensorial, intensidad, persistencia del aroma y valoración global entre los lotes de queso inoculados con levaduras y el lote control. Sin embargo, los valores medios de los parámetros sensoriales en los lotes con levaduras en comparación con el control fueron en general mayores. Lo cual indica,

que las levaduras modificaron en parte las características sensoriales.

En la figura 1 se muestra el anàlisis de componentes principales (PCA) de los parámetros microbiológicos, físico-químicos y sensoriales estudiados. En la proyección, se puede observar cómo el componente principal 1 (CP1) explica una variabilidad del 47,05% y el componente principal 2 (CP2) del 18,77%, por lo tanto, ambos componentes principales recogen el 65,82% de la variabilidad de los datos. Como se puede observar, las variables PCA (bacterias aerobias mesófilas), PDA (levaduras), MRS (BAL), y parámetros sensoriales persistencia e intensidad tienen más peso sobre el CP 1, por lo que, el CP 1 define mejor la diferencia existente entre ellas. Mientras que las demás variables, pH y variables sensoriales: firmeza sensorial, firmeza instrumental, análisis visual de la pasta y aceptabilidad son explicadas por ambos componentes principales. El PCA muestra claramente como se diferencian los lotes inoculados con levaduras del lote control. El lote control está correlacionado con valores más elevados en ambas firmezas y mejor aceptabilidad. Por el contrario los nueve lotes inoculados con levaduras se correlacionaron positivamente con los parámetros microbiológicos, demostrando su implantación en la matriz del queso y con los parámetros sensoriales de intensidad, persistencia y análisis visual de la pasta, mientras que mostraron una correlación negativa con la firmeza sensorial e instrumental y aceptabilidad. Entre los lotes de levadura el lote *Y. alimentaria* L2014 fue el más divergente, mientras que el lote *P. jadinii* L1731 el más similar al lote control. Sin embargo, entre ellos destacaron los lotes *P. kudriavzevii* L373, *Y. lipolytica* L2495 y *K. lactis* L1507 por su correlación positiva con los parámetros sensoriales de intensidad y persistencia y negativa con ambas firmezas.

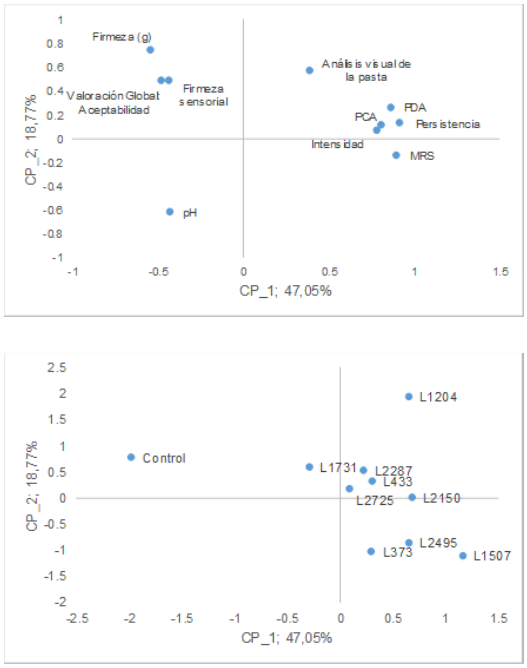


Figura 1: Análisis de componentes principales de los parámetros de microbiología (PCA: bacterias aerobias mesófilas; MRS: bacterias ácido-lácticas; PDA: levaduras), pH, firmeza y sensoriales (Análisis visual de la pasta, persistencia, intensidad, firmeza y aceptabilidad global).

En conclusión, tres levaduras, *P. kudriavzevii* L373, *Y. lipolytica* L2495 y *K. lactis* L1507, en base a su relación con los parámetros sensoriales de intensidad y persistencia y con la firmeza sensorial e instrumental mostraron ser las mejores candidatas para formar parte de un cultivo iniciador mixto para la elaboración de quesos de pasta blanda de Leche cruda de oveja.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido finanaciado por el Plan Regional de Proyectos y Ayudas a la Investigación de la Junta de Extremadura mediante los proyectos con referencia IB16038 y GR21180.

REFERENCIAS

[1] Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., & Córdoba, M.G. J. Dairy Sci., 2013, 96(9), 5477-5486.

[2] Merchán, A. V., Ruiz-Moyano, S., Hernández, M. V., Benito, M. J., Aranda, E., Rodríguez, A., & Martín, A. J. Dairy Sci., 2022, 105(4), 2931-2947.

UNA NUEVA ESPECIE DE *ASPERGILLUS* PRODUCTORA DE AFLATOXINAS AISLADA DE LA CAÑA DE AZÚCAR BRASILEÑA

Silva J.J.[1], Fungaro M.H.P. [2], Taniwaki M.H.[1], Iamanaka B.T.[1]

1 Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Brazil.

2 Universidade Estadual de Londrina (UEL), Brazil.

Josue.biomol@gmail.com

Aspergillus sección *Flavi* és un grupo fúngico muy importante en los alimentos; muchas especies de este grupo causan el deterioro de los alimentos, además, *A.* sección *Flavi* albergan la mayoría de las especies aflatoxigénicas. Las aflatoxinas son metabolitos nocivos para la salud humana y animal, habiéndose reconocido como el principal contaminante natural de los alimentos. La contaminación por aflatoxinas ha sido reportada principalmente en maní, maíz, especias, nueces (almendras, pistachos, avellanas, pecanas y nueces de Brasil), frutas, verduras y leche. La IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) ha clasificado las aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 y AFM2) en el grupo 1 como cancerígenas para los humanos. Además del efecto cancerígeno, la exposición a las aflatoxinas puede conducir al desarrollo de efectos inmunosupresores, hepatotóxicos y otros efectos patológicos. Por lo tanto, reconocer la biodiversidad de A. sección *Flavi* en los alimentos es necesario para reducir los riesgos para la salud pública.

El objetivo de nuestro estudio fue investigar la diversidad de la sección *Flavi* aislada de alimentos producidos en Brasil: mandioca, caña de azúcar, pimienta negra, paprika, nuez de Brasil, yerba mate, maní, arroz y maíz.

Para ello, alrededor de 400 cepas que previamente habían sido identificadas morfológicamente como pertenecientes a *A.* sección *Flavi*, fueron sometidas a análisis molecular, a través de un abordaje multilocus (*CaM*, *BenA* y *RPB2*). Las amplificaciones y la secuenciación se realizaron en las mismas condiciones reportadas en Silva et al. [1].

Con base en las secuencias de nucleótidos obtenidas, se aplicaron diferentes enfoques genotípicos, como análisis de máxima verosimilitud, inferencia bayesiana y métodos basados en coalescencia, con base en estos análisis fue posible clasificar un grupo de cepas, predominantemente aisladas de caña de azúcar, que no se agrupó con ninguna de las especies aceptadas formalmente en *A.* sección *Flavi* (Fig. 1).

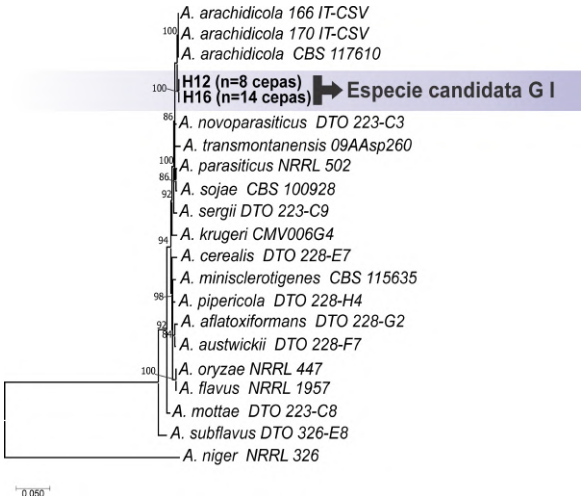


Figura 1: Análisis de máxima verosimilitud de *A.* sección *Flavi (serie Flavi)* basado en conjuntos de datos multiloci combinados (*CaM+BenA+RPB2*). Solo se muestra bootstrap ≥ 60%. *Aspergillus niger* es el grupo externo.

Por lo tanto, con base en el concepto de especie filogenética/genotípica [2], este grupo (G I) representa una linaje evolutiva

independiente, y decidimos tratarla como una nueva especie filogenética. Esta especie candidata está estrechamente relacionada con *Aspergillus arachidicola*, sin embargo, forma un grupo monofilético distinto y estadísticamente bien respaldado (Fig. 1).

Según lo recomendado por International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (ICNafp) y por el International Commission of *Penicillium* and *Aspergillus* (ICPA), utilizamos enfoques polifásicos, integrando datos genotípicos y fenotípicos. Los análisis morfológicos se realizaron de acuerdo con Samson et al. [3], y el análisis de la producción de aflatoxinas (B y G) se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD), según Silva et al. [4].

Todas las cepas de la especie candidata (G I) fueron capaces de producir aflatoxinas tipo B (B_1 y B_2) y G (G_1 y G_2).

En medio CYA (25 °C, 7 d) la especie candidata presenta colonias de color verde oliva, con micelio aéreo en la región central, abundante esporulación, superficie aterciopelada; exudados presentes (incoloros); pigmentos solubles y esclerocios ausentes. En MEA (25 °C, 7 d): Colonias de color verde claro, micelio aéreo en la región central. Pigmentos y esclerocios ausentes; exudados transparentes. En YESA (25 °C, 7 d): Colonias verdes; aspecto aterciopelado; micelio aéreo; pigmentos solubles, exudados y esclerocios ausentes (Fig. 2). Micromorfológicamente, tiene cabezas de conidios marrones, uniseriadas y biseriadas. Conidióforos con estípites hialinos, finamente arrugados. Vesículas globulares a subglobosas. Conidios lisos a ligeramente arrugados (Fig. 2). Sus principales caracteres diagnósticos en relación con *A. arachidiola* son su patrón de crecimiento reducido en medio MEA, además, el color y la textura de la colonia también son bastante diferentes en este medio en relación con *A. arachidicola* (ver Pildain et al. [5]). El principal carácter discriminatorio es la producción de esclerocios (baja pero consistente) en medio CYA (37 °C) (Fig. 2).

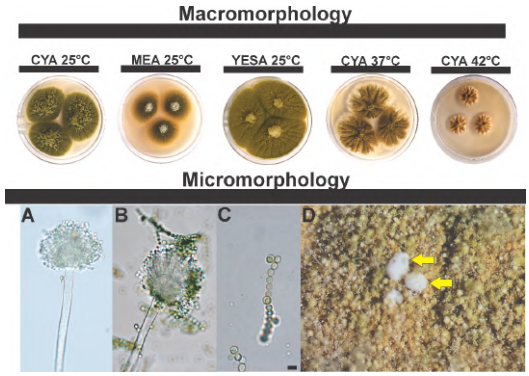


Figura 1: Morfología de la especie candidata G I. (A y B) Conidióforos; (C) Conidios (barra de escala de 5 µm); (D) Esclerocios (CYA 37 °C), las flechas amarillas indican estructuras.

AGRADECIMIENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Process 2018/25552–0; J. J. Silva grant # 2018/25597–3).

REFERENCIAS

[1] JJD Silva, BT Iamanaka, LS Ferranti, et al. Diversity within *Aspergillus niger* Clade and Description of a New Species: *Aspergillus vinaceus* sp. nov. *J. Fungi*, **2020**, 6(4), 371.

[2] DE Rosen. Fishes from the upland and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, **1979**, 162, 267–376.

[3] RA Samson, CM Visagie, J Houbraken, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.*, **2014**, 78, 141-173.

[4] JJ Silva, O Puel, S Lorber, et al. Occurrence and diversity of *Aspergillus* in commercial yerba mate elaborated for the Brazilian beverage 'chimarrão'. *Food Res. Int.*, **2019**, 121, 940-946.

[5] MB Pildain, JC Frisvad, G Vaamonde, et al. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2008**, 58725-735.

EVOLUCION CUANTITATIVA DE *CAMPYLOBACTER* A LO LARGO DE LA CADENA ALIMENTARIA. RIESGO ASOCIADO A LOS PREPARADOS Y PRODUCTOS CÁRNICOS DE AVES

Castaño Garrido M. A.[1], Sánchez Cánovas A. M.[1], Villa López M. I.[2], González González D.[2], Martínez Reina MA G.[1]

1 Consejería de Salud de Murcia/Laboratorio Regional de Salud Pública/Laboratorio de Microbiología.

2 Consejería de Salud de Murcia/Servicio de Seguridad Alimentaria y Zoonosis.

mangeles.castano@carm.es

INTRODUCCIÓN.- *Campylobacter* spp. es uno de los agentes zoonóticos presentes en alimentos más habitualmente relacionados con toxiinfecciones alimentarias en Europa, presentando una relativamente alta detección por encima de los límites legales (R.D 2073/2005), en canales y carne fresca de aves (broilers).

OBJETIVO.- Mostrar la evolución de este patógeno en la carne y productos cárnicos de aves, observada durante el periodo 2019-2021 en la Región de Murcia.

MATERIAL Y METODOS.- Para la detección y recuento de *Campylobacter* se pesan asépticamente X g (generalmente 10 g) del alimento y se añaden 9 X ml de agua de peptona tamponada (generalmente 90 ml). Se homogeniza en Stomacher 1 minuto. Se siembra esta dilución (1 ml de la suspensión madre sobre la superficie de tres placas de Agar mCCDA y 0,1 ml de la suspensión madre en la superficie de una placa de mCCDA). Las placas se incuban en microaerofilia a 41,5ºC ± 1ºC /44 ± 4 horas. En Agar mCCDA, *Campylobacter* forma colonias de color grisáceo, a menudo con un brillo metálico, planas y húmedas, con tendencia a extenderse. Se seleccionan las placas que contengan menos de 150 colonias típicas o sospechosas y se cuentan dichas colonias. Para la confirmación se escogen 5 colonias sospechosas de ser *Campylobacter* y se realiza un ensayo de aglutinación de látex.

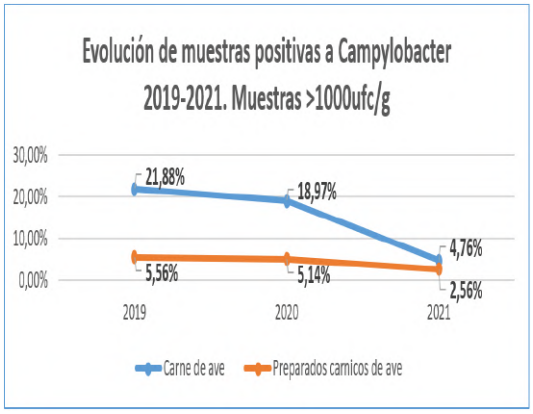
RESULTADOS.- Según los análisis realizados por el Laboratorio de la Dirección General de Salud Pública, correspondientes a las muestras pertenecientes al Programa de Vigilancia de Agentes Zoonóticos en Alimentos durante este periodo se compara la presencia de *Campylobacter* spp. en derivados cárnicos de ave (n=103 alimentos de primer procesado) y la carne fresca de estas especies (n=111) comercializados en esta CCAA (alimentos de primer procesado). Los resultados observados indican un nº de detecciones significativas de *Campylobacter* spp. consideradas como de riesgo crítico de infección (>1.000ufc/gr) en algunos productos tras el procesado primario de la carne (elaboración de preparados cárnicos), no encontrándose el patógeno en los productos cárnicos de aves examinados.

EVOLUCION DE MUESTRAS POSITIVAS A *CAMPYLOBACTER* POR AÑO Y TIPO DE PRODUCTO (>1000ufc/g)

ALIMENTOS	2019	2020	2021
Carne de ave	21,88%	18,97%	*4,76%
Preparados cárnicos de ave	*5,56%	5,14%	2,56%
Productos cárnicos ave*	0,00%	0,00%	0,00%

*El porcentaje obtenido tiene un valor relativo ya que el número de muestras analizado es bajo

En el siguiente gráfico se observa la evolución temporal de las prevalencias en el periodo de estudio.



CONCLUSIONES.- El riesgo identificado en los preparados cárnicos de aves no puede considerarse de alto impacto dado que los productos estudiados reciben mayoritariamente un tratamiento térmico previo a su consumo.

Este grupo de alimentos se ha identificado ocasionalmente implicado en ETAS, especialmente las hamburguesas "caseras" y los productos adobados, debido probablemente a la ineficacia de los tratamientos culinarios y/o a contaminaciones cruzadas.

Aunque el número de datos manejado no es excesivo, considerando en conjunto el periodo estudiado, nos permite aportar las tendencias mencionadas en las conclusiones.

AGRADECIMIENTOS

-Scharlab S.L.
-Personal técnico y auxiliar Laboratorio Microbiología

REFERENCIAS

[1] UNE-EN ISO 10272-2 "Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y la enumeración de Campylobacter spp. Parte 2: Técnica de recuento de colonias".

[2] Instrucciones del ensayo de aglutinación para Campylobacter. "Campylobacter spp. látex kit". Ref.MGNF46 AES Chemunex.

VIGILANCIA DE ESPECIES DE *VIBRIO* EN BIVALVOS COMERCIALIZADOS EN LA REGION DE MURCIA DURANTE EL PERIODO 2019-2021

Sánchez Cánovas M.A.[1], Castaño Garrido M. A.[1], García Ortúzar V.[2], Villa López M. I.[3], Martínez Reina M. G.[1]

1 Consejería de Salud de Murcia/Laboratorio Regional de Salud Pública/Laboratorio de Microbiología.

2 Consejería de Salud de Murcia/Servicio de Salud Pública de Lorca.

3 Consejería de Salud de Murcia/Servicio de Seguridad Alimentaria y Zoonosis.

ana.sanchez@carm.es

INTRODUCCIÓN.- En la aparición de 3 casos humanos de bacteriemia por *Vibrio cholerae* no -O1/no O139, en pacientes con multipatologías de base y tras las oportunas investigaciones epidemiológicas y análisis microbiológicos, se identificó como única evidencia de contacto con el patógeno la manipulación y/o consumo de moluscos bivalvos por los pacientes. Los datos bibliográficos, refieren que la presencia de diversas especies de *Vibrio* en aguas costeras no está asociada al cumplimiento normativo requerido para la comercialización de los moluscos bivalvos en la UE (R. 2073/2005). Se incorporó al Programa Oficial de Vigilancia de Patógenos en Alimentos la investigación de *V. cholerae* (especificación *Vibrio cholerae* no -O1) y *Vibrio parahemolyticus*, dada la similitud en los hábitats y sus condiciones de crecimiento.

OBJETIVO.- Planificar un muestreo a realizar en los periodos de mayor riesgo de presencia de estos patógenos e investigar la presencia de *Vibrio cholerae* no toxigénico no -O1 no O139 en moluscos bivalvos comercializados en Murcia para confirmar el posible origen de la infección.

MATERIAL Y MÉTODOS.- Se pesan X g (generalmente 25 g) del alimento y se añaden 9X ml de Agua de Peptona alcalina salina (225ml). Se homogeniza en Stomacher 1 minuto y se incuba a 41,5º C ± 1ºC durante 6 ± 1 horas. A continuación se transfiere 1ml del cultivo anterior a un tubo con 10ml de Agua de Peptona Salina alcalina (ASPW) y se incuba a 41,5ºC ± 1ºC durante 18 ± 1h.

Se siembra una alícuota del cultivo en el tubo con caldo APSW, con asa de cultivo estéril de 1µl sobre la superficie de una placa de Agar TCBS y otra alícuota en Agar ChromID *Vibrio*. Se Incuban las placas a 37ºC/21-27 h. Se examinan las placas para identificar la presencia de colonias típicas de *Vibrio* spp.

En Agar TCBS, *V. parahaemolyticus* aparecen con colonias lisas, de color verde, de 2-3mmm de diámetro y *V. cholerae* presenta colonias lisas, de color amarillo, de 1-2 mm de diámetro.

En Agar ChromID *Vibrio*, *V. parahaemolyticus* presenta colonias de color rosa y *V. cholerae*: colonias de color azul o verde azulado a verde.

Se resiembran las colonias sospechosas en placas de Agar Nutritivo salino (SNA) y se incuban a 37ºC ± 1ºC/24 ± 3 h. Se realizan las confirmaciones bioquímicas utilizando el sistema API20E.

Los resultados se expresan como Detectado ó No detectado/X g.

RESULTADOS.- Se han investigado un total de 55 muestras en estos 3 años, aislándose 3 positivos a *V. cholerae* y confirmándose la presencia de *V. cholerae* no-O1 no O139 en 1 de las muestras, en el año 2020 (1'8 %). V. parahemolyticus se investigó en 55

muestras, confirmándose 13 positivas (23´6 %).

En la siguiente tabla, se expresan en porcentaje los resultados analíticos obtenidos durante el periodo de estudio:

RESULTADOS DE MUESTRAS POSITIVAS 2019-2021. PORCENTAJE			
DETERMINACION ANALITICA	**2019**	**2020**	**2022**
Vibrio parahemolyticus	21,43%	30,00%	16,67%
Vibrio Cholerae* sensu lato	0,00%	10,00%	4,76%
*Las muestras identificadas como positivas se enviaron al CNM para la confirmación de la genoespecie buscada no O:1, no O139			

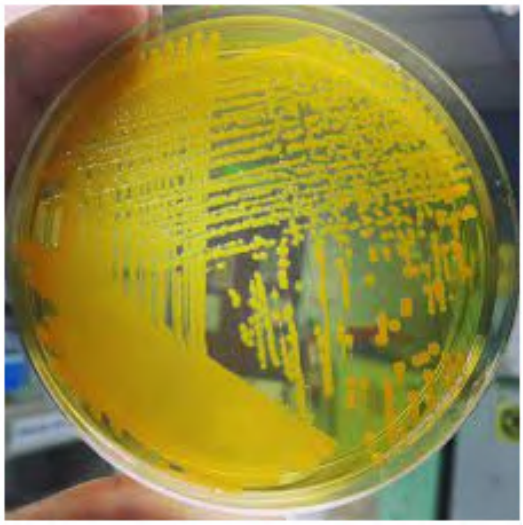


Figura 1: *V. cholerae* en Agar TCBS.

Figura 2: *V. parahaemolyticus* en Agar TCBS.

CONCLUSIONES.- La detección de *V. parahemolyticus* ha sido constante en estos años de estudio y puede indicar la presencia de *V. cholerae* no- O1.

La confirmación de la genoespecie de *V. cholerae* no-O1 no O139, fue realizada por el CNA y comunicada oportunamente a la AESAN.

Aunque la identificación de la especie diana no fue temporalmente coincidente con los casos humanos, sí ha confirmado como factible el posible origen de los mismos.

AGRADECIMIENTOS

Colegio Oficial Farmacéutico de la Región de Murcia, Scharlab S.L., Personal técnico y auxiliar Laboratorio Microbiología.

REFERENCIAS

[1] UNE-EN-ISO21872-1:2018: Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la determinación de *Vibrio* spp.

[2] Reglamento (CE) 2073/2005 de la Comisión, de 15 de Noviembre de 2005.

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS EN UNA COLECCIÓN DE CEPAS AISLADAS DE LANGOSTINO

Iglesias Valenzuela B., Pérez Pulido R., Martínez Cañamero M., Ortega Blázquez I., Ortega Morente E., Mena Ordoñez L., Grande Burgos MJ., Gálvez del Postigo A., Lucas López R.

Universidad de Jaén/ Facultad de Ciencias Experimentales/ Departamento de Ciencias de la Salud/ Área Microbiología/ Paraje las Lagunillas s/n 23071 Jaén.

rlucas@ujaen.es

La transmisión de microorganismos portadores de resistencias a antibióticos a traves de la cadena alimentaria es un motivo de preocupación. En este trabajo se ha aislado una colección de cepas a partir de muestras de langostino para posteriormente identificarlas y determinar los niveles de resistencias a diferentes antibióticos

Los alimentos procedentes de animales marinos pueden contener microorganismos portadores de resistencias, saprofitos o patógenos (1). Las principales causas de la selección de cepas resistentes en animales marinos se atribuyen a la contaminación antropogénica y al uso de antimicrobianos en acuicultura (2,3,4). Para controlar la transmisión de resistencias a antimicrobianos en la cadena alimentaria es importante evaluar la supervivencia y proliferación de microorganismos portadores de resistencias durante el procesado y la vida útil de los alimentos, especialmente en aquellos que se consumen crudos o ligeramente procesados. Entre los métodos de inactivación de microorganismos en alimentos destacan los tratamientos por alta presión hidrostática (APH), los cuales representan una buena alternativa a los tratamientos térmicos, mejorando la calidad microbiológica y disminuyendo el riesgo de transmisión de patógenos y la contaminación post-proceso (5,6).

El objeto de este estudio es identificar y determinar la presencia de cepas multirresistentes de langostino antes y durante el almacenamiento de las muestras tratadas por altas presiones hidrostáticas combinadas con calor.

Las muestras de langostino procedentes de diferentes establecimientos, se envasaron al vacío en bolsas termoselladas. Posteriormente fueron tratadas mediante altas presiones hidrostáticas a 250, 300 y 350 MPa durante 5 min. Los tratamientos se aplicaron por duplicado a temperaturas de 22ºC y de 45ºC. Tanto las muestras control como las tratadas se homogeneizaron para posteriormente realizar recuento y aislar colonias en diferentes medios de cultivo: PCA, MRS, TCSB, VRBGA, CFCA, y KLIGLER. Los aislados se identificaron mediante amplificación del rDNA 16S y análisis comparativo de las secuencias obtenidas. Se determinó el fenotipo de resistencia a antibióticos betalactámicos con discos de cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina, meropenem y amoxicilina clavulánico.

Se analizaron un total de 369 cepas obtenidas de las muestras de langostinos tratadas o no por APH y aisladas de diferentes medios de cultivo. En el estudio, mediante discos de antibióticos en Mueller Hinton, encontramos que, de las 369 cepas aisladas, un 51% eran resistentes a ceftazidima, un 34% mostraron resistencia a cefoxitina y cefotaxima, un 19% mostraron

resistencia a meropenem, y un 18% a amoxicilina con clavulánico (Fig.1).

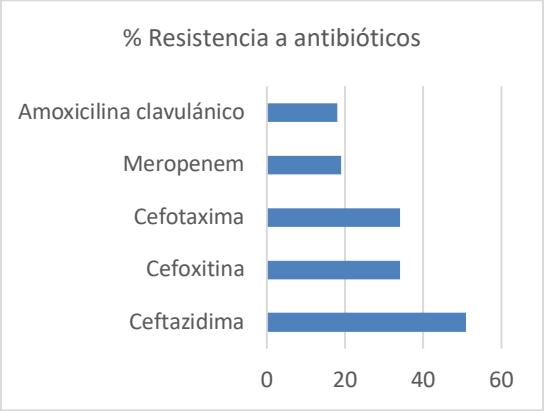


Figura 1: Porcentaje de cepas resistentes a antibióticos

En la identificación bacteriana se observó que destacaban 65 cepas identificadas como *Psychrobacter*, 44 se identificaron como *Vibrio*, 43 como *Shewanella*, 42 correspondían a *Carnobacterium*, 28 fueron identificadas como *Pseudoalteromonas,* 24 como *Aerococcus* y 21 de las 369 fueron identificadas como *Staphylococcus*. De igual modo se identificaron otras bacterias pero en menor número (Fig. 2).

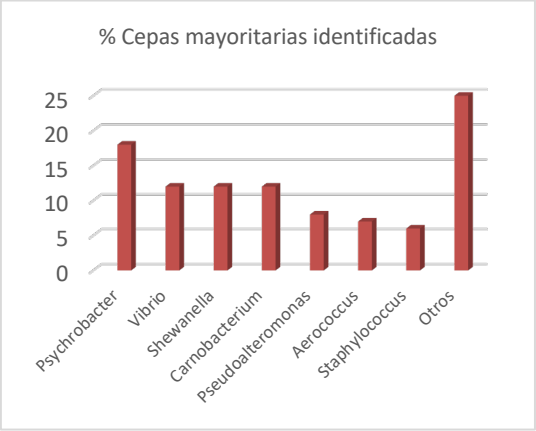


Figura 2: Porcentaje de cepas mayoritarias identificadas

Como conclusión, los resultados muestran la diversidad de cepas resistentes en las muestras marinas y la necesidad de estudiar la presencia de los genes responsables de dichas resistencias.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto 1260210 Consejería De Economía y Conocimiento-FEDER ANDALUCÍA 2014-2020. Grupo de investigación "Microbiología de los alimentos y del medio ambiente" AGR230.

REFERENCIAS

[1] S Elbashir, S Parveen, J Schwarz, M Jahncke, A DePaola, *Food Microbiol,* **2018,** 70, 85-93.

[2] FC Cabello, HP Godfrey, AH Buschmann, HJ Dolz, *Lancet Infect Dis,* **2016**, 16, e127–33.

[3] FAO, Antimicrobial resistance (AMR) in aquaculture, **2017**, COFI:AQ/IX/2017/SBD.11.

[4] Y Han, J Wang, Z Zhao, J Chen, H Lu, G Liu, *Environ Sci Technol,* **2017**, 51, 10850–10860.

[5] J Ronholm, F Lau, SK Banerjee, *Front Microbiol*, **2016**, 22, 7:350.

[6] CY Wang, HW Huang, CP Hsu, BB Yang, *Crit Rev Food Sci Nutr,* **2016**, 56, 527-40.

DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE MUESTRAS DE ALIÑO PROCESADAS O NO POR ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA

Javier Rodríguez López, Mª José Grande Burgos, Rubén Pérez Pulido, Belén Iglesias Valenzuela, Rosario Lucas López, y Antonio Gálvez

Universidad de Jaén/Departamento Ciencias de la Salud/Área de Microbiología. Campus Las Lagunillas s/n, Jaén, 23071

agalvez@ujaen.es

La contaminación microbiana de los alimentos puede producirse a través de diferentes fuentes [1, 2]. Los aderezos y condimentos se preparan a menudo en casa o en los servicios de restauración sin aplicar ningún tratamiento para inactivar los posibles microorganismos resistentes a antibióticos presentes [3]. En consecuencia, estos productos listos para ser consumidos pueden actuar como vehículos de transmisión de dichos microorganismos, por lo tanto, es necesario definir un proceso en el cual se controlen todos aquellos factores que afectan a la seguridad de los alimentos [4]. Dentro de este tipo de técnicas aplicadas en alimentos destaca los tratamientos con altas presiones hidrostáticas como método de conservación, cuya aplicación ha experimentado un crecimiento exponencial en la última década [5].

En el presente estudio, se preparó un aderezo, con cilantro y perejil como ingredientes principales, y se aisló una colección de 80 cepas para probar su resistencia a diferentes antibióticos. Para ello, se utilizaron los siguientes medios de cultivo suplementados o no con diferentes compuestos antimicrobianos: agar triptona-soja (TSA), agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGC), agar McConkey suplementado con cefotaxima o imipenem, agar Mueller Hinton (MH) suplementado con cloruro de benzalconio o cefotaxima y agar KPC con su suplemento específico.

Tras realizar la extracción de ADN de la colección de los 80 aislados, estos fueron identificados a nivel de especie mediante secuenciación del gen ribosómico 16S (rDNA). Un 38,75% fueron identificados como *Pseudomonas*, seguido de un 26,25% de *Bacillus*, ambos como grupos mayoritarios. El 15% pertenecían a *Paenibacillus*, y un 12,5% a *Lactobacillus*. Un 2,5% fueron identificadas como *Obesumbacterium*, y se identificó un solo aislado de *Aerococcus*, *Rahnella*, *Siccibacter* y *Staphylococcus* (Figura 1).

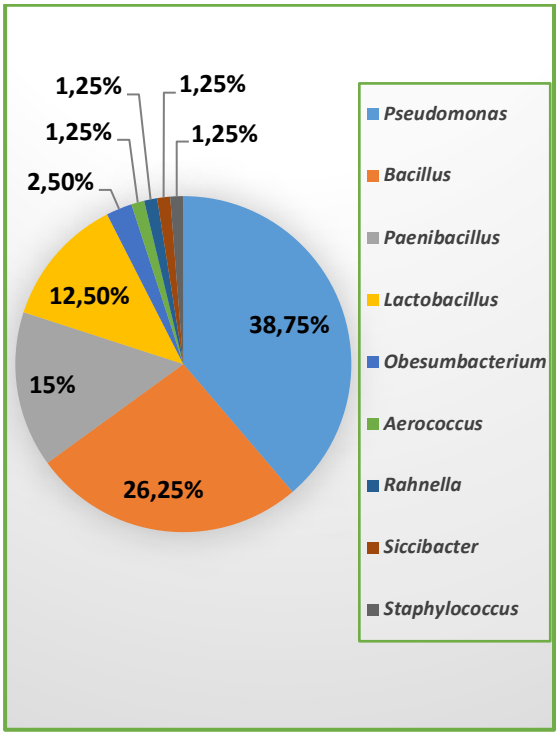


Figura 1: Identificación de especies aisladas en aliño.

Los resultados obtenidos en el ensayo de resistencias a antibióticos, mediante antibiograma, indicaron que, de las 80 cepas aisladas, 72 mostraron resistencia a cefotaxima (CTX), 59 a cefoxitina (FOX), 57 a eritromicina (E), 55 a amoxicilina clavulánico (AMC), 28 a ceftazidima (CAZ), 18 a cloranfenicol (C), 16 a kanamicina (K), 15 a las sulfonamidas (S3) y 13 a meropenem (MEM) (Figura 2).

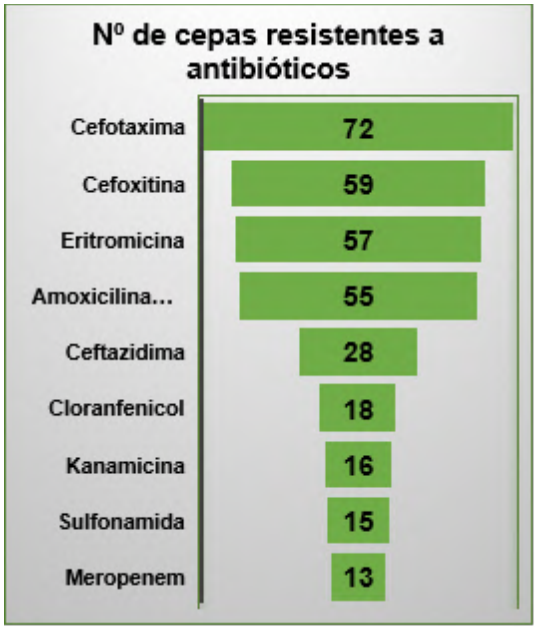


Figura 2: Número de especies aisladas del aliño que mostraron resistencia a los diferentes antibióticos utilizados.

Ninguno de los aislados mostró resistencia a los antibióticos ciprofloxacino, gentamicina o tetraciclina. Además, cabe destacar una cepa, identificada como *Pseudomonas*, la cual presentó resistencia a 7 de los 12 antibióticos ensayados (Tabla 1).

En conclusión, los resultados del presente estudio muestran la necesidad de investigar la presencia de los posibles determinantes genéticos de resistencia a los antibióticos adquiridos, así como la determinación de la posible correlación entre el fenotipo y genotipo de resistencia.

Identificación	Resistencia a antibióticos
Pseudomonas paralactis	-Amoxicilina-clavulánico -Ceftazidima -Cefoxitina -Cefotaxima -Kanamicina -Sulfonamida -Eritromicina

Tabla1: Perfil de multirresistencia más destacado encontrado en el estudio realizado con cepas bacterianas aisladas del aliño.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto AGL2016-77374-R (MINECO), Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (Acción 1 ayudas competitivas PAIUJA 2017-2018, PAIUJA 2019-2020 y PAIUJA 2021-2022; contratos predoctorales PIFPP/2017), y el Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeiA3).

REFERENCIAS

[1] S. Seo y K.R. Matthews. Food Microbiology, **2014**, 38, 87–92.

[2] J. Santamaría y G. A. Toranzos. International Microbiology, **2003**, 6(1), 5–9.

[3] C. N. Berger, S. V. Sodha, R. K. Shaw, P. M. Griffin, D. Pink, P. Hand, G. Frankel. Environmental Microbiology, **2010**, 12(9), 2385–2397.

[4] P. B. Sant'Anna, B. D. Melo Franco, D. F. Maffei. Journal of the Science of Food and Agriculture, **2020**, 100(13), 4664–4670.

[5] K. Aganovic, C. Hertel, R. F. Vogel, R. Johne, O. Schlüter, U. Schwarzenbolz, H. Jäger, T. Holzhauser, J. Bergmair, A. Roth, R. Sevenich, N. Bandick, S. E. Kulling, D. Knorr, K. Engel, V. Heinz. Food Science and Food Safety, **2021**, 90(3), 341–347.

ESTUDIO DE TOLERANCIA A METALES EN *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo 4,[5],12:i:-

Arrieta-Gisasola A.[1,2], Garaiburu-Ramos N.[1], Martínez-Malaxetxebarria I.[1,2], Martínez-Ballesteros I.[1,2], Bikandi J.[1,2], Garrido V.[3], Grilló M.J.[3], Laorden L.[1,2]

1 Universidad del País Vasco (UPV/EHU)/Facultad de Farmacia/Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología/Grupo de investigación MikroIker. 01006 Vitoria-Gasteiz, Álava.

2 Instituto de Investigación Sanitaria Bioaraba/Microbiología, Enfermedades Infecciosas, Agentes Antimicrobianos y Terapia Génica. 01006 Vitoria-Gasteiz, Álava.

3 Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-Gobierno de Navarra)/Grupo de Sanidad Animal. 31192 Mutilva, Navarra.

ainhoa.arrieta@ehu.eus

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es la segunda zoonosis de transmisión alimentaria más reportada en humanos en Europa, siendo la variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) el principal serotipo detectado en España[1]. Tras lograr el control de *Salmonella* spp. en aves, los productos de origen porcino son la principal fuente de infección para el ser humano. Desde 2015, la prevalencia de *Salmonella* 4,[5],12:i:- ha aumentado en el ganado porcino a nivel europeo[2], hecho que pudiera asociarse a la tolerancia de *Salmonella* 4,[5],12:i:- a los metales empleados en el sector porcino, donde su uso está permitido como aditivos en piensos[3]. En este contexto, los metales más utilizados son el zinc y el cobre[4], habiéndose descrito la presencia de mercurio como contaminante[5]. Además, en ocasiones, la plata se emplea como desinfectante, antiséptico o conservante[6].

OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio fueron (i) analizar la tolerancia frente a $AgNO_3$ y $HgCl_2$ en cepas de *Salmonella* 4,[5],12:i:-, (ii) analizar la presencia de genes *silA* y *silE* de resistencia a plata y el gen *merA* de resistencia a mercurio y (iii) evaluar la posible relación entre la presencia de elementos genéticos móviles (EGM) portadores de dichos genes y la tolerancia de *Salmonella* frente a los metales analizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se seleccionaron 28 cepas monofásicas de *Salmonella* 4,[5],12:i:- y 4 cepas de *S*. Typhimurium aisladas de cerdos asintomáticos (n=11) y de casos clínicos humanos (n=17). La selección se realizó basándose en la formula antigénica, fagotipo y perfil de resistencia a antibióticos. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del $AgNO_3$ y $HgCl_2$ se determinó por el método de dilución en caldo. La cepa *S*. Typhimurium ATCC 14028 se utilizó como control negativo.

Todas las cepas fueron secuenciadas mediante Illumina MiSeq. Se analizó en primer lugar la presencia de genes de resistencia a plata (*silA* y *silE*) y mercurio (*merA*), así como la localización de dichos genes en la isla genómica 4 de *Salmonella* (SGI-4)[7], plásmido pUO-STmRV1[8] y plásmido pUO-STVR2[9]. Para localizar los genes de aquellas cepas positivas en las que no pudo determinarse su localización en alguno de los EGM citados, se realizó un análisis comparativo empleando las secuencias disponibles en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

RESULTADOS

Los análisis bioinformáticos revelaron la presencia de *silA* y *silE* en 22 cepas (21 cepas monofásicas y una cepa *S*. Typhimurium). En 8 cepas monofásicas, estos genes de resistencia se localizaron en el plásmido

pUO-STmRV1, mientras que en las 14 cepas restantes, se localizaron en la isla SGI-4. Entre las cepas portadoras del plásmido pUO-STmRV1, 7 mostraron valores de CMI iguales a los de la cepa control (32 µM) y la cepa restante, un valor doble (64 µM). Sin embargo, entre las cepas portadoras de la isla SGI-4, 13 mostraron valores de CMI entre 2 y 8 veces superiores (64-256 µM) al de la cepa control y solo una el mismo valor (32 µM).

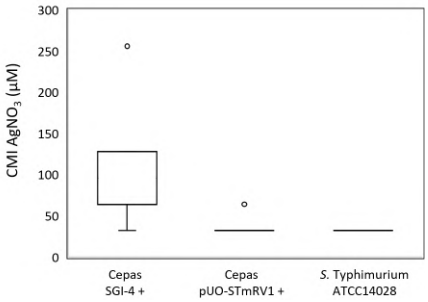


Figura 1: Diagrama de cajas de valores mínimos y máximos de CMI al $AgNO_3$ en cepas portadoras de los genes *silA* y *silE* en SGI-4 (n=14) o pUO-STmRV1 (n=8) y en la cepa control *S*. Typhimurium ATCC 14028. Los círculos representan los valores atípicos.

El gen *merA* de resistencia al mercurio se detectó en 15 cepas monofásicas y en 2 cepas *S*. Typhimurium. En 8 de las cepas monofásicas se detectó en el plásmido pUO-STmRV1, mientras que en las 2 cepas *S*. Typhimurium el gen se localizó en el plásmido pUO-STVR2. En las restantes 7 cepas monofásicas no se pudo determinar la localización del gen en ninguno de los EGM analizados. En estas cepas, no se encontró ninguna similitud entre las secuencias adyacentes a dicho gen y los EGM disponibles hasta la fecha en las bases de datos del NCBI.

Independientemente de su localización, 16 de las cepas portadoras del gen *merA* mostraron una CMI al $HgCl_2$ de 8-16 µg/ml, i.e. entre 2-4 veces superior a la CMI de la cepa control (4 µg/ml) (Figura 2). La cepa restante, con presencia del gen *merA* en el plásmido pUO-STmRV1, mostró el mismo valor de CMI que la cepa control.

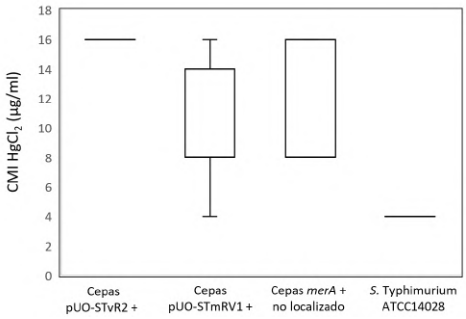


Figura 2: Diagrama de cajas de valores mínimos y máximos de CMI al $HgCl_2$ en cepas portadoras del gen *merA* en pUO-STVR2 (n=2), pUO-STmRV1 (n=8) o en localización no determinada (n=7) y en la cepa control *S*. Typhimurium ATCC 14028.

CONCLUSIONES

La alta prevalencia de elementos genéticos móviles que confieren tolerancia frente a metales podría ser una de las causas de la adaptación y el éxito evolutivo de *Salmonella* 4,[5],12:i:- en el sector porcino. Actualmente, se están realizando nuevos estudios para determinar la implicación de los EGM estudiados en la resistencia frente a otros metales como cobre, zinc y arsénico.

Además, determinar la ubicación del gen de resistencia *merA* se convierte en un reto importante en las cepas *Salmonella* 4,[5],12:i:- de esta colección, ya que podría estar localizado en un EGM no descrito hasta la fecha.

AGRADECIMIENTOS

A. Arrieta-Gisasola agradece a la UPV/EHU por su contrato predoctoral.

REFERENCIAS

[1] EFSA, ECDC. *EFSA Journal,* **2021**,19(12).

[2] EFSA, ECDC. *EFSA Journal*, **2021**, 19(2).

[3] Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003. Publications Office of the European Union, 2022.

[4] L. Petrovska, et al. *Emerging Infectious Diseases*, **2016**, 22(4), 617-624.

[5] EFSA, ECDC. *EFSA Journal*, **2008**, 654, 1-76.

[6] J. Mourão, et al. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2015**, 45(6), 610-616.

[7] P. Branchu, et al. *Frontiers in microbiology*, **2019**, 1118.

[8] X. Vázquez, et al. *Sci. Rep.*, **2021**, 11(1), 1-9.

[9] A. Herrero, et al. *Antimicrob. Agents Chemother*., **2008**, 52(12), 4514-7.

CINÉTICA DE ACTIVACIÓN Y GERMINACIÓN DE ESPOROS DE *B. weihenstephanensis* FRENTE A TRATAMIENTOS FÍSICOS Y QUÍMICOS

Salvador M., Ruiz V., Gayán E., Condón S.

Universidad de Zaragoza-Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2)/Facultad de Veterinaria/Depto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Tecnología de los Alimentos. C/Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza. scondon@unizar.es

El control de los esporos bacterianos supone un gran desafío en la conservación de los alimentos, ya que para su inactivación generalmente se aplican tratamientos térmicos de esterilización que reducen considerablemente la calidad del alimento. Por ello, la industria alimentaria requiere el diseño de métodos de erradicación más respetuosos, como los tratamientos basados en germinación-inactivación, los cuales primero inducen la germinación para aprovechar la pérdida de resistencia de las células germinantes mediante métodos de inactivación moderados. Para el desarrollo de tratamientos de germinación-inactivación efectivos es de vital importancia conocer la cinética de germinación inducida por distintos agentes de conservación, la cual ha sido escasamente estudiada, especialmente en aislados naturales. En esta investigación, se estudió la dinámica de germinación de una cepa aislada de alimentos de *Bacillus weihenstephanensis* frente a un tratamiento de altas presiones hidrostáticas (APH), ácido y alcalino.

Los tratamientos de APH (< 600 MPa) son capaces de inducir la germinación a través de la activación de los receptores de germinación[1]. Por ello, se estudió el efecto de un tratamiento a 400 MPa en la supervivencia de los esporos de *B. weihenstephanensis* mediante recuento en placa (agar nutritivo) antes y después de un tratamiento de pasteurización (75°C, 10 min) para estimar el número total de células (esporos y células germinadas) y de esporos, respectivamente. Se observó una caída rápida de la supervivencia antes y después del tratamiento de pasteurización de aproximadamente un 60%, seguida de un hombro de 6 min donde el recuento se mantuvo constante, y a partir del min 10, la supervivencia se redujo exponencialmente con el tiempo (Fig. 1). Sin embargo, los recuentos de esporos (tras el tratamiento de pasteurización) sufrieron una caída de un ciclo logarítmico adicional a partir del min 15 de tratamiento, lo que sugería la coexistencia de esporos en distintas fases de germinación: unos en una fase tal que los sensibiliza al calor, pero no a la presión, y otros en una fase tal que los sensibiliza frente a ambas tecnologías.

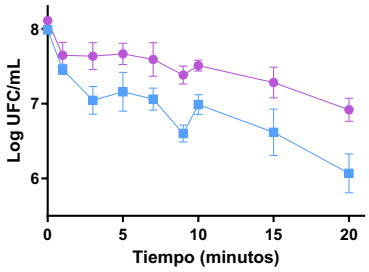


Figura 1. Germinación de *B. weihenstephanensis* con un tratamiento de APH (400 MPa): curvas de supervivencia antes (●) y después (■) de pasterizar (75°C, 10 min).

Por otro lado, se estudió el efecto de un tratamiento ácido (HCl, 1N) o alcalino (NaOH, 1 N) en la supervivencia y germinación de los esporos mediante recuento en placa y la liberación de ácido dipicolínico (DPA) del interior de los esporos por espectrofotometría (270 nm) (Fig. 2).

En la Fig. 2A se observa que el tratamiento con HCl redujo exponencialmente la supervivencia alcanzando una inactivación del 99,99% a los 60 min de tratamiento. Sin embargo, la salida de DPA fue prácticamente lineal liberándose hasta un

80% a los 60 min. Esta salida es similar a la observada en *B. subtilis* (85%) por otros autores[2].

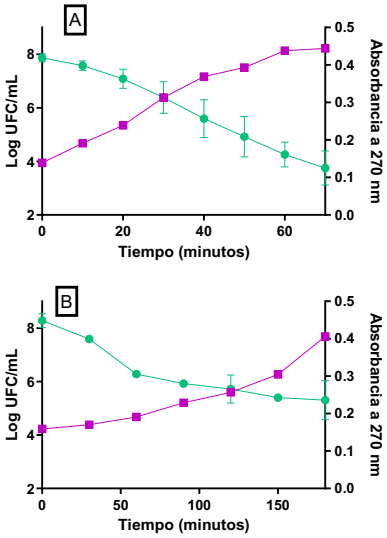


Figura 2. Supervivencia de los esporos de *B. weihenstephanensis* (●) y liberación de DPA (■) durante el tratamiento con HCl 1 N (A) y NaOH 1 N (B).

Por el contrario, durante el tratamiento con NaOH, la salida de DPA ocurrió más lentamente, puesto que a los 120 min se había liberado menos de un 50% coincidiendo con una pérdida de viabilidad del 99,9% (Fig. 2B). Aun así, esta salida fue mayor a la observada por otros autores en *B. subtilis* donde tan solo se liberaba un 10%[2]. Dado que el NaOH parece afectar a las enzimas líticas del córtex (CLEs)[2], se decidió estudiar el efecto de un tratamiento con lisozima o dipicolinato cálcico (Ca-DPA) en la supervivencia de los esporos tratados con NaOH. Así, se observó el restablecimiento de la supervivencia en ambos casos (Fig. 3), indicando que el tratamiento con NaOH prevenía la germinación debido a la inactivación de las CLEs.

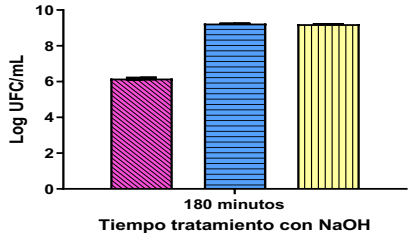


Figura 3. Recuento de esporos expuestos a NaOH (1 N, 180 min) antes (▨) y después de un tratamiento con lisozima (▬) o Ca-DPA (▥).

Como la liberación de DPA fue más rápida en presencia de HCl, se estudió la resistencia de los esporos tratados subletalmente con HCl (1N, 10 min) frente a un tratamiento térmico moderado (70°C-80°C, 0,25-2,00 min) (Fig. 4). Así, se observó una inactivación casi instantánea a todas las temperaturas de una subpoblación, lo que sugería que el tratamiento con ácido podría inducir la germinación. Sin embargo, la magnitud de la población termosensible varió con la temperatura de tratamiento, lo que evidenciaba la coexistencia de células en diferentes estadíos de germinación.

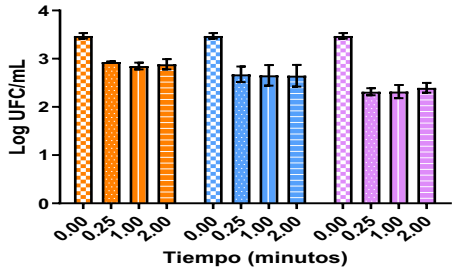


Figura 4. Inactivación de *B. weihenstephanesis* tras un tratamiento subletal de HCl (1 N, 10 min) y un posterior tratamiento térmico: 70°C (▬), 75°C (▬) y 80°C (▬) durante 0 (▩), 0,25 min (▩), 1,00 min (▥) y 2,00 min (▤).

En conclusión, mientras que un tratamiento con APH es capaz de inducir completamente la germinación de una fracción de esporos de *B. weihenstephanensis*, un tratamiento subletal con ácido podría favorecer la germinación de forma breve y heterogénea antes de su inactivación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por un proyecto CICYT (AGL 2015-69565-P), FEDER, FSE, Oficina Aragonesa de Ciencia, Tecnología y Universidad, y por un proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación–Agencia Estatal de Investigación (PID2019-104712RA-100). M. Salvador es beneficiaria de una beca predoctoral (2020) del Gobierno de Aragón (DGA).

REFERENCIAS

[1] K. Reineke, A. Mathys, V. Heinz, D. Knorr, Trends *Microbiol.*, **2013**, *21*, 296-304.

[2] B. Setlow. C.A. Loshon, P.C. Genest, A.E. Cowan, C. Setlow, P. Setlow, *J. Appl. Microbiol.*, **2002**, *92(2),* 362-375.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE GluLm Y SU PAPEL EN LA DEGLICOSILACIÓN DE FLAVONOIDES Y SECOIRIDOIDES EN ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Curiel J. A., Peirotén Á., Langa S., Blasco L., Landete J. M.
Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC), Carretera de La Coruña Km 7,5, 28040, Madrid, España.
joseantonio.curiel@inia.csic.es

Las propiedades saludables de los polifenoles son limitadas debido a que se encuentran principalmente en forma glicosilada y, por tanto, sus efectos dependen de su transformación en derivados más biodisponibles. En este sentido, existe una tendencia creciente hacia el uso de enzimas β-glucosidasas con el objetivo de mejorar la concentración y biodisponibilidad de compuestos bioactivos en alimentos de origen vegetal [1].
Limosilactobacillus mucosae INIA P508 es una bacteria láctica (BAL) aislada de heces de lactantes que se caracteriza por exhibir actividad β-glucosidasa capaz de deglicosilar flavonoides precursores produciendo compuestos bioactivos como quercetina, naringenina, kaempferol, eriodictiol, daidzeína y genisteína [2]. Con el fin de identificar genéticamente la enzima β-glucosidasa responsable, se identificaron *in silico* varios genes putativos en el genoma de *L. mucosae* INIA P508 que se clonaron en varias cepas de BAL utilizando el vector pNZ:TuR, explorando posteriormente su actividad glucosidasa sobre flavonoides [3]. Aquellas cepas heterólogas que expresaron el gen *glu_913* de *L. mucosase* INIA P508 exhibieron actividad β-glucosidasa similar a la de la cepa *L. mucosae* INIA P508 y pudieron catalizar de manera eficiente la deglicosilación de isoflavonoides, flavonas y flavanonas. Sin embargo, las propiedades bioquímicas de la enzima Glu_913 (en adelante GluLm) aún eran desconocidas.

Este estudio describe la caracterización bioquímica de la enzima β-glucosidasa GluLm recombinante de *L. mucosae* INIA P508. Se obtuvo un alto rendimiento de GluLm recombinante purificada (14 mg/L, **Figura 1**).

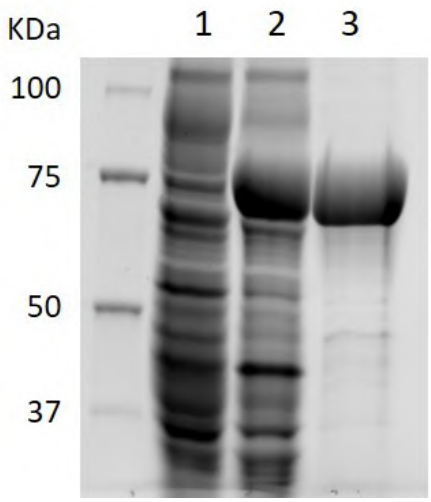


Figura 1. Análisis de la expresión y purificación de la enzima GluLm procedente de *L. mucosae* INIA P508. Extractos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) pLATE31 inducida por IPTG, línea 1; extractos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) GluLm inducida por IPTG, línea 2; fracción de GluLm eluida después de la columna de afinidad quelante His, línea 3. Gel SDS-PAGE sin teñir (7.5 %) revelado mediante detección fluorescente (ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad, Richmond, CA).

La enzima mostró actividad óptima en amplios rangos de pH (5.0-8.0) y temperatura (25-60ºC), aunque no logró mantener la actividad después de 24 h de incubación a 25ºC (**Figura 2**). Los iones Ca^{2+} incrementaron la actividad β-glucosidasa,

mientras que $FeCl_3$, glucosa, $MgCl_2$ y $MnCl_2$ no afectaron la reacción.

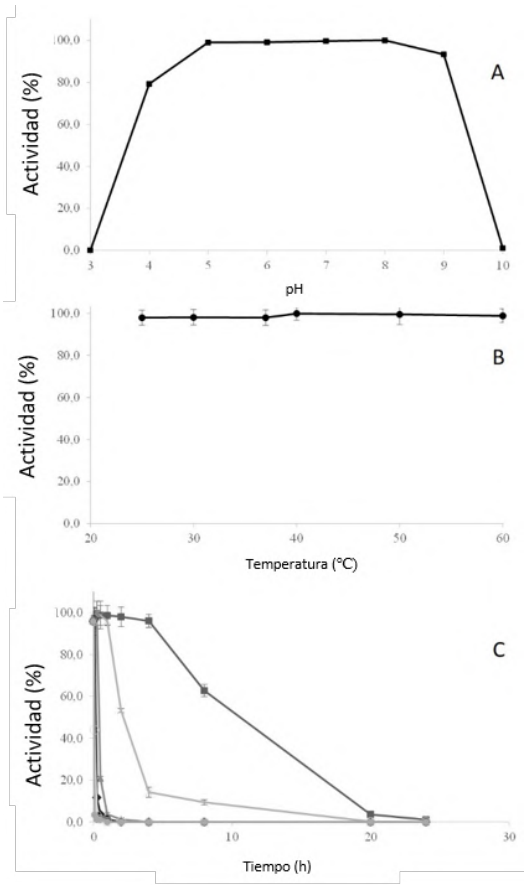


Figura 2. Propiedades bioquímicas de GluLm recombinante. (A) Actividad relativa de GluLm bajo diferentes pH. La actividad enzimática se ensayó a 37ºC durante 5 min. (B) Actividad relativa de GluLm a diferentes temperaturas. La actividad enzimática se ensayó a pH 7.0. (C) Actividades residuales de la GluLm recombinante después de la preincubación a 25 °C (■), 30 °C (×), 37 °C (▲), 40 °C (♦), 50 °C (○) y 60 °C (●). La actividad máxima se definió como el 100% en todos los casos.

De manera similar a otras GH3 β-glucosidasas descritas a partir de BAL, GluLm exhibió actividades de β-xilosidasa, β-galactosidasa y β-fucosidasa. Sin embargo, esta es la primera vez que una β-glucosidasa GH3 se caracteriza por hidrolizar diferentes familias de fenoles glicosilados como flavonoides y secoiridoides. Teniendo en cuenta las actividades subyacentes observadas, se puede considerar a GluLm como una enzima β-glucosidasa inespecífica que presenta alta afinidad (K_m de 0.10 mmol L^{-1}) y constante específica (86554.0 mmol L^{-1} s^{-1}) frente a *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranósido (**Tabla 1**).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de GluLm recombinante frente a diferentes sustratos derivados de *p*-nitrofenol.

	K_m (mmol L^{-1})	V_{max} (µmol min^{-1})	K_{cat}/K_m (mmol L^{-1} s^{-1})
pNPG	0.10 ±0.01	33.78 ±2.54	86554.0
pNPGAL	2.81 ±0.18	0.86 ±0.05	41.9
pNPBFU	1.03 ±0.04	1.64 ±0.09	217.5
pNPAFU	2.82 ±0.24	0.06 ±0.00	2.75
pNPXYL	0.76 ±0.05	4.07 ±0.04	728.6

pNPG, *p*-nitrofenil β-D-glucopiranósido; pNPGAL, *p*-nitrofenil β-D-galactopiranósido; pNPBFU, *p*-nitrofenil β-D-fucopiranósido; pNPAFU, *p*-nitrofenil α-L-fucopiranósido; pNPXYL, *p*-nitrofenil β-D-xilopiranósido

En conclusión, las propiedades bioquímicas descritas en este estudio respaldan el interés en la aplicación tanto de GluLm y como de *L. mucosae* INIA P508 para dirigir la biotrasformación de una amplia gama de precursores glicosilados, presentes en alimentos de origen vegetal, en compuestos más biodisponibles y bioactivos.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por PID2020-119630RB-I00 y RYC2019-026368-I del Ministerio de Ciencia e Innovación de España..

REFERENCIAS

[1] Ruiz de la Bastida, A., Peirotén, A., Langa, S., Álvarez, I., Arqués, J. L., Landete, J. M. *Food Res. Int.*, **2021**, 147, 110488.

[2] Bravo, D., Peirotén, A., Álvarez, I., Landete, J. M. *J. Funct. Foods*, **2017**, 37, 373–378

[3] Gaya, P., Peirotén, A., Landete, J. M. *Appl. Microbiol. Biotechnol,*. **2020**, 104, 4903–4913.

EFECTOS DE UNA BEBIDA DE SOJA FERMENTADA POR *BIFIDOBACTERIUM PSEUDOCATENULATUM* INIA P815 EN LA FERTILIDAD Y PERFIL LIPÍDICO EN UN MODELO MURINO DE PRE-MENOPAUSIA

Ana Ruiz de la Bastida[1], Susana Langa[1], Ángela Peirotén[1], Raúl Fernández-Gonzalez[2], Abel Sánchez-Jiménez[3], María Maroto Oltra[2], Juan Luis Arqués[1], Alfonso Gutierrez-Adan[2], José María Landete[1]

[1] Departamento de Tecnología de Alimentos. [2] Departamento de Reproducción Animal. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC). Carretera de La Coruña Km 7.5, 28040, Madrid.

[3] Departamento de Matemática Aplicada (Biomatemática), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. C/José Antonio Novais 12, 28040, Madrid.

ana.ruiz@inia.csic.es

La premenopausia es la transición del período reproductivo al no reproductivo que generalmente comienza entre 5 y 10 años antes de la menopausia. La premenopausia también está asociada, entre otros efectos, con una disminución de la fertilidad y un aumento de los triglicéridos y colesterol. Desde hace años, los ginecólogos recomiendan el consumo de isoflavonas para mejorar los síntomas asociados tanto con la menopausia como con la premenopausia.

En este trabajo, una bebida de soja fue fermentada por *Bifidobacterium pseudocatenulatum* INIA P815, bacteria que mejora la biodisponilidad y los niveles de las isoflavonas presentes en la bebida de soja[1], y fue administrada a ratonas envejecidas cíclicas (modelo murino de premenopausia) y ratonas no cíclicas (menopausia). Se emplearon ratones hembras C57BL6 de 9-10 meses divididas en cíclicas y no cíclicas, y a su vez subdivididas en función del tratamiento a recibir: sin tratamiento (CNT), tratadas con bebida de soja (SB) y tratadas con bebida de soja fermentada (FSB). Estos tratamientos se administraron durante 36 días para, posteriormente, estudiar a tiempo final los cambios producidos en el peso de las ratonas, la fertilidad, el perfil lipídico, y los niveles de proteína C reactiva (CRP), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) e isoflavonas presentes en suero. El trabajo fue completado con un análisis metagenómico y un análisis transcriptómico del hígado.

Los pesos de las ratonas se mantuvieron durante todo el periodo de tratamiento. Al finalizar el periodo de tratamiento, se detectó la presencia de las agliconas daidzeina y genisteina en los sueros de las ratonas tratadas con FSB y SB. También se detectó la presencia de estas agliconas en el hígado y la grasa ovárica de las ratonas tratadas, si bien estos niveles fueron muy bajos.

		COLESTEROL (mg/dL)	TRIGLICERIDOS (mg/dL)
		TF	TF
Ratonas cíclicas	*CNT*	80,75 ± 19,87[a]	96,39 ± 21,83[a]
	FSB	80,12 ± 9,66[a]	86,65 ± 35,93[a]
	SB	86,75 ± 20,89[a]	99,75 ± 25,85[a]
Ratonas no cíclicas	*CNT*	82,25 ± 23,88[a]	80,49 ± 25,43[ab]
	FSB	88,16 ± 29,56[a]	65,85 ± 20,82[a]
	SB	83,09 ± 18,91[a]	90,6 ± 43,37[b]

Tabla 1: Perfil lipídico. Niveles de colesterol y triglicéridos totales en suero a tiempo final.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de colesterol total detectados

en suero entre los diferentes grupos. Sin embargo, en el caso de los triglicéridos totales en suero, las ratonas tratadas con el tratamiento FSB mostraron menores concentraciones frente a las ratonas tratadas con el tratamiento SB y las controles.

Mientras que los niveles de IL-6 no sufrieron cambios significativos en ninguno de los grupos de ratonas, sí que se observó un leve aumento de los niveles de TNF-α en las ratonas cíclicas y no cíclicas tratadas con el tratamiento FSB, el cual podría asociarse a un efecto inmuno-estimulante de la bebida fermentada. También se aprecio un leve aumento de CRP en las ratonas no cíclicas tratadas con el tratamiento FSB.

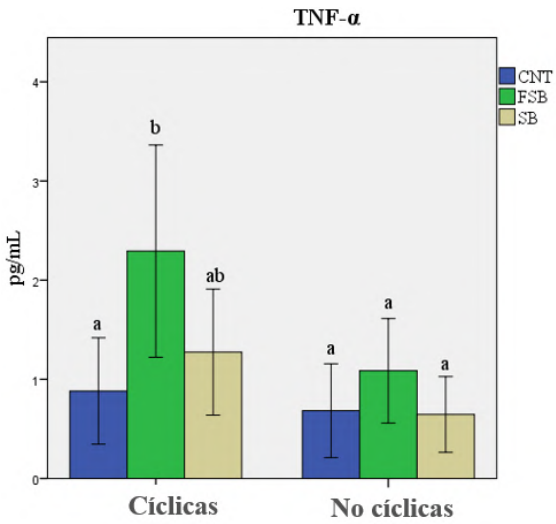


Figura 1: Niveles de TNF-α en suero a tiempo final.

Uno de los efectos más destacados del tratamiento FSB se observó en la fertilidad de las ratonas cíclicas, donde se dio un aumento significativo de la respuesta ovárica, visto en el número de ovocitos recuperados, mientras que en las ratonas cíclicas tratadas con SB no se observó ningún efecto en la fertilidad.

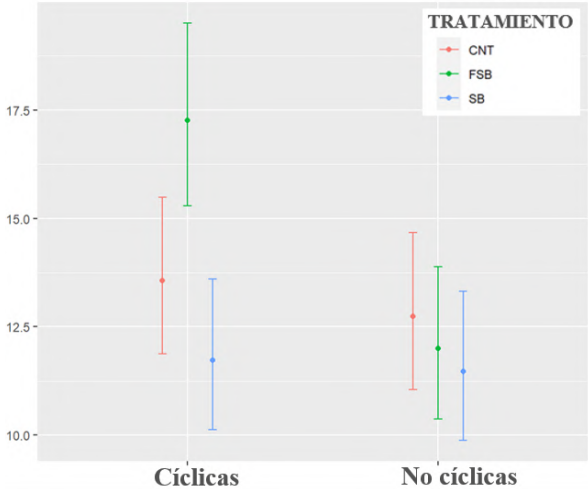


Figura 2: Número de ovocitos recuperados.

Finalmente, en los estudios de metagenómica se observaron mayores niveles de los géneros *Ruminococcus* y *Clostridium* (*Firmicutes*) en las ratonas no cíclicas tratadas con FSB.

La bebida de soja fermentada por *B. pseudocatenulatum* INIA P815 mejoró la fertilidad y el perfil lipídico de un modelo murino de pre-menopausia. Esta bebida vegetal fermentada tendría un elevado potencial como alimento funcional en mujeres que están finalizando su periodo reproductivo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID2020-11960RB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación de España. Ana Ruiz de la Bastida es beneficiaria de un contrato predoctoral (PRE2018-086293).

REFERENCIAS

[1] A. Ruiz de la Bastida, A. 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 – Food Sci. Technol., 2022, 154, 112872.

MICROBIOTA INTESTINAL, HIPERTENSIÓN Y SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRARRENAL

Hidalgo M[1], Segarra AB[2], García-Asenjo R[2], Martínez-Cañamero M[1], Ramírez-Sánchez M[2], Prieto I[2].

1 Universidad de Jaén/Facultad de Ciencias Experimentales/Departamento de Ciencias de la Salud/Área de Microbiología. Campus las Lagunillas s/n 23071. Jaén. España.

2 Universidad de Jaén/Facultad de Ciencias Experimentales/Departamento de Ciencias de la Salud/Área de Fisiología. Campus las Lagunillas s/n 23071. Jaén. España.

iprieto@ujaen.es

Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado la vinculación entre la cantidad/calidad de grasa administrada con la dieta, los cambios en la microbiota intestinal y la alteración de variables fisiológicas, entre las que destacan las modificaciones en los valores de Presión Arterial Sistólica (PAS) (1).

El Sistema Renina Angiotensina (SRA) (Figura 1) es uno de los principales reguladores de los valores de presión arterial, tanto a nivel sistémico (2) como local en distintos órganos, principalmente los riñones (3). Alteraciones en el SRA intrarenal se han vinculado con el desarrollo de hipertensión, y los cambios renales se han relacionado con modificaciones en la microbiota intestinal (4).

La administración de una dieta enriquecida al 20% en mantequilla durante tres meses incrementaba significativamente los valores de PAS en ratones Swiss Webster. Entre las especies aisladas de las heces de los ratones del grupo mantequilla destacó, por su relación con la PAS, *Enterococcus faecalis* Ac7- 73.

El objetivo del presente trabajo fue constatar el efecto de la administración oral de *Enterococcus faecalis* Ac7- 73 en ratones sobre la regulación de la PAS, y la posible participación de cambios en el Sistema Renina Angiotensina intrarenal.

Enterococcus faecalis Ac7- 73 fue administrado seis semanas a un grupo de ratones Swiss Webster. Paralelamente se determinaron los valores de PAS al principio, punto medio y final del periodo experimental, tanto del grupo problema como de su grupo placebo. Transcurridas las seis semanas, todos los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de riñón.

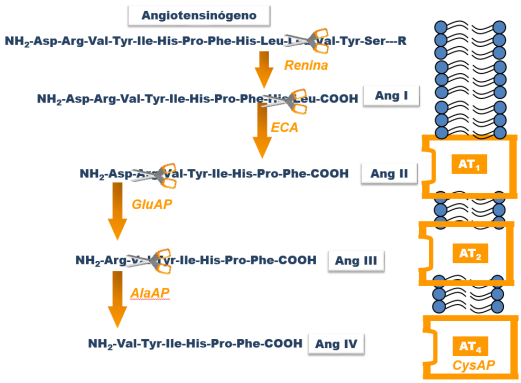


Figura 1: Cascada del SRA donde se indican los péptidos y las enzimas que participan.

Las muestras de riñón fueron homogenizadas, separándose las fracciones solubles y unidas a membrana. En cada fracción se determinaron por métodos fluorimétricos las actividades de distintas Aminopeptidasas relacionadas con la cascada del Sistema Renina–Angiotensina.

El análisis estadístico de los resultados demostró que, aunque no había diferencias significativas en los valores de PAS iniciales, los valores medios de grupo problema fueron estadísticamente superiores, tanto en el punto medio como al final del periodo experimental (Figura 2).

Paralelamente, se detectó un aumento significativo de las actividades Glutamato y Cistina Aminopeptidasa en los ratones que fueron inoculados con *Enterococcus faecalis* Ac7- 73,

específicamente en la fracción de membrana (Figura 3) pero no en la soluble (datos no mostrados).

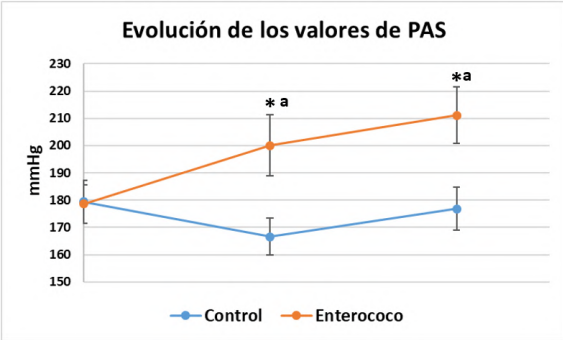


Figura 2: Evolución de los valores de Presión Arterial. *p<0,05 diferencias entre grupos.
[a] p<0,05 diferencia respecto a los valores iniciales.

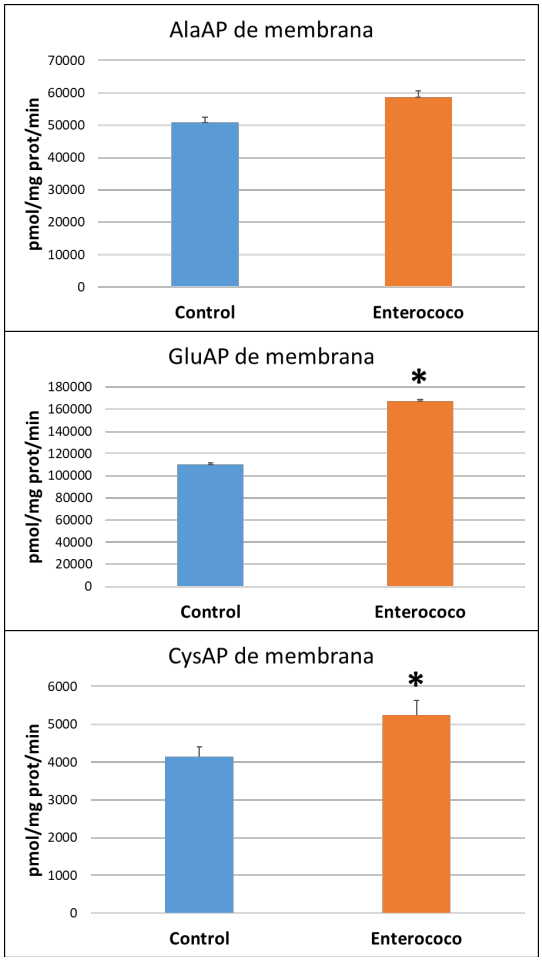


Figura 3: Valores medios ±ESM de las actividades Aminopeptidasas renales en la fracción membrana. *p<0,05.

Estos datos ponen de manifiesto la implicación directa de determinadas modificaciones en la microbiota intestinal sobre el desarrollo de la hipertensión arterial, al tiempo que establecen una relación con cambios en actividades enzimáticas moduladoras del SRA intrarenal, sistema que se sabe está íntimamente relacionado con las modificaciones en los valores de PAS que conducen al desarrollo de hipertensión. El aumento en la actividad GluAP indicaría una activación del RAS intrarenal, con mayores concentraciones de AngII y de los péptidos derivados de su metabolismo (AngIII y AngIV). El incremento de la actividad CysAP sería coherente con una mayor concentración de AngIV, péptido para el que actúa como receptor, y con un aumento en el metabolismo de la vasopresina.

Nuestros resultados inciden en la importancia de la grasa dietética en el desarrollo de la hipertensión, y en el posible papel de la microbiota intestinal como diana terapéutica para esta enfermedad crónica de gran prevalencia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen su colaboración al Centro de Experimentación y Producción Animal de la Universidad de Jaén.

REFERENCIAS

[1] Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One. 2018, 2, 13(1):e0190368.

[2] Prieto I, Hermoso F, de Gasparo M, Vargas F, Alba F, Segarra AB, Banegas I, Ramírez M. Aminopeptidase activity in renovascular hypertension. Med Sci Monit. 2003, 9(1):BR31-6. PMID: 12552234.

[3] Domínguez-Vías G, Segarra AB, Ramírez-Sánchez M, Prieto I. Effects of Virgin Olive Oil on Blood Pressure and Renal Aminopeptidase Activities in Male Wistar Rats. Int J Mol Sci. 2021 May 20, 22(10):5388.

[4] Zaky A, Glastras SJ, Wong MYW, Pollock CA, Saad S. The Role of the Gut Microbiome in Diabetes and Obesity-Related Kidney Disease. Int J Mol Sci. 2021, 6, 22(17):9641.

ESTUDIO DE BACTERIAS LÁCTICAS PROCEDENTES DE LA MUCOSA INTESTINAL MURINA TRAS LA INGESTA DE DIETAS RICAS EN GRASAS.

Cobo-Molinos A. [1], **Olid-López M.C.** [2], **Hidalgo M.** [2], **Prieto I.** [3], **Gálvez A.** [2], **Martínez-Cañamero M.** [2]

1 Universidad de Granada, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología. Campus de la Cartuja s/n, CP 18071, Granada
2 Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento Ciencias de la salud, Área de Microbiología. Campus Las Lagunillas s/n, CP 23071, Jaén
3 Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento Ciencias de la salud, Área de Fisiología. Campus Las Lagunillas s/n, CP 23071, Jaén
acmolinos@ugr.es

Como ya es conocido, las dietas altas en grasas tienen efectos sobre la composición de la microbiota intestinal del huésped. El aceite de oliva virgen extra (AOVE) tiene una clara influencia en la microbiota del intestino en comparación con otras grasas de tipo saturado, con sus beneficios fisiológicos ampliamente estudiados. Sin embargo, gran parte de la población consume aceite de oliva tratado con un proceso depurativo para suavizar su sabor, pero que también lo priva de polifenoles y otros componentes minoritarios muy beneficiosos [1].

Sería interesante pues, saber si distintos tipos de grasa ejercen o no efectos diferentes sobre la microbiota y cuáles serían las consecuencias fisiológicas de esos cambios [2]. Para ello, en esta línea de trabajo, se estudió la influencia de una dieta rica en aceite de oliva virgen extra en comparación con otras dietas grasas (aceite refinado y mantequilla) sobre la microbiota de ratones que fueron alimentados con dieta estándar o con dietas altas en dichas grasas [2].

Los ratones Swiss Webster usados para este experimento, fueron alimentados con una dieta estándar o alta en grasas enriquecida con AOVE, ROO o mantequilla [1], además de evaluarse también parámetros fisiológicos durante el experimento.

Tras doce semanas suministrándoles la dieta, los animales fueron sacrificados, obteniéndose una colección de cepas bacterianas a nivel de la mucosa del intestino grueso (IG) y heces (H). A la colección obtenida, se le realizó diferentes pruebas bioquímicas como crecimiento en medio selectivo MRS a 30ºC, crecimiento en MRS+NaCl al 6,5%, crecimiento en MRS líquido con campana de Durham, crecimiento en medio selectivo KAA a 37ºC, prueba de catalasa y tinción de Gram (Tabla 1).

Cepa	Gram	Disposición	Prueba catalasa	Medio MRS + NaCl 6,5%	Medio KAA	
					Crecimiento	Colonias
IG8-1	Positivo	Cocos	Negativo	Positivo	Positivo	Oscuras
IG8-2	Positivo	Cocos	Negativo	Positivo	Positivo	Oscuras
IG8-3	Positivo	Bacilos	Negativo	Positivo	Positivo	Oscuras
IG8-4	Positivo	Bacilos largos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-5	Positivo	Bacilos largos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-6	Positivo	Bacilos	Negativo	Positivo	Positivo	Oscuras
IG8-7	Positivo	Bacilos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-9	Positivo	Bacilos largos	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
IG8-10	Positivo	Bacilos largos	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
IG8-11	Positivo	Bacilos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
IG8-14	Positivo	Cocos	Negativo	Positivo	Positivo	Oscuras

Tabla1: Pruebas bioquímicas ensayadas

Del total de cepas aisladas se seleccionaron finalmente 11 cepas procedentes de mucosa de intestino, que presentaron tinción de Gram positiva y prueba de la catalasa negativa, con un crecimiento en MRS a 30ºC, mostrándose que

correspondían a bacterias del ácido láctico (BAL). Todas ellas fueron aisladas del mismo animal, el cual había sido alimentado con dieta rica en grasa insaturada procedente de aceite de oliva.

Por medio de la identificación de la región conservada r16s, se mostró que todas las cepas pertenecían al género *Lactobacillus* excepto una, del género *Enterococcus*, especie *E. faecium*. De las cepas de *Lactobacillus* aisladas, solo dos pertenecían a la especie *L. johnsonii*, y el resto a la especie *L. murinus* (Tabla 2).

CEPA	Especie	Query	Ident
IG8-1	*Lactobacillus murinus*	100%	98%
IG8-2	*Enterococcus faecium*	99%	95,11%
IG8-3	*Lactobacillus murinus*	97%	95,78%
IG8-4	*Lactobacillus johnsonii*	100%	100%
IG8-5	*Lactobacillus johnsonii*	97%	98,73%
IG8-6	*Lactobacillus murinus*	98%	98%
IG8-7	*Lactobacillus murinus*	98%	96,24%
IG8-9	*Lactobacillus murinus*	96%	94,08%
IG8-10	*Lactobacillus murinus*	98%	98,5%
IG8-11	*Lactobacillus murinus*	98%	98%
IG8-14	*Lactobacillus murinus*	98%	98,29%

Tabla2: Determinación de especies por medio de la identificación de la región conservada r16s.

La colección fue sometida a un estudio de la producción de antimicrobianos (bacteriocinas) por la inhibición del crecimiento de una cepa indicadora (*Staphylococcus aureus* CECT 828) en MRS tamponado. Para ello se sembró un césped con la bacteria indicadora CECT 828 en medio tamponado MRS agar, y se colocó una gota de 5 µl de cada una de las cepas aisladas de intestino (IG) crecidas overnight, incubando a 30ºC durante 48 horas. Se observó que, de las 11 cepas ensayadas, todas excepto 3 presentaban halos de inhibición, siendo los mayores halos de 5 y 6 mm para las cepas IG8-2 e IG8-1 respectivamente (Figura 1).

Las cepas que presentaron inhibición por gota, fueron crecidas en medio MRS líquido y centrifugado tras 24 horas a 30ºC, para retirar las células del cultivo y el sobrenadante fue ensayado por el método de pocillos [3], pero no se obtuvo actividad frente a la indicadora.

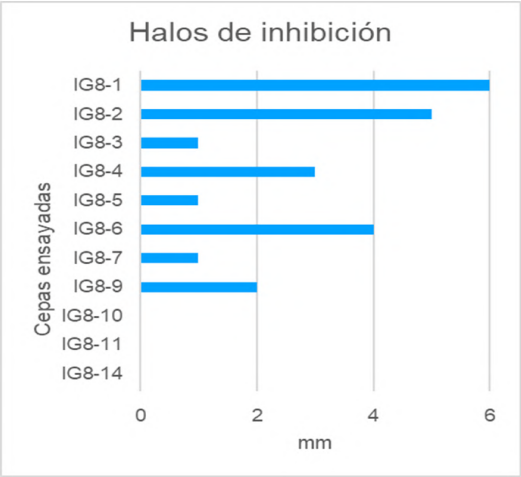


Figura 1. Presencia de halos de inhibición

Se realizó también un estudio de la presencia de genes para la producción de aminas biógenas (tiramina (TDC), ornitina (ODC) e histamina (HDC)) mediante PCR, donde dos cepas mostraron la presencia del gen para la tirosina descarboxilasa (IG8-1 e IG8-2) y ninguna presentó genes para ODC ni HDC.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por la CEICE-JA (Proyecto de Excelencia Ref. AGR 6340) y el Plan Propio UJA (Acción 1b 2021).

REFERENCIAS

[1] N Martínez, I Prieto , M Hidalgo, A B Segarra, A M Martínez-Rodríguez, A Cobo-Molinos, M Ramírez, A Gálvez, M Martínez-Cañamero. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. Microorganisms, **2019**, 7, 61, 1-13.

[2] I Prieto, M Hidalgo, A B Segarra, A M Martínez-Rodríguez, A Cobo-Molinos, M Ramírez, H Abriouel, A Gálvez, M Martínez-Cañamero. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. Plos One, **2018**, 1-20.

[3] J Tagg & A R McGiven. Bacteriocin activity can be detected and assayed by a modification of the punchhole method. Applied Microbiology, **1971**, 21, 5, 943.

ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DE POLIFENOLES DEL ACEITE DE OLIVA SOBRE ENTEROCOCOS INTESTINALES AISLADOS DE RATONES ALIMENTADOS CON DIFERENTES DIETAS ALTAS EN GRASA.

Natalia Andújar-Tenorio[1], Antonio Cobo[2], Ana Mª Martínez-Rodríguez[3], Marina Hidalgo[1], Isabel Prieto[4], Antonio Gálvez[1], Magdalena Martínez-Cañamero[1]

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 Granada, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología. Campus de la Cartuja s/n, CP 18071, Granada
3 Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Campus Las Lagunillas s/n, CP 23071, Jaén
4 Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento Ciencias de la salud, Área de Fisiología. Campus Las Lagunillas s/n, CP 23071, Jaén
nandujar@ujaen.es

Los secoiridoides (oleuropeína y derivados), una de las principales clases de polifenoles contenidos en las aceitunas y el aceite de oliva, inhiben o retrasan la tasa de crecimiento de una variedad de bacterias. En estudios previos habíamos mostrado que enterococos intestinales aislados de ratones alimentados con dietas altas en grasa eran capaces de crecer significativamente mejor en presencia de aceite de oliva refinado que con virgen extra pero que las cepas procedentes de dieta estándar se inhibían igualmente en presencia de ambos aceites de oliva [1]. Este resultado nos animó a medir la susceptibilidad *in vitro* a dos secoiridoides del olivo (*Olea europaea*), la oleuropeína (el principio amargo de las aceitunas) y el hidroxitirosol (derivado de la oleuropeína por hidrólisis enzimática y responsable de la alta estabilidad del aceite de oliva) en una colección de veintiséis cepas de enterococos aisladas de ratones alimentados con dieta estándar o con dietas altas en grasa enriquecidas con mantequilla, aceite de oliva refinado o aceite de oliva virgen extra y tras seis o doce semanas de dieta [2]. Para ello se utilizaron concentraciones de 15.75, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 µg/mL mediante el método de microtitulación en caldo [3].

Como se puede observar en las Figuras 1 y 2, a bajas concentraciones, ninguno de los dos compuestos tuvo un efecto drástico sobre el crecimiento de las cepas, por lo que se decidió repetir el experimento usando mayores concentraciones de polifenol. En el caso de la oleuropeína, se usaron dos concentraciones diferentes (250 y 500 µg/mL) y, para el hidroxitirosol, se usó solo la concentración mayor (500 µg/mL).

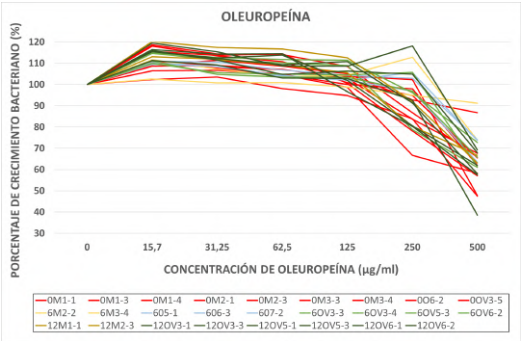


Figura 1: Efecto de la oleuropeína a diferentes concentraciones en cepas de enterococos.

Por un lado, en la oleuropeína, tal y como muestra la Figura 1, se produjo un efecto inhibitorio en el crecimiento de la mayor parte de las cepas a la concentración de 250 µg/mL, mientras que todas fueron inhibidas a 500 µg/mL

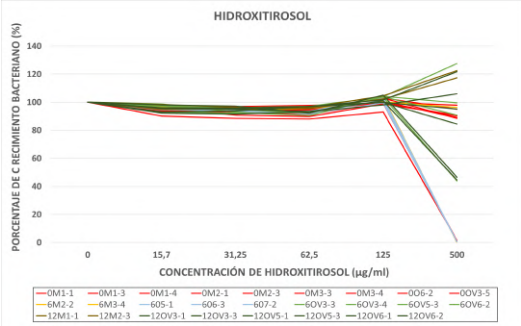


Figura 2: Efecto del hidroxitirosol a diferentes concentraciones en cepas de enterococos.

Por otro lado, en el caso del hidroxitirosol, no hubo inhibición generalizada en el crecimiento de las cepas, incluso algunas de ellas mostraron un aumento de este. Sin embargo, sí se inhibieron la mayoría y en seis casos, el crecimiento fue prácticamente nulo (Figura 2).

Cuando comparamos el porcentaje de crecimiento de las cepas aisladas de los grupos con diferentes dietas, obtuvimos diferencias estadísticamente significativas al 5% para el hidroxitirosol a 125 µg/mL, entre las cepas aisladas a 0 semanas (cuando todas tenían aún alimentación estándar) y el resto de cepas (aisladas todas de dietas altas en grasas) a las 6 y a las 12 semanas (T-test, p= 0.0204; Figura 3). A esta misma concentración y con este polifenol también se obtuvieron diferencias significativas pero al 10% (p=0.072) al comparar mediante un análisis ANOVA el porcentaje de crecimiento de las cepas aisladas de dieta estándar, las de aceite de oliva virgen extra y las del resto de grasas. En el caso de la oleuropeína, sólo se obtuvo diferencia significativa al 10% a 125 µg/mL (p= 0.070), entre las cepas aisladas de dieta estándar y el resto de cepas.

Es llamativo no haber encontrado diferencias entre el aceite de oliva virgen (alto en estos polifenoles) y el resto de grasas, aunque esto va en la misma línea ya observada con respecto a la resistencia al propio aceite [2]. Será necesario ampliar el estudio a más cepas, pero en cualquier caso estos resultados nos pueden ayudar a entender cómo diferentes cepas de un género son capaces de adaptarse a entornos cambiantes y cómo estos cambios pueden afectar a la fisiología del huésped.

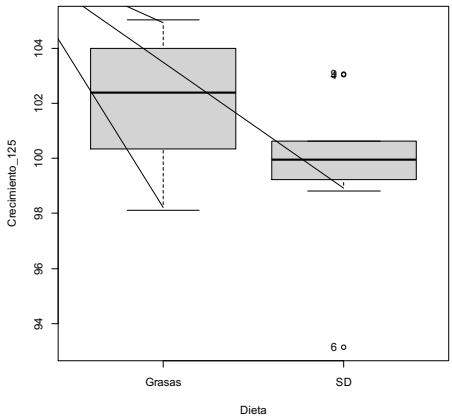


Figura 3: Representación con diagrama de cajas del porcentaje de crecimiento detectado en cepas aisladas de dietas altas en grasa (Grasas) y de dieta estándar (SD).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por la CEICE-JA (Proyecto de Excelencia Ref. AGR 6340) y el Plan Propio UJA (Acción 1b 2021).

REFERENCIAS

[1] Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo-Molinos A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Refined versus Extra Virgin Olive Oil High-Fat Diet Impact on Intestinal Microbiota of Mice and Its Relation to Different Physiological Variables. Microorganisms. 2019; 7, 61: 1-13.

[2] Sánchez B, Cobo A, Hidalgo M, Martínez-Rodríguez AM, Prieto I, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Faeces in Mice. Int J Mol Sci. 2019; Sep 2;20(17):4290.

[3] Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. J Microbiol Methods. 2010; 81(2), 121–126.

MICROBIOTA INTESTINAL MURINA Y SU RELACIÓN CON VARIABLES FISIOLÓGICAS TRAS SEIS SEMANAS DE DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN O MANTEQUILLA.

Natalia Andújar-Tenorio[1], Antonio Cobo[2], Ana Mª Martínez-Rodríguez[3], Marina Hidalgo[1], Ana Belén Segarra[4], Isabel Prieto[4], Antonio Gálvez[1], Magdalena Martínez-Cañamero[1]

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 Granada, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología. Campus de la Cartuja s/n, CP 18071, Granada

3 Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Campus Las Lagunillas s/n, CP 23071, Jaén

4 Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento Ciencias de la salud, Área de Fisiología. Campus Las Lagunillas s/n, CP 23071, Jaén

canamero@ujaen.es

Previamente hemos estudiado en ratones el efecto de dietas enriquecidas con aceite de oliva virgen (EVOO) y con mantequilla (BT) en comparación con una dieta de pienso estándar (SD) encontrando diferencias en la microbiota que correlacionan con variables fisiológicas tras tres meses de experimentación, entre los grupos de oliva virgen y mantequilla [1]. En esta ocasión presentamos los resultados obtenidos en el balance intermedio del experimento (tras seis semanas de dieta), con objeto de determinar si las diferencias ya descritas pueden ser detectadas previamente o si existen tendencias que apunten a los resultados finales, así como los resultados obtenidos en diferentes variables fisiológicas y las correlaciones encontradas. A nivel de variables fisiológicas, se midió la ingesta de agua y alimentos, el peso corporal, diuresis y la presión arterial sistólica y la única diferencia encontrada fue en la presión arterial sistólica, donde la dieta enriquecida con EVOO mostró valores significativamente más bajos que la dieta estándar y la enriquecida con mantequilla (p=0,004).

Al secuenciar la diversidad microbiana del gen 16S rRNA mediante secuenciación masiva de las muestras fecales, la cantidad de lecturas fue estable. En total, las secuencias se clasificaron en ocho filos, 88 familias y 227 géneros.

Entre los filos, las proteobacterias fueron predominantes de manera estadísticamente significativa en el grupo alimentado con mantequilla, mientras que *Tenericutes* fue significativamente menos frecuente en el alimentado con aceite de oliva virgen (Figura 1).

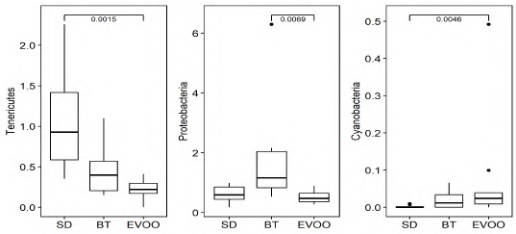


Figura 1. Distribución porcentual de los filos con diferencias significativas.

Al mismo tiempo, se establecieron análisis de regresión con todas las variables. Como también teníamos disponibles medidas fisiológicas al final del experimento, ya recogidas en Prieto et al, 2018 [1], repetimos el análisis de regresión con estas variables como dependientes. Además de las variables mencionadas antes, al final del experimento también se midió en plasma el nivel de insulina, glucosa, triglicéridos, colesterol total y se obtuvo el cociente HDL/LDL. El filo *Proteobacteria*, junto con *Tenericutes*, mostró una relación positiva con la glucosa a las 12 semanas (R^2=0.60; p=0.0207).

También se hicieron comparaciones a nivel de familias (Figura 2) y géneros (Figura 3), con las respectivas regresiones.

Las correlaciones encontradas no solo son concomitantes, sino que algunos de los cambios detectados en los porcentajes microbianos a las seis semanas se correlacionan, a veces de forma exclusiva, con cambios en los valores fisiológicos detectados más tarde, a las doce semanas.

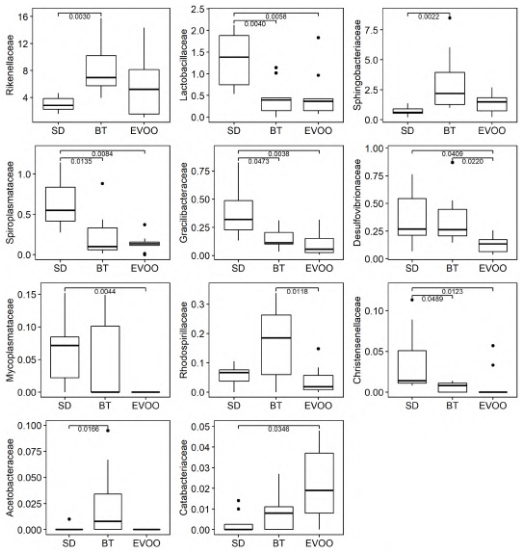


Figura 2. Distribución porcentual de las 11 familias con diferencias significativas.

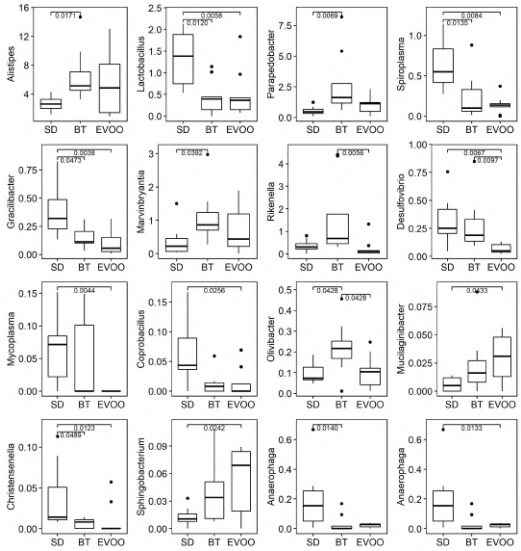


Figura 3. Distribución porcentual de los 16 géneros con diferencias significativas.

Desulfovibrionaceae/Desulfovibrio destaca al correlacionar con la presión arterial sistólica, la ingesta de alimentos, la ingesta de agua y la insulina a las doce semanas. Esto no sólo sugiere una implicación temprana en la probabilidad de desarrollar respuestas fisiológicas y bioquímicas alteradas más adelante en la vida del huésped, sino que también abre la posibilidad de utilizar este género como marcador en el riesgo de sufrir diferentes patologías en el futuro.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por la CEICE-JA (Proyecto de Excelencia Ref. AGR 6340) y el Plan Propio UJA (Acción 1b 2021).

REFERENCIAS

[1] Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez-Rodríguez AM, Cobo-Molinos A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. PLoS One, 2018; 1-20.

METABOLISMOS DE LEVADURAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS DE 10 PREBIÓTICOS COMERCIALES

Vázquez-Hernández M.[1,2], Ruiz-Moyano S.[1,2], Rivas M.A.[1,2], Córdoba M.G.[1,2], Martín A.[1,2]

1 Universidad de Extremadura/Escuela de Ingenierías Agrarias/Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Nutrición y Bromatología. Avd. Adolfo Suárez s/n, 06007, Badajoz.

2 Universidad de Extremadura/Instituto Universitario de Investigación de Recursos Agrarios (INURA). Avd. de la Investigación s/n, 06006, Badajoz

amartin@unex.es

Los probióticos son microorganismos vivos que ingeridos en una cantidad adecuada ejercen un efecto beneficioso [1]. La utilización de prebióticos, hidratos de carbono no digeribles, contribuye a la implantación del probiótico en el tracto intestinal. En este trabajo se ha estudiado el potencial de diez prebióticos comerciales (Tabla 1) para favorecer el crecimiento de 20 cepas de levaduras con potencial funcional aisladas de quesos de leche cruda de oveja de pasta blanda de Extremadura (Tabla 2).

Tabla 1:productos prebióticos utilizados en el estudio.

Productos	Fabricantes
Lactulosa	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Fructoligosacárido (FOS)	Beneo Orafti P95
Xilooligosacáridos (XOS)	www.bolinherb.com
GOS vegetales	Olygose
Oligosacárido de glucosa	Solabia: bioecolians
Rafinosa	Scharlab
Estaquiosa	Scharlab
Oligosacárido de soja	Fuji Oil
Maltodextrina	Bulk
Vitafiber	Bioneutra

La evaluación de la capacidad de utilizar los diferentes compuestos prebióticos como fuente de carbono se realizó en un turbidómetro automático Bioscreen C. Para ello, previamente se inocularon las cepas de levaduras al 1% a partir de una solución de 10^7 células/mL en el medio cultivo (Base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos y sulfato de amonio suplementado con 0,5 g/L de sulfato de amonio (p/v) y 0,125% (p/v) de agar bacteriológico) suplementado en cada caso con cada uno de los prebióticos seleccionados al 2% (p/v). Como control positivo del crecimiento se utilizó glucosa y como control negativo el medio de cultivo sin fuente de carbono. Doscientos µL de cada medio fueron repartidos en cada pocillo de la placa multipocillos. La dinámica de crecimiento de cada levadura en los diferentes prebióticos fue monitorizada en un Bioscreen C a mediante la medición de la densidad óptima (DO) a 600 nm a intervalos regulares. Las placas multipocillos fueron cultivadas en el Bioscreen C a una temperatura de 27,5 ºC sin agitación. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 2:cepas de levadura utilizadas en el estudio [2,3].

Especies	Código de cepas
Kluyveromyces lactis	1507, 1885, 1922, 2287, 2725
Kluyveromyces marxianus	1886, 1917, 1919
Pichia fermentans	1859, 1865, 1911, 1913
Pichia kudriazevii	373, 1801, 1809, 1832
Pichia jadinii	433, 1731
Yarrowia lipolytica	1961, 2495

El porcentaje de variación del crecimiento de cada levadura en cada prebiótico con respecto al control positivo (glucosa) se determinó aplicando la siguiente ecuación:

%crecimiento=[100-((DOglucosa-DOprebiótico)/(DOglucosa))]

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo usando el programa estadístico SPSS para Windows, realizando en cada caso un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y después la comparación de medias se llevó a cabo mediante el test de Tukey ($p<0,05$).

Los resultados obtenidos mostraron que los oligosacáridos de soja permitieron el crecimiento de todas las especies de levadura a niveles similares a glucosa. Sin embargo, los principales componentes de este prebiótico, rafinosa y estaquiosa, no eran metabolizados por todas las levaduras. Esto indica que podría deberse a la presencia de monosacáridos o disacáridos en la composición de este prebiótico. Otros prebióticos mostraron un crecimiento más selectivo de las levaduras. Lactulosa y FOS permitieron el crecimiento principalmente de las levaduras del género *Kluyveromyces*, aunque los FOS también fueron utilizados de forma relevante por *Pichia jadinii*. Los oligosacáridos formados por glucosa unidos mediante diferentes enlaces α- (vitafiber, maltodextrina y bioecolians) permitieron un elevado crecimiento de *Pichia jadinii*. Además, bioecolians también favoreció el crecimiento de *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* y *Pichia kudriavzevii*. Finalmente, olygose permitió un crecimiento limitado, mientras que XOS fue utilizado de forma moderada. Entre las diferentes especies de levaduras evaluadas, *Kluyveromyces* marxianus mostró el mayor potencial para el metabolismo de los prebióticos comerciales estudiados. En particular, las cepas de *K. marxiaxinus* crecieron adecuadamente en 5 prebióticos, moderadamente en dos y de forma limitada en tres (Figura 1).

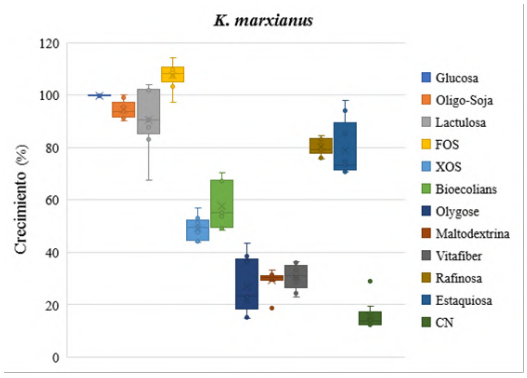


Figura 1: Crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* en prebióticos comerciales en comparación con su crecimiento en glucosa. CN indica el crecimiento en ausencia de fuente de carbono.

Por lo tanto, podemos concluir que los resultados obtenidos evidenciaron que el crecimiento de las levaduras en los diferentes prebióticos fue variable dependiendo de la especie y cepa estudiada. Así, más estudios mediante modelos matemáticos sobre la cinética de crecimiento, así como, en los productos derivados de su metabolismo contribuirían a establecer que prebiótico sería más idóneo para su utilización en combinación con cada cepa de levadura.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido finanaciado por el Plan Regional de Proyectos y Ayudas a la Investigación de la Junta de Extremadura mediante los proyectos con referencia IB16038 y GR21180.

REFERENCIAS

[1] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Sanders, M. E. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol, 2014, 11(8), 506-514..

[2] Merchán, A. V., Benito, M. J., Galván, A. I., & Ruiz-Moyano, S. LWT Food Sci. Technol, 2020, 124, 109173.

[3] Merchán, A. V., Ruiz-Moyano, S., Hernández, M. V., Benito, M. J., Aranda, E., Rodríguez, A., & Martín, A. J. Dairy Sci., 2022, 105(4), 2931-2947.

EFECTO DE LAS LÍAS DE LEVADURAS SOBRE LA REALIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

Violeta García Viñola[1*], Candela Ruiz De Villa[1], Albert Bordons[2], Cristina Reguant[2], Nicolas Rozès[1]

1 Universitat Rovira i Virgili, Facultat d'Enologia, Grupo de Biotecnología Microbiana de los Alimentos (BMA), Departament de Bioquímica i Biotecnologia

2 Universitat Rovira i Virgili, Facultat d'Enologia, Grupo de Biotecnología Enológica (BE), Departament de Bioquímica i Biotecnologia

violeta.garcia@urv.cat

INTRODUCCIÓN

La fermentación maloláctica (FML) de los vinos, descarboxilación del ácido L-málico en ácido L-láctico por las bacterias lácticas [1], es un proceso que se realiza principalmente después de la fermentación alcohólica (FA) del mosto de uva. Se ha descrito que la autolisis de las levaduras —constituyentes mayoritarios de las lías [2]— mediante la liberación de metabolitos de tipo nitrogenado, lipídico, manoproteínas y otros, a lo largo del tiempo pueden favorecer el correcto desarrollo de la FML [3]. El uso de fermentaciones con levaduras *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces* es cada vez más común [4] y la composición de sus lías puede variar afectando a la FML.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de lías obtenidas después de la fermentación alcohólica (FAL) en mosto sintético por *Torulaspora delbrueckii (T.d.)* o *Saccharomyces cerevisiae (S.c.)* sobre la realización de la fermentación maloláctica (FML) por dos cepas de *Oenococcus oeni* VP41 (Lalvin) y PSU-1 (ATCC BAA-331) en diferentes estadios de crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la preparación de lías de levadura, se realizaron dos FAL por separado de T.d. Prelude (Viniflora Prelude, Chr. Hansen) y *S.c.* QA23 (Lalvin QA23, Lallemand) en mosto sintético. Las células se recogieron y liofilizaron al final de la FAL. Para la realización de las FML se prepararon dos inóculos de *O. oeni* VP41 y PSU-1 por separado en medio MRS. Las cepas fueron inoculadas en 50 mL de vino sintético con una concentración en etanol de 12% (v/v), con 2 g/L de ácido L-málico, pH 3,5 y con una población inicial de 2 10^6 cél/mL BAL. Las condiciones de FML fueron; la inoculación por separado en fase exponencial y estacionaria de crecimiento sin lías, con lías de S.c. QA23 y con lías de T.d. Prelude a una concentración de 1 g/L. Todas las muestras y fermentaciones se realizaron por triplicado. Para realizar los análisis de esteroles y ácidos grasos de las lías se utilizó GC-MS y GC-FID respectivamente [5].

RESULTADOS

Los resultados mostraron que las lías de las dos levaduras tenían una composición en ácidos grasos (AG) y esteroles distinta (Tabla 1). Todos los grupos de AG mostraron diferencias significativas y en el caso de los esteroles se encontraron diferencias entre escualeno y ergosterol.

Se observó un comportamiento diferente de las dos cepas de *O. oeni* durante la realización de la FML (Figura 1) en las distintas condiciones. La utilización de cultivos en fase de crecimiento exponencial, como iniciadores de la FML, disminuyó el tiempo de fermentación en mínimo 2 días

para aquellas condiciones que fueron capaces de terminarla.

Tabla 1: Composición (%) en ácidos grasos y esteroles en lías de *S.c.* Prelude y *T.d.* Prelude. MCFA (ácidos grasos de cadena media), SFA (ácidos grasos saturados), UFA (ácidos grasos insaturados) y PUFA (ácidos grasos poliinsaturados, C18:2). Las letras minúsculas indican que hay diferencias significativas (Tuckey p < 0,05).

		S.c. QA23		*T.d. Prelude*	
Composición ácidos grasos	***MCFA***	4,10	± 0,17 [a]	3,47	± 0,03 [b]
	SFA	35,31	± 0,42 [b]	27,67	± 0,81 [a]
	UFA	60,05	± 0,52 [a]	64,16	± 0,83 [b]
	PUFA	0,54	± 0,34 [b]	4,70	± 0,05 [a]
Composición esteroles	***Escualeno***	77,42	± 6,37 [a]	64,08	± 2,65 [b]
	Ergosterol	19,63	± 6,47 [a]	33,47	± 2,36 [b]
	Lanosterol	2,95	± 0,42 [a]	2,45	± 0,46 [a]

Por otro lado, la adición de lías influyó de manera diferente para cada tipo de cepa de *O. oeni*. Se aprecia el efecto negativo de la adición de lías de *S.c.* QA23 en la FML en ambas cepas, en las que solo pudo terminar la fermentación la cepa PSU-1.

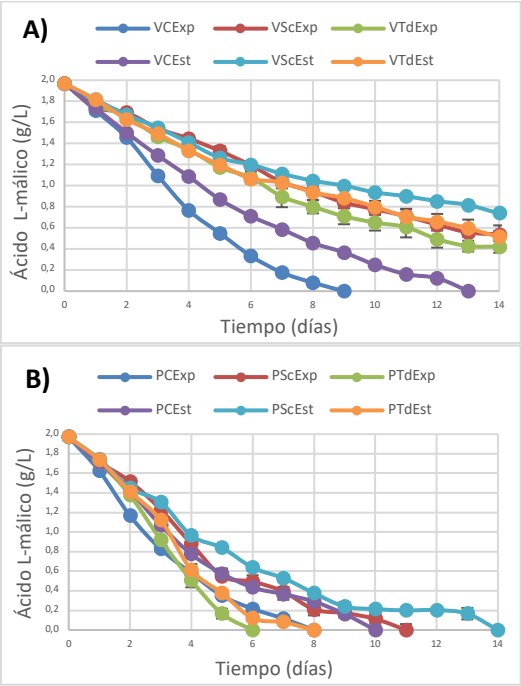


Figura 1: Cinéticas de la FML de *O. oeni* VP41 (A) y PSU-1 (B) en vino sintético con inóculo en fase exponencial sin lías (VCExp y PCExp), con lías de *S.c.* (VScExp y PScExp), con lías de *T.d.* (VTdExp y PTdExp) y en fase estacionaria de crecimiento sin lías (VCEst y PCEst), con lías de *S.c.* (VScEst y PScEst) y con lías de *T.d.* (VTdEst y PTdEst).

La cepa PSU-1 finalizó la FML en todos los casos y en menos tiempo, siendo la condición con lías de *T.d.* Prelude (6 días) la más favorable seguida del control sin lías (8 días). La cepa VP41 en combinación con lías no fue capaz de finalizar la FML, pero sí que lo hizo en el control sin lías.

CONCLUSIONES

Las lías de *T.d.* Prelude tienen un mejor perfil lipídico al contener mayor porcentaje de UFA y PUFA, sin embargo, no favorecen la fermentación en el caso de combinación con la cepa VP41. Por otro lado, la fase estacionaria de crecimiento del inóculo utilizado como cultivo iniciador retrasa la fermentación, pero no es un factor determinante. Por todo ello, la FML puede verse afectada por la combinación del tipo de lía de levadura y la cepa de *O. oeni* utilizada como cultivo iniciador.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades por el proyecto PGC2018-101852-B-I00 y a la URV por la beca Martí Franquès (2021PMF-PIPF-5) para V. García Viñola.

REFERENCIAS

[1] C.R. Davis, D. Wibowo, R. Eschenbruch, T.H. Lee, G.H. Fleet. *Practical implications of malolactic fermentation: a review. Am. J. Enol. Vitic.*, **1985**, *36, 290-301*.

[2] C. Fornairon-Bonnefond, C. Camarasa, M. Moutounet, J.M. Salmon. *New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: a bibliographic review. OENO One*, **2002**, *36, 49-69*.

[3] A. Balmaseda, A. Bordons, C. Reguant, J. Bautista-Gallego. *Non-Saccharomyces in wine: effect upon Oenococcus oeni and malolactic fermentation. Front. Microbiol.*, **2018**, *9, 534*.

[4] I. Andorra, M. Berradre, N. Rozès, A. Mas, J. M. Guillamón, B. Esteve-Zarzoso. *Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. Eur. Food Res. Technol.* **2010**, 231, 215–224

[5] T. Jordá, N. Rozès, S. Puig *Sterol Composition Modulates the Response of Saccharomyces cerevisiae to Iron Deficiency J. Fungi* **2021**, 7, 901-917.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS RESPONSABLES DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA NO DESEADA EN VINOS DE LA D.O. CAVA

Fernández D.[1,2], Bordons A.[1], Canals J.M.[2], Zamora F.[2], Reguant C.[1]

1 Universitat Rovira i Virgili/Facultad de Enología/Departamento de Bioquímica y Biotecnología/Grupo Biotecnología Enológica. C/Marcel·lí Domingo,1, 43007 Tarragona
2 Universitat Rovira i Virgili/Facultad de Enología/Departamento de Bioquímica y Biotecnología/Grupo Tecnología Enológica. C/Marcel·lí Domingo,1, 43007 Tarragona
albert.bordons@urv.cat

La fermentación maloláctica (FML) consiste en la descarboxilación del ácido L-málico que resulta en ácido L-láctico. Esta transformación la realizan las bacterias lácticas (BL) presentes en el vino, principalmente la especie *Oenococcus oeni*. En muchos vinos, sobre todo los tintos, este proceso se realiza, o bien espontáneamente o bien inoculando cultivos iniciadores, para disminuir la acidez y conseguir mejoras organolépticas. Sin embargo, en la mayoría de vinos espumosos tipo Cava no se desea que tenga lugar la FML ya que el contenido en ácido L-málico no es muy elevado y no se quiere disminuir la acidez que organolépticamente es positiva en este tipo de vinos. Por lo tanto, el desarrollo de la FML en vinos espumosos es considerado un defecto que, además, supone pérdidas económicas importantes para la bodega ya que deben descartarse los lotes afectados por este problema. El trabajo presentado se enmarca en un proyecto, con la participación de tres bodegas elaboradoras de cava (Vallformosa, Codorníu y Castillo de Perelada), cuyo objetivo es minimizar la FML no deseada en este tipo de vino.

En base al análisis de registros de las tres bodegas, se recogieron 35 muestras de botellas de cava de lotes en las que se había detectado la FML. Con el fin de caracterizar las cepas de BL asociadas al desarrollo de la FML, se sembraron las muestras en medio de cultivo sólido MRS enriquecido [1] para favorecer el crecimiento de BL y se pudo aislar un número elevado de colonias. Mediante PCR específica [2] se determinó que todos los aislados pertenecían a la especie *O. oeni*. Estos aislados fueron tipificados a nivel de cepa mediante VNTR [3]. Esta técnica permitió diferenciar 10 genotipos diferentes. Las cepas tipificadas fueron codificadas y conservadas para posteriores estudios.

Para caracterizar la presencia de BL en las diferentes etapas del proceso de elaboración de cava se realizaron muestreos en la línea de producción de las tres bodegas. Se detectó la presencia de BL viables en todos los puntos del muestreo. Aunque los niveles de población eran bajos al inicio del proceso, entre 10^2 y 10^3 UFC/ml, durante el tiempo de crianza las poblaciones de BL aumentaron. En concordancia, se detectó el desarrollo de FML completa en algunas botellas durante el periodo de crianza. En los muestreos realizados se recuperaron e identificaron mediante PCR y VNTR una cantidad representativa de las colonias aisladas. Las cepas tipificadas pertenecían todas a la especie *O. oeni*. En la Figura 1 se muestra el número de aislados de *O. oeni*, en base a su

genotipo (VNTR), de las muestras recogidas en una de las bodegas.

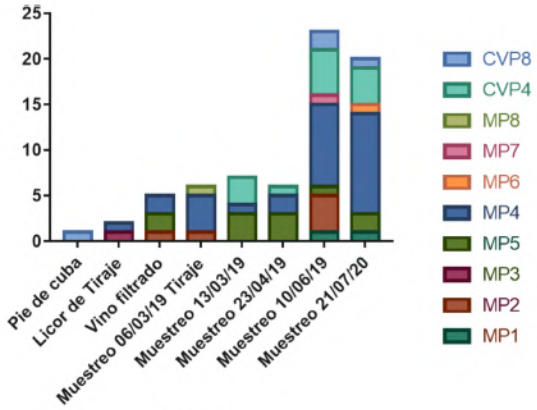


Figura 1: Número de aislados de *O. oeni* en base a su genotipo en muestras de diferentes etapas del proceso de elaboración.

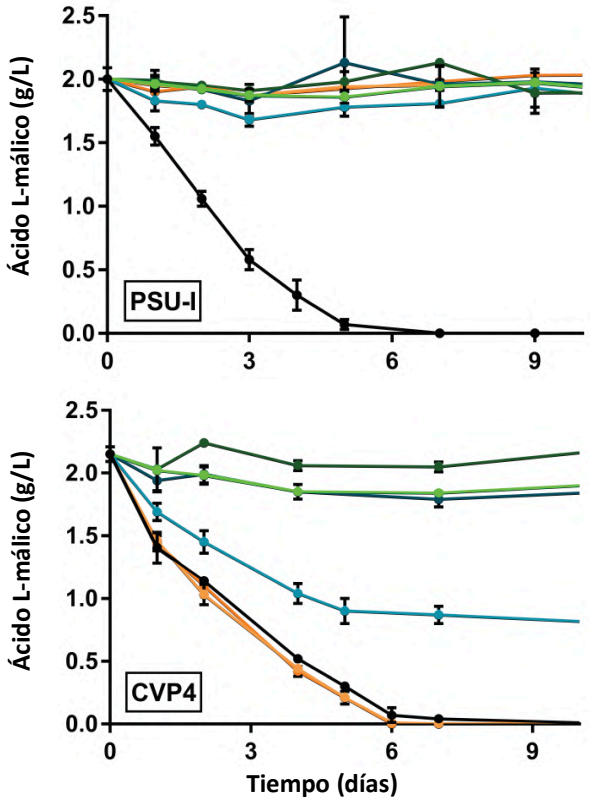


Figura 2: Efecto sobre el consumo de ácido L-málico de las cepas *O. oeni* PSU-1 y CVP4 de los tratamientos: control (negro), SO_2 (naranja claro 0.03 g/L y oscuro 0.06 g/L), ácido fumárico (verde claro 0.3 g/L y oscuro 0.6 g/L) y quitosano (azul claro 0.2 g/L y oscuro 0.5 g/L).

Algunas de las cepas de *O. oeni* aisladas de cava fueron caracterizadas en vino sintético en base a su tolerancia a tratamientos inhibidores: i) ácido fumárico, ii) quitosano y iii) SO_2. A modo de ejemplo, en la Figura 2 se muestran los resultados para la cepa de referencia *O. oeni* PSU-1 (ATCC BAA-331) y una cepa aislada de cava (CVP4). Se pudo observar que, en general, las cepas aisladas de cava presentan mayor resistencia al quitosano y SO_2 que algunas cepas de *O. oeni* aisladas de otros tipos de vino, como PSU-1. Sin embargo, todas las cepas se mostraron sensibles al tratamiento con ácido fumárico.

En conclusión, los resultados mostraron que las BL pueden estar presentes en poblaciones bajas desde el inicio del proceso de elaboración del cava a pesar de la filtración del vino base. Estas poblaciones pueden aumentar a lo largo del tiempo y dar lugar a la FML no deseada. Así, el riesgo de desarrollo de la FML está latente desde el inicio del proceso de elaboración. Además, se han podido aislar diversas cepas de *O. oeni* de cava que están siendo caracterizadas. Finalmente, los resultados obtenidos indican que la adición de ácido fumárico podría ser un tratamiento adecuado para inhibir la FML.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto Cava-noFML Grupos Operativos PDR 2014-2020 (Generalitat de Catalunya).

REFERENCIAS

[1] J Franquès, I Araque, E Palahí, MC Portillo, C Reguant, A Bordons. *LWT Food Sci Tech*, **2017**, 81, 326-334.

[2] G Zapparoli, S Torriani, P Pesente, F Dellaglio, *Lett Appl Microbiol*, **1998**, 27, 243-246.

[3] O Claisse, A Lonvaud-Funel. *Food Microbiol*, **2012**, 30, 340-347.

ANÁLISIS GENÓMICO DE CEPAS DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Y *Streptococcus thermophilus* PRODUCTORAS DE ÁCIDO GAMMA-AMINOBUTÍRICO (GABA)

José Alejandro Valenzuela[1,2], Lucía Vázquez[1,3], Javier Rodríguez[1,3], Ana Belén Flórez[1,3], Olga M. Vasek[2], Baltasar Mayo[1,3]

[1]Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300-Villaviciosa, España; [2]Biotecnología Microbiana para la Innovación Alimentaria, Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica-Universidad Nacional del Nordeste (CONICET-UNNE), Campus UNNE, Corrientes-3400, Argentina; [3]Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Avenida de Roma s/n, 33011-Oviedo, España

baltasar.mayo@ipla.csic.es

INTRODUCCIÓN

El GABA es un aminoácido no proteico que se sintetiza a partir del ácido glutámico por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD). El GABA actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central de los mamíferos y su ingesta disminuye la presión arterial y reduce el estrés psicológico, comportándose como un tranquilizante. Debido a sus efectos beneficiosos, la industria alimentaria está interesada en la producción de alimentos enriquecidos con GABA. La utilización de bacterias ácido-lácticas (BAL) productoras de GABA permitiría su producción durante la elaboración y maduración de los productos fermentados. *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus* se encuentran entre las BAL más utilizadas como fermentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En un grupo de aislados de *L. lactis* y *S. thermophilus* procedentes de leche cruda se detectaron varias cepas productoras de GABA. La cuantificación de GABA se realizó por cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (UHPLC). Con el objetivo de determinar la base genética de la producción de GABA y su estructura, y contribuir al mismo tiempo a caracterizar la seguridad alimentaria de los productores, se seleccionaron cuatro cepas de cada especie y se sometieron a secuenciación y análisis genómico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En medio de cultivo M17 suplementado con glucosa (*L. lactis*) o lactosa (*S. thermophilus*) y glutamato monosódico (5 Mm) como sustrato, las cepas de *L. lactis* y *S. thermophilus* produjeron cantidades variables de GABA: entre 1,09 a 6,29 mM.

El análisis genómico de las cepas mostró que todas ellas portaban los genes que codifican la enzima GAD y el antiportador organizados en una estructura de operón. El ensamblaje del genoma de la cepa de *L. lactis* Lc14.4 ubicó el operón en varios contigs, lo que impidió conocer su estructura. El orden de los genes y los genes que los flanquean fueron distintos en las cepas de *L. lactis* y de *S. thermophilus* (Fig. 1). Como puede verse, el operón del GABA en *L. lactis* comprende también un gen regulador (*gadR*), situado en la primera posición (Fig. 1A), y está flanqueado por genes cromosómicos como los que codifican la glutamato sintasa (*gltB*) y la ribonucleasa HII (*rnhB*). El operón de *S. thermophilus* parece estar codificado en el cromosoma y en igual posición en todas las cepas. Sin embargo, el operón de las cepas de esta especie carece del regulador y está flanqueado por secuencias que codifican

elementos de inserción y proteínas de movilización (Fig. 1B), lo que sugiere su adquisición por transferencia horizontal.

Aparte de la glutamato descarboxilasa, no se detectó en el genoma de las cepas ningún otro gen que codifique otras carboxilasas de aminoácidos, en concordancia con el resultado negativo en la producción de aminas biógenas. Tampoco se identificaron genes de resistencia transmisibles, de acuerdo con el fenotipo de susceptibilidad de las cepas a un conjunto de 16 antibióticos.

En el genoma de los lactococos, se identificaron clústeres de utilización de la lactosa a través de la ruta de Leloir y de la tagatosa-6-fosfato, incluyendo genes respectivos para una β-galactosidasa y una β-fosfogalacto-sidasa. Como en otros genomas analizados, las cepas de *S. thermophilus* solo presentaron genes (contiguos) para la β-galactosidasa y la permeasa. Se identificaron genes que codifican la proteinasa caseinolítica de *L. lactis* y *S. thermophilus* (PrtP y PrtS, respectivamente) en la mayoría de las cepas, pero no en LA1, St9.1 y St18.1.

CONCLUSIONES

El análisis genómico de cuatro cepas de *L. lactis* y cuatro de *S. thermophilus* productoras de GABA, permitió determinar la posición y estructura del operón de síntesis de este compuesto bioactivo. El análisis genómico contribuyó, además, a determinar el potencial biotecnológico de las cepas y garantizar su seguridad alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo se financió con el proyecto PID2019-110549RB-I00/AEI/10.13039/501100011033. La estancia de JAV se patrocina con una beca del Programa de Movilidad Académica de la Asociación Universitaria Iberoamericana de Posgrado (AUIP).

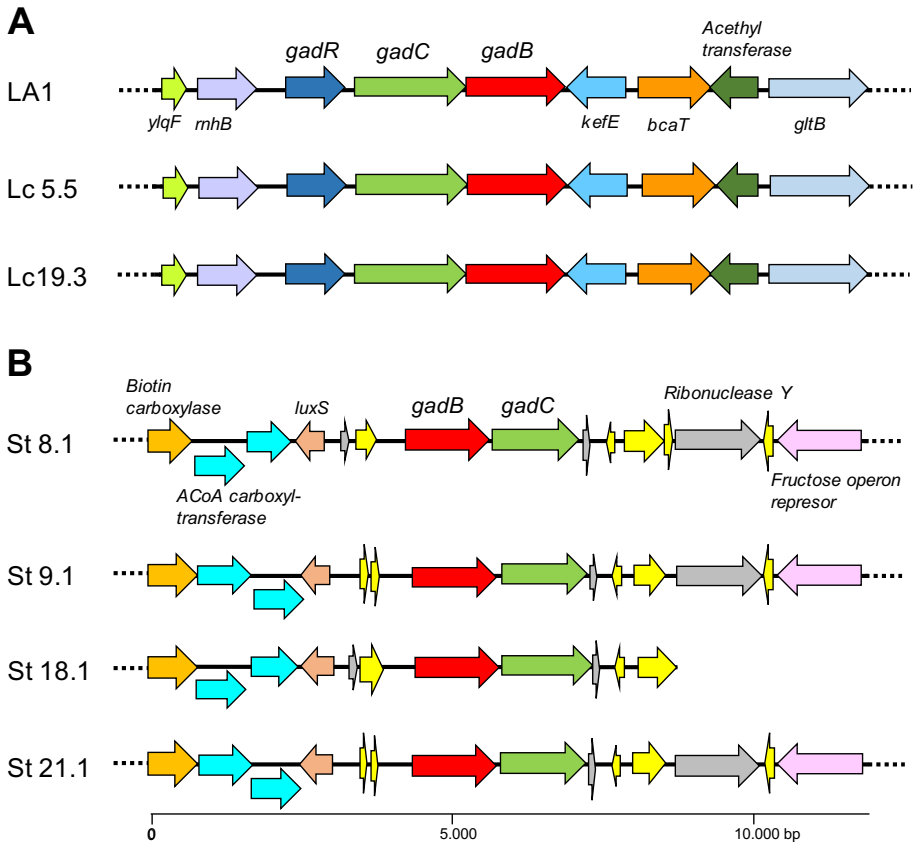


Fig. 1. Organización génica del operón del GABA en cepas de *S. thermophilus* (A) y de *L. lactis* (B). Colores idénticos denotan los mismos genes. En amarillo, ORFs que codifican transposasas o proteínas de movilización.

AISLAMIENTO DE MUTANTES DE *Torulaspora delbrueckii* RESISTENTES A SULFUROSO, ETANOL Y ALTA PRESIÓN DE CO_2 PARA LA ELABORACIÓN DE CAVA

Alberto Martínez[1], Rocío Velázquez[1], Joaquín Bautista-Gallego[1], Célénie Desarbres[3], María Luz Álvarez[2], Emiliano Zamora[2], Manuel Ramírez[1]

[1]Departamento de Ciencias Biomédicas, Área de Microbiología, Edificio Juan Remón Camacho, Avda. de Elvas s/n. 06006 Badajoz, España
[2]Estación Enológica, Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio, Junta de Extremadura, 06200 Almendralejo, España
[3]IUT Génie Biologique, Université de Bourgogne BP 17867 21078 DIJON CEDEX, France
albertomb@unex.es

Torulaspora delbrueckii es probablemente entre las levaduras no-*Saccharomyces* la más adecuada para su uso en vinificación, dado que se ha descrito que puede mejorar la calidad organoléptica de los vinos. Tiene menor eficiencia para completar la fermentación del vino que *Saccharomyces cerevisiae*, ya que posee menor capacidad de fermentación y mayor sensibilidad a diferentes condiciones de estrés, como presencia de SO_2, etanol y CO_2. Para solucionar este problema, se realizó un estudio genético de cuatro estirpes de *T. delbrueckii* seleccionadas, con la finalidad de eliminar posibles alelos recesivos deletéreos para obtener nuevos clones-espora mejorados con mayor capacidad de fermentación. Adicionalmente, se realizaron aislamientos secuenciales de mutantes espontáneos resistentes a diferentes condiciones estresantes relacionadas con la elaboración de vinos tranquilos y espumosos.

Se aislaron mutantes espontáneos de *Torulaspora delbrueckii* (*Td*) de medios suplementados con 500 mg/L SO_2 (SD-500 SO_2) o 10% Etanol (YPD-10% EtOH).

Se seleccionó un mutante de cada tipo para elaborar cava en condiciones de bodega: *Td* Mut5B-SO2R (resistente a SO_2) y *Td* Mut6A-SO2R-EtOHR-33 (resistente a SO_2 y etanol). Se preseleccionaron un total de 40 colonias de *T. delbrueckii* para intentar obtener mutantes espontáneos resistentes a alta presión de CO_2 (HP^R).

La mayoría de los mutantes HP^R mostraron una mejora relevante en las fermentaciones de vino base sintético suplementadas con 50 mg/L de SO_2 (**Figura 1A**). Además, pudieron completar la fermentación cuando la cantidad de SO_2 se redujo a 30 mg/L solo 3 o 4 días después de la levadura de referencia *Sc* 85R4A. Solo uno de los mutantes seleccionados, *Td* MutHP40, no mejoró con respecto a su cepa parental directa *Td* Mut6A-SO2R-EtOHR-33 (**Figura 1B**).

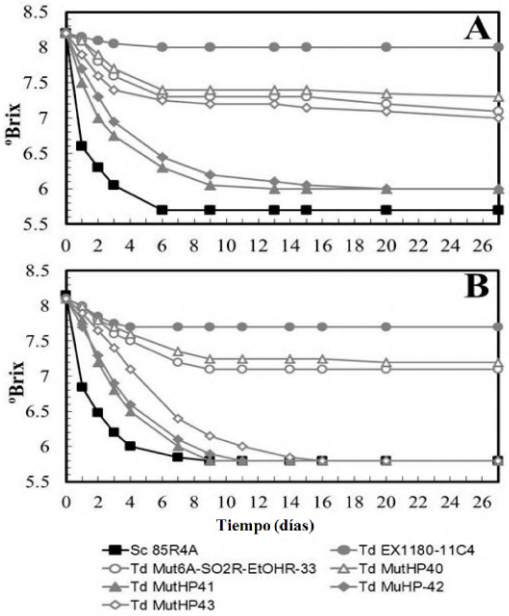


Figura 1. Cinética de fermentación de vino base sintético suplementado con 50 mg/L (A) o 30 mg/L de SO_2 (B).

A continuación, se elaboraron nuevos cavas con los dos mutantes HP^R seleccionados, *Td* MutHP41 y *Td* MutHP42, para repetir la estrategia anterior de selección de nuevos clones de levadura aún más resistentes a alta presión de CO_2. Una vez más, aunque los dos mutantes mostraron mejores cinéticas de fermentación y dominancia que su levadura parental, ninguno de los dos pudo dominar y completar la fermentación dentro de la botella. *Td* MutHP41 fue claramente la mejor de las levaduras *T. delbrueckii* (**Figura 2**). Estos resultados confirman que *Td* MutHP41 supone realmente una mejora para la fermentación de cava industrial sobre su levadura parental.

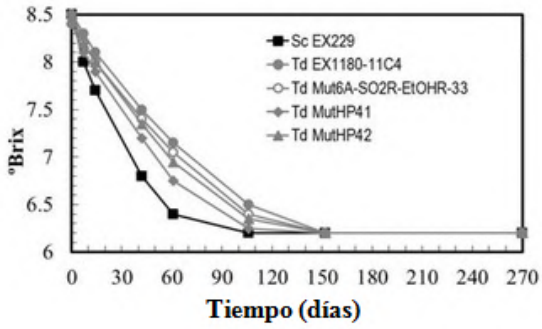


Figura 2: Cinética de fermentación durante las segundas fermentaciones de vinos espumosos inoculados con mutantes seleccionados de *T. delbrueckii* HP^R.

Dado que *T. delbrueckii* necesita más oxígeno para crecer que *S. cerevisiae*, probamos dos protocolos para acondicionar los cultivos de levadura antes de la inoculación del vino base sintético (30 mg/L SO_2): uno con agitación ocasional cada 4–12 h y otro con agitación continua. La agitación ocasional mejoró la capacidad de fermentación de todas las levaduras, incluida la estirpe *S. cerevisiae* de referencia. La agitación continua mejoró aún más la capacidad fermentativa de todas las levaduras *T. delbrueckii* (**Figura 3**).

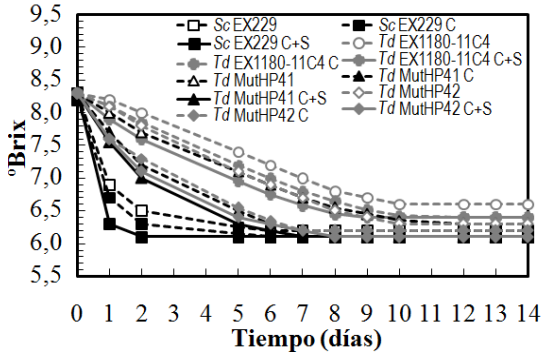


Figura 3. Cinética de fermentación de algunos mutantes *T. delbrueckii* HP^R inoculados en vino base sintético suplementado con 30 mg/L de SO_2. Nota: previo a la inoculación, los cultivos de levadura no se acondicionaron (sin indicación después del nombre de la cepa), se acondicionaron con agitación ocasional (C) o se acondicionaron con agitación continua (C+S).

Se concluye que los mutantes espontáneos de *Td* resistentes a sulfuroso y etanol se pueden mejorar aún más mediante aislamiento de clones HP^R a partir de botellas de cava en fermentación con alta presión de CO_2.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto AGL2017-87635-R financiado por MCIN/AEI/501100011033/, y por FEDER Una manera de hacer Europa, ayuda GR21062 financiada por la Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital, Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional, y el proyecto IB20069 financiado por la Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital, Junta de Extremadura y la Unión Europea.

REFERENCIAS

[1] Velázquez., Martínez, A., Zamora, E., Álvarez, M. L., Bautista-Gallego, J., Hernández, L. M., & Ramírez, M. (2020). Genetic improvement of *Torulaspora delbrueckii* for wine fermentation: eliminating recessive growth-retarding alleles and obtaining new mutants resistant to SO2, ethanol, and high CO2 pressure. Microorganisms, 8(9), 1372.

EL SUELO DEL VIÑEDO COMO RESERVORIO NATURAL DE LEVADURAS FERMENTATIVAS

Manuel Ramírez[1], Rocío Velázquez[1], Antonio López-Piñeiro[2], Ana Muñoz[1], Alberto Martínez[1], José A. Regodón[1]

1 Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, España.

2 Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, España.

mramirez@unex.es

Resumen: En este trabajo se investiga si las levaduras presentes en las uvas maduras y fermentaciones espontáneas de vino provienen del suelo del viñedo, el cual podría considerarse como un reservorio natural de levaduras fermentativas. Se analizaron los microorganismos cultivables de uvas maduras y del suelo de dos tipos de viñedos, uno con laboreo tradicional y otro de conservación con cobertura vegetal. Bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Bacillus* se detectaron en las uvas, y fueron muy abundantes en las muestras de suelo justo antes de vendimia, lo que sugiere un trasvase de microbios desde el suelo hacia las uvas. La cantidad de levaduras fermentativas en el suelo aumentó significativamente en las fechas cercanas a vendimia. Las levaduras *Saccharomyces* y *Lachancea* se aislaron del suelo y de fermentaciones espontáneas, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* y *Pichia* sólo se aislaron de fermentaciones de mosto, y *Torulaspora* solamente del suelo. Las levaduras *Saccharomyces* se aislaron del suelo del viñedo exclusivamente después de vendimia. El análisis de fermentaciones de mosto estéril inoculado con suelo reveló que éste no es el origen de las principales levaduras fermentativas del vino, *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*. Sin embargo, *Lachancea* y *Torulaspora* parecen residentes permanentes del suelo del viñedo, y fueron más abundantes en el viñedo de conservación que en el viñedo tradicional. Parece que las principales levaduras de la fermentación espontánea del vino, *Saccharomyces*, llegan a las uvas por un procedimiento más selectivo que la acumulación de polvo. Por el contrario, el suelo del viñedo es un reservorio natural para *Torulaspora* y *Lachancea*; que son levaduras ocasionales en las fermentaciones espontáneas.

Se estudiaron dos viñedos contiguos de la variedad *Tempranillo*. **NV**: Viñedo de Conservación (mantiene una cobertura vegetal espontánea a lo largo de todo el año) y **CT**: Viñedo Tradicional (utiliza el arado). Las muestras de suelo se tomaron bajo la hilera (**UV**) y en las calles entre hileras de vides (**IR**). Se realizaron fermentaciones de mosto estéril inoculado con muestras de suelo tomadas a lo largo del ciclo del cultivo.

En la mayoría de las localizaciones y fechas, la cantidad de levaduras no-*Saccharomyces* fue mayor en el suelo del viñedo NV que en el CT, pero fue similar para las levaduras *Saccharomyces*. Las levaduras no-*Saccharomyces* aumentaron antes y después de vendimia en ambos viñedos, mientras que las levaduras *Saccharomyces* solo aumentaron después de vendimia (**Figura 1**). *Hanseniaspora* fue la más frecuente en uvas, pero no se detectó en suelo. *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* y *Pichia* aparecieron exclusivamente en mosto de uva. *Saccharomyces* apareció en mosto y en suelos, pero solo en muestras tomadas después de vendimia. *Lanchacea*

se detectó en uvas y suelo, tanto antes como después de vendimia. *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Pichia* y *Rhodosporidium* solo se aislaron de suelo, al igual que *Torulaspora*.

Las levaduras fermentativas fueron escasas en el mosto (*Lanchacea*, *Saccharomyces*) o no detectadas (*Hanseniaspora*, *Pichia*, *Metschnikowia*) en el suelo. Las bacterias del mosto e inicio de fermentación pertenecían a tres géneros abundantes en suelo del viñedo: *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Bacillus*.

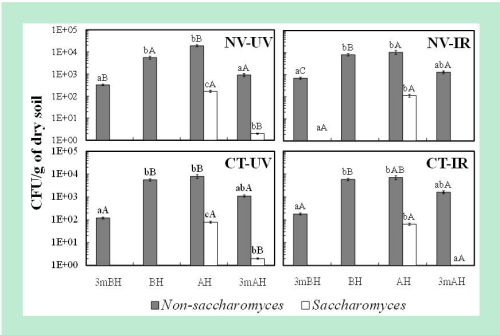


Figura 1: Fluctuación estacional de levaduras cultivables del suelo del viñedo. 3mBH, tres meses antes; BH, una semana antes; AH, una semana después; y 3mAH, tres meses después de vendimia. CT-UV, debajo de la vid de viñedo convencional; CT-IR, entre hileras de vid de viñedo convencional; NV-UV, debajo de la vid de viñedo no-laboreo; NV-IR, entre hileras de vid de viñedo no-laboreo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre fechas de muestreo en los mismos lugares (minúsculas) y entre ubicaciones en las mismas fechas de muestreo (mayúsculas) para cada levadura.

Todas las fermentaciones inoculadas con suelo ubicado bajo vides NV fueron completas. Las fermentaciones inoculadas con suelo del viñedo CT (bajo vides o entre hileras) o del viñedo NV entre hileras fueron incompletas, excepto las inoculadas con suelo recolectado después de vendimia (AH). Las fermentaciones completadas contenían principalmente T*orulaspora* y *Saccharomyces*, excepto las inoculadas con suelo recolectado después de vendimia entre hileras del viñedo NV, que tenían principalmente *Saccharomyces* y menos cantidad de *Torulaspora* y *Lanchacea* (**Figura 2**). No se detectó *Hanseniaspora* en ninguna fermentación inoculada con suelo.

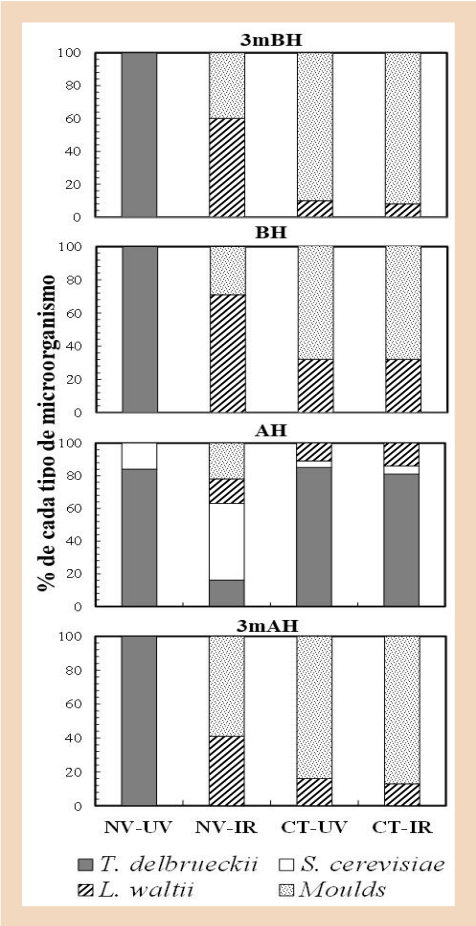


Figura 2: Frecuencias de mohos cultivables y levaduras en fermentaciones de mosto inoculado con suelo de viñedos. Las muestras se tomaron al inicio, etapa intermedia y final de fermentación. Los datos son las medias de estas tres muestras de dos experimentos independientes para cada tipo de fermentación.

AGRADECIMIENTOS

Proyectos GR18117, GR21062 y IB16132 (Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital, Junta de Extremadura), proyecto AGL2017-87635-R (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España), y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

REFERENCIAS

[1] Ramírez, M., López-Piñeiro, A., Velázquez, R., Muñoz, A., & Regodón, J. A. (2020). Analysing the vineyard soil as a natural reservoir for wine yeasts. *Food Res. Int.*, 129, 108845.

PREVALENCIA Y NIVELES DE CÉLULAS DE *Listeria monocytogenes* DE DISTINTOS ESTADOS FISIOLÓGICOS EN CARNE DE AVE

Capita, R.[1,2], Panera-Martínez, S.[1,2], Del Campo, C.[1,2], Díez-Moura, M.[1,2], Rodríguez-Melcón, C. [1,2], Alonso-Calleja, C.[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

rosa.capia@unileon.es; carlos.alonso.calleja@unileon.es

Listeria monocytogenes es el agente etiológico de la listeriosis, una zoonosis que se transmite principalmente por el consumo de alimentos contaminados [1]. Cada año se producen en el mundo aproximadamente 23.000 casos de listeriosis invasiva [2]. Por lo que respecta a la Unión Europea, en el año 2020 se confirmaron un total de 1.876 casos de listeriosis invasiva (0,42 casos por 100.000 habitantes), que se asociaron con una tasa de letalidad del 13,0%, la mayor del conjunto de enfermedades de transmisión alimentaria [3]. Por otro lado, la listeriosis es una infección que provoca importantes lesiones y secuelas, como meningitis, encefalitis, septicemia, endocarditis y abortos [4].

El Reglamento (CE) núm. 2073/2005 de la Comisión (y modificaciones posteriores), incluye criterios microbiológicos para *L. monocytogenes* en determinadas categorías de alimentos. En esta normativa se establecen como métodos de referencia los dependientes de cultivo, que no permiten la detección de las células viables no cultivables.

La presencia en los alimentos de bacterias patógenas (por ejemplo, *L. monocytogenes*) en estado viable no cultivable supone un desafío para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública, teniendo en cuenta su potencial patogenicidad para el consumidor y su dificultad de detección. Este trabajo de investigación tuvo como objetivo conocer la prevalencia y los niveles de *L. monocytogenes* de diferentes estados fisiológicos (células totales, células viables cultivables, células viables no cultivables y células inactivadas) en 52 canales de pollo recogidas, inmediatamente después de su obtención, en dos mataderos del noroeste de España.

Se utilizaron métodos dependientes de cultivo para la detección (UNE-EN ISO 11290-1:2018) y la cuantificación (UNE-EN ISO 11290-2:2018; límite de detección de 1 log_{10}ufc/g) de las células viables cultivables. Los niveles de células totales y de células viables se determinaron por q-PCR, utilizando, en el segundo caso, el marcador de viabilidad monoacida de propidio (PMAxx). Este compuesto es capaz de atravesar las membranas de las células dañadas, uniéndose exclusivamente al ADN de células inactivadas y bloqueando así su amplificación por q-PCR. El límite de detección de la q-PCR fue de 2,15 log_{10}ufc/g [5]. Las concentraciones de células viables no cultivables y de células inactivadas se estimaron por diferencia.

Considerando todas las técnicas simultáneamente, se detectaron células de *L. monocytogenes* en algún estado fisiológico en 39 (75,0%) muestras, en 13 de ellas (25,0% del total) únicamente por q-PCR, en 10 (19,2%) únicamente con

métodos dependientes de cultivo y en 16 (30,8%) por ambas técnicas (Figura 1). Estos resultados indican que en 13 muestras únicamente había células inactivadas o viables no cultivables (en niveles ≥ 2,15 log_{10} ufc/g). Por otro lado, el hecho de que en 10 muestras se detectase *L. monocytogenes* únicamente mediante métodos de cultivo es indicador de que en las muestras había células viables cultivables a concentraciones ≥ 1 log_{10} ufc/g y que los niveles de células totales se encontraban por debajo de 2,25 log_{10} ufc/g.

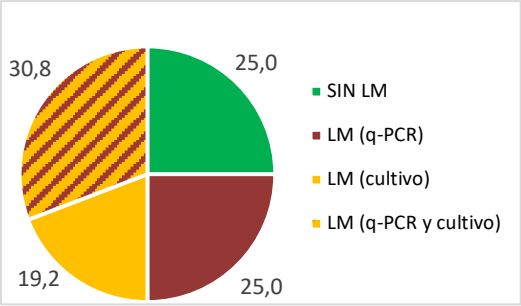


Figura 1: Porcentajes de canales de pollo con *Listeria monocytogenes* (LM) detectada mediante métodos dependientes e independientes (q-PCR) de cultivo.

Se detectaron células viables cultivables de *L. monocytogenes* en 26 canales (50%). En 3 de ellas (en las que pudo cuantificarse mediate el método UNE-EN ISO 11290-2:2018) los niveles fueron de 1 log_{10} ufc/g. En las 23 canales restantes la concentración fue inferior a 1 log_{10}ufc/g, ya que se detectó el microorganismo únicamente después de realizar dos enriquecimientos selectivos en medio líquido (UNE-EN ISO 11290-1:2018).

Se detectaron (q-PCR) células totales, células viables, células viables no cultivables y células inactivadas en 29 (55,8%) canales, siendo las concentraciones estimadas en las muestras positivas de 4,64 ± 0,60 log_{10} ufc/g (células totales), 2,69 ± 0,66 log_{10} ufc/g (células viables), 2,69 ± 0,66 log_{10} ufc/g (células viables no cultivables) y 4,63 ± 0,60 log_{10} ufc/g (células inactivadas) (Figura 2).

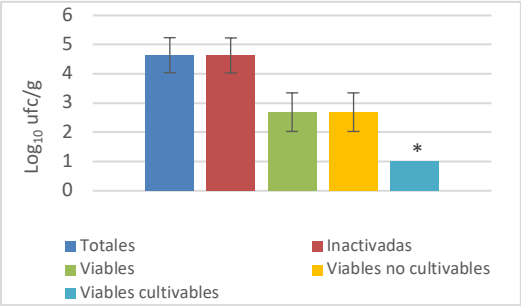


Figura 2: Niveles (log_{10} ufc/g) de células de *Listeria monocytogenes* de diferentes estados fisiológicos (totales, inactivadas, viables, viables no cultivables y viables cultivables) presentes en canales de pollo. Se muestran únicamente los datos de las canales con células de los cinco grupos. *, para hacer los cálculos se consideró el límite de detección de la técnica (1 log_{10} ufc/g).

La mayor parte de las células viables detectadas en canales de pollo se encontraban en estado viable no cultivable. Dada la potencialidad de las células de este estado fisiológico para causar enfermedad, es aconsejable emplear la técnica de q-PCR, junto con un marcador de viabilidad, para detectar y cuantificar en alimentos las células viables no cultivables de *L. monocytogenes*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación ha sido subvencionado por la Junta de Castilla y León (LE018P20), el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-098267-R-C33) y la Universidad de León (18BB282).

REFERENCIAS

[1] C. Rodríguez-Melcón, C. Alonso-Calleja, C. García-Fernández, J. Carballo, R. Capita, *Biology*, **2022**, *11*, 46.

[2] D. Rodríguez-Campos, C. Rodríguez-Melcón, C. Alonso-Calleja, R. Capita, *Pathogens*, **2019**, 8(4), 250.

[3] EFSA and ECDC, *EFSA J.*, **2021**, *19(12)*, 6971 (324 pp.).

[4] H.A. Shourav, M. Hasan, S. Ahmed, *J. Agric. Food Res.*, **2020**, *2*, 100082.

[5] S. Panera-Martínez, C. Rodríguez-Melcón, V. Serrano-Galán, C. Alonso-Calleja, R. Capita, *Food Control*, **2022**, *135*, 108608.

EFECTO DE DIFERENTES TERPENOS SOBRE LOS BIOFILMS DE *Listeria* spp.

Jiménez de Juan, D.[1,2], Capita, R.[1,2], Alonso-Calleja, C.[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

djimj@unileon.es; carlos.alonso.calleja@unileon.es

La listeriosis es una zoonosis que se transmite principalmente por el consumo de alimentos contaminados y que afecta con mayor frecuencia a los denominados grupos de riesgo (niños, ancianos, mujeres embarazadas y personas inmunodeprimidas). Cada año se producen en el mundo aproximadamente 23.000 casos de listeriosis invasiva [1]. Por lo que respecta a la Unión Europea, en el año 2020 se confirmaron un total de 1.876 casos de listeriosis invasiva (0,42 casos por 100.000 habitantes), que se asociaron con una tasa de letalidad del 13,0%, la mayor del conjunto de enfermedades de transmisión alimentaria [2]. De las 26 especies que constituyen el género *Listeria*, la más importante es *Listeria monocytogenes*, por ser el agente etiológico de la gran mayoría de los casos y brotes de listeriosis, tanto en seres humanos como en animales. *Listeria ivanovii* y *Listeria seeligeri* también pueden provocar listeriosis en algunas ocasiones [3].

Listeria spp. tiene la capacidad para formar biopelículas o biofilms en diferentes superficies [4]. Los biofilms son comunidades microbianas estructuradas embebidas en una matriz polimérica extracelular secretada por los propios microorganismos. Estas estructuras favorecen la persistencia de las bacterias en los entornos de procesado de alimentos y el sistema sanitario, ya que las células sésiles son hasta 1.000 veces más resistentes a los biocidas y antibióticos que las bacterias planctónicas o de vida libre. Así, se ha estimado que más del 80 % de las infecciones están asociadas a biofilms [5].

En las últimas décadas se está produciendo un marcado incremento en la prevalencia de resistencia a los antibióticos, estimándose que, de continuar esta tendencia, en el año 2050 las infecciones provocadas por bacterias resistentes serán la principal causa de muerte en el mundo, con unos 10 millones de fallecimientos anuales [6, 7]. La importancia creciente de la resistencia a los antimicrobianos justifica la necesidad de buscar alternativas a estos compuestos. En este sentido, existen algunas estrategias prometedoras, como el empleo de compuestos de origen vegetal. Estos compuestos naturales presentan menor probabilidad de desarrollo de resistencias que los antibióticos, puesto que, a diferencia de éstos, actúan sobre múltiples lugares diana (efecto "*multi-target*"). Además, algunos compuestos antimicrobianos derivados de plantas están aprobados por la administración estadounidense de alimentos y medicamentos (FDA) como "Generalmente Reconocidos Como Seguros" (GRAS), por lo que son inocuos y bien aceptados por los consumidores [8].

Los terpenos (carvacrol, eugenol, timol o trans-cinamaldehído), son muy abundantes en diferentes aceites esenciales de origen vegetal [8-11]. En estudios realizados recientemente se ha demostrado que estos compuestos pueden tener una elevada actividad frente a varias especies de bacterias patógenas relevantes, tanto Gram-positivas como Gram-

negativas [9]. El principal mecanismo de acción de estas moléculas consiste en la degradación de las membranas bacterianas y la inhibición de las bombas de expulsión ("*efflux pumps*"), de ahí que se les conozca como "*efflux pumps inhibitors*" (EPIs). Este mecanismo de acción se traduce en la acumulación de los compuestos fenólicos en el espacio intracelular, lo que causa una interrupción del metabolismo y una progresiva inhibición de las funciones celulares y conduce, en última instancia, a la inactivación y muerte celular [8, 10, 11].

Hasta el momento se ha demostrado claramente la efectividad de los terpenos y terpenoides (sus derivados oxidados o de mayor longitud de cadena hidrocarbonada) sobre las células planctónicas de diferentes grupos microbianos. Sin embargo, son escasos los trabajos encaminados a conocer la actividad de estos compuestos sobre las biopelículas o biofilms bacterianos, siendo este un aspecto de gran interés que necesita nuevas investigaciones [12].

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto de 6 combinaciones de cuatro terpenos comunes y abundantes en muchas especies de plantas (carvacrol, timol, eugenol y trans-cinamaldehído), aplicados de dos en dos, sobre las biopelículas de 10 cepas *Listeria* spp. (9 cepas de *Listeria monocytogenes* y una cepa de *Listeria ivanovii*) previamente formadas en placas de poliestireno. Tras la generación de los biofilms durante 48 h a 37 °C en condiciones estáticas, se procedió a su tratamiento (24 horas a 37 °C) con cinco concentraciones diferentes de los terpenos (8 veces la concentración mínima inhibitoria -MIC-, 4 MIC, 2 MIC, 1 MIC y control -sin terpeno-). Para el estudio de los biofilms se empleó la técnica de tinción con cristal violeta, realizándose las lecturas, tras el tratamiento con los compuestos terpenoides, a una densidad óptica de 580 nm (DO_{580}) con ayuda de un Bioscreen C MBR.

La DO_{580} de los biofilms no tratados (controles) osciló entre 0,46 ± 0,16 y 2,03 ± 0,63. Tras el tratamiento con los terpenos la DO_{580} se redujo, de manera proporcional a la concentración aplicada. En general, los biofilms fueron completamente erradicados a concentraciones de entre 2 MIC y 4 MIC, dependiendo de la cepa y el compuesto considerados.

Estos resultados demuestran que los terpenos ensayados poseen actividad antibiofilm, por lo que, a la hora de eliminar o controlar estas estructuras, podrían suponer una alternativa o complemento a los antimicrobianos de origen sintético.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación ha sido subvencionado por el *Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-098267-R-C33),* la *Junta de Castilla y León (LE018P20) y* la *Universidad de León (18BB282).*

REFERENCIAS

[1] D. Rodríguez-Campos, C. Rodríguez-Melcón, C. Alonso-Calleja, R. Capita, *Pathogens*, **2019**, *8(4)*, 250.

[2] EFSA and ECDC, *EFSA J.*, **2021**, *19(12)*, 6971 (324 pp.).

[3] C. Rodríguez-Melcón, C. Alonso-Calleja, C. García-Fernández, J. Carballo, R. Capita, *Biology*, **2022**, *11*, 46.

[4] C. Rodríguez-Melcón, C. Alonso-Calleja, R. Capita, *Appl. Sci.,* **2019**, *9(23)*, 52-56.

[5] C. González-Machado, R. Capita, F. Riesco-Peláez, C. Alonso-Calleja, *PLoS ONE*, **2018**, *13(7)*, e0200011.

[6] A. Castaño-Arriba, C. González-Machado, G. Igrejas, P. Poeta, C. Alonso-Calleja, R. Capita, *Pathogens*, **2020**, *9*, 1021.

[7] R. Capita, C. Alonso-Calleja, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2013**, *53(1)*, 11-48.

[8] M.G. Cusimano, V. Di Stefano, M. La Giglia, V.D.M. Lo Presti, D. Schillaci, F. Pomilio, M. Vitale, *Molecules*, **2020**, *25(2)*, 383.

[9] B. Khameneh, M. Iranshahy, V. Soheili, B.S. Fazly Bazzaz. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, **2019**, *8*, 118.

[10] Q. Liu, H. Niu, W. Zhang, H. Mu, C. Sun, J. Duan, *Lett. Applied Microbiol*., **2015**, *60(5)*, 421-430.

[11] W. Yuan, H.G. Yuk, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2019**, *85(14)*, e00271-19.

[12] D.C. Nuță, C. Limban, C., Chiriță, M.C. Chifiriuc, T. Costea, P. Ioniță, I. Nicolau, I. Zarafu, *Processes*, **2021**, *9(3)*, 537.

NUEVAS ESPECIES DE *Fusarium* PRODUCTORAS DE TOXINAS T-2 Y HT-2 EN CAMPOS DE AVENA

Gil-Serna J.[1], **Vázquez C.**[1], **Patiño B.** [1]

1 Universidad Complutense de Madrid/Facultad de CC Biológicas/Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología. C/José Antonio Nováis 12, 28040, Madrid, España.

jgilsern@ucm.es

Los tricotecenos tipo A son importantes micotoxinas que, en los últimos años, han sido el foco de atención de las autoridades europeas, esperándose que en los próximos meses se establezca la legislación de sus niveles máximos en productos alimentarios [1]. En este grupo, destacan las toxinas T-2 y HT-2 ya que presentan elevada toxicidad frente a animales y humanos y están presentes cada vez en mayor número de productos alimentarios. La avena es el cereal donde más frecuentemente se ha descrito la presencia de estas toxinas, fundamentalmente en países del norte de Europa donde las condiciones climáticas favorecen al crecimiento de los hongos productores [2]. Distintos estudios de incidencia llevados a cabo en nuestro grupo han descrito la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en cereales españoles, pero hasta el momento no se sabía que especies eran las productoras de las mismas.

Recientemente, nuestro grupo ha llevado a cabo un estudio metataxonómico de las comunidades fúngicas de muestras de avena en España y se ha demostrado la presencia de distintas especies de *Fusarium* que podrían ser potenciales productoras de toxinas T-2 y HT-2 [3]. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar estas especies para comprobar si son capaces de sintetizar este tipo de toxinas.

A partir de muestras tomadas en campos de avena de distintas localidades españolas, se aislaron especies de *Fusarium* mediante banco de diluciones y siembra en placas de agar rosa de bengala con cloranfenicol. La identificación de los hongos del género *Fusarium* es especialmente compleja debido a los cambios taxonómicos que se han producido en los últimos años. Por ello, la clasificación de los aislados se confirmó mediante un exhaustivo análisis filogenético por máxima verosimilitud que implicó la secuenciación de la región parcial del factor de elongación 1-α, el gen *rpbo2* y la región ITS1-5,8S-ITS2. En este análisis se incluyeron más de 80 cepas de las principales especies del género *Fusarium*. Los aislados se identificaron como *F. acuminatum*, *F. brachygibbosum*, *F. flocciferum*, *F. poae* y *F. tricinctum*.

Los hongos aislados se cultivaron en caldo GYEP, un medio inductor de la síntesis de tricotecenos, durante 10 días a 28º C en un agitador orbital (150 rpm). Se procedió a evaluar su capacidad de producir toxinas T-2 y HT-2 mediante ELISA competitivo. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

	Concentración T-2/HT-2 (µg/L)
F. acuminatum	ND
F. brachygibbosum	15,02 ± 0,62
F. flocciferum	21,13 ± 1,39
F. poae	ND
F. tricinctum	ND

Tabla1: Concentración de T-2/HT-2 en cultivos de GYEP inoculados con las distintas especies de *Fusarium* tras 10 días de incubación. Los resultados son la media ± error estándar de las cuatro réplicas evaluadas. ND indica que los valores estaban por debajo del límite de detección de la técnica.

Se puede comprobar que tanto el aislado identificado como *F. brachygibbosum* como el correspondiente a *F. flocciferum* producen estas micotoxinas en medio GYEP.

Teniendo en cuenta que la avena es la principal matriz susceptible de estar contaminada con toxinas T-2 y HT-2, se procedió a comprobar si estas especies también eran capaces de producir estas micotoxinas en el propio sustrato. Para ello, se llevó a cabo la inoculación de 25 g de granos de avena con dos bocados de micelio de cada una de las cepas y se incubaron en estático durante 14 días a 28 ºC. La concentración de toxinas T-2/HT-2 en las muestras se evaluó igualmente mediante ELISA competitivo.

Los resultados de la producción de toxinas T-2 y HT-2 en avena por *F. brachygibbosum* y *F. flocciferum* se muestran en la tabla 2. En ambos casos, se puede comprobar como los aislados son capaces de producir las toxinas en este sustrato, lo que las convierte en una fuente potencial de riesgo de contaminación en avena.

	Concentración T-2/HT-2 (µg/L)
F. brachygibbosum	45,44 ± 10,87
F. flocciferum	36,11 ± 22,08

Tabla2: Concentración de T-2/HT-2 en avenas inoculadas con las distintas especies de *Fusarium* tras 14 días de incubación. Los resultados son la media ± error estándar de las cuatro réplicas evaluadas.

La presencia de *F. brachygibbosum* en matrices alimentarias se ha descrito en muy pocas ocasiones, pero recientemente la EFSA lo ha incluido como un importante hongo fitopatógeno que supone peligro potencial en cultivos alimentarios debido a un claro aumento de su incidencia [4]. Por otro lado, hay muy pocos estudios que hayan aislado *F. flocciferum* de algún cultivo o alimento. Sin embargo, teniendo en cuenta la dificultad de su discriminación de otras especies del complejo de especies de *Fusarium tricinctum*, no se puede descartar que haya habido problemas de mala identificación y los aislados se hayan atribuido a otras especies más comunes como *F. tricinctum* o *F. acuminatum*. En algunos trabajos, se ha mencionado el posible potencial de ambas especies para producir micotoxinas, pero, hasta nuestro conocimiento, este es el primer trabajo donde se describe inequívocamente su capacidad para producir tricotecenos tipo A.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la necesidad de estudios extensos de incidencia de especies de *Fusarium* en nuestro país, que se lleven a cabo con cuidadosas asignaciones taxonómicas de los aislados descritos. Solo de esta manera se podrá esclarecer el potencial riesgo que supone su presencia en productos alimentarios.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, proyecto RTI 2018-097593-B-C21R y la Comunidad de Madrid/Universidad Complutense, proyecto CAM/UCM, proyecto PR65/19-22428

REFERENCIAS

[1] European Commission, *OJEU,* **2013**, *91,* 12-15.

[2] Dipendra K. Mahato, Shikha Pandhi, Madhu Kamle, Akansha Gupta, et al., *Toxicon*, **2022**, 208, 62-77.

[3] Jéssica Gil-Serna, Belén Patiño, Covadonga Vázquez, Ángel Medina, *XXVIII Congreso Sociedad Española de Microbiología*, **2021**.

[4] EFSA Panel on Plant Health, *EFSA J.*, **2021**, 19, 6887.

CARACTERIZACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PROCEDENTES DE INDUSTRIAS ELABORADORAS DE EMBUTIDOS Y JAMÓN CURADO

Pérez-Boto D.[1], D'Arrigo M.[2], García-Lafuente A.[2], Pérez-Baltar A.[1], Arqués J.L.[1], Medina M.[1]

1 CSIC/INIA/Departamento de Tecnología de Alimentos. Ctra. La Coruña km. 7,5 28040 Madrid

2 CSIC/INIA/Centro para la Calidad de los Alimentos. Calle José Tudela s/n 42004 Soria

perez.boto@inia.csic.es

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista capaz de crecer en numerosos alimentos, en un amplio intervalo de temperaturas, pH y concentraciones de sal. La contaminación se atribuye a una manipulación inadecuada en combinación con un almacenamiento en condiciones de abuso de temperatura (1). Las enterotoxinas estafilocócicas causan gastroenteritis a las 2-8 h de su ingestión. Algunas cepas enterotoxigénicas pueden ser resistentes a meticilina (MRSA) detectándose en derivados cárnicos (2).

Se ha investigado la presencia de *S. aureus* en 6 empresas elaboradoras de productos cárnicos curados madurados. Se recogieron 720 muestras de ambiente y superficies y 82 de ingredientes, masas y productos. Los aislados coagulasa + se identificaron mediante PCR multiplex (genes 16S, *mec*A y nucleasa). El tipado molecular se realizó por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) y *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Se estudió la presencia de genes de enterotoxinas (*sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sek, sem, sen, seo, sep, seq, ser, seu* y *sev*), de la leucocidina de Panton-Valentine (*pvl*), de la toxina del síndrome del shock tóxico *(tst*) y de resistencia a penicilina (*blaZ*). Se identificó el *egc* (*enterotoxin gene cluster*), mediante la secuenciación de sus genes. Además, se investigó la producción de las enterotoxinas A-D con el kit SET-RPLA y la resistencia a los antibióticos PEN, AMP, AMC, OXA, FOX, CLD, ERY, CLF, TET, CIP, GEN, VAN, TMP y SMX mediante antibiogramas de difusión en disco.

Se detectó la presencia de *S. aureus* en 5 de las 6 industrias (Tabla 1), con una incidencia global del 4,7%, que fue del 4,8% durante el procesado (DP) y del 1,4% tras la limpieza y desinfección (TLD). La prevalencia en productos fue del 13,4% (productos intermedios, masas y tripas), aunque no se aisló en producto final. Se seleccionaron 38 aislados, uno por muestra positiva, de los que 5 (13,2%) fueron MRSA.

	Superficies	DP	TLD	Contacto	No contacto	Productos
Planta	Nº muestras/ Nº positivas	Nº muestras/ Nº positivas	Nº muestras/ Nº positivas	Nº muestras/ Nº positivas	Nº muestras/ Nº positivas	Nº muestras/ Nº positivas
A	123/4	122/3	1/1	49/3	74/1	22/2
B	183/11	129/11	54/0	98/6	85/5	36/4
C	139/7	71/6	68/1	60/4	79/3	11/5
D	104/3	53/2	51/1	49/2	55/1	13/0
E	97/2	60/2	37/0	61/1	36/1	NA
F	74/0	69	5	48	26	NA
Total	720/27	504/24	216/3	365/16	355/11	82/11

Tabla 1: Prevalencia de *S. aureus*

El análisis por PFGE de los MSSA (sensibles a meticilina) reveló un total de 14 pulsotipos (PT) con una alta diversidad. Los aislados MRSA se detectaron en masas y superficies de una única planta.

Mediante MLST se obtuvieron 11 secuenciotipos (ST) agrupados en 7 complejos clonales (CC) (Figura 1). El más abundante fue ST30, en las plantas B y D, seguido de ST12 en la planta C y ST1 en B, C y E. El resto de STs, ST15, ST45, ST9, ST71, y ST433 aparecieron en menor proporción y solo en una de las plantas. Se describió un nuevo secuenciotipo: ST5554. Los 4 MRSA

se adscribieron al ST398 (CC398). Los ST1, ST9 y ST188 se agruparon en el CC1, los ST30 y ST433 en el CC30 y el resto a CC7, CC12, CC15 y CC45.

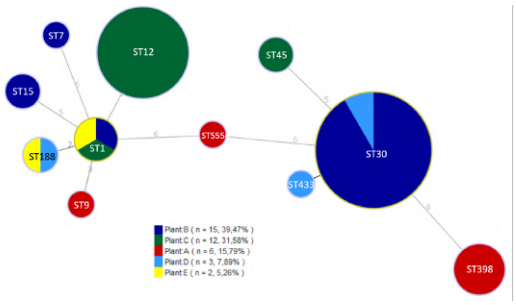


Figura 1: Relación filogenética entre los distintos aislados analizados por MLST

Se detectó producción de enterotoxina A en los cultivos de 11 aislados ST30 de la planta C y un ST188 de la D, de enterotoxina B en un aislado ST1 de la planta B y de enterotoxina C por dos aislados ST12 y ST45 de la C.

Se comprobó la presencia de genes de virulencia en 33 de los 38 aislados (Tabla 2). En los ST398, ST12, ST554 y ST7 no se observaron genes de enterotoxinas. Dieciséis aislados (ST9, ST30, ST45 y ST433) presentaron los genes *seg, sei, sem, sen, seo, seu*, que integran el clúster de enterotoxinas *egc*. Se registró una incidencia elevada del gen *tst*, confirmado por secuenciación, pero no del *pvl.* La secuenciación de los amplificados inespecíficos de este último permitió identificar el gen de la leucotoxina *luk*ED (ST12).

Once aislados fueron sensibles a todos los antibióticos. Un 71% eran resistentes al menos a un antibiótico y un 18% a tres o más, siendo considerados MDR (*multidrug resistant*). La mayoría de resistencias detectadas fueron a la penicilina, con detección de *blaZ.* Los aislados MRSA mostraron resistencia, al menos, a tres clases de antibióticos.

La incidencia de *S. aureus* puede considerarse baja, y su presencia en superficies limpias poco destacable. Sin embargo, esta contaminación es más elevada, en mezclas cárnicas, apuntando el origen de *S. aureus* a las materias primas, las cuales podrían contaminar el ambiente de procesado.

Aislado	Planta	ST	Gen enterotoxinas	*tst*	*pvl*
A42	A	ST398	-	-	-
A6	A	ST398	-	-	-
A17	A	ST398	-	-	-
A18	A	ST398	-	-	-
A19	A	ST9	*seg, sei, selm, sen, seo, seu*	+	-
A20	A	ST5554	-	+	-
B1	B	ST7	-	-	-
B3	B	ST1	*seh*	+	-
B4	B	ST15	-	+	-
B28	B	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
B29	B	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
B30	B	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
B31	B	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
B32	B	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
B33	B	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
B34	B	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
B35	B	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
B36	B	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
B37	B	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
B38	B	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
B39	B	ST15	-	+	-
C8	C	ST12	-	+	-
C9	C	ST12	-	+	-
C10	C	ST12	-	+	-
C12	C	ST12	-	+	-
C13	C	ST45	*sec, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
C21	C	ST12	-	+	*lukED*
C22	C	ST12	-	+	*lukED*
C23	C	ST12	-	+	*lukED*
C24	C	ST12	-	+	*lukED*
C25	C	ST12	-	+	*lukED*
C26	C	ST45	*sec, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
C27	C	ST1	*seh*	+	-
D5	D	ST433	*seg, sei, sem, sen, seo, seu*	-	-
D40	D	ST188	*sea*	+	-
D41	D	ST30	*sea, seg, sei, sem, sen, seo, seu*	+	-
E43	E	ST1	*seh*	-	-
E44	E	ST188	-	+	-

Tabla 2: Virulencia de los aislados de *S. aureus*

La presencia de *S. aureus* con determinantes de virulencia, de aislados MDR y de MRSA ST398, representa un riesgo potencial para los consumidores, si las condiciones de conservación no son adecuadas. Se subraya la importancia de monitorizar la contaminación, así como de mejorar la higiene de las materias primas y en el ambiente de procesado de productos cárnicos.

AGRADECIMIENTOS
Proyecto RTA2017-00027-C03-01

REFERENCIAS

[1] *Sergelidis D, Angelidis AS. Lett. Appl. Microbiol.* ***2017****, 64, 409-418.*
[2] *Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Toxins* ***2010****, 2, 1751-1773.*

DESARROLLO DE NUEVOS BIOCIDAS NATURALES DE ORIGEN MICROBIANO CON EFICACIA FRENTE A *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Mercedes de la Cruz[1], Sagrario Ortiz [2], Ángeles Melguizo[1], Pilar Sánchez[1], Jesús Martín[1], José R. Tormo[1], Ignacio González[1], Victor González[1], Olga Genilloud[1], Francisca Vicente[1], Juan Arqués [2], Joaquín V. Martinez-Suarez [2]

1 Fundación MEDINA, Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento 34, Armilla, Granada E-18016, España

2 Dpto. de Tecnología de Alimentos, INIA-CSIC, Madrid, España

mercedes.delacruz@medinaandalucia.es

Listeria monocytogenes es uno de los principales patógenos alimentarios en términos de mortalidad. Los ambientes en que se procesan los alimentos pueden favorecer la supervivencia de ciertos microorganismos, como *L. monocytogenes* que además tiene la capacidad de formar biofilms en las instalaciones y equipos de las industrias alimentarias. Este hecho incrementa el riesgo de contaminación de los alimentos y conduce a problemas críticos de Seguridad Alimentaria y Salud Pública, suponiendo a su vez un impacto económico importante.

Las células bacterianas asociadas a biofilms son más resistentes a los desinfectantes que las células planctónicas (Figura 1), y esto dificulta su eliminación y permite su persistencia en las zonas de producción de alimentos durante largos periodos de tiempo.

Para aumentar la seguridad y calidad microbiológica de los alimentos mediante el desarrollo y validación de nuevos biocidas, nuestro proyecto combina la metodología de HTS (*High throughput screening* o de cribado de alto rendimiento) con la exploración de nuevas aplicaciones de los productos naturales de origen microbiano.

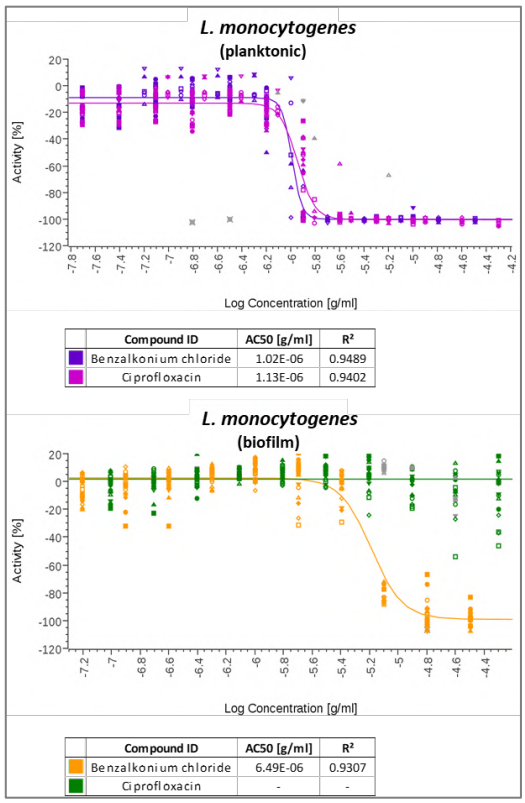


Figura 1: Diferencia de sensibilidad a un desinfectante (cloruro de benzalconio) de células planctónicas y biofilms de *L. monocytogenes*. El antibiótico ciprofloxacino se incluye como control.

Así, se han establecido las condiciones experimentales de un ensayo *in vitro* de HTS para seleccionar extractos con actividad antibiofilm frente a *L. monocytogenes* .

La actividad se ha medido mediante fluorescencia utilizando resazurina (un indicador de oxido-reducción que permite cuantificar la viabilidad de las células presentes en los biofilms).

Además, se ha contado con cinco cepas de *L. monocytogenes* resistentes a desinfectantes procedentes de una planta de producción de alimentos (S1, S10-1, S2-2, S2-3, S10-3; López-Alonso *et al*., 2015), siendo una de las cepas (S1) un mutante *prfA* (Ortiz *et al*., 2016). Como control se ha utilizado una cepa de referencia sensible a desinfectantes (*L. monocytogenes* EGD-e; Glaser *et al*., 2001).

Por el momento se han ensayado en las condiciones establecidas 1520 extractos, de los cuales 127 han sido seleccionados en base a su perfil de actividad frente a la cepa EGD-e.

Posteriormente, estos extractos se han ensayado frente al panel de cinco cepas de *L. monocytogenes* resistentes a desinfectantes, y se han analizado sus perfiles cromatográficos para priorizarlos según su actividad y según contengan o no moléculas ya conocidas.

Se ha visto que 43 extractos contienen compuestos tales como nocardamina, deferoxamina y fenazina entre otros, 28 presentan un perfil cromatográfico muy pobre y 56 no presentan coincidencias con moléculas registradas ni en la base de datos interna de la Fundación MEDINA ni en el Diccionario de Productos Naturales.

Por otro lado, 12 extractos presentan una actividad antibiofilm uniforme sobre las cinco cepas resistentes, y de ellos 3 extractos están dentro del grupo sin coincidencias con moléculas anteriormente descritas.

Actualmente, se está trabajando en estudiar la naturaleza y aplicabilidad de los extractos seleccionados, así como en la búsqueda de nuevos biocidas procedentes de productos naturales con actividad frente a *L. monocytogenes*.

El complejo mecanismo de la formación de biofilms se ha conseguido definir cada vez mejor, pero la dificultad que plantea su eliminación sigue siendo un grave problema. En este contexto, el desarrollo de nuevos biocidas de origen natural permitirá a la industria alimentaria implementar nuevas estrategias de de limpieza y desinfección que sean más efectivas.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el Proyecto RTI2018-098267-R-C31 del Ministerio de Ciencia e Innovación de España.

REFERENCIAS

[1] Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durand, L., Dussurget, O., Entian, K.-D., Fsihi, H., Garcia-Del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.-M., Karst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Mata Vicente, J., Ng, E., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J.-C., Remmel, B., Rose, M., Rusniok, C., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J.-A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P. "Comparative genomics of Listeria species." Science (2001) 294:849-852. doi: 10.1126/science.1063447.

[2] López-Alonso, V, Ortiz, S, Martínez-Suárez, J. V. 2015. Genome sequences of five disinfectant-resistant Listeria monocytogenes strains from two Iberian pork processing plants. Genome Announcements 3: e00077-15. doi: 10.1128/genomeA.00077-15.

[3] Ortiz, S., López-Alonso, V., Rodríguez, P., Martínez-Suárez, J. V. 2016. The connection between persistent, disinfectant-resistant Listeria monocytogenes strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: evidence from comparative genome analysis. Applied and Environmental Microbiology, 82: 308-317. doi: 10.1128/AEM.02824-15.

ESTUDIO FENOTÍPICO Y GENÉTICO DE LA PRODUCCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN CEPAS DE *Enterococcus* AISLADAS DE QUESOS TRADICIONALES.

Abarquero, D.[1], Fresno, J.M.[1], Renes, E.[1], Mayo, B.[2], Tornadijo, M.E.[1]

1 Universidad de León / Facultad de Veterinaria / Dpto. Higiene y Tecnología de los Alimentos / Grupo BALAT. Campus de Vegazana s/n, (24071) León, León (España).

2 CSIC / Instituto de los Productos Lácteos de Asturias / Departamento de Microbiología y Bioquímica. Paseo Río Linares, s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias (España).

dabac@unileon.es

Enterococcus es el tercer género más amplio de las bacterias lácticas (BAL) que está presente como parte de la microbiota de la leche. Debido a su ubicuidad, su papel es esencial en productos lácteos artesanales como los quesos, especialmente en aquellos elaborados a partir de leche cruda, donde tienen un papel importante en la maduración [1]. Los enterococos definen la textura y las propiedades sensoriales del queso, gracias a su elevada actividad proteolítica; e influyen en su microbiota, debido a su capacidad de producir bacteriocinas. Sin embargo, la presencia de enterococos en el queso puede producir la acumulación de aminas biógenas (BAs), lo cual puede provocar intoxicaciones de considerable gravedad [2]. El objetivo de este trabajo fue detectar fenotípicamente y genéticamente la producción de BAs en cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos artesanales elaborados con leche cruda.

Tabla 1. Especies y cepas incluidos en este estudio.

Especie	Cepa
Enterococcus faecalis	TAUL44, TAUL69, TAUL242, TAUL245, TAUL1400
Enterococcus durans	TAUL210
Enterococcus gilvus	TAUL267, TAUL1210, TAUL1351t

Se seleccionaron cinco cepas de *E. faecalis*, una de *E. durans* y tres cepas de *E. gilvus*. Por un lado, se ensayó la producción de tiramina, histamina y putrescina mediante la incubación de las cepas durante 72 h en caldo MRS suplementado con 1 mM de los aminoácidos precursores (tirosina, histidina, ornitina y agmatina) y se cuantificó por UHPLC. Por otro lado, se realizó la detección por PCR de los genes que codifican las enzimas tirosina descarboxilasa (*tdcA*), histidina descarboxilasa (*hdcA*), ornitina descarboxilasa (*odc*) y el clúster agmatina deiminasa (*aguA-aguD*).

Tabla 2. Cebadores utilizados para la detección por PCR de los genes que codifican las enzimas tirosina descarboxilasa (*tdcA*), histidina descarboxilasa (*hdcA*), ornitina descarboxilasa (*odc*) y agmatina deiminasa (*aguA-aguD*).

Name	Sequence (3'-5')	bp	Ref.
tdc1	AACTATCGTATGGATATCAACG	720	[3]
tdc2	TAGTCAACCATATTGAAATCTGG		
HDC3	GATGGTATTGTTTCKTATGA	435	[4]
HDC4	CCAAACACCAGCATCTTC		
ODC1	NCAYAARCAACAAGYNGG	900	[4]
ODC2	GRTANGGNTNNGCACCTTC		
Seq1	CAAGATTTDTTCTGGGCHTTYTTCTC	700	[5]
Seq2	TTGGHCCACARTCACGAACCCT		

Tras el cultivo de las cepas de *Enterococcus* en presencia de 1 mM de histidina, no se detectó producción de histamina en

ninguna de las nueve cepas estudiadas, ni producción de putrescina a partir de la ornitina. Tampoco se detectó producción de tiramina en ninguna de las tres cepas de *E. gilvus*. Sin embargo, sí fue detectada producción de tiramina en la cepa de *E. durans* TAUL210 y en las cinco cepas de *E. faecalis*, registrándose la mayor producción en el cultivo inoculado con la cepa TAUL245 (1.917 mM). Por último, la producción de putrescina a partir de la agmatina se detectó únicamente en las cinco cepas de *E. faecalis*, siendo la cepa TAUL245 la que mayor producción registró (0.474 mM).

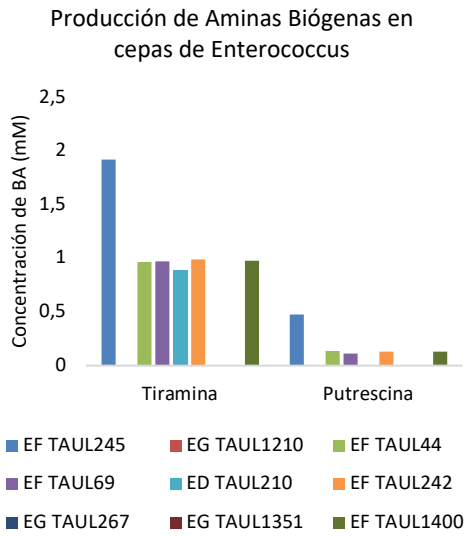


Figura 1: producción de tiramina y putrescina (mM) cuantificado por UHPLC en las cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos artesanales. EF: *E. faecalis*, EG: *E. gilvus,* ED: *E. durans*.

La detección por PCR de los genes que codifican las enzimas implicadas en la síntesis de las BAs incluidas en el estudio no mostró amplificación de los genes *hdcA* ni *odc* en ninguna de las cepas ensayadas. Sin embargo, sí hubo amplificación del gen *tdcA* en las cinco cepas de *E. faecalis* y en la cepa de *E. durans*, así como la amplificación de *aguA-aguD* en las cinco cepas de *E. faecalis*.

En conclusión, la abundancia de enterococos, especialmente de cepas de *E. faecalis*, como parte de la microbiota de la leche cruda puede conducir a la acumulación de BAs tóxicas en el queso como la tiramina o la putrescina, lo cual implica un riesgo desde el punto de vista de la seguridad alimentaria.

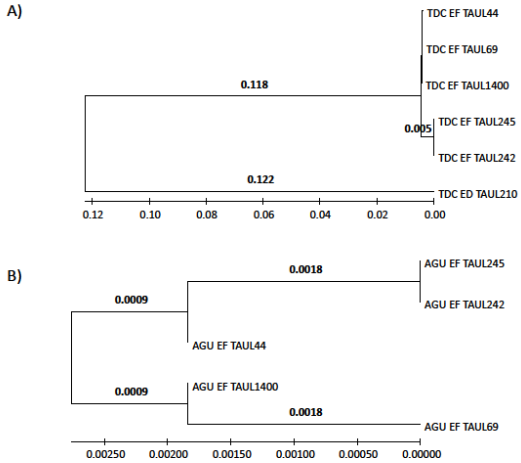


Figura 2. A) Árbol filogenético (método de máxima verosimilitud) del segmento interno (642 pb) del gen de la tirosina descarboxilasa (*tdcA*) de las cepas *E. faecalis* y *E. durans*; y B) árbol filogenético (método de máxima verosimilitud) del segmento interno (547 pb) del fragmento del clúster de genes de la agmatina deiminasa (*aguA-aguD*) de las cepas *E. faecalis;* generados con el software MEGA (v.11). La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones por sitio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de León la beca para estudios de doctorado otorgada a Daniel Abarquero, recogida en el marco del Programa Propio de ayudas a la Investigación de la Universidad de León.

REFERENCIAS

[1] de Sousa MA, Muller MP, Berghahn E, de Souza CFV, Granada CE. LWT - Food Sci Technol, **2020**, 131(July).

[2] Tittarelli F, Perpetuini G, Di Gianvito P, Tofalo R. LWT - Food Sci Technol, **2019**, 101, 1–9.

[3] Fernández M, Linares DM, Alvarez MA. J Food Prot, **2004**, 67(11), 2521–2529.

[4] Coton M, Romano A, Spano G, Ziegler K, Vetrana C, Desmarais C, et al. Food Microbiol, **2010**, 27(8), 1078–1085.

[5] Ladero V, Rattray FP, Mayo B, Martín MC, Fernández M, Alvarez MA.. Appl Environ Microbiol, **2011**, 77(18), 6409–6418.

IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE GENES RESPONSABLES DE LA ADHESIÓN DE CEPAS DE *Lentilactobacillus parabuchneri* PRODUCTORAS DE HISTAMINA

M. Agustina Sarquis[1, 2], Víctor Ladero[1, 2], María Díaz[1, 2], María Fernández[1, 2], Miguel A. Alvarez[1, 2].

1 Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC, Paseo Rio Linares s/n, 33300, Villaviciosa, España.

2 Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Av. del Hospital Universitario, s/n, 33011 Oviedo, Asturias, España.

maag@ipla.csic.es

La histamina es una amina biógena que se sintetiza mediante descarboxilación enzimática del aminoácido histidina y que, debido al metabolismo de algunas bacterias, se puede acumular en concentraciones elevadas en los alimentos, provocando reacciones adversas en los consumidores. El queso es uno de los alimentos en los que más frecuentemente se acumula histamina a concentraciones tóxicas, siendo *Lentilactobacillus parabuchneri* el principal responsable (1). Trabajos previos de nuestro grupo revelaron la capacidad de algunas de sus cepas de formar biofilms en distintas superficies, lo que constituye un riesgo de contaminación de los quesos durante su producción, especialmente de los quesos procesados, como los rallados y cortados.

Los biofilms son comunidades de microorganismos que permanecen adheridos a una superficie y embebidos en una matriz extracelular. Su presencia en la industria alimentaria es muy habitual, pudiendo adherirse a las superficies de los equipamientos utilizados, provocando la contaminación de los alimentos. Dependiendo de las especies pueden causar su deterioro, con la consecuente pérdida económica, e incluso pueden ser responsables de intoxicaciones alimentarias.

El objetivo del presente trabajo fue identificar los genes de *L. parabuchneri* involucrados en la formación del biofilm y determinar su funcionalidad.

Con este fin, se secuenció y analizó el genoma de 6 cepas con diferentes capacidades de producción de biofilm (fuertes, moderadas y débiles). En ellas, se confirmó la presencia del *cluster HDC* de producción de histamina. Además, se identificó un *cluster* de 4 genes (Figura 1), presente únicamente en las cepas formadoras de biofilm fuerte, que mostró similitud con genes implicados en la formación de *pili*, siguiendo el modelo *sortase-mediated pilus* (2), y que por tanto podría estar relacionado con la capacidad de adhesión a superficies.

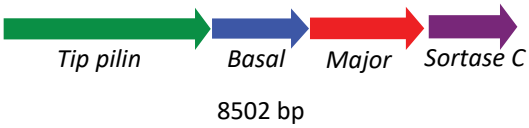


Figura 1: *Cluster* de adhesión formado por 4 genes. *Tip pilin* favorece la adhesión a superficies; *Basal* permite el anclaje a la pared celular; *Major* codifica las pilinas que forman el eje principal del *pilus*; y *Sortase C* codifica la enzima que realiza los enlaces covalentes entre las pilinas.

Se realizaron Blast para saber si otras especies contenían el *cluster* y se encontró que *Levilactobacillus brevis* SRCM101174 y

Lactobacillus plantarum LZ227 presentaban un *cluster* similar, ubicado en un plásmido. Es por ello que, mediante RT-qPCR, comprobamos que en *L. parabuchneri* IPLA11150 (cepa fuerte formadora de biofilm) el número de copias estimado para los genes del *cluster* era aproximadamente 10 veces mayor que para los genes de localización cromosómica, evidenciando una localización plasmídica. A partir de este resultado, se realizó la secuenciación del genoma mediante PacBio, confirmándose que efectivamente el *cluster* de adhesión en la cepa de *L. parabuchneri* IPLA11150 se encuentra en un plásmido de 33,4 Kb. En este plásmido se localizaron 47 ORF, a 28 de las cuales se les asignó una posible función. De ellas, 13 presentaron similitud con transposasas y secuencias de inserción, por lo que podrían facilitar la transmisión del *cluster* a otras cepas, transfiriéndoles la habilidad de adherirse a superficies.

Para determinar la funcionalidad del *cluster* identificado se procedió a su clonación en *Lactococcus lactis* NZ9000, una bacteria láctica no formadora de biofilm. En primer lugar, se amplificó el *cluster* mediante PCR y se realizó una transformación intermedia en *Escherichia coli* DH10B. Tras comprobar la secuencia del inserto, este se ligó en el vector pIL253 como un fragmento *Sal*I y *Bgl*II de 7,13 kb y se transformó en *L. lactis* NZ9000. Se amplificaron y secuenciaron los insertos de varios transformantes positivos, y se seleccionó uno con la secuencia correcta (clon pMAS22).

Posteriormente, se utilizó la técnica del cristal violeta descrita por Díaz y col. (3), con la cual se evaluó la habilidad de este transformante de formar biofilms en placas de poliestireno.
Brevemente, se inocularon los pocillos con un cultivo a 10^6 UFC/ml. Tras 48h de incubación a 32ºC, se realizaron dos lavados con PBS, se tiñeron las células con cristal violeta (0,5% p/v) y se eliminaron los restos tras tres lavados con agua destilada estéril. Se añadió acetona/etanol (33%) para diluir y medir la densidad óptica (DO) de la biomasa de los biofilms. Se observó un incremento significativo de la DO del clon pMAS22 respecto del transformante que contenía el vector pIL253 vacío, indicando que el *cluster* confería un aumento de la capacidad de adherencia a la cepa portadora (Figura 2).

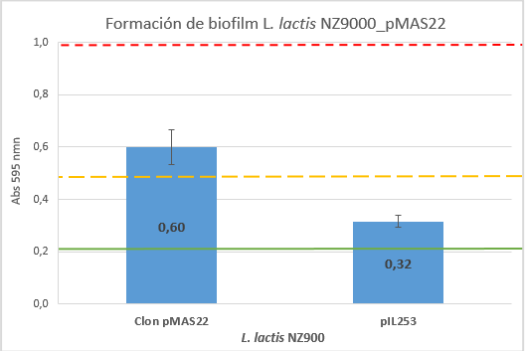


Figura 2: Capacidad de formación de biofilms en poliestireno de los transformantes de *L. lactis* NZ9000. Los datos muestran los valores medios ± desviación estándar de los replicados biológicos y técnicos. Línea verde = DOc; Línea marilla= 2 × DOc; línea roja = 4 × DOc.

AGRADECIMIENTOS

This work is part of a project that has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie Grant Agreement No. 813439.

REFERENCIAS

[1] Diaz M, Ladero V, Redruello B, Sanchez-Llana E, del Rio B, Fernandez M, et al. A PCR-DGGE method for the identification of histamine-producing bacteria in cheese. Food Control. 2016;*63*:216–23.

[2] Vengadesan Krishnan PC and AK. Pili in Probiotic Bacteria. Intech. 2016;i:13.

[3] Diaz M, del Rio B, Sanchez-Llana E, Ladero V, Redruello B, Fernández M, et al. Histamine-producing Lactobacillus parabuchneri strains isolated from grated cheese can form biofilms on stainless steel. Food Microbiol. 2016;*59*:85–91.

EFECTO DE VARIOS ADITIVOS ALIMENTARIOS SOBRE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Listeria monocytogenes* PRESENTES DE FORMA NATURAL EN CARNE DE POLLO

Alonso-Calleja, C.[1,2], Rodríguez-Melcón, C.[1,2], Esteves, A.[3], Capita, R.[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 Ciências Veterinárias, Escola Superior de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), 5000-801-Vila Real, Portugal

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

Las bacterias resistentes a los antibióticos presentes en los alimentos suponen un desafío para la Salud Pública, ya que pueden provocar infecciones humanas por ingestión o contacto. Además, estos microorganismos son un reservorio de genes de resistencia con potencialidad para ser transferidos a otros grupos microbianos a lo largo de la cadena alimentaria [1, 2].

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de tres aditivos de amplio uso en la Industria Alimentaria, nitrito sódico (NS), nisina (NI) y ácido láctico (AL), en la resistencia a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* presentes de forma natural en 20 muestras de carne de pollo picada procedentes de León (España) y Vila Real (Portugal), 10 de cada origen.

Los aditivos se aplicaron a concentraciones de 100 ppm (NS), 10 ppm (NI) o 3.000 ppm (AL). Tras el almacenamiento durante 24 horas a 4 °C se aislaron 250 cepas de *L. monocytogenes* (UNE-EN ISO 11290-1:2018), que se identificaron a nivel de especie por PCR mediante el estudio del gen *lmo1030* [2] (Figura 1).

Los aislamientos se ensayaron frente a un panel de 15 antibióticos (difusión por disco, CLSI) de interés clínico. Se utilizaron los siguientes discos de antibióticos (Oxoid): ampicilina (AMP, 10 µg), oxacilina (OX, 1 µg), gentamicina (CN, 10 µg), eritromicina (E, 15 µg), vancomicina (VA, 30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 25 µg), rifampicina (RD, 5 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), cloranfenicol (C, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), enrofloxacina (ENR, 5 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), cefepima (FEP, 30 µg) y nitrofurantoína (F, 300 µg).

Todas las colonias que presentaban una morfología característica en el medio cromogénico (OCLA, Oxoid) se identificaron como *L. monocytogenes* por PCR (Figura 1).

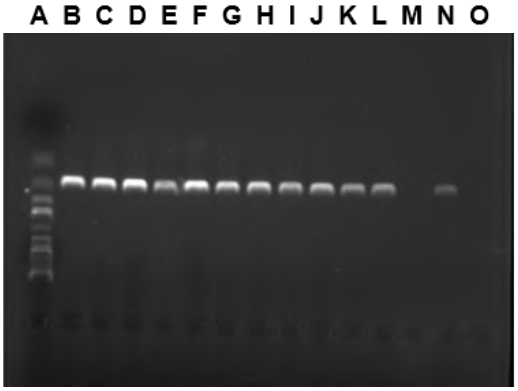


Figura 1: Productos de amplificación de la PCR para la detección del gen *lmo1030*. Carriles: A = marcador de tamaño (250 a 10.000 pb), B-L = cepas ensayadas, M = sin muestra, N = control positivo (ATCC 13932), O = control negativo (H_2O MilliQ).

La prevalencia de *L. monocytogenes* en las muestras de carne picada control (sin tratar con aditivos) fue del 70% (14 muestras positivas de las 20 examinadas). Estos valores se redujeron hasta el 60% (12 muestras en el caso de las tratadas con NS), 65% (13 muestras tras el tratamiento con NI) o 50% (10 muestras tratadas con AL).

Considerando todos los aislamientos y antibióticos simultáneamente, el porcentaje de resistencias en las muestras control (no tratadas) de origen español fue del 41,33 %. Tras los tratamientos con aditivos, estos porcentajes aumentaron hasta el 43,62 % (muestras tratadas con NS), 44,17 % (NI) y 49,14 % (AL). Por lo que respecta a las muestras de Portugal, los porcentajes fueron 33,33 % (control), 40,27 % (NS), 40,53 % (NI) y 38,40 % (AL) (Figura 2).

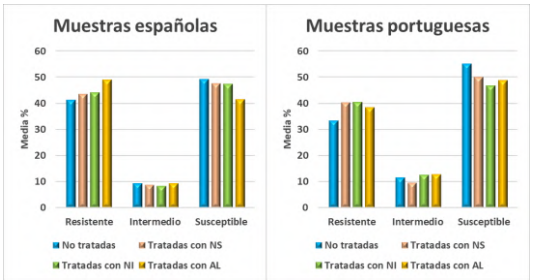


Figura 2: Porcentajes medios de resistencia, susceptibilidad reducida (intermedia) o susceptibilidad en cepas de *L. monocytogenes* aisladas de muestras de carne picada española y portuguesa en función del tratamiento recibido. NS, nitrito sódico; NI, nisina; AL, ácido.

Se observaron elevados porcentajes de resistencia a oxacilina, cefoxitina, cefotaxima, cefepima, ciprofloxacina y nitrofurantoína. Tras los tratamientos con aditivos se detectaron algunos cambios en el patrón de resistencia de las cepas. Así, después de 24 horas de contacto con estos compuestos se puso de manifiesto un aumento en el número de resistencias a gentamicina, eritromicina, rifampicina y tetraciclina en las cepas de origen español, destacando el nitrito sódico y el ácido láctico como los aditivos que provocaron el mayor incremento de resistencia con respecto a las cepas no tratadas. Sin embargo, en las cepas de origen portugués se observó, con respecto a las procedentes de muestras no tratadas, un aumento de las resistencias a gentamicina, eritromicina, sulfametoxazol-trimetoprim y rifampicina. En este caso destaca el tratamiento con nisina, que también causó un elevado porcentaje de resistencias a tetraciclina con respecto a otros tratamientos o a las muestras no tratadas.

El patrón de resistencia a antibióticos más frecuentemente observado en las muestras tratadas fue OX-FOX-CTX-FEP-CIP-F, mostrado por 43 cepas (32 aisladas de carne picada de origen español y 11 procedentes de carne picada adquirida en Portugal). Otros patrones de resistencia frecuentes fueron: OX-FOX-CTX-FEP-RD-CIP-F (20 cepas), OX-FOX-CTX-FEP-CIP (16 cepas), OX-FOX-CTX-FEP-F (15 cepas) y OX-FOX-CTX-FEP (11 cepas).

Los resultados obtenidos sugieren que el uso de aditivos alimentarios podría contribuir al aumento de la resistencia a los antibióticos en cepas de *L. monocytogenes*, hecho preocupante en el escenario de la Seguridad Alimentaria. Sería conveniente realizar estudios como el que se presenta con anterioridad a la autorización de los aditivos alimentarios.

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-098267-R-C33), Junta de Castilla y León (LE018P20) y Universidad de León (18BB282).

REFERENCIAS

[1] R. Capita, C. Alonso-Calleja, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2013**, *53(1)*, 11-48.

[2] S. Panera-Martínez, C. Rodríguez-Melcón, V. Serrano-Galán, C. Alonso-Calleja, R. Capita, *Food Control*, **2022**, *135*, 108608.

[3] J. Ryu, Y.S. Park, Y.S. Yeom, A. Shrivastav, S.H. Lee, Y.R. Kim, H.Y. Kim, *Food Control*, **2013**, *32(2)*, 659-664.

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORA DE ESBL Y/O STEC-EPEC EN AISLADOS DE GRANJAS PORCINAS.

Sandra Martínez-Álvarez[1], Isabel Benito[1], Minerva Viguera[1], Raquel Hidalgo-Sanz[1], Susana Sanz[1], Carmen Olarte[1], María de Toro[2], Carmen Torres[1]

[1] Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño.

[2] Plataforma de Genómica y Bioinformática, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La resistencia a los antibióticos (RAM) es una de las mayores amenazas para la salud pública mundial. Durante mucho tiempo, el problema de la RAM se centró únicamente en el entorno clínico, pero a lo largo de los años diversos estudios han evidenciado que hay otros ecosistemas que están muy implicados en esta problemática. Años atrás, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento, profilaxis o tratamiento de enfermedades infecciosas no estaba limitado. En concreto, el sector porcino fue uno de los más afectados ya que los brotes de diarrea neonatal y posdestete debidos a infecciones por *Escherichia coli* enterotoxigénica afectan a una gran proporción de cerdos y suelen ser recurrentes en las mismas piaras requiriendo medidas de control muy costosas. *E. coli* es una bacteria comensal que forma parte de la microbiota intestinal de la mayoría de los animales y adultos sanos, constituyendo un importante reservorio de genes de resistencia y desempeñando un papel potencial en la propagación de la resistencia. En la actualidad, la resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación ha aumentado provocando un importante problema sanitario asociado a la producción de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) (familias CTX-M, SHV y TEM) y pAmpC. Por otro lado, la colistina, cuya resistencia está mediada principalmente por el gen mcr-1, es la última línea de defensa contra *E. coli* resistente a los carbapenémicos. Sin embargo, su uso en producción animal durante décadas como tratamiento y aditivo para piensos ha aumentado su diseminación en el entorno ganadero considerándose según la Organización Mundial de la Salud de importancia crítica ya que su uso en medicina humana está muy restringido debido a sus altos niveles de nefrotoxicidad. El objetivo de este estudio fue la caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia antibióticos de los aislados obtenidos de un estudio previo, focalizado en la detección de BLEEs (Sanz et al., 2018). Además, se ha estudiado la diversidad genética de los aislados mediante tipado molecular por MLST y sus correspondientes grupos filogenéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se incluyeron y caracterizaron 38 aislados *E. coli* obtenidos en un estudio previo (Sanz et al., 2018) a partir de muestras fecales y ambientales de dos granjas porcinas de regímenes intensivo y semi-extensivo. Estos aislados se identificaron mediante MALDI-TOF-MS y se conservaron a -80ºC. Se realizó el estudio de sensibilidad a 15 antibióticos (ampicilina, amoxicilina-clavulánico, ácido nalidíxico, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, imipenem, ciprofloxacina, amikacina, gentamicina, tobramicina, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol, estreptomicina y tetraciclina) mediante la técnica disco-placa siguiendo las recomendaciones de CLSI (Clinical

Laboratory Standards Institute, 2022). Además, se realizó el cribado de BLEEs mediante la prueba de sinergia de doble-disco utilizando dos cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y cefotaxima) entre el disco de amoxicilina-clavulánico. La presencia de genes de resistencia a los antibióticos se determinó mediante PCR y secuenciación: betalactámicos (bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{CMY} y bla_{DHA}), tetraciclina (*tet*(A) y *tet*(B)), SXT (*sul1, sul2, sul3, dfrA1 y dfrA12*) aminoglucósidos (*aac(3)-II*), estreptomicina (*aadA1/aadA2*), quinolonas (*aac(6')-Ib-1b-cr, qnrA, qnrS, qnrB, OqxAB*), fenicoles (*cmlA, floR, y catA1*) y colisitina (*mcr-1*). Del mismo modo se realizó el análisis de los factores de virulencia estudiándose la presencia de los genes stx_1 y stx_2 que codifican la producción de toxina Shiga y *eae* que codifica la intimina. Para determinar los clones genéticos circulantes se realizó el tipado molecular de las cepas BLEE-positivas mediante el análisis de los grupos filogenéticos (Clermont et al., 2013) y MLST (Multilocus Sequence Typing). Además, se realizó la secuenciación del genoma completo (NGS) de una cepa BLEE-*mcr-1*. positiva.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 38 aislados *E. coli* procedentes de 2 granjas porcinas con regímenes intensivo y semi-extensivo. Es destacable que el 68% de las cepas mostraron fenotipo de multirresistencia y cinco de las 38 cepas (13%) fueron sensibles a todos los antibióticos testados. Se detectaron altas tasas de resistencia a ampicilina (68,4%; bla_{CTX-M}), tetraciclina (78,9%; *tet*(A), *tet*(B)) y trimetroprim-sulfametoxazol (68,4%; *sul1, sul2, sul3*) y en menores ratios a cloranfenicol (24%; *catA1, cmlA, floR*), estreptomicina (30%), gentamicina (13,2%; *aac(3)-I*, *aac(3)-II*, *ANT(2")*) y tobramicina (15,3%; *APH(IV)*).
Es importante destacar la detección del fenotipo BLEE en doce de las 38 cepas portando el gen $bla_{CTX-M-14}$ codificante de la enzima CTX-M-14. Once de los 12 aislados BLEEs fueron resistentes a colistina, con CMI superior a 4 µg/ml y 8 de ellas portaban el gen *mcr-1*. El tipado molecular realizado en las cepas *E. coli* portadoras de BLEEs reveló una amplia diversidad de clones (secuencia tipo-filogrupo): ST10163-B1 (n=5), ST4030-B1 (n=4), ST542-B1 (n=2) y ST453-B1 (n=1). Se estudió por secuenciación masiva la localización del gen *mcr-1* (que codifica la resistencia a colistina) en una de las cepas, identificándose en un plásmido IncX4 de 34 Kb, mientras que el gen $bla_{CTX-M-14}$ se encontraba en otro plásmido de 75 Kb, asociado a MOBF, compatible con un plásmido de tipo IncF. El estudio de los factores de virulencia realizado para las 38 cepas *E. coli* reveló la presencia de genes stx_1 (n=11), stx_2 (n=1) y *eae* (n=4) indicativo de STEC y EPEC, siendo dos de estas cepas BLEE-positivas. Por todo ello se puede evidenciar que el entorno de los sistemas actuales de producción de carne porcina, así como el ganado porcino, pueden suponer un importante reservorio de genes de resistencia y virulencia de relevancia en salud pública como es el caso de BLEEs y de los patotipos STEC-EPEC.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS

[1] 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. PMID: 30284921.

[2] Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., and Gordon, D.M. (**2013**) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep 8: 58–65.

MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN AISLAMIENTOS DE *ARCOBACTER* PROCEDENTES DE AGUAS Y ALIMENTOS

Baztarrika Uria I.[1], Salazar-Sánchez A.[1], Rodríguez-Medina O.[1], Alonso R.[1,2], Martínez-Ballesteros I[1,2], Martinez-Malaxetxebarria I[1,2]

1 Universidad del País Vasco (UPV/EHU)/Facultad de Farmacia/Inmunología, Microbiología y Parasitología/Grupo de investigación MikroIker. 01006 Vitoria-Gasteiz, Álava

2 Instituto de investigación Sanitaria Bioaraba/Microbiología, Enfermedades Infecciosas, Agentes Antimicrobianos y Terapia génica. 01006 Vitoria-Gasteiz, Álava

itsaso.baztarrica@ehu.eus

INTRODUCCIÓN

Varias especies del género *Arcobacter*. están catalogadas como patógenos alimentarios y un serio peligro para la salud humana (Ramees *et al*. 2017). Están presentes en una gran variedad de alimentos y diferentes masas acuáticas (Ramees *et al*. 2017; Martinez-Malaxetxebarria *et al*. 2022). Algunas especies de este género, principalmente *A. butzleri* y *A. cryaerophilus*, causan infecciones intestinales y extraintestinales, mayoritariamente autolimitadas, aunque en ocasiones pueden requerir tratamiento antimicrobiano (β-lactámicos, fluoroquinolonas y macrólidos, entre otros) (Sciortino *et al*. 2021; Abay, S. *et al*. 2022). En los últimos años se ha detectado un aumento en la resistencia a antibióticos en *Arcobacter* spp., lo que puede dificultar el tratamiento de los pacientes (Ruiz de Alegría Puig, C. *et al*. 2021).

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue determinar, mediante secuenciación y análisis de genomas completos, el resistoma de diferentes especies de *Arcobacter* spp. aisladas de alimentos y aguas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 66 cepas del género *Arcobacter* spp., incluyendo las especies *A. butzleri* (n=52), *A. cryaerophilus* (n=7), *A. skirrowii* (n=1), *A. thereius* (n=1), *A. lanthieri* (n=1) y *A. vitoriensis* (n=2). Además, se incluyeron dos aislamientos de *Arcobacter*. Las cepas procedían de alimentos de origen vegetal (n = 5), animal terrestre (n = 20) y animal marino (n = 23); así como de aguas de rio (n = 8) y fecales (n = 10) (Alonso *et al*. 2018; Martinez-Malaxetxebarria *et al*. 2022).

El genoma de las cepas fue extraído con el Kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) y posteriormente secuenciado mediante tecnología Illumina en un secuenciador NextSeq. La calidad de las secuencias obtenidas (*reads*) se determinó por medio del software FastQC y posteriormente fueron ensambladas con el programa bioinformático SPAdes para obtener los archivos de *contigs*. Los genes de resistencia antimicrobiana (GRA) se detectaron utilizando la base de datos ARCO_IBIZ_AMR (Müller *et al*., 2020) mediante el software ABRicate. Las sustituciones Thr85Ile y Ser97Asn de la región determinante de resistencia a quinolonas (RDRQ) del gen *gyrA*, asociadas respectivamente a resistencia y susceptibilidad a fluoroquinolonas, se detectaron por análisis comparativo de secuencias.

RESULTADOS

Los resultados mostraron la presencia de genes de resistencia en todas las cepas analizadas, entre los que se identificaron genes de resistencia a antimicrobianos de uso clínico como β-lactámicos (*bla2*, *bla3*,

hcpC), polimixinas (*arnA*, *arnB*, *eptA*), cloranfenicol (*cat3*, *wbpD*), estreptogramina (*vatD*), tetraciclina (*tetA*), fosmidomicina (*fsr*), fluoroquinolonas (*relE*), sulfonamidas (*macB1*, *bcr1*, *bcr2*) y biciclomicina (*bcr1*, *bcr2*).

Adicionalmente, se detectaron nueve bombas de eflujo (BE1, BE3, BE4, BE10, BE11, BE14, BE15, BE16,-BE17) y un sistema de secreción de tipo 1 (SST1). Todas las cepas analizadas, excepto las identificadas como *A. skirrowii* y *A. thereius,* presentaron al menos la bomba BE14, implicada en la resistencia a sulfonamidas y biciclomicina; el 34,8% presentaron simultáneamente ocho de las nueve bombas; y el 25,8 % presentaron el SST1. En los dos últimos casos todos todas las cepas resultaron ser *A. butzleri*. Curiosamente, todas las cepas en las que se detectó una mayor variedad de bombas provenían de alimentos de origen vegetal y de aguas fecales. Sin embargo, no se identificaron diferencias en la distribución del SST1 en función del origen.

Respecto a las mutaciones detectadas en la región RDRQ (Figura 1), la sustitución Thr85Ile fue detectada en cinco cepas de *A. butzleri*, de entre las cuales en cuatro también fue detectada la sustitución Ser97Asn. Respecto a su origen, cuatro de ellas (80%) procedían de aguas fecales.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran la amplia distribución de perfiles genéticos potencialmente asociados a multirrestencia en *Arcobacter* spp., lo cual es preocupante desde la perspectiva de salud pública. Además, se remarca la importancia de los estudios fenotípicos para la correcta interpretación de la resistencia molecular detectada.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto agradece la "Ayuda de formación a personal investigador y tecnólogo para 2020, en el entorno científico-tecnológico y empresarial del sector agropesquero y alimentario vasco".

REFERENCIAS

[1] Ramees, T. P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R. S., Kumar, A., Saminathan, M., Tiwari, R., Malik, Y. S., & Singh, R. K. (2017). *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control - a comprehensive review. The veterinary quarterly, *37*(1), 136–161. https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1323355.

[2] Martinez-Malaxetxebarria, I., Girbau, C., Salazar-Sánchez, A., Baztarrika, I., Martínez-Ballesteros, I., Laorden, L., Alonso, R., Fernández-Astorga, A. (2022). Genetic characterization and biofilm formation of potentially pathogenic foodborne *Arcobacter* isolates. International journal of food microbiology, *373*, 109712. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109712.

[3] Abay, S., Yaman, A., Karakaya, E., & Aydin, F. (2022). Prevalence and antibacterial susceptibilities of *Arcobacter* spp. and *Campylobacter* spp. from fresh vegetables. World journal of microbiology & biotechnology, 38(8), 132. https://doi.org/10.1007/s11274-022-03315-3.

[4] Ruiz de Alegría Puig, C., Fernández Martínez, M., Pablo Marcos, D., Agüero Balbín, J., Calvo Montes, J. (2021). Outbreak of *Arcobacter butzleri*? An emerging enteropathogen. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.https://doi.org/10.1016/j.eimc.2021.10.010.

[5] Alonso, R., Martinez-Malaxetxebarria, I., Girbau, C., Carmona, S., Velasco, H., Fernández-Astorga, A. (2018). Genomic diversity of *Arcobacter* spp. isolated from surface waters. Journal of microbiology and biotechnology, 7(2), 13-21.

[6] Müller, E., Abdel-Glil, M. Y., Hotzel, H., Hänel, I., Tomaso, H. (2020). *Aliarcobacter butzleri* from water poultry: Insights into antimicrobial resistance, virulence and heavy metal resistance. Genes, *11*(9), 1104. https://doi.org/10.3390/genes11091104.


```
A. butzleri RM4018  GLKPVHRRILYAMHDLSITSKSAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDISVYDALVRMAQSFSLRAPLVDGQGNFGSIDGDNAAAMRYTEARMTRIAEEVLRDLDKDTVNFVPNYDDTM
Ab-CZ4              GLKPVHRRILYAMHDLSITSKSAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDIISVYDALVRMAQNFSLRAPLVDGQGNFGSIDGDNAAAMRYTEARMTRIAEEVLRDLDKDTVNFVPNYDDTM
Ab-FW2              GLKPVHRRILYAMHDLSITSKSAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDIISVYDALVRMAQNFSLRAPLVDGQGNFGSIDGDNAAAMRYTEARMTRIAEEVLRDLDKDTVNFVPNYDDTM
Ab-FW10             GLKPVHRRILYAMHDLSITSKSAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDISVYDALVRMAQSFSLRAPLVDGQGNFGSIDGDNAAAMRYTEARMTRIAEEVLRDLDKDTVNFVPNYDDTM
Ab-FW42             GLKPVHRRILYAMHDLSITSKSAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDIISVYDALVRMAQNFSLRAPLVDGQGNFGSIDGDNAAAMRYTEARMTRIAEEVLRDLDKDTVNFVPNYDDTM
Ab-FW46             GLKPVHRRILYAMHDLSITSKSAYKKSARIVGDVIGKYHPHGDIISVYDALVRMAQNFSLRAPLVDGQGNFGSIDGDNAAAMRYTEARMTRIAEEVLRDLDKDTVNFVPNYDDTM
                    ******************************************* *********** ************************************************************
```

Figura 1. Mutaciones (Thr85Ile y Ser97Asn) identificadas en cepas de *A. butzleri* en la RDRQ del gen *gyrA*.

VARIANTES RESISTENTES A GENTAMICINA DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM PUEDEN MOSTRAR RESISTENCIA CRUZADA FRENTE AL CALOR

Campillo, R., Berdejo, D., Fau, A., Pagán, R., García-Gonzalo, D.
Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Universidad de Zaragoza-CITA, 50013 Zaragoza, España
rcampillo@unizar.es

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) en microorganismos patógenos continúa amenazando seriamente la salud pública. Se estima que cada año la RAM es responsable de unas 33 000 defunciones, y supone unos 1 100 millones de euros a los sistemas sanitarios de los países de la Unión Europea y del Espacio Económico Europeo (UE/EEE) [1]. En este sentido, la cadena alimentaria parece desempeñar un papel crucial en la aparición y diseminación de RAM, sobre todo en las fases de producción primaria. De hecho, aislamientos procedentes de alimentos de *Salmonella* spp., el principal agente causal de brotes de origen alimentario en la UE en 2020 [2], mostraron resistencia a "antimicrobianos de importancia crítica" [3], tales como la gentamicina (GEN).

Los métodos de conservación de alimentos nos han permitido alcanzar unos niveles aceptables de protección frente a los microorganismos patógenos, como *Salmonella* spp. No obstante, se desconoce en qué grado la aparición de RAM puede condicionar la eficacia higienizante de los métodos de conservación, como el tratamiento térmico (TT).

Objetivo

El objetivo de este estudio fue evaluar la resistencia cruzada al calor de variantes resistentes (VR) de *Salmonella* Typhimurium LT2 (WT) obtenidas mediante dos ensayos de evolución diferentes en presencia de GEN.

Materiales y métodos

Se obtuvieron las VR sometiendo a WT, durante 10 días, a dos ensayos de evolución diferentes con dosis de GEN.

Por un lado, en el ensayo A (Figura 1A) se expuso a WT a una dosis constante entre ciclos de GEN (0.5×CMI, "Concentración Mínima Inhibitoria"). Por otro lado, en el ensayo B (Figura 1B) se enfrentó a WT a un gradiente creciente de GEN entre ciclos, de modo que la presión selectiva ejercida por el antibiótico era cada vez mayor (1.85× diariamente). Cada ciclo de exposición se realizó a 37 ºC durante 24 h, en tubos de ensayo con 5 mL de caldo Mueller-Hinton con ajuste de cationes (MH). Inicialmente, los tubos se inocularon con ≈ 2×10^6 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL en fase exponencial de crecimiento.

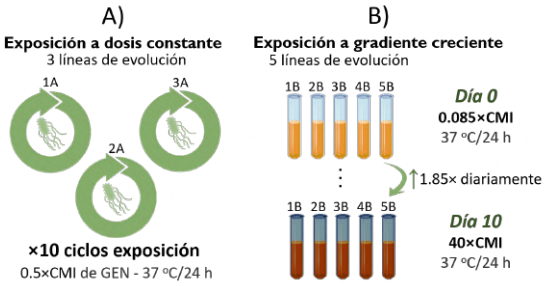


Figura 1: diseño experimental de la obtención de variantes resistentes (VR) a gentamicina (GEN) a partir de dos ensayos de evolución (A y B). CMI: "Concentración Mínima Inhibitoria".

Los aislamientos de las VR se realizaron a partir de colonias procedentes de los ciclos de exposición más avanzados que permitieron el crecimiento microbiano en agar MH.

Se evaluó la termorresistencia de las VR calculando los ciclos log_{10} inactivados tras un TT de 54 ºC/30 min en tampón citrato-fosfato pH 7.0. Los recuentos se obtuvieron en placas de agar tripticasa soja con extracto de levadura incubadas durante 24 h a 37 ºC, y se compararon con los de WT.

Resultados y discusión

Ambos ensayos de evolución posibilitaron la selección de cepas más resistentes a GEN que WT (Tabla 1).

Cepas ensayo A	CMI (µg/mL)	Cepas ensayo B	CMI (µg/mL)
WT	1	WT	1
1A	4	1B	16
2A	4	2B	4
3A	8	3B	4
-	-	4B	4
-	-	5B	4

Tabla 1: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de gentamicina para *Salmonella* Typhimurium LT2 (WT) y las cepas evolucionadas aisladas tras los ensayos A y B.

Por un lado, las tres VR procedentes del ensayo A mostraron incrementos en la CMI de GEN de hasta 8 veces (rango: 4-8 µg/mL) respecto a WT (1 µg/mL). Por otro lado, los aumentos descritos en las cinco VR del ensayo B fueron de hasta 16 veces (rango: 4-16 µg/mL) como consecuencia de la exposición a dosis cada vez mayores de GEN. Los incrementos de resistencia observados, especialmente el de VR_{1B}, suponen una elevada probabilidad de fallo terapéutico [4], por lo que se pudo catalogar a todas las VR como "resistentes".

Tras el TT (54 ºC/30 min), ninguna de las tres VR procedentes del ensayo A mostraron incrementos en su termorresistencia (datos no mostrados). Sin embargo, dos de las cinco VR del ensayo B mostraron una menor inactivación (p<0.05) para el mismo TT: mientras que WT se inactivó 5.8±0.4 ciclos log_{10}, se redujeron 4.7±0.4 y 4.8±0.3 ciclos log_{10} de VR_{3B} y VR_{4B}, respectivamente (Figura 2).

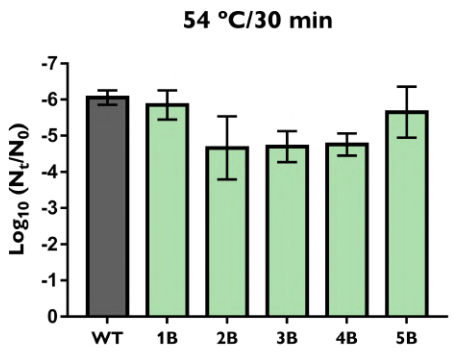


Figura 2: inactivación de *Salmonella* Typhimurium (WT) y sus cepas evolucionadas (1B-5B) obtenidas del ensayo B, tras un tratamiento térmico de 54 ºC/30 min en tampón citrato fosfato pH 7.0. $N_0 \approx 2\times10^9$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL.

Conclusiones

La elaboración del presente estudio ha permitido concluir que: a) el ensayo de evolución de gradiente creciente (ensayo B) presenta un mayor potencial para aislar VR con grandes incrementos de resistencia a los antibióticos y al calor, y b) eventuales alelos genéticos en poblaciones bacterianas que confieran RAM, como *S*. Typhimurium resistente a GEN, podrían comprometer la seguridad alimentaria por la aparición de resistencias cruzadas a los tratamientos de conservación, como el TT.

Agradecimientos

Estudio financiado por la Agencia Estatal de Investigación (España) (Proyecto Nº. PGC2018-093789-B-I00), por el Fondo Social Europeo y el Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento del Gobierno de Aragón.

Referencias

[1] Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades y Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, "Antimicrobial Resistance: Tackling the Burden in the European Union" (ECDC y OECD, 2019).

[2] EFSA y ECDC, *EFSA J.*, **2021**, 19(12), 6971.

[3] EFSA y ECDC, *EFSA J.*, **2022**, 20(3), 7209.

[4] Clinical Breakpoints and Dosing of Antibiotics, https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Consultado: 23/06/2022.

ESTUDIO DE LOS NIVELES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE PULPO

Belén Iglesias Valenzuela, Rubén Pérez Pulido, Elena Ortega Morente, Javier Rodríguez López, Magdalena Martínez Cañamero, Natalia Andújar Tenorio, Mª José Grande Burgos, Rosario Lucas López, Antonio Gálvez

Universidad de Jaén/Facultad de Ciencias Experimentales/Departamento de Ciencias de la Salud/Área de Microbiología. Campus Las Lagunillas s/n, 23071, Jaén

mbiglesi@ujaen.es

Debido al aumento de la incidencia de resistencias a agentes antimicrobianos de uso clínico y la presencia de cepas bacterianas multirresistentes en la cadena alimentaria, incluyendo entre los alimentos a los productos marinos [1, 2, 3], el control de la resistencia a antimicrobianos se considera un elemento esencial del concepto de "una sola salud" [4, 5].

Hay evidencia de que el consumo de animales acuáticos puede ser una ruta subestimada para la transmisión de bacterias resistentes a los antimicrobianos y genes de resistencia de animales acuáticos y su entorno a los humanos [6].

Un posible tratamiento para disminuir estas resistencias a antibióticos en bacterias puede ser el tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH). De esta forma, hay estudios en los que se ha observado que el tratamiento con APH podría reducir la resistencia en bacterias a antibióticos beta-lactámicos [7].

El objetivo de este estudio fue aislar de diferentes muestras de pulpo una colección de cepas para estudiar la resistencia fenotípica a antibióticos beta-lactámicos en los aislados obtenidos durante el almacenamiento de las muestras tratadas o no por APH.

Para la realización de este experimento se utilizó pulpo cocido listo para su consumo. Se tomaron 5 g de alimento y se envasaron al vacío. Se llevaron a cabo diferentes tratamientos con APH y diferentes temperaturas. Tanto las muestras tratadas con APH como las no tratadas se almacenaron en frío para su posterior análisis Así, se analizaron las muestras en los días 1, 5, 12 y 20. Para obtener los aislados, las muestras se sembraron en distintos medios de cultivo: agar para métodos estándar enriquecido con NaCl (PCA), agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS), agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCSB), agar bilis y rojo violeta con glucosa (VRBG), agar pseudomonas CFC, y Kligler, aislándose un total de 235 cepas.

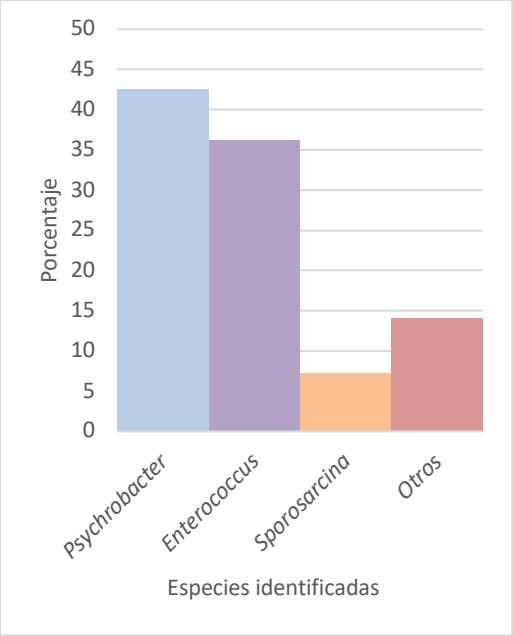


Figura 1: Porcentaje de géneros mayoritarios identificados en las muestras de pulpo analizadas.

Se llevó a cabo una extracción de ADN, para realizar la posterior secuenciación del ARNr 16S. Tras dicha secuenciación, estas cepas

fueron identificadas a nivel de especie como un 42 % pertenecientes al género *Psychrobacter*, un 36 % como género *Enterococcus*, un 7 % pertenecientes al género *Sporosarcina* y un 15 % pertenecientes a otros géneros minoritarios (Figura 1).

Una vez identificadas, las cepas bacterianas fueron sometidas a un estudio de resistencia a antibióticos beta-lactámicos mediante el uso de discos de antibióticos en agar Mueller Hinton. En el antibiograma se pudo observar que de las 235 cepas bacterianas asiladas 228 mostraron resistencia a cefoxitina, 210 a ceftazidima, 36 a cefotaxima, 17 a meropenem y 4 a amoxicilina clavulánico (Figura 2).

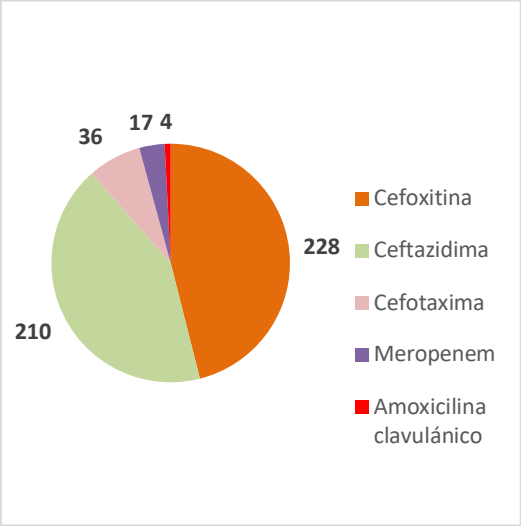


Figura 2: Cepas bacterianas presentes en pulpo resistentes a antibióticos beta-lactámicos.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto 1260210 Consejería De Economía y Conocimiento-FEDER ANDALUCÍA 2014-2020. Grupo de investigación "Microbiología de los alimentos y del medio ambiente" AGR230.

REFERENCIAS

[1] EFSA, EDCD, *EFSA* Journal, **2021**, 19(4):6490, 179.

[2] FAO, **2017**. COFI:AQ/IX/2017/SBD.11.

[3] JEM Watts, HJ Schreier, L Lanska, MS Hale, *Mar. Drugs*, **2017**, 15(6), 158.

[4] Comisión Europea. *COM*, **2017**, 339.

[5] K Queenan, B Häsler, J Rushton, *Int. J. Antimicrobial Agents* , **2016**, 48,422–427.

[6] D Schar, C Zhao, Y Wang, DGJ Larsson, M Gilbert, TP Van Boeckel, *Nat. Commun.*, **2021**, 12, 5384.

[7] J Rodríguez López, MJ Grande Burgos, R Pérez Pulido, A Gálvez, R Lucas, *Microorganisms*, 2020, 8(6), 909.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOACTIVAS FRENTE A *HELICOBACTER PYLORI* DE UN EXTRACTO DE *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L. Y SUS FRACCIONES OBTENIDAS POR FRACCIONAMIENTO SUPERCRÍTICO ANTISOLVENTE

Silván J.M.[1], Villalva M.[1], Alarcón-Cavero T.[2], Martínez-Rodríguez A.J.[1]

1 Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM), Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, Grupo MICROBIO. C/ Nicolás Cabrera 9, Campus de Cantoblanco, 28049, Madrid.

2 Hospital Universitario de la Princesa, Departamento de Microbiología. C/ Diego de León 62, 28006, Madrid.

jm.silvan@csic.es

Achillea millefolium L., conocida tradicionalmente como milenrama, es una planta medicinal que se utiliza principalmente en Europa para el tratamiento de diversos problemas de salud. Debido a los conocidos beneficios de esta planta, el estudio de su composición y de sus actividades biológicas ha despertado un creciente interés en las industrias farmacéutica y alimentaria. Entre sus principales efectos beneficiosos para la salud destacan sus propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, antibacterianas, antitumorales y antidiabéticas [1]. Siendo sus principales compuestos bioactivos los compuestos fenólicos y los terpenos [2].

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es uno de los principales patógenos humanos que se estima afecta al 50% de la población mundial [3]. La infección por *H. pylori* puede causar diversas enfermedades a nivel gástrico, que van desde la gastritis crónica, ulcera péptica, e incluso en fases muy avanzadas puede derivar en cáncer gástrico. Su tratamiento se basa en una terapia combinada de al menos dos antibióticos diferentes. Sin embargo, en los últimos años se han incrementado significativamente las cepas de *H. pylori* resistentes a los tratamientos con antibióticos [4], por lo que es necesario buscar nuevas alternativas sostenibles para su tratamiento.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial efecto antibacteriano, anti-inflamatorio y antioxidante de un extracto de milenrama (YE) y de sus fracciones insoluble (YPF) y soluble (YSF) obtenidas por fraccionamiento supercrítico anti-solvente frente a tres cepas de *H. pylori*.

Como se observa en la Tabla 1, todas las muestras redujeron significativamente ($p<0,05$) el crecimiento bacteriano de las tres cepas de *H. pylori* utilizadas en el estudio.

	Control	YE	YPF	YSF
Hp48	8,5 ± 0,3 ^{c}	<1,5 ^{a}	5,6 ± 0,7 ^{b}	<1,5 ^{a}
Hp53	8,4 ± 1,6 ^{d}	3,6 ± 0,5 ^{b}	6,3 ± 0,3 ^{c}	<1,5 ^{a}
Hp59	8,9 ± 0,9 ^{d}	2,1 ± 0,2 ^{b}	6,6 ± 0,6 ^{c}	<1,5 ^{a}

Tabla1: Actividad antibacteriana del extracto de milenrama (YE) y sus fracciones (YPF y YSF) (0,4 mg/mL) frente a *H. pylori* tras 48h de tratamiento. Los resultados se expresan como log UFC/mL ± DS (n=3). ^{a,b,c,d} Valores de una misma fila marcados con diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA) ($p<0,05$). *Límite de detección 1,5 log UFC/mL.

El extracto YE, constituido principalmente por flavonoides y ácidos fenólicos, fue bactericida para una de las cepas utilizadas

(*Hp48*). La fracción YPF, enriquecida en compuestos fenólicos, mostró una moderada actividad antibacteriana reduciendo hasta en 2,9 unidades log UFC/mL el crecimiento bacteriano. Sin embargo, la fracción YSF, constituida principalmente por terpenos, resultó ser la muestra con mayor actividad antibacteriana mostrando capacidad bactericida frente a las tres cepas de *H. pylori* estudiadas.

Las tres cepas de *H. pylori* estimularon la producción de citoquina IL-8 en las células gástricas (control) tras su infección (Figura 1). Sin embargo, tanto el extracto de milenrama (YE), como sus fracciones (YPF y YSF), inhibieron significativamente ($p<0,05$) la producción de IL-8, independientemente de la cepa infectiva utilizada, alcanzando porcentajes de inhibición en un rango entre 53-68%. Las fracciones YPF e YSF, mostraron mejores potenciales anti-inflamatorios que el extracto original de milenrama para cada una de las cepas de *H. pylori*.

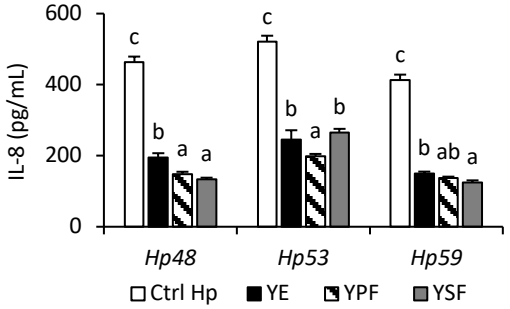


Figura1: Efecto del extracto de milenrama (YE) y sus fracciones (YPF y YSF) (0,08 mg/mL; pretratamiento 2h) en la producción de IL-8 en células gástricas infectadas por *H. pylori* (24h). Los resultados se expresan en pg/mL de IL-8 (media ± DS) (n=3). El control muestra la producción de IL-8 en células gástricas infectadas sin extractos. [a,b,c] Barras marcadas con diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA) ($p<0,05$).

Por último, en cuanto a la actividad antioxidante (Figura 2), la muestra YE y la fracción YPF inhibieron significativamente ($p<0,05$) la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en un rango entre 16-40%, independientemente de la cepa infectiva de *H. pylori* utilizada. Cabe destacar que la fracción YPF, enriquecida en compuestos fenólicos, fue la que mostró los mejores potenciales antioxidantes, reduciendo en un 40% la producción de ROS independientemente de la cepa de *H. pylori* infectiva. Sin embargo, la fracción YSF, solo mostró actividad antioxidante durante la infección celular con la cepa *Hp48*.

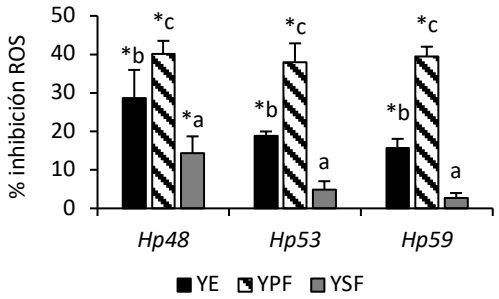


Figura2: Efecto del extracto de milenrama (YE) y sus fracciones (YPF y YSF) (0,08 mg/mL; pretratamiento 2h) en la producción de ROS intracelular en células gástricas infectadas por *H. pylori* (3h). Los resultados se expresan como % de inhibición en la producción de ROS (media ± DS) (n=3). *Barras marcadas con asterisco indican diferencias significativas en comparación con el control celular infectado (*t*-test) ($p<0,05$). [a,b,c] Barras marcadas con diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras para una misma cepa (ANOVA) ($p<0,05$).

Estos resultados demuestran la potencial eficacia del uso de extractos procedentes de milenrama frente a *H. pylori*, contribuyendo así al desarrollo y obtención de nuevas estrategias para el control de este patógeno humano.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue desarrollada en el marco del proyecto HELIFOOD (AGL2017-89566-R) financiado por el MINECO.

REFERENCIAS

[1] S. Dall'Acquaa, C. Bolegob, A. Cignarellab, R.M. Gaionb, G. Innocentia. *Phytomedicine*, **2011**, *18*, 1031-1036.

[2] M. Villalva, L. Jaime, D. Villanueva-Bermejo, B. Lara, T. Fornari, G. Reglero, S. Santoyo. *Food Res. Int.* **2019**, *115*, 128-134.

[3] J.G. Kusters, A.H.M. van Vliet, E.J. Kuipers. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 449-490.

[4] A. Savoldi, E. Carrara, D.Y. Graham, M. Conti, E. Tacconelli. *Gastroenterology*, **2018**, *155*, 1372-1382.

RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE PSEUDOMONAS AISLADAS DE ALIMENTOS VEGETALES

Pérez-Pulido R.[1], Grande Burgos M.J.[1], Rodríguez López J.[1], Iglesias Valenzuela B.[1], Toledo del Árbol J.[1], Martínez Viedma M.P.[2], Gálvez A.[1], Lucas R[1].

1 Universidad de Jaén. Facultad de Ciencias Experimentales. Dpto. Ciencias de la Salud. Campus las Lagunillas s/n. 23071. Jaén

2 PharmaMar. Av. De los Reyes, 1. 28770. Colmenar Viejo, Madrid

rppulido@ujaen.es

Introducción: Los consumidores demandan cada vez más productos saludables y nutritivos [1] . Una forma de consumir estos productos, son las mezclas de jugos vegetales y frutas o leche (smoothies), productos que deben ser mínimamente procesados, para conservar sus componentes bioactivos, además de para conservar su sabor [2]. Los microorganismos pueden sobrevivir a las operaciones de lavado y desinfección de los vegetales. Desde el punto de vista microbiológico, la seguridad de los alimentos no sólo debe tener en cuenta la presencia de microorganismos patógenos, alterantes, o productores de toxinas, sino también la posibilidad de que la microbiota presente actúe como reservorio de genes de resistencia a agentes antimicrobianos [3].

Las verduras y hortalizas pueden contener microorganismos patógenos y saprofitos (entre otras especies *Pseudomonas*) [4].

Los alimentos de origen vegetal que se consumen crudos son un motivo creciente de preocupación, ya que la ingesta de microorganismos portadores de resistencia a antibióticos permite que algunos de ellos se establezcan en el tracto digestivo, o puedan intercambiar material genético con la microbiota gastrointestinal autóctona [5].

Objetivo: poner de manifiesto la presencia de cepas del género *Pseudomonas* a partir de vegetales crudos listos para preparación de jugos vegetales, y evaluar a nivel fenotípico y genotípico la existencia de resistencias a antibióticos en dichas cepas.

Materiales y Métodos: A partir de una selección de vegetales crudos comprados en comercios de la zona se aislaron una colección de bacterias, mediante siembra en medios Mueller Hinton adicionados con cefotaxima a 64mg/l y imipenem 16mg/l, incubándose en aerobiosis a 28ºC. Posteriormente se aislaron colonias individuales, mediante subcultivo en medios con el mismo agente selectivo. Esta colección de cepas se identificó mediante secuenciación de la región 16S de rDNA, seleccionando solo aquellas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Se determinó el fenotipo de resistencia a antibióticos mediante ensayo en disco según recomendaciones de la EFSA (2012). Por último, se estudió la presencia de determinantes de resistencia mediante amplificación por PCR empleando como material de partida ADN total extraído de los aislados ensayados anteriormente (Fernández Fuentes et al. 2014b)

Resultados: Se aislaron un total de 144 cepas. Todas fueron identificadas como pertenecientes al género *Pseudomonas* mediante secuenciación del ADNr 16S, de las cuales 37 solo pudieron ser identificadas a nivel de género, las dos especies más representativas fueron: *Pseudomonas koreensis* (29 aislados) y *Pseudomonas fluorecens* (15 aislados) (Figura 1).

En los ensayos de resistencia con discos de antibióticos en Mueller-Hinton comprobamos que el 80,56% de las cepas eran resistentes a cefotaxima, el 79,86% a

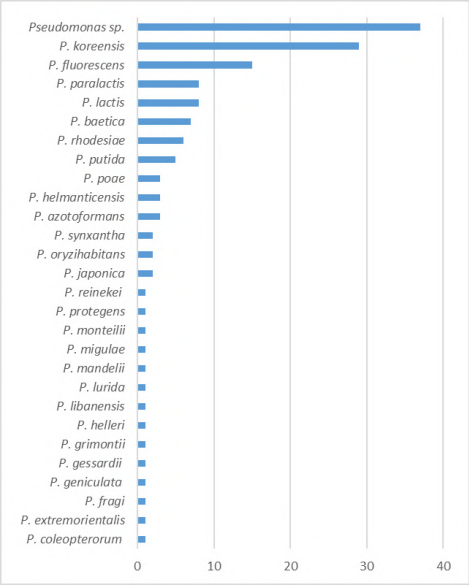


Figura 1: Especies de *Pseudomonas* identificadas

cefoxitina, el 65,97% a amoxicilina clavulánico, el 55,56 a eritromicina, el 40,28 a cloranfenicol y en menor porcentaje a otros antibióticos ensayados (tetracilcina, kanamicina, sulfometoxazol y eritromicina) (Figura 2).

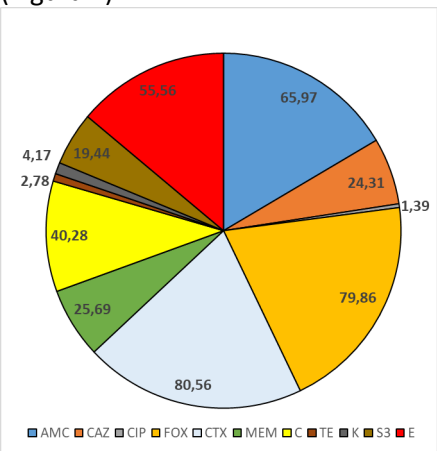


Figura 2: Porcentaje de especies resistentes a los diferentes antibióticos analizados. AMC: amoxicilina clavulánico, CAZ: ceftacidina, CIP: ciprofloxacino, FOX: cefoxitina, CTX: cefotaxima, MEM: meropenem, C: cloranfenicol, TE: tetraciclina, K: Kanamicina, S3: sulfometoxazol, E: eritromicina

A nivel genético se observó la presencia de genes de resistencia a β-lactámicos, donde el 17,36% de las cepas presentaban el gen *ctxM*, el 24,31% el gen *bla SHV* y el 25,69% el gen *bla TPSE*. A nivel de genes de aminoglucósidos el gen más representativo fue el *dfrA12* encontrado en el 16.67% de los aislados. Respecto a genes de tetraciclinas, el 35,42% presentaban el gen *tet M*, y el 15,28% el *tet G*. Por último, solo se encontró el gen *sul I* de sulfonamidas en el 6,94% de las cepas y genes de macrólidos, solo se encontraron el gen *ere A* (9,72%) y *ere B* (7,64%) (Tabla 1).

Conclusión: se puede comprobar que los alimentos vegetales poco procesados pueden contener una población de bacterias portadoras de resistencias a antibióticos, por lo que su presencia debe ser controlada y evaluada para evitar la dispersión de estos genes.

β-lactámicos					
bla-CTXMF/R	*bla-CTXM2F/R*	*bla IMP*	*bla KPC*	*bla NDM-1*	*bla OXA*
17,36%	4,17%	6,94%	2,78%	4,86%	2,78%
bla OXA-23	*blaOXA-48-like*	*bla SHV*	*bla TPSE*	*bla TEM*	*bla VIM-2*
0,69%	2,78%	24,31%	25,69%	6,94%	4,86%
Aminoglucóxidos					
aac	*aadA1F/R*	*dfrA12F/R*	*dfrA15F/R*		
3,47%	11,81%	16,67%	1,39%		
Tetraciclinas					
tet A	*tet C*	*tet D*	*tet E*	*tet G*	*tet K*
6,25%	1,39%	2,08%	1,39%	15,28%	2,08%
tet L	*tet M*	*tet S*			
5,56%	35,42%	4,86%			
Sulfonamidas					
sul I					
6,94%					
Macrólidos					
ere A	*ere B*				
9,72%	7,64%				

Tabla1: Porcentaje de genes de resistencia a antibióticos detectados en las diferentes cepas.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo fue financiado por el proyecto MINECO (AGL2016-77374-R)

REFERENCIAS

[1] S. Nanasombat, J. Thonglong J. Jitlakha, *Funct. Foods Health Dis*, **2015**, *5(1), 1-16.*

[2] A.M. Cardello. H.G. Schutz, L.L. Leshert, Innov *Food Sci & Emerg Technol*, ***2007***, *8, 73-83.*

[3] M.E. Doyle, *Foodb Pathog & Dis*, **2015**, *12, 261-279.*

[4] Z.S. Al-Kharousi, N. Guizani, A.M. Al-Sadi, I.M. Al-Bulushi, B. Shaharoona, *Int J Microbiol*, **2016**, *4292417.*

[5] N. Bhutani, C. Muraleedharan, D. Talreja, S.W. Rana, S. Walia, A. Kumar, S.K. Walia, *BioMed Res Int*, **2015**, *ID 547547.*

IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS BACTERIANAS AISLADAS A PARTIR DE GUACAMOLE

Javier Rodríguez López, Mª José Grande Burgos, Rubén Pérez Pulido, Belén Iglesias Valenzuela, Rosario Lucas López, y Antonio Gálvez

Universidad de Jaén/Departamento Ciencias de la Salud/Área de Microbiología.

Campus Las Lagunillas s/n, Jaén, 23071

jrlopez@ujaen.es

Tal es la gravedad que presenta actualmente la resistencia a antimicrobianos que la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo considera como una de las mayores amenazas a nivel global para la salud pública en este siglo [1, 2]. Los microorganismos aislados en el guacamole pueden presentar resistencia a diferentes antibióticos, por lo tanto, reducir la concentración de microorganismos multirresistentes es un proceso crucial para garantizar la seguridad alimentaria de este producto [3, 4].

Nuestro objetivo es aislar una colección de cepas resistentes de guacamole para probar su resistencia a diferentes antibióticos. Para ello, se analizaron un total de 70 cepas aisladas de guacamole en los siguientes medios de cultivo suplementados o no con diferentes compuestos antimicrobianos: agar triptona-soja (TSA), agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGC), agar MacConkey suplementado con cefotaxima o imipenem, agar Mueller Hinton (MH) suplementado con cloruro de benzalconio o cefotaxima y agar KPC con su suplemento específico.

Tras realizar la extracción de ADN de la colección de los 70 aislados, estos fueron identificados a nivel de especie mediante secuenciación del gen ribosómico 16S (rDNA). Como se muestra en la Figura 1, un 62,9% se identificaron como *Bacillus*, el 21,4% correspondían a *Leuconostoc*, un 4,3% a *Pseudomonas*, el 2,9% eran *Enterobacter*, un 1,4% correspondían a *Rahnella*, *Azospirillum*, *Lelliottia*, *Pantoea*, *Escherichia* o *Bacterium* (sinónimo heterotípico).

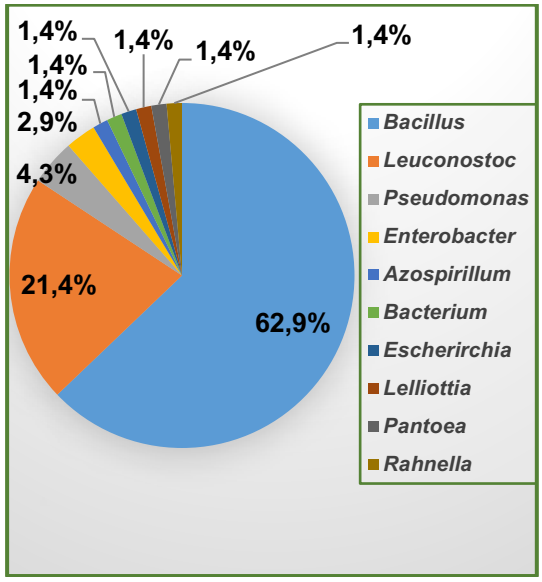


Figura 1: Número de especies aisladas del guacamole que mostraron resistencia a los diferentes antibióticos utilizados.

Posteriormente, una vez identificadas las cepas se ensayó la resistencia a antibióticos, teniendo en cuenta los halos de inhibición indicados por el CLSI. En dicho estudio, mediante antibiograma, encontramos que de las 70 cepas aisladas 57 mostraron resistencia a ceftazidima (CAZ), 50 de los aislados mostraron resistencia a cefotaxima (CTX), 39 a cefoxitina (FOX), 34 a eritromicina (E), 32 a sulfonamida (S3), 24 a

meropenem (MEM), 17 a amoxicilina clavulánico (AMC) y a cloranfenicol (C), 13 a ciprofloxacino (CIP), 7 a kanamicina (K), 4 a gentamicina (CN) y 3 a tetraciclina (TE) (Figura 2).

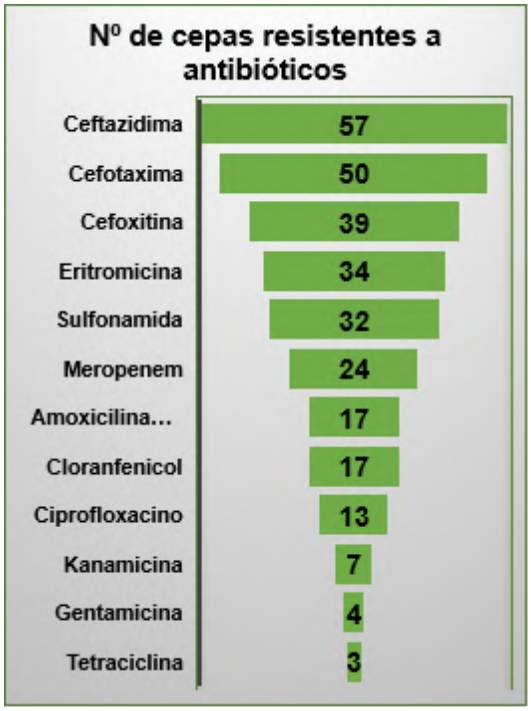


Figura 2: Número de especies aisladas del guacamole que mostraron resistencia a los diferentes antibióticos utilizados.

Treinta del total de las cepas (43%) mostraron resistencia a cinco o más de los 12 antibióticos utilizados en el ensayo. La identificación molecular indicó que la mayoría de las cepas pertenecían al género *Bacillus*, aunque cabe destacar dos cepas, identificadas como *Enterobacter* y *Escherichia*, las cuales presentaron resistencia a 11 de los 12 antibióticos ensayados (Tabla 1).

En conclusión, los resultados del presente estudio muestran la necesidad de investigar la incidencia de resistencias intrínsecas entre los formadores de endosporas aerobios y, de lo contrario, cuáles son los mecanismos involucrados en los genes de resistencia a los antibióticos, así como la determinación de posibles cepas multirresistentes.

Identificación	Resistencia a antibióticos
Escherichia sp.	-Amoxicilina-clavulánico -Ceftazidima -Cefoxitina -Cefotaxima -Meropenem -Cloranfenicol -Kanamicina -Gentamicina -Sulfonamida -Eritromicina -Tetraciclina
Enterobacter soli	-Amoxicilina-clavulánico -Ceftazidima -Cefoxitina -Cefotaxima -Meropenem -Cloranfenicol -Kanamicina -Gentamicina -Sulfonamida -Eritromicina -Ciprofloxacino

Tabla 1: Ejemplo de cepas multirresistentes a antibióticos aisladas del guacamole.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto AGL2016-77374-R (MINECO), Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (Acción 1 ayudas competitivas PAIUJA 2017-2018, PAIUJA 2019-2020 y PAIUJA 2021-2022; contratos predoctorales PIFPP/2017), y el Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeiA3).

REFERENCIAS

[1] D. Quiñones Pérez. Revista Cubana de Medicina Tropical, **2017**, 69(3), 1-17.

[2] World Health Organization. WHO, **2014**.

[3] C. N. Berger, S. V. Sodha, R. K. Shaw, P. M. Griffin, D. Pink, P. Hand, G. Frankel. Environmental Microbiology, **2010**, 12(9), 2385–2397.

[4] B. T. Liu, X. Y. Zhang, S. W. Wan, J. J. Hao, R. D. Jiang, F. J. Song. Frontiers in Microbiology, **2018**, 9.

ESTUDIO DE RESISTENCIAS A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* SPP AISLADAS EN POLLOS DE ENGORDE EN LA PROVINCIA DE VALENCIA.

Iranzo M.[1], Martí P.[2], Mormeneo S.[1], Mormeneo M.[2] Bort B.[1]

1 Universidad de Valencia/Facultad de Farmacia/Unidad de Microbiología. Avda Vicente Andrés Estelles s/n 46100, Burjassot, Valencia, España.

2 Laboratorio Superior de Salud Pública de la Generalitat Valenciana. Avda de Catalunya, 21. 46021, Valencia, España.

begobort@gmail.com

Introducción

Durante las últimas décadas, ha surgido una nueva preocupación con respecto a la cadena alimentaria, ya que puede desempeñar un papel importante en la transmisión de bacterias resistentes, así como genes de resistencia del reino animal a los humanos. Las bacterias de transmisión alimentaria muestran un abanico creciente, extenso y variado de resistencias a agentes antimicrobianos de importancia humana y veterinaria, y es probable que cualquier grado de difusión de resistencias influya en la salud de la población y en los tratamientos antimicrobianos.

En este contexto, *Campylobacter spp.* es un microorganismo de distribución mundial, y la causa más común de gastroenteritis notificada en los países desarrollados [1][2], siendo la carne de pollo, mayoritariamente, la responsable de estas infecciones [3].

La mayoría de las infecciones por *Campylobacter* son autolimitadas y no requieren tratamiento antimicrobiano. Sin embargo, los casos graves y prolongados de campilobacteriosis y las infecciones en poblaciones vulnerables y niños inmunocomprometidos pueden requerir terapia antimicrobiana. En tales casos, las quinolonas y los macrólidos son los fármacos de elección [4]. La tetraciclina también se puede utilizar como tratamiento alternativo [5]. Sin embargo, cuando surgen complicaciones, se requiere terapia con antibióticos en un momento en que la resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo. Cuando estos fármacos son ineficaces, la administración sistémica de aminoglucósidos es la única opción que queda [6].

Material y Métodos

Las muestras utilizadas para el aislamiento de *Campylobacter* procedían, por una parte, de tres mataderos industriales (carcasas y piel de cuello de pollo), obtenidas según la norma ISO 17604:2015, y por otra, de pollos de engorde envasados al por menor (muslo y pechuga) y envases de seis supermercados.

El aislamiento e identificación de *Campylobacter* se realizó de acuerdo con la norma ISO 10272–1:2017, confirmándose posteriormente los resultados mediante el sistema automatizado de Identificación Thermo-Scientific-SensititreTM (Thermo Fisher Diagnostics).

El estudio de sensibilidad a distintos antimicrobianos (ácido nalidíxico, ciprofloxacino, eritromicina, tetraciclina, gentamicina y estreptomicina), se efectuó siguiendo la técnica de microdilución de acuerdo con los métodos descritos por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y el Clinical and Laboratory Standards Institute, aceptados como método de referencia internacional (norma ISO 20776-1:2006). usando placas de Sensititre-Campylobacter-

EUCAMP2™ (ThermoFisher Diagnostics). Los aislados de *Campylobacter* spp se categorizaron como sensibles o resistentes utilizando los valores de corte epidemiológicos definidos por EUCAST.

El análisis estadístico se hizo empleando el paquete estadístico IBM-SPSS-Statistics for Windows, version 25.0 (Released 2017. IBM Corp., Armonk, New York) utilizando la prueba de Chi-cuadrado. El nivel de significación se fijó a $p \leq 0,05$.

Resultados

Se analizaron un total de 483 muestras, procedentes 430 de matadero y 53 del punto de venta, de las cuales 125 (25,9%) resultaron positivas en el aislamiento de *Campylobacter* spp., correspondiendo 23 a *Campylobacter coli* y 102 a *Campylobacter jejuni*.

C. jejuni presentó una alta resistencia al ácido nalidíxico y al ciprofloxacino, 96,1% y 90,2% respectivamente, mientras que *C. coli* mostró un 87% de resistencia a ambos antimicrobianos. Ambas especies fueron resistentes a la tetraciclina (*C. jejuni* 84,3% y *C. coli* 60,9%) y el 26,1% de *C. coli* fue resistente a la estreptomicina. Estos resultados no mostraron diferencias significativas en la frecuencia de resistencia antimicrobiana ($p \geq 0.05$) entre los aislados procedentes de mataderos y del punto de venta.

Se detectaron tres patrones principales de resistencia antimicrobiana: quinolona-tetraciclina (64%), quinolona (17,6%) y quinolona-tetraciclina-aminoglucósidos (8%). Además, el 12,8 % de los aislamientos presentó resistencia a múltiples fármacos, con niveles significativamente más altos detectados entre los aislamientos de *C. coli* (30,4 %) en comparación con *C. jejuni* (8,8 %) y tres cepas fueron resistentes a los seis antibióticos probados.

Por lo tanto, estos resultados indican que los pollos de engorde podrían ser una fuente de *Campylobacter* resistente a los antimicrobianos en humanos y, en consecuencia, representar un riesgo para la salud pública.

AGRADECIMIENTOS

Todos los autores expresan su agradecimiento a la Universidad de Valencia (Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia) y al Laboratorio de Salud Pública de Valencia, por el apoyo que permitió la elaboración de este estudio.

REFERENCIAS

[1] Dixon S, Keshavamurthy R, Farber DH, Stevens A, Pazdernik KT, Charles LE. A Comparison of Infectious Disease Forecasting Methods across Locations, Diseases, and Time. Pathogens. 2022; 11(2):185.

[2] Igwaran A, Okoh AI. Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. Heliyon. 2019; 5(11):e02814.

[3] European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2021. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. EFSA J. 19(12): e06971

[4] Dai L, Sahin O, Grover M, et al. New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant *Campylobacter*. Transl Res 2020;223:76-88. doi: 10.1016/j.trsl.2020.04.009.

[5] Alaboudi AR, Malkawi IM, Osaili TM, et al. Prevalence, antibiotic resistance and genotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from chickens in Irbid governorate, Jordan. Int J Food Microbiol 2020;327:108656.

[6] Lopez-Chavarrias V, Ugarte-Ruiz M, Barcena C, et al. Monitoring of antimicrobial resistance to aminoglycosides and macrolides in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from healthy livestock in Spain (2002-2018). Front Microbiol 2021;12:689262.

EFECTO SINÉRGICO DE ACEITES ESENCIALES Y EDTA FRENTE A CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *PSEUDOMONAS* SP.

Natacha Caballero Gómez, Julia Manetsberger, Nabil Benomar, Hikmate Abriouel
Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071-Jaén, España.

ncgomez@ujaen.es

Dada la permanente evolución y emergencia de bacterias multirresistentes a antibióticos y la problemática actual en la generación de nuevos antibióticos, la búsqueda de nuevos compuestos activos frente a patógenos multirresistentes es una necesidad urgente. Para ello, nuestro objetivo es la evaluación de la sinergia entre compuestos antimicrobianos (presentes en aceites esenciales y EDTA) frente a cepas multirresistentes de *Pseudomonas* sp. aisladas de la cadena alimentaria. La presencia de altas cargas microbianas, especialmente patógenos en productos animales destinados al consumo humano, constituyen un reto y refuerzan la importancia de controlar los patógenos zoonóticos en la carne y otros productos animales a través de un examen completo y continuo de la granja a la mesa (Campos Calero et al., 2018) En este sentido, se realizó una selección de cepas de *Pseudomonas* sp. multirresistentes en base a su perfil de susceptibilidad a diferentes antibióticos *in vitro* siguiendo las instrucciones de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). La susceptibilidad a los antibióticos se determinó usando el método de difusión en agar mediante discos, los antibióticos testados y la concentración ensayada fueron los siguientes: Ampicilina 10 µg (AMP), gentamicina 120 µg (CN), tetraciclina 30 µg (TE), vancomicina 30 µg (VA), ciprofloxacina 5 µg (CIP), rifampicina 5 µg (RD), eritromicina 15 µg (E), nitrofurantoin 300 µg (F), cloranfenicol 30 µg (CL), imipen 15 µg (IPM) y cefuroxima 15 µg (CX). A continuación se determinó la presencia de genes de resistencia a antibióticos asociados con resistencia a beta-lactámicos (*bla*OXA, *bla*CTXa-CTXb, *bla*SHV-1 y *bla*TEM), cloranfenicol (*catA1*, *catA2*, *catA3* y *catB3*), macrólidos (*ereA*, *ereB*, *ermA*, *ermB*, *msrA*, *mrsB* y *mefA*), tetraciclina (*tetA*, *tetB*, *tetO* y *tetQ*), aminoglucósidos [*aad(E)*, *aphA-3*, *aac(6=)-Ie-aph(2=)-Ia*, *aph(2=)-Ib*, *aph(2=)-Ic*, *aph(2=)- Id*, *aph(3=)-IIIa* y *ant(4=)-Ia*], trimetropina (*dfrA* y *dfrD*), y sulfonamida (*sulI*, *sulII* y *sulIII*). Las bombas de eflujo involucradas en múltiples resistencias a antibióticos también fueron testadas, como AcrA, AcrB, TolC, MexAB, MexCD y MexXY, mediante PCR.

De otra parte, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los aceites esenciales (Timol, Carvacrol, Limoneno, Geraniol y Eugenol) y el EDTA (como inhibidor de bombas de exporte) en las cepas multirresistentes seleccionadas usando el método de microdilución en placa (CLSI, 2020). Una vez determinada la MIC de los distintos compuestos se ensayaron combinaciones de los mismos a concentraciones sub-inhibitorias con el

objetivo de determinar las posibles sinergias entre ellos.

Cepa	Resistencia Fenotípica.	Determinantes Genéticos de Resistencia.
M33T02	AMP10,CXM30,RD5, CIP5,F300	BlaSHV(betalactámicos) ermB(Macrólidos) CadEIII(Aminoglucósidos),TolC (Bombas de elfujo)
M22K12	AMP10,CXM30,CIP5,IMP10,CN10,CE30	TolC (Bombas de eflujo), ermB (macrólidos),CatA1, CatA3(Cloranfenicol),BlaSHV, bla CTXb (Betalactámicos)
M15K10	AMP10,CXM30,RD5, CIP5,CE30,f300,AMC30	BlaSHV, BlaTEM (Betalactámicos),CatA1,CatA3,CatB3(Cloranfenicol),CadEIII (Aminoglucósidos),TolC,MexAB (Bombas de eflujo)
M13K11	CXM30,CIP5,CE30,TE30	TolC,MexAB(Bombas de eflujo),Sul I (Sulfonamidas),CadEIII(Aminoglucósidos),ermB (Macrólidos),CatA3(Cloranfenicol),BlaSHV(, blaCTXb Betalactámicos)
M24T11.2	AMP10,CXM30,RD5, CIP5,CE30,f300,AMC30, IMP10	BlaSHV(betalactámicos) CatA3(Cloranfenicol),ermB(Macrólidos) ,CadEIII(Aminoglucósidos),SuII (Sulfonamidas) TolC,MexAB (Bombas de eflujo)
IT08	AMP10,CXM30,CIP5, CE30,f300, E15,CE30	SuII (Sulfonamidas) TolC,MexAB (Bombas de eflujo),CatA3(Cloranfenicol),ermB(Macrólidos) ,CadEIII(Aminoglucósidos), bla CTXb (betalactámicos)
M32K04	AMP10,CXM30,RD5, CIP5,CE30,F300,IMP10,	BlaTEM (Betalactámicos),CatB3(Cloranfenicol),ereA(macrólidos), SuII (Sulfonamidas),TolC MexAB (Bombas de eflujo)
M24T022	AMP10,CXM30,CIP5, CE30,f300,AMC30,RD5,	TolC MexAB (Bombas de eflujo),BlaTem(Betalactámicos), ereA ,ereB(Macrólidos)
M33K08	AMP10,CXM30,CIP5, CE30,f300,RD5,	CatA3.CatB3(Cloranfenicol),ermB (macrólidos) CadEIII(Aminoglucósidos),TolC(Bombas de eflujo)
M24T02	AMP10,CXM30,RD5, CIP5,CE30,f300,AMC30,	TolC(Bombas de eflujo),ereB (Macrólidos),BlaTEM (Betalactámicos)

Tabla 1: Perfiles de resistencia fenotípica y genotípica.

Los resultados obtenidos demostraron que las cepas de *Pseudomonas* sp. albergan genes de resistencia a varios antibióticos (beta-lactámicos, eritromicina, tetraciclina y sulfonamidas, entre otros) siendo dicha resistencia adquirida por vía horizontal. El 100% de las cepas fueron resistentes a ciprofloxacina (CIP5), 90% a ampicilina (AMP10), 70% a cloranfenicol (CE30) y Cefuroxima (CXM30), 60% a rifampicina (RD5), 80% a nitrofurantoin (F300), 40% a amoxicilina-clavulánico (AMC30), 30% a imipem (IMP10) y 10% a gentamicina (CN10), tetraciclina (TE30) y eritromicina (E15). Por otro lado, el 100% de las cepas presentaron genes de bombas de eflujo, 90% de betaláctamicos y el 70% mostraron determinantes de resistencia para macrólidos y cloranfenicol. Sin embargo, ninguna cepa mostró determinantes de resistencia para trimetoprima (Tabla 1).

En cuanto a la MIC de los aceites esenciales o EDTA determinada *in vitro* fue variable dependiendo del compuesto en cuestión y de la cepa analizada (Tabla 2). La combinación de limoneno con EDTA fue la más efectiva frente a cepas multirresistentes de *Pseudomonas* sp. (Tabla 3).

Cepa	Thimol	Geraniol	Limonene	Carvacrol	Eugenol	EDTAmM
M33k04	200	300	200	200	300	0,01
M33K08	200	250	200	200	300	0,1
M13K11	200	300	200	200	300	200
M24k02	200	400	200	200	300	1
M15K10	100	300	100	100	300	1
M2K12	300	400	300	400	400	0,001
M24T11.2	200	400	200	200	300	1
M24T022	200	400	200	200	300	1
IT08	100	100	100	100	300	1
M33T02	150	150	100	100	400	1

Tabla2: Valores de MIC determinados para timol, geraniol, limoneno, carvacrol, eugenol y EDTA.

Cepa	Tymol+ EDTA	Carvacrol+EDTA	Limonene +EDTA	Geraniol +EDTA	Eugenol + EDTA
M33k04	-	-	-	-	-
M33K08	-	-	-	-	-
M13K11	+	+	+	+	+
M24k02	-	-	+	-	-
M15K10	-	-	+	+	-
M2K12	-	-	-	-	-
M24T11.2	-	-	+	-	-
M24T022	-	-	+	+	-
IT08	-	-	-	-	-
M33T022	-	-	-	-	+

Tabla3: Sinergias encontradas entre timol, carvacrol, limonene, geraniol y eugenol combinados con EDTA.
(+ Presencia de sinergia, - Ausencia de sinergia)

Como conclusión, podemos destacar el efecto sinérgico de compuestos de aceites esenciales y agentes inhibidores de bombas de exporte como una prometedora alternativa frente a bacterias multirresistentes, no obstante, dicho efecto debe ser evaluado para cada especie bacteriana diana.

AGRADECIMIENTOS
Proyecto de investigación PAIDI 2020 Cód. Ref. P20_00983.

REFERENCIAS

[1] Campos Calero, Guillermo, et al. "Deciphering resistome and virulome diversity in a porcine slaughterhouse and pork products through its production chain." Frontiers in microbiology 9 (2018): 2099. [2]

[2] CLSI-2020: https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORAS DE BETA-LACTAMASAS DE AMPLIO ESPECTRO

Morales-Hervás L.[1], Cobo-Molinos A.[2], Roldán C.[3], Liébana MC.[3], Gálvez del Postigo A[1]., Ortega-Morente E[1].

1. Universidad de Jaén/Facultad de Ciencias Experimentales/Departamento de Ciencias de la salud/ Área de Microbiología. Campus las lagunillas s/n, CP23071 Jaén
2. Universidad de Granada/ Facultad de Farmacia/ Departamento de Microbiología. Campus de Cartuja s/n. CP 18071 Granada
3. Complejo Hospitalario de Jaén/U.G.C. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. Av. del Ejército Español, 10. CP23007 Jaén

Introducción: La familia *Enterobacteriaceae* es un grupo bacteriano muy frecuentemente asociado a infecciones y toxiinfecciones alimentarias. *Escherichia coli* es una especie bacteriana enormemente diversa que muestra una considerable versatilidad metabólica con la capacidad de colonizar numerosos huéspedes animales. *E. coli* también forma parte de las bacterias comensales no patógenas que conforman la microbiota intestinal normal de humanos y varios animales.

Su diversidad genómica le proporciona una amplia gama de factores asociados con la virulencia, incluida la producción de toxinas, lipopolisacáridos de adherencia y proteasas codificadas por elementos genéticos móviles entre otros, contribuyendo a aumentar la adaptabilidad, competitividad y capacidad para colonizar el cuerpo humano.[1] Las patologías de transmisión alimentaria, así como las infecciones de tipo oportunista causadas por *E. coli* presentan una incidencia muy elevada, por lo que resulta de interés determinar la prevalencia de ciertas cepas capaces de desarrollar resistencia a antibióticos, especialmente en el ámbito hospitalario.

El objetivo de este estudio es analizar la resistencia a antibióticos de cepas de *E. coli* productoras de betalactamasas de amplio espectro (extended-spectrum beta-lactamases, ESBL), que pueda estar relacionada con un peor pronóstico de la enfermedad y/o una mayor incidencia de recidivas asociadas a estas infecciones.

Materiales y métodos: Se aislaron un total de 62 cepas de *E. coli* procedentes de muestras procesadas en el Complejo Hospitalario de Jaén, identificadas mediante espectrometría de masas (Malditoff, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight).

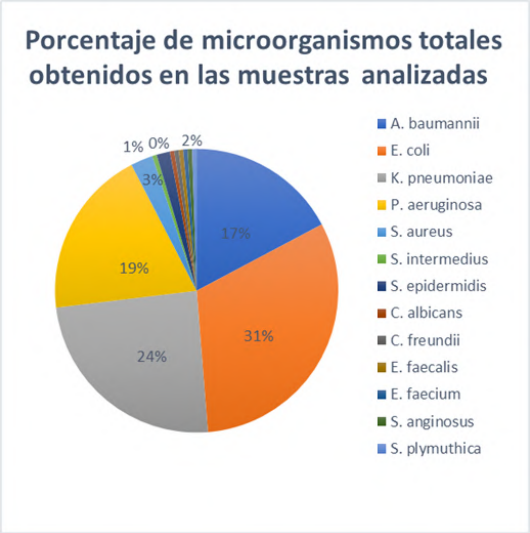


Figura 1: Porcentaje de microorganismos de las muestras procesadas.

Los antibiogramas rutinarios realizados para la selección de los tratamientos antibióticos empíricos se emplearon para seleccionar las cepas multi-resistentes y clasificarlas, en su caso, como productoras de ESBL.

Las muestras de *Escherichia coli* constituyeron el 31% de las muestras totales analizadas (Figura 1).

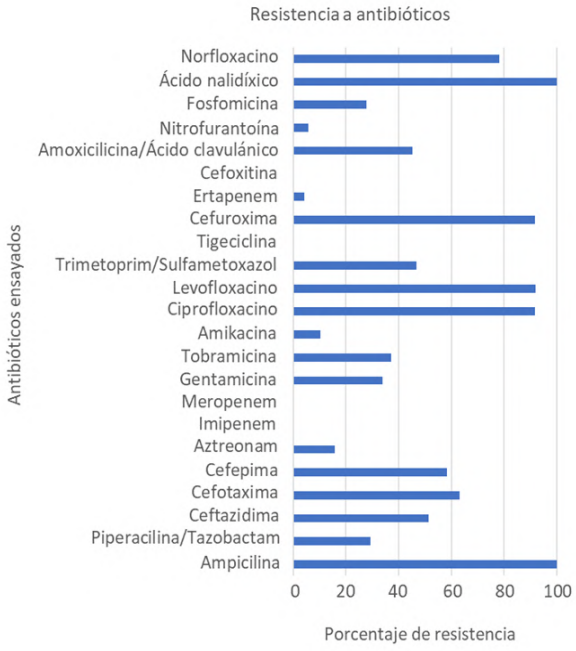


Figura 2: Porcentaje de resistencia a antibióticos detectada en cepas de *Escherichia coli*

Resultados: De un total de 197 muestras analizadas, se aislaron 62 cepas de la especie *E. coli*, de las que 25 presentaron una elevada resistencia a antimicrobianos, especialmente a betalactámicos (Figura 2).

Detectamos resistencias de un 100% a Ampicilina y a Ácido nalidíxico, así como del 91,9% frente a Levofloxacino, del 91,8% a Cefuroxima, del 91,7% a Ciprofloxacino, de un 78,2% a Norfloxacino y de un 63,1% a Cefotaxima. Observamos resistencias algo inferiores, de un 58,3% a Cefepima, un 51,4% a Ceftazidima, un 46,7% a Trimetoprim/Sulfametoxazol, un 45,2% a Amoxicilina/Ácido clavulánico, un 37,2% a Tobramicina y un 33,9% a Gentamicina. Los antibióticos con menores porcentajes de resistencia detactada fueron Piperacilina/Tazobactam con un 29,4%, Fosfomicina con un 27,8%, Aztreonam con un 15,7%, Amikacina con un 10,3%, Nitrofurantoína con un 5,6% y Ertapenem con un 4,2%. Finalmente, en esta especie encontramos completa sensibilidad a los siguientes antibióticos: Imipenem, Meropenem, Tigeciclina, Cefoxitina.

Conclusión: Las enfermedades transmitidas por los alimentos están asociadas con una alta morbilidad y mortalidad entre los pacientes, tanto en los países industrializados como en los países en desarrollo, siendo los patógenos bacterianos los principales agentes etiológicos de estas enfermedades. *Escherichia coli* es uno de los principales patógenos que contaminan alimentos disponibles para el consumo humano, generando numerosos casos de trastornos intestinales leves y graves en todo el mundo cada año[2].

Los altos niveles de resistencia a antibióticos y de producción de ESBL encontradas en cepas de *Escherichia coli* refuerzan la necesidad de formular una estricta política de prescripción y consumo responsable de antibióticos, así como la búsqueda de alternativas a los tratamientos antimicrobianos tradicionales.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por la Universidad de Jaén (estructura de investigación AGR230).

REFERENCIAS

[1] Mathers A. et al. 2015. *Escherichia coli* ST131: the quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Adv Appl Microbiol*. 90:109–154.

[2] Zorangel A. et al. 2015. Genetic Relatedness Among *Escherichia coli* Pathotypes Isolated from Food Products for Human Consumption in Cartagena, Colombia. *Foodborne pathogens and disease.* 12(5):454-461

EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA, LA SAL Y EL TAMAÑO DEL INÓCULO EN LA FASE DE LATENCIA DE *Staphylococcus aureus*

Grossi M.C., Cabeza M.C., García de Fernando G., Velasco R.

Universidad Complutense de Madrid/Facultad de Veterinaria/ S.D. de Tecnología Alimentaria. /Avda. Puerta de Hierro sn. Madrid 28040.

mgrossi@ucm.es

Staphylococcus aureus es un microorganismo muy relevante en alimentos "ready-to-eat", ya que puede multiplicarse en las condiciones de actividad de agua, pH y ambiente anóxico típicos de estos productos y cuando se producen abusos en la temperatura de almacenamiento [1]. Además, se detectan en los manipuladores de los alimentos, sobre todo en manos y nariz. Por otra parte, puede crecer en las condiciones de maduración de los embutidos curado-madurados como chorizo y salchichón.

Los modelos matemáticos predicen con bastante exactitud el crecimiento y la inactivación microbiana [2]. No obstante, no se tiene tanto éxito en la predicción de la fase de latencia ya que ésta no solo depende de las condiciones ambientales en que se encuentra el microorganismo, sino también de las condiciones previas por la que ha pasado (estado fisiológico). Otro factor a considerar es la variabilidad del comportamiento microbiano, existiendo bacterias con fases de latencia más o menos prolongadas [3]. Esto obliga a considerar en los modelos el tamaño del inóculo porque es indudable que la fase de latencia de una población con un número de bacterias elevado (centenares) será más corta que la de las células individualizadas, ya que su duración viene determinada por las bacterias que inician antes su multiplicación. En cambio, si son pocas bacterias, es menos probable que haya una bacteria "rápida". Por tanto, con inóculos pequeños (desde una a unas pocas decenas de células), las fases de latencia son más largas y, además, serán más variables [2].

Con estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del tamaño del inóculo y las condiciones de un embutido curado-madurado en la variabilidad de la fase de latencia de *S. aureus.*

Para ello, se prepararon distintos medios de cultivo a partir de caldo de soja tripticaseína (TSB) modificado, conforme la Tabla 1.

Medios	a_w	*NaCl*	*Nitrito(ppm)*	*pH*
TSB1	0,96	2,5%	25	5,5
TSB2	0,96	4%	25	5,5
TSB3	0,93	2,5%	25	5,5
TSB4	0,93	4%	25	5,5

Tabla 1: Diferentes condiciones del medio de cultivo preparado. El ajuste a la misma actividad de agua de muestras con distintos porcentajes de sal se lograba añadiendo glicerol csp.

La determinación de la fase de latencia se llevó a cabo en un Bioscreen C. En placas de 100 pocillos se inocularon 300 µL de diluciones de un cultivo de *S. aureus* ST8 con cargas iniciales (células/pocillo) de 0,1 y 1 (100 pocillos) y 10 y 100 (25 pocillos). Las muestras se incubaron a 22°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,2, correspondiente a aproximadamente 10^8 células/ml. La fase de latencia se estimó a partir de la siguiente expresión:

$$Lag = T_{det} - (LnN_{det} - LnN_0)/\mu_{max}$$

donde: Lag, es la fase de latencia; T_{det}, el tiempo (horas) que tarda la población microbiana en producir la turbidez establecida (DO=0,2); N_{det}, el número de microorganismos en el tiempo de detección; N_0, el inoculo inicial y μ_{max}, la

tasa máxima de crecimiento, previamente calculada (véase la Tabla 2).

	% de NaCl	
a_w	2,5	4,0
0,93	0,1464	0,1856
0,96	0,2147	0,2081

Tabla 2. Tasas máximas específicas de crecimiento (h^{-1}) de *S. aureus* ST8 a 22°C en diferentes condiciones de actividad de agua y porcentaje de NaCl.

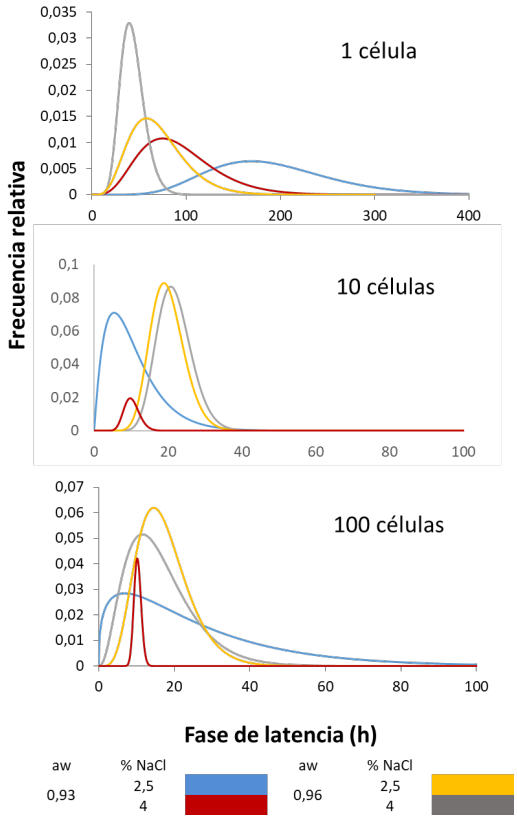


Figura 1. Distribuciones de frecuencias de la fase de latencia de micropoblaciones (1 célula, unas 10 células, unas 100 células) de S. *aureus* ST8 a 22°C en diferentes condiciones de actividad de agua y % de NaCl.

Una vez determinadas las fases de latencia se estimó su variabilidad. A partir de la varianza y la media, se calcularon los valores b (varianza/media) y k (media/b) y, posteriormente, la frecuencia relativa.

La figura 1 muestra las distribuciones de frecuencia de *S. aureus* ST8 a 22°C en condiciones de actividad de agua y porcentaje de NaCl similares a las que pueden encontrarse en un embutido curado madurado. La fase de latencia de las células individualizadas fue más prolongada que las de las poblaciones mayores. Así mismo, la variabilidad fue notablemente mayor. Este hecho era de esperar, pues como se mencionó en la introducción, cuantas más células componen una micropoblación, más probable es que haya células que se multipliquen en un tiempo menor y estas células "rápidas" condicionan la fase de latencia de la población. En cambio, las diferencias fueron menores entre las muestras con 10 y 100 células (véase la figura 1). Las fases de latencia de *S. aureus* en las micropoblaciones con 10 células con la menor actividad de agua fueron más cortas que las fases de latencia con una a_w de 0,96. Cuando el inóculo fue mayor (100 células), las diferencias se minimizaron.

Estos hechos parecen indicar que ni la a_w (hasta 0,93) ni el NaCl (hasta un 4%) son impedimentos para el desarrollo de *S. aureus* a temperatura ambiente, aunque las poblaciones sean muy pequeñas. El efecto inhibidor de una baja a_w parece apreciarse solo en las células individualizadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2017-00027-C03-02 y el Grupo UCM 920276.

REFERENCIAS

[1] Wu J, Acuff J, Waterman K, Ponder M. Evaluation of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* survival and growth during cooling of hams cured with natural-source nitrite. *J. Food Prot.*, **2021**, *84*, 286–90.

[2] Aguirre JS, Gonzalez A, Özçelik N, Rodríguez M R, García de Fernando G D. Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. *Int. J. Food Microbiol.,* **2013,** *164*, 60-69.

[3] D'Arrigo M, García de Fernando G D, Velasco R, Ordóñez J A, George S M, Pin C. Indirect measurement of the distribution of the lag time of single cells of *Listeria innocua* in food. *Appl. Environ. Microbiol*., **2006**, *72*, 2533-2538.

APLICACIÓN DE UNA NANOEMULSIÓN DE LIMONENO PARA LA DESCONTAMINACIÓN DE TOMATES CHERRY CONTAMINADOS ARTIFICIALMENTE CON *Listeria monocytogenes*

Mozzetti, A., Garre, A., Fernández, P.S., Palop, A.
Universidad Politécnica de Cartagena/Departamento de Ingeniería Agronómica/Instituto de Biotecnología Vegetal/Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum" Cartagena, España. alfredo.palop@upct.es

El procesado de muchos vegetales en la industria alimentaria incluye habitualmente una etapa de lavado, que tiene como principal objetivo eliminar la suciedad presente en su superficie, pero también contribuye de forma notable a reducir la carga microbiana. Por este motivo el agua de lavado suele contener alguna sustancia de carácter antimicrobiano, que ayude en la descontaminación microbiana de vegetales. Tradicionalmente se ha empleado el hipoclorito sódico para este fin. No obstante, la formación de sustancias potencialmente cancerígenas, como las cloraminas, desaconseja su uso y ha dado lugar a que, hoy en día, se busquen alternativas para sustituir al cloro [1].

Una posible alternativa es el uso de aceites esenciales en forma de nanoemulsión. Se ha demostrado que muchos aceites esenciales muestran un marcado efecto antimicrobiano. Sin embargo, también muestran una solubilidad en agua muy baja. Realizar una emulsión soluciona dicho problema [2].

El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de limoneno en forma de nanoemulsión como alternativa al cloro para la descontaminación de vegetales. Para ello se contaminaron artificialmente tomates Cherry con un cultivo de *Listeria monocytogenes*.

Los tomates Cherry fueron inoculados mediante inmersión durante unos segundos en un cultivo de 24 h a 37°C de *L. monocytogenes* Scott A en caldo BHI y secado por dos horas en cabina de flujo laminar.

Se prepararon nanoemulsiones de limoneno 1 M por homogeneización mecánica con un Ultraturrax IKA T18 basic a 300-500 rpm durante 15 minutos. La fase oleosa se preparó mezclando 6,0 mL de Tween 80 con 16,7 mL de D-limoneno. La fase acuosa se preparó con 27,5 mL de propilenglicol y 49,8 mL de agua destilada.

A continuación, los tomates fueron sumergidos en agua, hipoclorito y tres concentraciones diferentes de limoneno nanoemulsionado (50, 100 y 200 mM) durante 15 minutos. Todos los experimentos se realizaron, al menos, por triplicado.

La nanoemulsión de limoneno consiguió reducir la población de *L. monocytogenes* en más de un ciclo logarítmico a cualquiera de las concentraciones investigadas (figura 1). A la concentración más baja estudiada (50 mM), el nivel de descontaminación alcanzado fue de 1,41 ciclos logarítmicos, y llegó hasta 1,70 con la solución 200 mM, si bien el efecto parecía saturarse a concentraciones elevadas. Los resultados son similares a los obtenidos con hipoclorito (1,82 ciclos logarítmicos de reducción).

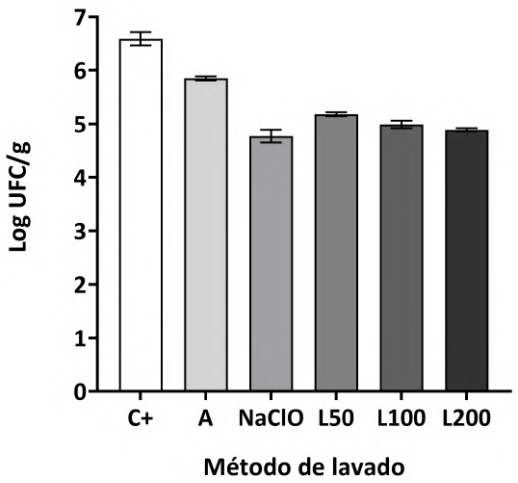


Figura 1: Carga microbiana de los tomates Cherry contaminados artificialmente con *L. monocytogenes* antes y después de diferentes métodos de lavado. C+: control, antes del lavado; A: agua; NaClO: hipoclorito sódico; L50: nanoemulsión de limoneno 50 mM; L100: nanoemulsión de limoneno 100 mM; L200: nanoemulsión de limoneno 200 mM. Las barras de error representan la desviación estándar de al menos 3 experimentos.

Se encontraron diferencias significativas entre todas las condiciones investigadas, salvo entre 100 y 200 mM de limoneno y entre el hipoclorito y 200 mM de limoneno. Estos resultados parecerían indicar que la concentración de limoneno alcanzaría un umbral, alrededor de 100 mM, más allá del cual no se conseguirían reducciones adicionales de la carga microbiana al incrementar la concentración de limoneno en la nanoemulsión (figura 2). Por este motivo se desarrolló una ecuación matemática asintótica (ec. 1), describiendo la reducción de la carga microbiana en función de la concentración de limoneno.

$$y = 0{,}73 + 1{,}27 * \frac{x}{x+45} \qquad \text{(ec. 1)}$$

donde *y* representa la reducción de la carga microbiana y *x* la concentración de limoneno en la nanoemulsión. En esta ecuación, 0,73 es el valor de la reducción de la carga que se obtiene lavando solo con agua y 1,27 la máxima reducción que se alcanzaría con limoneno.

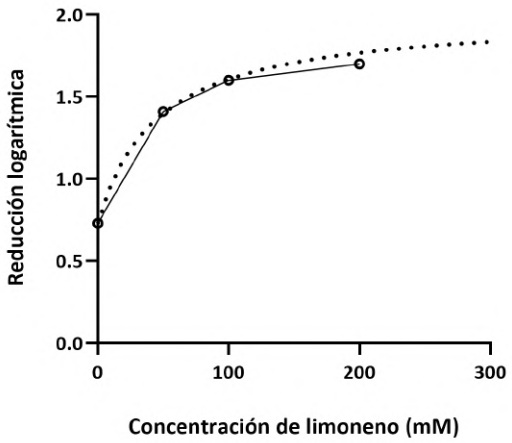


Figura 2: Representación de la reducción de la carga microbiana alcanzada en función de la concentración de limoneno en la nanoemulsión. ○: datos experimentales; ••• datos predichos.

En general, los valores de reducción de la carga microbiana publicados por diferentes autores en tratamientos estándar de descontaminación no superan los dos ciclos logarítmicos [3], por lo que estos resultados muestran que el limoneno en forma de nanoemulsión añadido al agua de lavado consigue una reducción de la carga microbiana similar a la que se obtiene con hipoclorito y otros tratamientos, representando una alternativa adecuada para sustituir al cloro en la descontaminación de vegetales.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido posible gracias al Proyecto PID2020-116318RB-C32 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033.

REFERENCIAS

[1] A Meireles, E Giaouris, M Simoes, *Food Res Int,* **2016**, *82,* 71-85.

[2] F Donsì, G Ferrari, *J Biotehc,* **2016**, *233*, 106-120.

[3] C Goodburn, CA Wallace, *Food Control*, **2013,** *32,* 418-427.

RE-DEFINIENDO LA TEMPERATURA MÍNIMA DE CRECIMIENTO DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS EN HUEVO Y OVOPRODUCTOS: INFLUENCIA DE LA DOSIS INICIAL Y LA HISTORIA TÉRMICA DEL OVOPRODUCTO

Guillén S.[1], Carrasco E.[2], Mañas P.[1], Álvarez I.[1], Cebrián G.[1]

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

2 Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba, Edificio Darwin, Anexo, 14010, Córdoba, España.

silviaguillen@unizar.es

La relevancia sanitaria de *Salmonella* y su frecuente asociación con los huevos y ovoproductos es de sobra conocida [1]. Aunque el crecimiento y la supervivencia de *Salmonella* en estos productos ha sido ampliamente estudiado, a día de hoy todavía hay aspectos que se desconocen. Recientemente se ha demostrado que factores como la dosis inicial o el historial térmico del ovoproducto también pueden influir en la capacidad de crecimiento de *Salmonella* en ellos [2], estando relacionado con la biodisponibilidad del hierro en el ovoproducto [3].

El objetivo de este estudio fue determinar la temperatura mínima de crecimiento en huevo y ovoproductos de 4 cepas de *S.* Enteritidis (CECT 4155, 4300, 4396 y 7160) en función de la dosis inicial de inóculo.

Para ello se determinó la capacidad de crecimiento de estas 4 cepas en diferentes condiciones experimentales: temperatura entre 6 y 20 °C; dosis inicial entre 10^2 y 10^6 UFC/ml y en los siguientes ovoproductos: huevo entero (líquido), clara y yema, todos ellos tanto crudos como pasteurizados. En total fueron 158 condiciones por cepa (+ 24 réplicas por condición). Los diferentes ovoproductos fueron inoculados con monocultivos de las 4 cepas de *Salmonella* y su crecimiento (o no) se comprobó tras 30 días de incubación (tras 15 días también en el caso de la clara de huevo). El crecimiento se confirmó cuando se detectó una diferencia de más de 0,5 Log UFC/ml con la dosis inicial. A partir de los resultados obtenidos se construyeron una serie de ecuaciones mediante regresión logística polinómica que permitieron estudiar las interacciones entre estos factores (la dosis inicial y la historia térmica) sobre la probabilidad de crecimiento para cada cepa de *S*. Enteritidis en estos productos. Una vez obtenidos los modelos para cada cepa, se desarrolló otro modelo para cada ovoproducto ajustando en conjunto los datos correspondientes a las cuatro cepas.

Los resultados obtenidos indicaron que las temperaturas mínimas de crecimiento de *S*. Enteritidis fueron mayores en la clara (9,47 - 18,25 °C) que en el huevo entero (7,15 - 7,78 °C) o en la yema (7,10 - 7,75 °C). Además, estos resultados también demostraron que en algunos productos (huevo entero líquido crudo y clara cruda y pasteurizada) la temperatura mínima de crecimiento de *Salmonella* dependía de la dosis inicial y que, en el caso del huevo entero y la clara, también dependía de su historial térmico previo (Figura 1). Experimentos preliminares indicaron que, en la yema de huevo, ni la dosis inicial ni su historial térmico influían en la temperatura mínima de crecimiento de *S*. Enteritidis, y

por ello se construyó un modelo único para este producto del huevo.

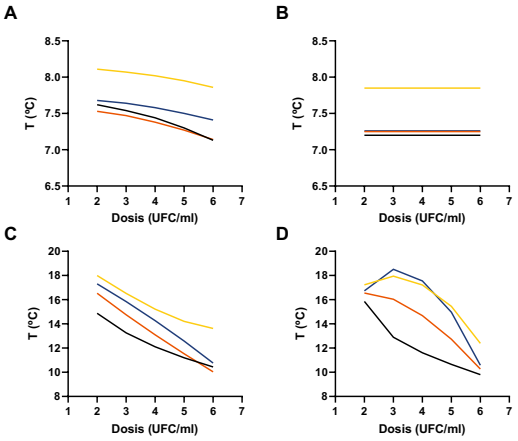


Figura 1: Efecto de la temperatura y la dosis inicial sobre la probabilidad de crecimiento de las cepas de *S.* Enteritidis en el huevo entero líquido crudo (A) y pasteurizado (B), y en la clara de huevo cruda (C) y pasteurizada (D). Los colores se corresponden a las 4 cepas de *S.* Enteritidis (4155 negro; 4300 naranja; 4396 amarillo; 7160 azul).

Por otro lado, se observaron grandes diferencias en las temperaturas mínimas de crecimiento entre cepas en algunos productos, hasta de aproximadamente 6 °C en la clara de huevo (Figura 1). Estas diferencias en la temperatura mínima de crecimiento entre las distintas cepas podrían estar relacionadas con su capacidad para sintetizar estos sideróforos, ya que la cepa CECT 4300, que mostraba la mayor capacidad de producción de sideróforos (determinado según lo descrito por Payne, 1994 [4]), era una de las cepas (junto con CECT 4155) con las temperaturas mínimas de crecimiento más bajas, mientras que la cepa CECT 4396 era la que producía menos sideróforos y la que mostraba una menor capacidad de crecimiento a bajas temperaturas.

Para evaluar los modelos de regresión logística obtenidos, se seleccionaron varias condiciones límite y se testaron. En términos generales, se obtuvo una buena correlación entre los valores obtenidos en la validación y los predichos por los modelos para cada cepa y con el modelo con el conjunto de datos, aunque con algunas excepciones.

Este enfoque experimental nos ha permitido hacer una predicción más precisa de las temperaturas mínimas de crecimiento de *Salmonella* en los ovoproductos, teniendo en cuenta factores adicionales (dosis e historial térmico) y proporcionando al mismo tiempo una cuantificación de la variabilidad intra-específica, todos ellos aspectos de la mayor relevancia para mejorar la seguridad alimentaria de los huevos y ovoproductos, ya que permitiría desarrollar evaluaciones cuantitativas del riesgo de *Salmonella* más precisas y también mejorar sus procesos de producción, almacenamiento y distribución. También podría ayudar a revisar o perfeccionar las directrices actuales para la gestión de estos productos, tanto en el caso de la industria como para los consumidores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha contado con el apoyo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional y del MINECO-CICYT (proyecto AGL2017-84084-R) y del Instituto de Estudios del Huevo. S. G agradece el apoyo financiero para su estancia de investigación proporcionado por la Universidad de Zaragoza, la Fundación Bancaria Ibercaja y Fundación CAI (CM7/19).

REFERENCIAS

[1] EFSA, *EFSA J.* **2021**, 19(12):6971.

[2] S. Guillén, M. Marcén, I. Álvarez, P. Mañas, G. Cebrián, *Foods* **2021**, *10*, 1621,

[3] S. Guillén, G. Cebrián, *Food Microbiol.* **2022**, *104*, 104008.

[4] S.M. Payne, "Methods in Enzymology" (Academic Press, 1994).

MODELIZACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA EPIDÉMICA F2365 DE *L. MONOCYTOGENES* Y DE SU MUTANTE QUE SOBREEXPRESA PRFA EN LECHE UHT A TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN

Espí-Malillos A.[1], López-Almela I.[1], Ruiz P.[2], López-Mendoza MC.[2], Quereda JJ.[1]

1 Universidad Cardenal Herrera-CEU/Facultad de Veterinaria/Departamento Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos/Patógenos Intracelulares: Biología e Infección. Calle Santiago Ramón y Cajal, s/n, 46115. Alfara del Patriarca (Valencia).

2 Universidad Cardenal Herrera-CEU/Facultad de Veterinaria/Departamento Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos/Nutrición Humana y Seguridad Alimentaria para la Salud. Calle Santiago Ramón y Cajal, s/n, 46115. Alfara del Patriarca (Valencia).

juan.quereda@uchceu.es

Los factores de virulencia han demostrado tener un papel clave en la supervivencia del patógeno durante la infección del hospedador, sin embargo, el coste-beneficio de poseerlos queda en entredicho cuando el microorganismo cohabita en otros medios donde dichos factores no resultan esenciales [4]. La leche de vaca higienizada es uno de los alimentos más consumidos en el mundo y utilizado en la elaboración de productos lácteos listos para el consumo. Sus características fisicoquímicas proporcionan un medio idóneo para el crecimiento de microorganismos patógenos, aumentándose el riesgo si existe contaminación tras el proceso de higienización [3].

Listeria monocytogenes es un patógeno alimentario, comúnmente asociado al consumo de productos listos para el consumo, capaz de colonizar el tracto gastrointestinal, cruzar la barrera intestinal y causar enfermedad entre la población susceptible [1]. Su capacidad psicrófila permite que *L. monocytogenes* pueda sobrevivir y multiplicarse en condiciones de refrigeración en etapas de post-procesado, siendo especialmente crítica la contaminación tras la pasterización del alimento. Así lo confirman diferentes brotes de listeriosis asociados al consumo de productos lácteos refrigerados, previamente pasterizados [4].

De los cuatro linajes evolutivos de *L. monocytogenes*, las cepas del linaje I son responsables de la mayoría de los brotes de listeriosis de carácter epidémico [3]. En este estudio, se ha modelizado la cinética de crecimiento de una cepa de *L. monocytogenes* del linaje I en leche UHT (*Ultra High Temperature*) a 4ºC durante un periodo de 35 días: la cepa F2365, causante de un brote mortal de listeriosis en California en 1985 por consumo de queso blando estilo mexicano, y un mutante de esta, que contiene al principal regulador de genes de virulencia de este microorganismo, PrfA, constitutivamente activo.

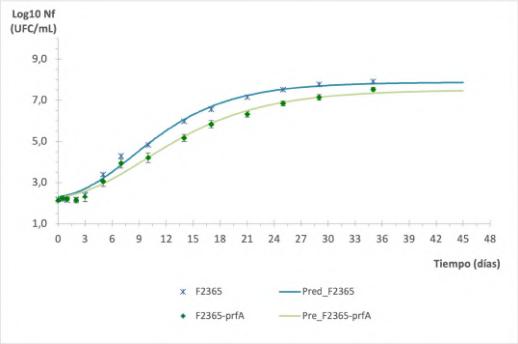


***Figura 1**:* Crecimiento de *L. monocytogenes* en leche UHT. Se representa la media del logaritmo decimal de los recuentos por mL y la desviación estándar de las cuatro réplicas experimentales por cepa. La línea continua representa los valores predichos según el modelo de

La cepa F2365 y su mutante con prfA constitutivamente activo fueron inoculadas independientemente en tubos falcon de leche UHT hasta alcanzar la concentración de inóculo inicial deseada de 200 UFC/mL. Los tubos falcon de leche se almacenaron a 4ºC y el crecimiento de *L. monocytogenes* se contabilizó a los 0, 0'5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 17, 21, 25, 29 y 35 días (Fig. 1).

Durante el ciclo de infección habitual por *L. monocytogenes*, la activación transcripcional de los genes regulados por PrfA (dependiente de múltiples factores como: la temperatura, diversas fuentes de carbono, la L-glutamina y los niveles de BCAA) tiene lugar primordialmente a nivel intracelular [2].

Parámetros	Cepa	$\bar{X}$	DE	CV (%)	Mínimo	Máximo
Log No [(Log$_{10}$ cfu/mL)/día]	F2365	2,19	± 0,01	0,6	2,17	2,20
	F2365-prfA	2,14	± 0,05	2,4	2,09	2,20
Log Nf máx [(Log$_{10}$ cfu/mL)/día]	F2365	7,86	± 0,04	0,5	7,81	7,86
	F2365-prfA	7,50	± 0,11	1,4	7,39	7,61
ΔLog Nf [(Log$_{10}$ cfu/mL)/día]	F2365	5,67	± 0,04	0,7	5,6	5,7
	F2365-prfA	5,36	± 0,14	2,6	5,2	5,5
Fase Lag (días)	F2365	2,29	± 0,62	27,2	1,74	2,90
	F2365-prfA	2,42	± 0,33	13,5	2,07	2,86
$\mu_{máx}$ [(Log$_{10}$ cfu/mL)/día]	F2365	0,35	± 0,03	8,79	0,31	0,38
	F2365-prfA	0,27	± 0,01	3,77	0,27	0,29
RMSE	F2365	0,26				
	F2365-prfA	0,26				
df	F2365	80				
	F2365-prfA	81				
R^2_{adj}	F2365	98,5				
	F2365-prfA	98,21				

Tasa de crecimiento mayor
Tasa de crecimiento menor

Tabla 1: Parámetros cinéticos estimados para describir el crecimiento de la cepa F2365 de *L. monocytogenes* y su mutante con prfA constitutivamente activo en leche UHT.

A pesar de que ambas cepas son capaces de multiplicarse en la leche UHT almacenada a 4ºC, la cepa epidémica con la mutación en PrfA mostró una menor velocidad de crecimiento y una mayor fase de latencia, respecto a la cepa F2365 salvaje (Tabla 1). El retraso en la adaptación al medio durante la fase de latencia y la menor tasa de crecimiento durante la fase exponencial de la cepa F2365 mutada en PrfA indican que la reducción del crecimiento puede atribuirse expresamente a la activación de genes de virulencia innecesarios durante el crecimiento en alimentos. Por tanto, la activación transcripcional de factores de virulencia en productos lácteos como la leche UHT demuestra ser una carga que limita la competitividad de *L. monocytogenes* en este tipo de ambientes.

Este estudio muestra que, en concordancia con otros trabajos publicados anteriormente [2, 4], el crecimiento de cepas de *L. monocytogenes* en leche UHT puede verse significativamente perjudicado por la activación de factores de virulencia que resultan claves en la interacción patógeno-hospedador.

REFERENCIAS

[1] Disson, O., Moura, A., Lecuit, M., Trends Microbiol, **2021**, *29(9):811-22*, 1-12.

[2] Portman, JL., Dubensky, SB., Peterson, BN., Whiteley, AT., Portnoy, DA., mBio, **2017**, *8:e01595-17*, 1-13.

[3] Quereda, JJ. et al., Virulence, **2021**, *12(1):2509-45*, 2509-2545.

[4] Vasanthakrishnan, RB., De las Heras, A., Scortti, M., Deshayes, C., Colegrave, N., Vázquez-Boland, JA., Environ Microbiol, **2015**, *17(11)*, 4566-4579.

APLICACIÓN DE UNA CEPA AUTÓCTONA DE *Debaryomyces hansenii* EN LA PREPARACIÓN DE LOMOS IBÉRICOS CON MENORES CONCENTRACIONES DE CONSERVANTES QUÍMICOS.

Helena Chacón-Navarrete[1], Francisco Ruiz-Pérez[1], Francisco J. Ruiz-Castilla[1], Pilar Ruiz Pérez-Cacho[2], Hortensia Galán Soldevilla[2], José Ramos[1].

1 Universidad de Córdoba/ Departamento Química Agrícola, Edafología y Microbiología. Campus de Rabanales, 14014, Córdoba.

2 Universidad de Córdoba/ Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Campus de Rabanales, 14014, Córdoba.

mi1raruj@uco.es

Debaryomyces hansenii es la levadura más abundante en embutidos y productos cárnicos curados [1,2]. En vista del acusado interés en la incorporación de nuevos métodos de conservación en este tipo de productos y, a raíz de la elevada preocupación de los usuarios por consumir productos más naturales y con menos conservantes químicos [3], hemos llevado a cabo un estudio de cómo la inoculación de la cepa LRC2 de *D. hansenii*, afecta a las propiedades físico-químicas y organolépticas de lomos ibéricos procedentes del Valle de los Pedroches (Córdoba). Esta levadura no convencional presenta una serie de características como su especial tolerancia a la sal, conocida inocuidad en su consumo y potencial inhibidor en la proliferación de hongos patógenos (Ver resumen "Análisis de cepas autóctonas de la levadura *Debaryomyces hansenii* como agentes de biocontrol ante hongos indeseados en productos cárnicos curados" de Chacón-Navarrete et al. en este Congreso), que la hacen una opción más que deseable para su implementación como conservante natural en productos cárnicos curados.

Durante el proceso de embuchado, una batería de lomos fue inoculada en superficie con la cepa LRC2. La inoculación de lomos con levadura seleccionada se realizó cultivando el microorganismo en medio complejo (Yeast extract 1%, Peptone 2%, Dextrose 2%) líquido durante 36 horas, pasado este tiempo se recogieron las células, se lavaron con agua fría estéril y se preparó una suspensión concentrada (A_{600nm}=20). Las levaduras se mantuvieron refrigeradas en hielo picado hasta el momento de la inoculación, que siempre fue menor de 5 horas. La inoculación (0,75 g de levadura por lomo, 2 Kg) se llevó a cabo con ayuda de un pulverizador y un pincel sobre la superficie del embutido y se obtuvieron finalmente 10 condiciones diferentes que se recogen en la **Tabla 1**. Los lomos se dejaron madurar durante 3 meses a una temperatura media de 13ºC.

Condición	Sal (g/Kg lomo)	Nitrito-Nitrato (g/Kg lomo)
Con levadura (LRC2)	24	5
	15	5
	10	5
	24	4
	24	3
Sin levadura	24	5
	15	5
	10	5
	24	4
	24	3

Tabla 1: Condiciones estudiadas.

Tras el periodo de maduración, se observó que, durante el curado e independientemente del contenido de conservantes químicos, la levadura en estudio fue capaz de implantarse y proliferar de manera exitosa en la superficie de los lomos (**Figura 1**).

Figura 1: Implantación de levaduras *Debaryomyces hansenii* inoculadas en la superficie de lomos de cerdo. De izquierda a derecha: 0, 10 y 30 días de maduración.

Una vez curados, se realizaron controles de calidad, así como mediciones de sus propiedades fisicoquímicas, contenido en agua, concentración de sal o pH. Finalmente, por medio de una serie de catas, se determinó la influencia de la levadura en las cualidades organolépticas del producto final, siendo este uno de los factores determinantes de la viabilidad de su aplicación como conservante.

Aunque los resultados específicos obtenidos serán presentados durante el congreso, podemos afirmar que, de manera global, la levadura aceleró el proceso de maduración de los lomos y que mejoró sus características organolépticas. Además, en algunos de los tratamientos, la presencia de LRC2 fue capaz de suplir completamente los efectos de la reducción en conservantes químicos, lo que supone aspectos muy prometedores en estas líneas de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo ha sido realizado gracias a la colaboracion de Navalpedroche S.L, el Plan Propio de Investigación 2022 de la Universidad de Córdoba y el Proyecto FEDER (1380653-R).

REFERENCIAS

[1] J. Ramos, Y. Melero, L. Ramos-Moreno, C. Michán, L. Cabezas. *Debaryomyces hansenii* Strains from Valle De Los Pedroches Iberian Dry Meat Products: Isolation, Identification, Characterization, and Selection for Starter Cultures. *J Microbiol Biotechnol.* ***2017***, *27*, 1576–1585.

[2] L. Ramos-Moreno, F. J. Ruiz-Castilla, C. Bravo, E. Martínez, M. Menéndez, R. Dios-Palomares, J. Ramos. Inoculation with a terroir selected *Debaryomyces hansenii* strain changes physico-chemical characteristics of Iberian cured pork loin. *Meat Sci.* ***2019***, 157, 107875.

[3] L. Ramos-Moreno, F. Ruiz-Pérez, E. Rodríguez-Castro, J. Ramos. *Debaryomyces hansenii* Is a Real Tool to Improve a Diversity of Characteristics in Sausages and Dry-Meat Products. *Microorganisms*, ***2021***, *9*, 1512.

APLICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (VOCS) PROCEDENTES DE LEVADURAS PARA EL CONTROL DE PENICILLIUM EXPANSUM EN MANZANA

Martínez A.[1,2], Casquete R.[1,2], Gudiño I.[1,2], Córdoba J.J.[1,2], Hernández A.[1,2]

[1]Universidad de Extremadura/Escuela de Ingenierías Agrarias/Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Nutrición y Bromatología. Avd. Adolfo Suárez s/n, 06007, Badajoz.

[2]Universidad de Extremadura/Instituto Universitario de Investigación de Recursos Agrarios (INURA). Avd. de la Investigación s/n, 06006, Badajoz. ahernandez@unex.es

Las manzanas son ampliamente consumidas a nivel mundial, además de su uso para la obtención de zumos, compotas, etc. Uno de los principales problemas es la contaminación por mohos toxigénicos como *Penicillium expansum* productor de patulina. Para su control cada vez son más demandadas alternativas a los fungicidas de síntesis para disminuir los residuos tóxicos y el daño ambiental. Dentro de estas estrategias destaca el control biológico utilizando microorganismos antagonistas [1]. Diversos mecanismos de acción se han asociado a la capacidad de los microorganismos antagonistas para controlar a los mohos alterantes y toxigénicos [2]. La producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) por microorganismos antagonistas [3] y/o la aplicación directa de estos compuestos antifúngicos [4] es uno de los mecanismos menos estudiados y con un amplio potencial de aplicación.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad de inhibir el desarrollo de *P. expansum* de diferentes VOCs procedentes de levaduras antagonistas, como estrategia para aumentar la vida útil y mejorar la calidad de las manzanas y los productos derivados.

Para ello se utilizaron 8 VOCs procedentes de levaduras [3, 5]: propionato de etilo (EP), acetato 2-metilbutilo (MA), acetato de isobutilo (IA), isobutanol (IB), 2-feniletanol (PL), acetato de etilo (EA), acetato de isoamilo (ILA), y acetato de propilo (PA).

Se evaluó la capacidad de estos compuestos para controlar el desarrollo de dos cepas de *P. expansum*, (CECT2280 y CECT2278) en un medio de cultivo a base de manzana (20% de manzana cv. Golden Delicius, 2% agar bacteriológico) en el que se inocularon las cepas de moho que se expusieron a diferentes cantidades (10, 25 y 100 µL) de los VOCs. En estos ensayos se evaluaron la velocidad de crecimiento del micelio del moho y el periodo de latencia en comparación con las placas control sin exposición a VOCs. Con los compuestos y cantidades más efectivos se realizó un ensayo en manzanas inoculadas con las cepas de *P. expansum*, almacenadas en contenedores cerrados a 20ºC. El efecto de los compuestos se analizó mediante la determinación de la severidad de las infecciones por *P. expansum* en comparación con las manzanas control sin aplicación de compuestos volátiles.

Seis de los 8 compuestos mostraron capacidad de prolongar la fase lag y reducir las tasas de crecimiento de ambas cepas de *P. expansum* dependiendo de la dosis de compuesto (p<0,050). Únicamente los compuestos EP e IA no controlaron o estimularon el desarrollo de los mohos en agar manzana. Por el contrario, destacaron los compuestos MB, ILA y PL que aumentaron el periodo Lag más de 4 veces respecto al control; y los compuestos IB, ILA y PL que disminuyeron las tasas de crecimiento más de 3 veces cuando se aplicaron 100 µL de compuesto.

El análisis del efecto global de los compuestos volátiles de forma conjunta para ambas cepas (Figura 1) mostró que los compuestos más efectivos fueron IB, ILA y PL, que se seleccionaron para su aplicación

en manzanas dañadas e inoculadas con las cepas de *P. expansum*.

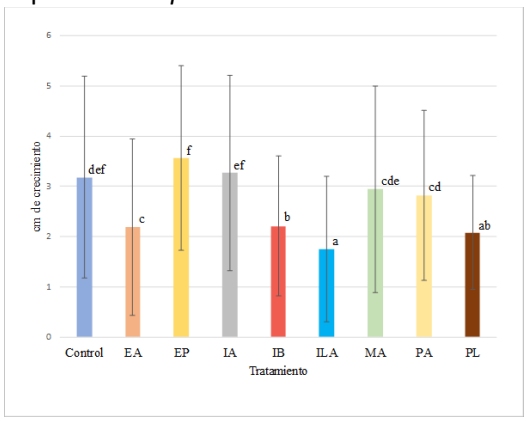


Figura 1: Crecimientos medios globales (cm) de *P. expasum* tratados con los compuestos volátiles propionato de etilo (EP), acetato 2-metilbutilo (MA), acetato de isobutilo (IA), isobutanol (IB), 2-feniletanol (PL), acetato de etilo (EA), acetato de isoamilo (ILA), y acetato de propilo (PA).

La aplicación de los VOCs seleccionados en cantidades equivalentes a los 100 mL empleados en los ensayos in vitro mostró resultados desiguales. La aplicación de ILA provocó una rápida alteración de la fruta, por lo que fue descartado para el ensayo. Los resultados de la aplicación de IB y PL se muestran en la figura 2.

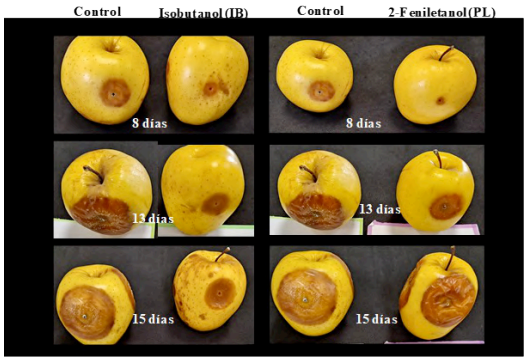


Figura 2: Efecto de la aplicación de isobutanol (IB) y 2-feniletanol (PL) sobre manzanas cv. Golden Delicius inoculadas con *Penicillium expansum* CECT2280.

Los resultados del ensayo in vivo muestran que de forma global el compuesto IB fue efectivo en el control de las podredumbres en manzana, aunque los efectos dependieron de la cepa (Figura 3).

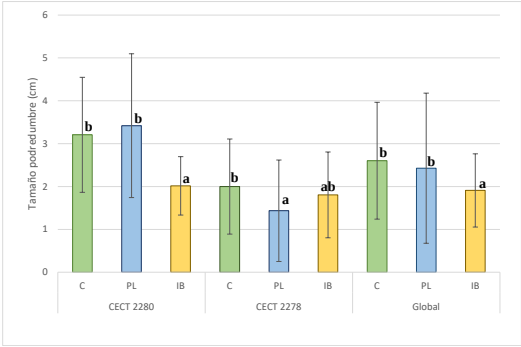


Figura 3: Severidad de las podredumbres (cm) tras los tratamientos con isobutanol (IB) y 2-feniletanol (PL).

Estos resultados demuestran que los compuestos volátiles antifúngicos de origen microbiano pueden ser una alternativa viable para el control de podredumbres en la postcosecha.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto RTI2018-096882-B-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ FEDER "Una manera de hacer Europa" y las Ayudas a la Investigación de la Junta de Extremadura mediante el proyecto GR21180.

REFERENCIAS

[1] Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D., & Wilson, C. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm?. *Postharvest Biol Technol*, **2009**, 52(2), 137-145.

[2] Spadaro, D., & Droby, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci Technol*, **2016**, 47, 39-49.

[3] Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., Galvan, A. I., Córdoba, M. G., Casquete, R., Serradilla, M. J., & Martín, A. Selection and application of antifungal VOCs-producing yeasts as biocontrol agents of grey mould in fruits. *Food Microbiol*, **2020**, 92, 103556.

[4] Galván, A. I., Hernández, A., de Guía Córdoba, M., Martín, A., Serradilla, M. J., López-Corrales, M., & Rodríguez, A. Control of toxigenic *Aspergillus* spp. in dried figs by volatile organic compounds (VOCs) from antagonistic yeasts. *Int J Food Microbiol*, **2022**, 109772.

[5] Cabañas, C. M., Hernández, A., Martínez, A., Tejero, P., Vázquez-Hernández, M., Martín, A., & Ruiz-Moyano, S. Control of *Penicillium glabrum* by indigenous antagonistic yeast from vineyards. *Foods*, **2020**, 9(12), 1864.

EFECTO DEL PROTOCOLO DE APLICACIÓN DE LOS PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEF) EN LA EFICIENCIA DE LA INACTIVACIÓN DE *Sacharomyces cerevisiae*

Sanz, J., Álvarez, I., Raso, J.

Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Tecnología de los Alimentos, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2. Calle de Miguel Servet 177, 50013.

jsanzm@unizar.es

Los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF) es una tecnología de interés para la industria alimentaria debido a su capacidad para inactivar las formas vegetativas de los microorganismos a temperaturas inferiores a las utilizadas en el procesado térmico.

El tratamiento mediante PEF consiste en la aplicación intermitente, en forma de pulsos de muy corta duración (µs), de un voltaje de alta intensidad (kV) entre dos electrodos donde se encuentra el producto a tratar [1, 2]. El voltaje aplicado genera un campo eléctrico que, si es de suficiente intensidad, provoca el fenómeno de electroporación. Como consecuencia, se modifica la permeabilidad selectiva de la membrana citoplasmática de las células microbianas lo que conduce a su inactivación [3].

La eficacia de los tratamientos PEF depende de muchos parámetros de procesado. Los más importantes son la intensidad del campo eléctrico, el tiempo de tratamiento y la energía específica total. Otros factores que también pueden afectar la eficacia son la frecuencia de tratamiento y la anchura de pulso. Recientemente se están desarrollando generadores PEF que permiten aplicar distintos protocolos de pulsos. Es importante optimizar el protocolo de aplicación de los pulsos para poder conseguir la máxima inactivación microbiana con los mínimos requerimientos energéticos.

El objetivo de este estudio fue investigar la influencia del protocolo de aplicación de los pulsos en la eficacia de la inactivación de *Sacharomyces serevisiae* por PEF.

Para ello, se comparó la eficacia de pulsos de onda cuadrada de 1, 2 y 10 µs con un pulso de 10 µs dividido a su vez en 5 pulsos de 2 µs o en 10 pulsos de 1 µs (figura 1). Para ello se utilizaron tratamientos PEF aplicados a dos intensidades de campo eléctrico (15 y 20 kV/cm) a tiempos de tratamiento de 50, 100, 150 y 250 µs.

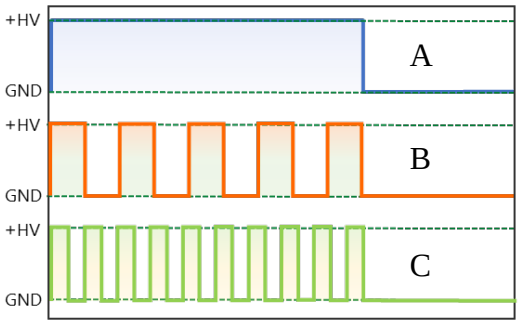


Figura 1: Comparación de un pulso de 10 µs (A) con un pulso de 10 µs dividido en 5 pulsos de 2 µs (B) y en 10 pulsos de 1 µs (C).

La figura 2 muestra la inactivación obtenida con pulsos de onda cuadrada de 1, 2 y 10 µs (2A) con un pulso de 10 µs y un pulso de esta duración dividido a su vez en 5 pulsos de 2 µs o en 10 pulsos de 1 µs (2B) a una intensidad de campo eléctrico de 15 kV/cm y diferentes tiempos totales de tratamiento. La figura 2 muestra un incremento importante de la inactivación al incrementar el tiempo de tratamiento de 50 a 100 µs. A pesar de aplicar el mismo tiempo de tratamiento y la misma energía específica los tratamientos aplicados con pulsos de 1 µs fueron menos eficaces que los aplicados a 2 y 10 µs. Un comportamiento similar se observó cuando

el pulso de 10 µs se dividió en pulsos de 1 y 2 µs. En los tratamientos con una energía específica total de 40,5 kJ/kg o menos los tratamientos en los que se dividió el pulso de 10 µs en pulsos de 1 µs fueron menos eficaces.

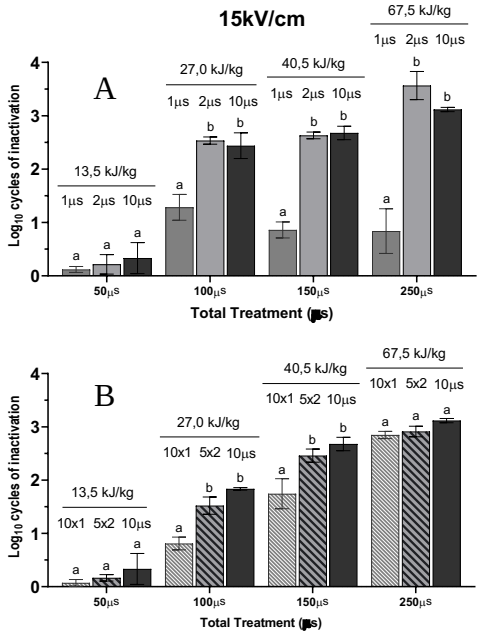


Figura 2: Inactivación en *Sacharomyces cerevisiae* a 15 kV/cm mediante la aplicación de pulsos de 1, 2 y 10 µs (3A) o con un pulso de 10 µs dividido a su vez en 5 pulsos de 2 µs o en 10 pulsos de 1 µs (3B).

Un comportamiento similar se observó cuando los mismos tratamientos se aplicaron a 20 kV/cm (Figura 3A y 3B) para aquellos tratamientos con una energía específica inferior a 50 kJ/kg. Los tratamientos aplicados con pulsos de 1 µs (3A) o con pulsos de 10 µs divididos en pulsos de 1 µs (3B) fueron menos eficaces.
En resumen, los tratamientos con un pulso de 10 µs dividido a su vez en 5 pulsos de 2 µs o en 10 pulsos de 1 µs no fueron más eficaces que los tratamientos en los que el pulso no se dividió. Por otro lado, en aquellos tratamientos con un nivel energético inferior a 50 kJ/kg los pulsos de una anchura de 1 µs fueron menos eficaces que los aplicados a anchuras superiores.

Estos resultados parecen indicar que pulsos más estrechos (1 µs) requieren un umbral energético para poder incrementar el potencial transmembrana de las células de *S. cerevisiae* y que se manifieste la electroporación. En conclusión, para la inactivación de *S. cerevisiae* se recomienda la aplicación de pulsos de una duración superior a 1 µs sin necesidad de aplicar pulsos de una determinada duración divididos a su vez en pulsos de una duración menor.

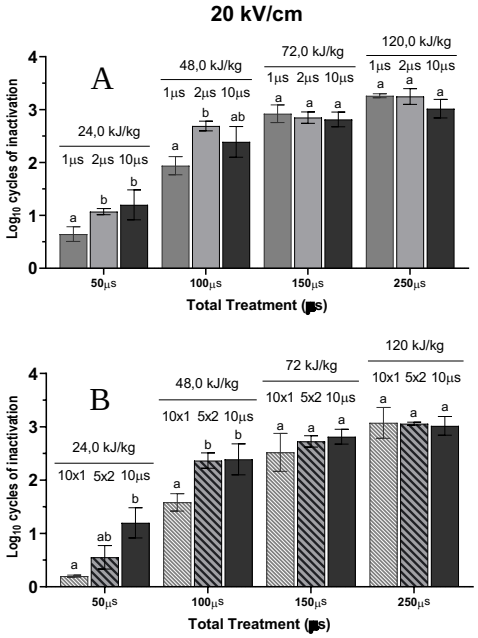


Figura 3: Inactivación en *Sacharomyces cerevisiae* a 20 kV/cm mediante la aplicación de pulsos de 1, 2 y 10 µs (3A) o con un pulso de 10 µs dividido a su vez en 5 pulsos de 2 µs o en 10 pulsos de 1 µs (3B).

AGRADECIMIENTOS

Financiado por el proyecto PEFRev (PID2020-113620RB-I00) de la Agencia Española de Investigación.

REFERENCIAS

[1] G. V. Barbosa-Cánovas., y Q. H. Zhang., *"Pulsed electric fields in food processing: fundamental aspects and application",* CRC Press, 2001.

[2] J. Raso., y I. Álvarez., *"Pulsed electric fields processing: Cold Pasteurization. Reference Module in Food Science".* DOI:10.1016/b978-0-08-100596-5.03103-6, 2016,

[3] T. Kotnik., P. Kramar., G. Pucichar., D. Miklavcic., y M. Tarek., *"Cell membrane electroporation part-1: the phenomennon. IEEE electrical insulation magacine", 2012, 28(5), 14-23.*

TERMORRESISTENCIA Y CINÉTICA DE GERMINACIÓN DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* 168 OBTENIDOS EN MEDIOS CON ACTIVIDAD DE AGUA REDUCIDA

Freire V., Condón S., Gayán E.

Universidad de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2) /Facultad de Veterinaria/Depto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. C/Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza. elisago@unizar.es

Los esporos bacterianos provocan alteraciones de los alimentos y toxiinfecciones alimentarias debido a su gran resistencia a los procesos de conservación [1]. No todos los esporos, ni tan siquiera de la misma suspensión, germinan de manera sincronizada ni frente a los mismos estímulos, lo que dificulta el uso de estrategias basadas en eliminar los esporos germinados, más sensibles, aplicando tratamientos de menor intensidad [2].

Por el momento, existen pocos datos sobre el efecto de otras condiciones de esporulación, además de la temperatura, en la termorresistencia y su efecto en la cinética de germinación [3].

En este trabajo, se estudió el comportamiento de esporos de *Bacillus subtilis* 168 obtenidos en medios con actividad de agua reducida (aW= 0.98) con dos solutos, cloruro sódico y glicerol, en comparación con los obtenidos en condiciones óptimas (controles).

Todas las suspensiones presentaron hombros en las termorresistencias a 105°C, siendo éste mucho mayor en los esporos obtenidos a baja Aw con ambos solutos (Fig. 1). De hecho, los esporos obtenidos con glicerol resultaron ser los que presentaban un mayor valor Z (9,4°C frente a 7,6°C en los controles). El contenido en ácido dipicolínico (DPA) de los esporos obtenidos en glicerol (1,3 pg/esporo) y cloruro sódico (1,0 pg/esporo) fue mayor que en los controles (0,8 pg/esporo), lo que podría explicar, al menos en parte, la mayor resistencia al calor de las suspensiones obtenidas a baja Aw [4].

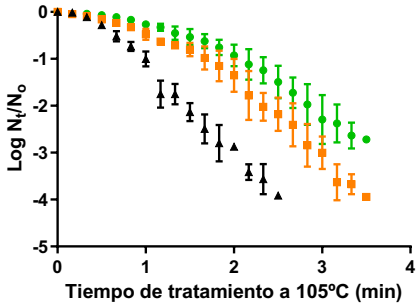


Figura 1: Gráfica de supervivencia a 105ºC en tampón McIvlaine de pH 7.0 de las suspensiones control (▲, negro) y obtenidas a Aw reducida en presencia de glicerol (■, naranja) o cloruro sódico (●, verde). Se muestra la tendencia promedio de tres réplicas biológicas.

La cinética de germinación se estudió mediante la monitorización del descenso de la densidad óptica (DO, 600 nm) y/o la liberación de DPA por fluorometría con TbCl. El porcentaje de esporos germinados al final de cada ensayo fue confirmado por recuento microscópico.

La germinación inducida por L-valina, L-alanina y AGFK (L-Asparagina, D-glucosa, D-fructosa y potasio) resultó ser deficiente en todos los esporos obtenidos a baja Aw en comparación con los obtenidos en condiciones óptimas (Fig. 2). Por el contrario, en caldo nutritivo enriquecido con extracto de levadura, los esporulados en presencia de cloruro sódico presentaron una mayor velocidad de germinación que los controles (Fig. 2).

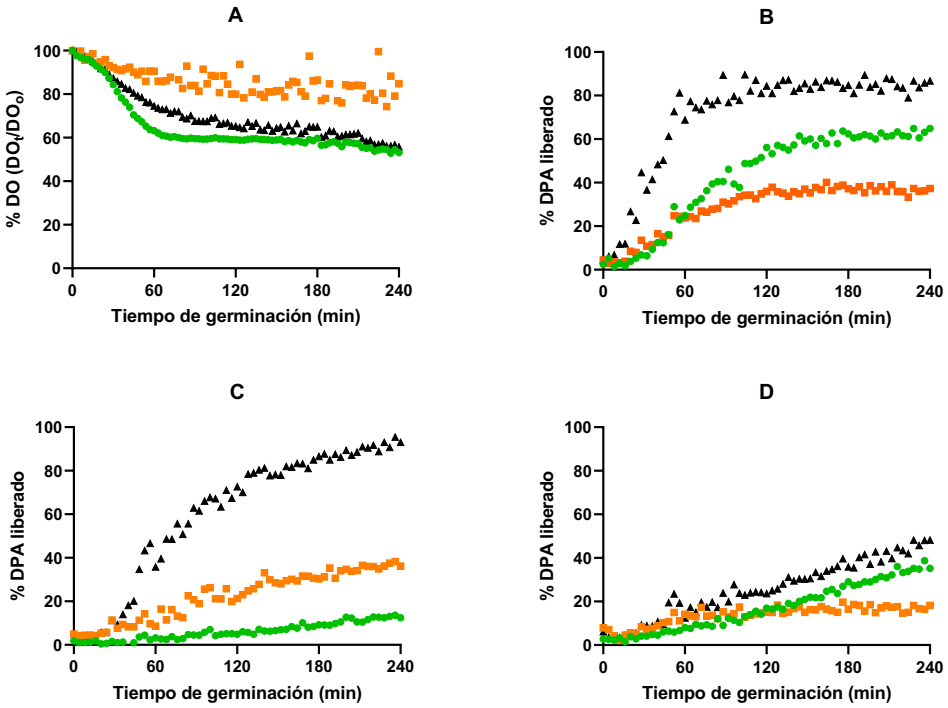


Figura 2: Cinéticas de germinación a 37°C de las suspensiones de esporos obtenidas en condiciones óptimas (▲, negro) y a Aw reducida en presencia de glicerol (■, naranja) o cloruro sódico (●, verde) frente a distintos nutrientes: A) Caldo nutritivo suplementado con extracto de levadura, B) L-alanina, C) L-Valina y D) AGFK. Se muestra la tendencia promedio de tres réplicas biológicas.

La germinación inducida por dipicolinato cálcico (Ca-DPA) fue inferior en los esporos obtenidos a baja Aw (Fig. 3), lo que podría indicar diferencias estructurales en el córtex o deficiencias en los enzimas líticos del córtex [5].

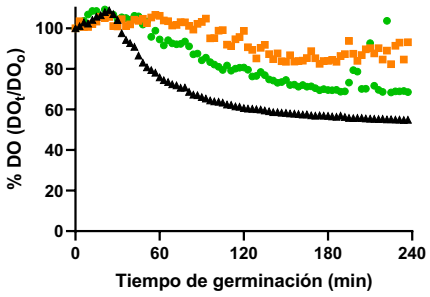


Figura 3: Cinéticas de germinación inducida con Ca-DPA a 30°C de las suspensiones de esporos obtenidas en condiciones óptimas (▲, negro) y a Aw reducida en presencia de glicerol (■, naranja) o cloruro sódico (●, verde). Se muestra la tendencia promedio de tres réplicas biológicas.

Estos resultados muestran la relevancia de la Aw durante la esporulación en la resistencia de los esporos y en la heterogeneidad de germinación, factores que condicionan el diseño de estrategias orientadas al control de esporos en la industria alimentaria.

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] P. Setlow, J. T. Liu y J. R. Faeder," Bacterial Spores: Current Research and Applications" *Current Research and Applications,* (ed. E. Abel-Santos (Norwich: Horizon Scientific Press)., 2012)

[2] Y. Zhang y A. Mathys, *Frontiers in microbiology,* **2018**, *9*, pp. 3163

[3] H. N.T.Minh, A. Durand, P. Loison, J. Perrier-Cornet, y P. Gervais, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2011**, *90(4)*, pp. 1409-1417

[4] M. Paidhungat, B. Setlow, A. Driks, and P. Setlow, *J. Bacteriol.*, **2000**, *182*, pp. 5505–5512.

[5] M. Paidhungat, K. Ragkousiy y P. Setlow *J. Bacteriol.*, **2001**, *183(16)*, pp. 4886-4893

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A FAGOS Y ENDOLISINAS DE DISTINTAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

Jurado A.[1,2], Fernández L.[1,2], Rodríguez A.[1,2], García P.[1,2]

1 Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares, 33300, Villaviciosa, España

2 Grupo DairySafe. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, España.

pgarcia@ipla.csic.es

La rápida adquisición de resistencia a los antibióticos en los miembros del género *Staphylococcus*, especialmente la especie *Staphylococcus aureus*, se ha convertido en un problema notable en la clínica y en la industria alimentaria. A pesar de ser un comensal del ser humano y de otros animales, *S. aureus* es también un importante patógeno oportunista, causante de infecciones del torrente sanguíneo y de los tejidos blandos, de neumonía asociada a la ventilación mecánica y de intoxicaciones alimentarias, entre otras afecciones (1).

Los bacteriófagos y las endolisinas, proteínas sintetizadas por los mismos para hidrolizar el peptidoglicano bacteriano y permitir la liberación de la progenie viral, son una opción novedosa para combatir la contaminación por este patógeno en el ámbito alimentario (2). Sin embargo, el éxito de su aplicación dependerá de la susceptibilidad de las distintas cepas a estos antimicrobianos. Así, es necesario encontrar fagos y endolisinas que tengan un amplio espectro de acción dentro de esta especie bacteriana.

En este trabajo, se realizó un estudio comparativo a nivel fenotípico y genotípico de 17 cepas de *S. aureus* con distintos orígenes: clínico (SH1000, MW2, 132, RN4220, Newman), leche de vacas con mastitis (V329, Sa9, Sa5, Sa7, IPLA19), industria láctea (IPLA1, IPLA3, IPLA5) e industria cárnica (IPLA11, IPLA13, IPLA15, IPL16).

Por un lado se observó que si bien todas las cepas formaban **biofilms**, solo 3 de ellas (SH1000, 132 y V329) eran buenas formadora (Figura 1).

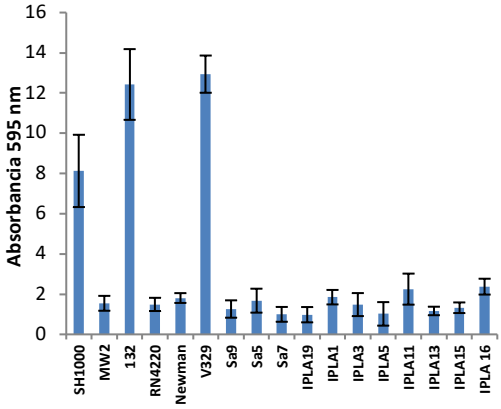


Figura 1: Formación de biofilms determinada por tinción con cristal violeta y posterior medida de la absorbancia a 595 nm.

También se observó que todas las cepas menos una (132) producían algún tipo de **hemolisina** en agar sangre. En cuanto a la producción de **estafiloxantina**, solo había dos cepas que no producían nada de pigmento: la RN4220 que no tiene un SigB activo y la V329 en la que se comprobó posteriormente que portaba una mutación en el gen *crtN*, el primero en la ruta de biosíntesis del pigmento. Por otro lado, la cepa Sa9 solo producía un pigmento amarillo claro debido a una mutación en el gen *crtP*.

Otro de los fenotipos estudiados fue la capacidad de **deslizamiento** sobre agar debido a la producción de surfactantes. En este caso, no se encontraron grandes

diferencias entre cepas, si bien los valores más altos se observaron en los aislados de origen cárnico y de leche de vacas con mastitis.

En relación a la **susceptibilidad** de las distintas cepas al **fago virulento phiIPLA-RODI**, se observó que todas eran lisadas por el stock concentrado del fago, pero que el grado de susceptibilidad de las mismas variaba mucho de unos aislados a otros. Por ejemplo, mientras que algunas cepas mostraban concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) en el rango de 10^3-10^5 PFU/ml, otras necesitaban un título de 10^7 o 10^8 PFU/ml para ser completamente inhibidas por el fago (Tabla 1). En paralelo, se comparó la sensibilidad al fago de las distintas cepas en función de la eficiencia de plaqueo (EOP). En este caso, también se observaron diferencias entre los aislados y, en concreto, hubo cuatro cepas para las que la eficiencia de plaqueo fue 0, indicando que el fago era muy poco eficiente para propagarse en las mismas y dar lugar a una placa de lisis. (Tabla 1).

Cepa	MIC RODI	EOPs	MIC LysRODI
SH1000	8,50E+03	0,63	1
MW2	8,50E+08	0,27	1
132	8,50E+08	0,00	1
RN4220	8,50E+08	0,11	2
Newman	8,50E+07	0,37	2
V329	8,50E+08	0,33	2
Sa9	8,50E+04	0,76	1
Sa5	8,50E+03	1,16	>2
Sa7	8,50E+05	0,30	2
IPLA19	8,50E+02	0,42	1
IPLA1	8,50E+03	0,72	2
IPLA3	8,50E+08	0,00	2
IPLA5	8,50E+07	0,00	2
IPLA11	8,50E+08	0,00	>2
IPLA13	8,50E+04	0,48	1
IPLA15	8,50E+08	0,24	2
IPLA16	8,50E+03	1,00	2

Tabla1: Susceptibilidad de las distintas cepas al fago phiIPLA-RODI y la endolisina LysRODI. *EOPs: Resultado de los cocientes usando IPLA16 como referencia.

La última característica fenotípica estudiada fue la **susceptibilidad a la endolisina** derivada del fago anterior, denominada **LysRODI**. Los resultados mostraron que la endolisina lisaba todas las cepas ensayadas, si bien se observaron ligeras diferencias en su susceptibilidad a la misma (Tabla 1).

En relación al análisis genotípico, de las 12 cepas procedentes del sector alimentario, el 50% no codificaba ningún gen de enterotoxinas, el 16% tenía uno y el resto tenía más de uno. Asimismo, el 41% de estas cepas codificaba algún gen de resistencia a antibióticos (Sa7, IPLA3, IPLA5, IPLA11, IPLA15, 132, MW2).

En conclusión, nuestros datos muestran que cepas procedentes de distintos ambientes y con características fenotípicas diversas son susceptibles al fago phiIPLA-RODI y a la endolisina derivada del mismo. Por ello, se propone seguir estudiando su potencial como agentes bioconservantes y/o como agentes para la descontaminación en el sector alimentario.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al Dr. A. Toledo-Arana (Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-Universidad Pública de Navarra, España) por proporcionarnos las cepas V329, 132 and Newman; J.R. Penadés por la cepa RN4220, MW2, SH1000.

Este Trabajo fue financiado por el proyecto Marie Sklodowska-Curie No. 813439 (Horizonte 2020, UE), así como el proyecto IDI/2018/000119 (Programa de Ciencia, Tecnología e Innovación 2018-2020 y FEDER EU, Principado de Asturias, España). A.J. recibió una ayuda JAE-Intro (CSIC, España).

REFERENCIAS

1. Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nature reviews. Disease primers, 4, 18033.
2. Cha, Y., Son, B., & Ryu, S. (2019). Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13. *Food microbiolog y*, *84*, 103245.

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR DE UNA COLONIA SEMBRADA EN SUPERFICIE Y SU RELACIÓN CON LA EFICACIA DE TRATAMIENTOS CON LUZ UV-C SOBRE LA SUPERFICIE DE ALIMENTOS SÓLIDOS

Ospina-Corral, S., Ariño, L., Alejandre, M., Arqued, A., Álvarez, I., Cebrián, G.

Universidad de Zaragoza, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Tecnología de los Alimentos, Instituto Agroalimentario de Aragón IA2, C/ Miguel Servet 177, CP 50013

seospinaco@unizar.es

Introducción.

El uso de luz UV-C para inactivar microorganismos en alimentos sólidos ha sido estudiado intensamente en los últimos años. La luz UV-C se utiliza para la descontaminación de superficies, y su eficacia depende en gran medida de la topografía de la superficie y la concentración celular sobre esta. Estudios previos han demostrado que la carga microbiana influye en gran medida en la eficacia letal del tratamiento. Algo similar ocurre con la forma en la que se distribuyen espacialmente los microorganismos, ya que se pueden generar fenómenos de sobra en el que las células más expuestas, incluso muertas, protegerían a las que se encontraran debajo de ellas.

El objetivo de este estudio fue desarrollar una metodología que permita determinar la concentración celular en superficies sólidas de alimentos (en este estudio, agar como matriz modelo), para establecer la concentración celular hasta la cual los tratamientos UV-C son letalmente efectivos.

Metodología.

Placas de Petri con agar TSA fueron sembradas con *Listeria monocytogenes* FDA LS806 GFP en concentraciones de 10^3 células/placa. Las placas fueron incubadas a 10°C con el fin de obtener un crecimiento lento de las colonias. Fotografías de cada placa fueron tomadas cada día durante 8 días de seguimiento utilizando una cámara fija con una resolución de 5MP, a razón de 0,048mm por píxel. El tamaño y el número de colonias se analizaron utilizando un software de análisis de imagen desarrollado por el grupo de investigación utilizando Matlab®. Se seleccionaron aleatoriamente colonias con distintos tamaños, que fueron extraídas del agar y el número de células presente fue determinado mediante recuento en placa y qPCR con y sin ruptura previa mediante el uso de bead-beater de la muestra de la colonia con agar. En paralelo, estas placas se sometieron a tratamientos con luz UV-C (0,2 a 2 J/cm^2) tras distintos días de incubación, determinándose su eficacia letal y la evolución del tamaño de las colonias con el tiempo después de ser sometidas a estos tratamientos.

Resultados y discusión. La Figura 1 presenta los resultados obtenidos del análisis del número de células por colonia según el tamaño de la colonia. Se puede observar que los recuentos determinados mediante qPCR presentan unos valores mayores que los recuentos en placa. Adicionalmente, se observa un recuento aun mayor cuando se rompe el agar por medio de bead beater, debido probablemente a una disgregación más eficiente de la colonia. Si bien la qPCR no permite distinguir entre células vivas y muertas, esta metodología qPCR tras ruptura con bead-beater resultó la más adecuada para los fines de este estudio y, por ello, fue la utilizada para cuantificar el número de células por colonia. Es notable que entre 10 y 25px de tamaño, el cambio en la cantidad de células por colonia tiene un comportamiento lineal, el cual permite la

interpolación de recuentos contra tamaño de colonia dentro de este rango.

En la Figura 2 se puede apreciar la evolución del tamaño de las colonias a medida que pasa el tiempo en placas de Petri incubadas a 10°C sometidas o no a tratamientos de luz UV-C en diferentes momentos (día 3 y día 5).

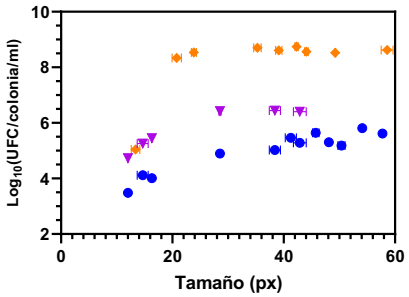


Figura 1: Población microbiana según distintas técnicas de recuento: ● Recuento en placa, ▼qPCR y ◆ qPCR con ruptura mediante bead-beater.

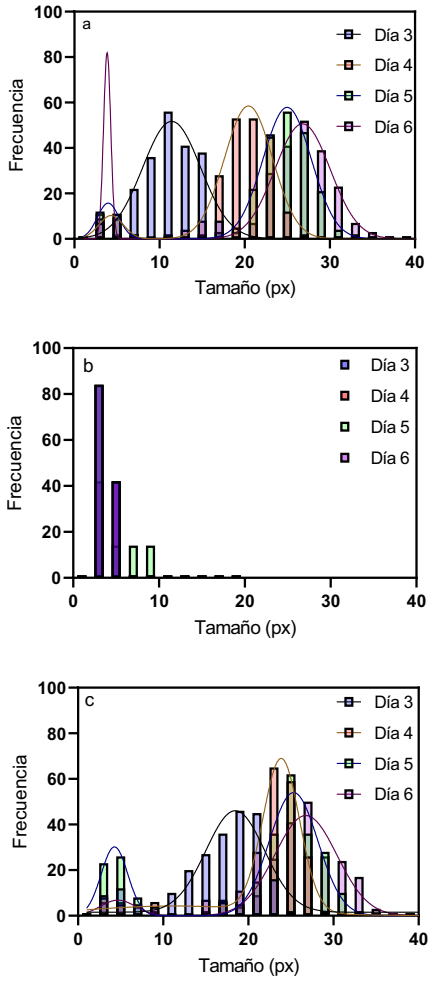


Figura 2: Número de células de distintos tamaños en placas de agar TSA tras 6 días de seguimiento en a) Sin aplicar tratamiento de luz UV-C, b) Aplicando el tratamiento en el día 3 de seguimiento y c) Aplicando el tratamiento en el día 5 de seguimiento.

Se puede apreciar que, mientras en las placas donde no se aplicaron tratamientos UV-C la evolución del tamaño fue progresiva, en la placa donde se aplicó el tratamiento en el día 3 (Figura 2b) cuando las colonias aún no superaban los 10px de tamaño, el cambio tanto en tamaño como en el número de colonias conforme aumentaba el tiempo de incubación fue mínimo. Sin embargo, cuando el tratamiento fue aplicado en una placa en el día 5 con colonias más grandes (Figura 2c), se puede apreciar la formación de dos poblaciones, una de colonias con un tamaño superior a 15px que continúa creciendo, y una con colonias pequeñas que parecen no evolucionar.

Los resultados obtenidos permitieron establecer una relación entre la resistencia a la luz UV-C y el tamaño de la colonia, determinándose que, en colonias por encima de 0,48 - 0,72 mm (10-15px) de diámetro de colonia, los tratamientos de UV-C dejaban de ser eficaces. Eso correspondería al momento/tamaño en que las colonias superaran las 10^4 células/colonia. Sin embargo, son necesarios más estudios para establecer de forma certera el límite de células por colonia en el que los tratamientos por UV-C dejan de ser eficaces y cómo estos se pueden contrastar con los alimentos sólidos, en los que la carga microbiana inicial y su forma de distribuirse en la superficie podrían influenciar la letalidad del tratamiento.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto ha recibido financiación del programa H2020 research and innovation programme bajo la beca Marie Sklodowska-Curie No. 801586

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ANÁLOGOS DE PROCIANIDINAS DE ORIGEN VEGETAL FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS ALIMENTARIOS RESISTENTES A BIOCIDAS Y ANTIBIÓTICOS

Cruz Sáez D.[1], Cobo Molinos A.[1], Glibota N.[1], Alejo Armijo A[2]., Altarejos Caballero J.[2], Salido Ruiz S.[2], Ortega Morente E[1].

1 Universidad de Jaén/Facultad de Ciencias Experimentales/Departamento de Ciencias de la salud/ Área de Microbiología. Campus las lagunillas s/n, CP23071 Jaén
2 Universidad de Jaén/Facultad de Ciencias Experimentales/Departamento de Química Inorgánica y Orgánica/ Área de Química Orgánica. Campus las lagunillas s/n, CP23071 Jaén
eortega@ujaen.es

A partir de compuestos aislados de madera de poda de laurel, hemos obtenido diversos análogos de proantocianidinas tipo A, con interés biológico por su actividad antimicrobiana y que pueden ser usados frente a microrganismos patógenos transmitidos por alimentos. Las dos series de compuestos analizados (derivados con un grupo nitro ($-NO_2$) en posición C-6 y los equivalentes halogenados) se han diseñado teniendo en cuenta nuestra experiencia previa en el campo de los productos naturales y sus derivados, con actividad antimicrobiana y antioxidante. Intentaremos profundizar con ambas series en la relación estructura-actividad de análogos de proantocianidinas tipo A que ya han demostrado actividad como antimicrobianos en el ámbito alimentario [1].

Para ello, se estudió dicho efecto sobre una colección de 12 cepas bacterianas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Dichas cepas seleccionadas para el estudio (Tabla 1), fueron previamente aisladas en el laboratorio de nuestro grupo de investigación AGR230 (Microbiología de los Alimentos y del Medio Ambiente), a partir de alimentos ecológicos, siendo identificadas y caracterizadas como resistentes a biocidas y antibióticos [2].

Tras el ensayo de las 12 cepas seleccionadas frente al compuesto UJAEN107 y 11 análogos del mismo (UJAEN112, UJAEN113, UJAEN114, UJAEN115, UJAEN116, UJAEN120, UJAEN 121, UJAEN122, UJAEN123, UJAEN124 Y UJAEN125), se observó que el compuesto UJAEN107 presenta actividad bactericida frente a 10 de las 12 cepas ensayadas (todas ellas Gram-positivas) a una concentración de 1mg/mL, en base a la formación de halos de inhibición de crecimiento en medio sólido, sobre las bacterias indicadoras seleccionadas, mostrando diámetros de halos de inhibición en la mayoría de los casos iguales o superiores a 10 mm.

También se observó actividad antimicrobiana del resto de análogos a la concentración máxima ensayada (1 mg/mL) pero sólo frente a 3 ó 4 cepas, en función del compuesto analizado, destacando el análogo UJAEN123, que sí presentó una alta actividad bactericida, muy similar a la del compuesto UJAEN107, con formación de halos de hasta 18 mm frente a la cepa *Bacillus cereus* UJA27q a la máxima concentración ensayada (1 mg/mL) (Figura 1).

En base a estos resultados se calculó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) para los análogos que produjeron inhibición en el ensayo previo en placa. Los valores de

MICs se determinaron mediante el método de microdilución en placas de microtitulación de 96 pocillos (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) según lo recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute [2].

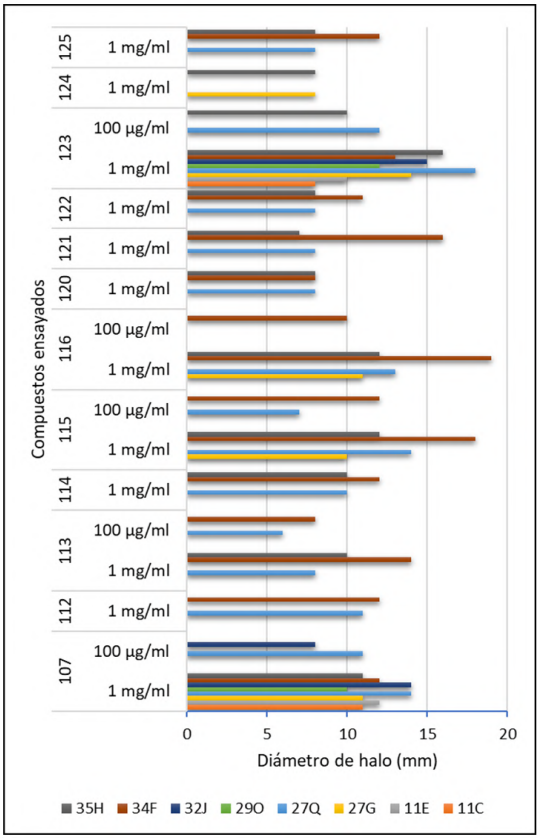


Figura 1. Halos de inhibición producidos frente a las distintas cepas ensayadas.

Tras realizar el ensayo, lo más destacado que se observó fue que el análogo UJAEN123 presentaba una MIC de 50 para la mayoría de las cepas ensayadas, destacando la MIC más baja de este compuesto (10 µg/mL) que fue obtenida frente a la cepa *Staphylococcus saprophyticus* UJA27g y las MIC más altas (1 mg/mL) para las cepas *Pantoea agglomerans* UJA29o, *Salmonella* sp. UJA40k y *Salmonella* sp. UJA40l (Tabla 1).

En conclusión, se deduce que el compuesto UJAEN123 puede constituir la base de estudio para posteriores ensayos que profundicen en la posible aplicación de dicho compuesto o bien sus análogos estructurales como conservantes naturales o bien como potenciadores de la acción de biocidas en el ámbito alimentario.

Cepas ensayadas	MIC
Pantoea agglomerans UJA7m	50 µg/mL
Enterococcus faecium UJA11c	50 µg/mL
Enterococcus casseliflavus UJA11e	50 µg/mL
Staphylococcus saprophyticus UJA27g	10 µg/mL
Bacillus cereus UJA27q	50 µg/mL
Pantoea agglomerans UJA29o	1 mg/mL
Klebsiella terrigena UJA32j	100 µg/mL
Staphylococcus aureus UJA34f	50 µg/mL
Lactobacillus casei UJA35h	50 µg/mL
Enterobacter sp. UJA37p	50 µg/mL
Salmonella sp. UJA40k	1 mg/mL
Salmonella sp. UJA40l	1 mg/mL

Tabla1. MICs del compuesto UJAEN123 frente a las distintas cepas ensayadas procedentes de alimentos ecológicos.

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por el Programa Operativo FEDER Andalucía 2014-2020, convocatoria 2020 de ayudas a proyectos de i+D+i (referencia 1380669).

REFERENCIAS

[1] A., Alejo-Armijo, N., Glibota, M.P., Frías, J., Altarejos, A., Gálvez, E., Ortega-Morente, and S., Salido. *Int J Food Sci Technol*. **2017**. *52*, 679-686.

[2] A., Alejo-Armijo, N., Glibota, M.P., Frías, J., Altarejos, A., Gálvez, S., Salido, E., Ortega-Morente. J Agric Food Chem. **2018**. *66*(9), 2151–2158

RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES CON PISCICOLINA 126 PARA MEJORAR LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y REDUCIR LA PRODUCCIÓN DE HISTAMINA EN SALMÓN MARINADO

Elías González-Gragera[1], Mª Luisa García-Marín[1], Lydia Viedma[1], Ana Falcon-Piñeiro[2], J. David García-López[2], Manuel Martínez-Bueno[1] & Alberto Baños[2]

1 Universidad de Granada. Dpto. Microbiología. Av. de Fuente Nueva, s/n, 18071 Granada.
2 DMC Research. Camino de Jayena, 82, 18620 Alhendín, Granada.
abarjona@dmcrc.com

En los últimos años se ha experimentado un incremento del consumo de productos de la pesca mínimamente procesados como el sushi, sashimi o pescado marinado. Esta mayor demanda obliga a la industria alimentaria a desarrollar soluciones de conservación que contribuyan a extender la vida útil de estos alimentos de una forma natural garantizando su seguridad. Entre los riesgos que más preocupan a los productores de estos alimentos se encuentra la presencia de aminas biógenas que a altas concentraciones y en personas sensibles pueden desarrollar efectos adversos como la escombroidosis o intoxicación por histamina [1].

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia de un recubrimiento comestible en base a quitosano que incorpora piscicolina 126 (50 µg/mL) de *Carnobacterium maltaromaticum* DMC-22 en el control de histamina en salmón marinado. Las piscicolina 126 es un péptido antimicrobiano de clase IIa descrito por su actividad frente a patógenos como *Listeria monocytogenes* [2]. Para ello, se realizaron *challenge tests* inoculando superficialmente en la superficie de filetes de salmón marinado (3x3 cm^2) las cepas productoras de histamina *Photobacterium angustum* DSM 19184 y *Companilactobacillus alimentarius* DMC-04 (concentración inicial de 10^4 UFC/cm^2). Tras ello, el recubrimiento con y sin bacteriocina, fue aplicado mediante inmersión (30 segundos). A continuación, el salmón fue envasado al vacío y conservado a 4 ºC durante 35 días. A diferentes tiempos de muestreo se evaluó el impacto de los tratamientos sobre la calidad microbiológica y se determinó la concentración de histamina mediante HPLC-MS.

Se observó una mejora significativa de la calidad microbiológica y una reducción de los niveles de histamina en los lotes tratados con el recubrimiento contenido de piscicolina. Estos resultados demuestran que la aplicación de recubrimientos que incorporen péptidos antimicrobianos de bacterias ácido lácticas como la piscicolina 126 contribuyen a mejorar la calidad microbiológica y a reducir el riesgo de producción de histamina en pescado marinado.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto BIOPROMEDFOOD. *Bio-protective cultures and bioactive extracts as sustainable combined strategies to improve the shelf-life of perishable Mediterranean food*. Co-financiado por CDTI y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Convocatoria PRIMA.

REFERENCIAS

[1] Hungerford JM. Histamine and Scombrotoxins. Toxicon. 2021 Oct 15;201:115-126. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.08.013. Epub 2021 Aug 20. PMID: 34419509.

[2] Ingham A, Ford M, Moore RJ, Tizard M. The bacteriocin piscicolin 126 retains antilisterial activity in vivo. J Antimicrob Chemother. 2003 Jun;51(6):1365-71. doi: 10.1093/jac/dkg229. Epub 2003 Apr 25. PMID: 12716771.

Influencia del factor σ^B en la resistencia a los pulsos eléctricos de alto voltaje dependiente de la fase y temperatura de crecimiento en *Staphylococcus aureus*

Nadal L., Mañas P., Cebrián G.
Universidad de Zaragoza/Facultad de Veterinaria/Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Tecnología de Alimentos. C/Miguel Servet, 177, 50013.
lnadal@unizar.es

Factores fisiológicos como la fase y temperatura de crecimiento de las bacterias pueden influir en su resistencia a los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) [1,2]. Por otro lado, se ha demostrado ampliamente que el factor sigma alternativo σ^B se encuentra involucrado en la respuesta frente a diversos estreses relevantes en la industria alimentaria, aunque su papel es aún en parte desconocido [3,4].

El objetivo de este trabajo fue determinar si el factor sigma alternativo σ^B determina la resistencia a los PEAV dependiente de la fase y temperatura de crecimiento en *Staphylococcus aureus*.

Para alcanzar el objetivo propuesto, se estudió la actividad σ^B, mediante RT-qPCR, de células de *S. aureus* Newman en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, crecidas a distintas temperaturas (20-42°C), y la resistencia a los PEAV (25 kV/cm) de esta cepa y de su mutante isogénica carente de *sigB*.

En los resultados obtenidos se observó que las células en fase exponencial presentaron una actividad σ^B (relacionada inversamente con el valor Ct) similar entre 20 y 37°C, descendiendo esta cuando eran crecidas a 42°C (Figura 1). Resultados similares se obtuvieron para las células en fase estacionaria, aunque en este caso las crecidas a 20°C mostraron una actividad ligeramente mayor que las crecidas a 30 y 37°C (Figura 2). Además, se demostró que, como cabía esperar, la entrada en fase estacionaria de crecimiento resultó en un aumento de actividad σ^B para las células crecidas a todas las temperaturas (Figura 3).

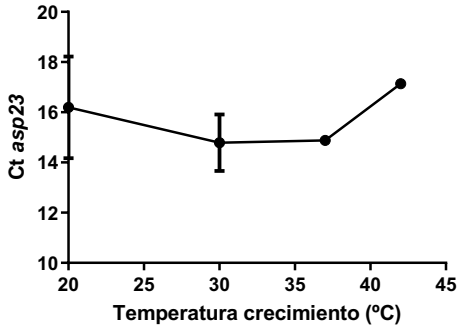


Figura 1: Evolución del parámetro Ct de *asp23*, normalizado utilizando *gmk* como referencia, en función de la temperatura de crecimiento (20-42°C), en células en fase exponencial de *S. aureus* Newman.

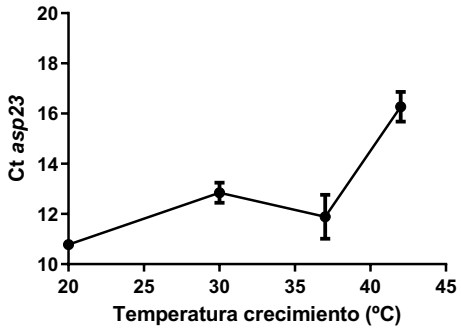


Figura 2: Evolución del parámetro Ct de *asp23*, normalizado utilizando *gmk* como referencia, en función de la temperatura de crecimiento (20-42 °C), en células en fase estacionaria de *S. aureus* Newman.

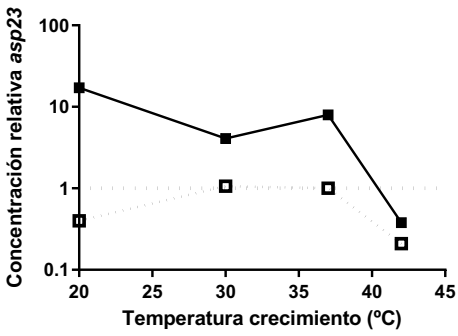


Figura 3: Evolución de la concentración relativa de *asp23* en función de la temperatura de crecimiento (20-42°C), comparando células en fase exponencial de *S. aureus* Newman (cuadrados vacíos) con células en fase estacionaria (cuadrados rellenos) y tomando como referencia (valor 1), las células en fase exponencial crecidas a 37°C.

En las determinaciones de resistencia a los PEAV de las células en fase exponencial, y para todas las temperaturas de crecimiento, no se apreciaron diferencias significativas en resistencia entre la cepa parental y su mutante isogénico Δ*sigB* (Figura 4).

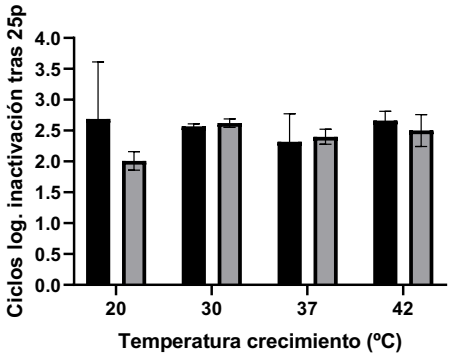


Figura 4: Ciclos logarítmicos de inactivación tras la aplicación de 25 pulsos (25 kV/cm) en células de *S. aureus* Newman (barras negras) y *S. aureus* Newman mutante *sigB* (barras grises), en fase exponencial y crecidas a diferentes temperaturas (20-42°C).

En las células en fase estacionaria, se demostró que la cepa parental era más resistente en todos los casos, pero no se observó en dicha cepa una influencia significativa de la temperatura de crecimiento en la resistencia (al contrario que en la mutante y a lo descrito previamente para otras cepas de *S. aureus*) (Figura 5).

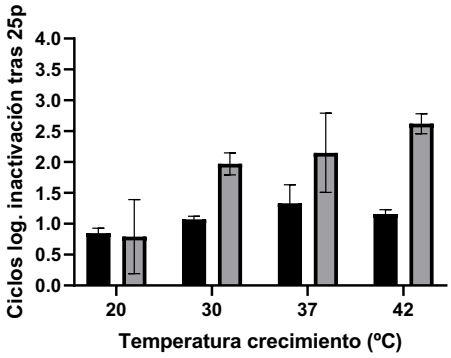


Figura 5: Ciclos logarítmicos de inactivación tras la aplicación de 25 pulsos (25 kV/cm) en células de *S. aureus* Newman (barras negras) y *S. aureus* Newman mutante *sigB* (barras grises), en fase estacionaria y crecidas a diferentes temperaturas (20-42°C).

Estos resultados confirman que σ^B influye en la resistencia a los PEAV de *S. aureus*, pero claramente sugieren que no sería el único mecanismo de resistencia implicado en la supervivencia de este microorganismo a dichos tratamientos. Serán necesarios nuevos estudios para esclarecer el porqué del diferente comportamiento de esta cepa frente a otras en cuanto a la influencia de la temperatura de crecimiento en la resistencia a los PEAV.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Formación Profesional (FPU18/04898).

REFERENCIAS

[1] G. Cebrián, N. Sagarzazu, R. Pagán, S. Condón, P. Mañas, *Int. J. Food Microbiol.*, **2007**, *118*, 304-311.

[2] G. Cebrián, S. Condón, P. Mañas, *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, **2016**, *37*, 161-169.

[3] M. Hecker, J. Pané-Farré, U. Volker, *Annu. Rev. Microbiol.*, **2007**, *61*, 215-236.

[4] C. O'Byrne, K.A. Karatzas, *Adv. Appl. Microbiol.*, **2008**, *65*, 115-140.

DESARROLLO DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES BIOPROTECTORES PARA MEJORAR LA SEGURIDAD ALIMENTARIA DE AGUACATE Y MELÓN IV GAMA.

J. David García-López[1], Aroa Morales-Muñoz[1], Ricardo Miñano[1], Nicoló Dall´Osso[2], Federica Barbieri[2], Giulia Tabanelli[2], E. Guillamón[1], Alberto Baños[1].

[1] DMC Research. Camino de Jayena, 82, 18620 Alhendín, Granada.

[2] Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bolonia, Italy.

La tendencia de la sociedad en los últimos años, marcada por un ritmo de vida más acelerado, ha propiciado un notable aumento en el consumo de alimentos listos para comer (RTE, *ready-to-eat*). En este grupo se incluyen vegetales y frutas IV gama [1] los cuales se suelen ofrecer pelados, cortados y envasados, listos para su consumo. Estos alimentos presentan diferentes problemáticas de conservación como procesos de oxidación o deshidratación lo que afecta a su calidad y vida útil. Además, al ser alimentos crudos procesados pueden ser sensibles a la presencia de determinados microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* [2].

La industria alimentaria se esfuerza en desarrollar tecnologías que contribuyan a mejorar la frescura y calidad de estos alimentos de una forma natural, asegurando el mínimo procesado. Entre los métodos más empleados se encuentran el uso de antioxidantes naturales, el envasado en atmósferas modificadas (MAP) o la aplicación de recubrimientos comestibles.

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un recubrimiento comestible funcional elaborado a base de sucroésteres de ácidos grasos, ácido ascórbico, alfa-tocoferol y que además incorpora la bacteriocina producida por la cepa *Lactobacillus paraplantarum* BPF-2, descrita por su capacidad para producir antibiosis frente a patógenos [3] [4] [5]. Esta cepa se ha caracterizado previamente comprobándose *in vitro* su capacidad de inhibición frente a diferentes cepas de *L. monocytogenes*, además se han establecido las condiciones de producción de su bacteriocina en medio líquido.

En primer lugar, se realizaron ensayos de vida útil para evaluar el efecto de un recubrimiento comestible contenido de esta bacteriocina previamente filtrada y purificada mediante cromatografía (40960 AU/ml). A partir de aguacates y melones frescos se cortaron porciones de 1 cm^3. Los recubrimientos con y sin bacteriocina se aplicaron mediante inmersión de los cubos de fruta durante un 1 minuto, posteriormente se dejaron secar durante 10 minutos y fueron envasados en MAP (70% N2 y 30% CO2) a 4°C. Además, se incluyó un lote sin tratar como control. Los ensayos se realizaron por duplicado. A diferentes tiempos de conservación se determinó pH, Aw, color y la evolución de los recuentos microbiológicos; mesófilos aerobios, enterobacterias, mohos y levaduras.

Además, se realizaron *challenge tests* frente a *L. monocytogenes* (concentración inicial 3 Log/cm^3). Para ello, se realizó una inoculación mediante inmersión durante 5 minutos con las cepas de *L. monocytogenes* CECT4032 *y* DSM 112143. Tras lo cual, se dejaron secar las muestras durante 30 minutos para facilitar la fijación del patógeno a la superficie de la fruta. Posteriormente se aplicaron los tratamientos por inmersión durante 1 minuto y se almacenaron a las mismas condiciones de conservación anteriormente descritas (MAP/4°C). Finalmente, para evaluar la efectividad del tratamiento se cuantificó la concentración del patógeno a diferentes tiempos según la metodología propuesta por UNE-EN ISO 11290 y utilizando medio selectivo cromogénico COMPAS LISTERIA (Biokar Diagnostics, Francia).

Los resultados obtenidos en los estudios de vida útil demostraron que no existía variación significativa en los parámetros de pH, Aw y

color, entre las muestras de fruta que fueron tratadas con los recubrimientos, con y sin bacteriocina. Sin embargo, se observó una ligera mejora de los parámetros microbiológicos con reducciones significativas (P<0.05) de mesófilos totales en los lotes tratados con el recubrimiento con bacteriocina. Por otro lado, en los estudios de *challenge test* se observaron reducciones significativas en los recuentos de *L. monocytogenes* (P<0,01), tanto en melón como en aguacate (Figuras 1 y 2), con diferencias de hasta 4-5 unidades logarítmicas respecto a los controles, respectivamente.

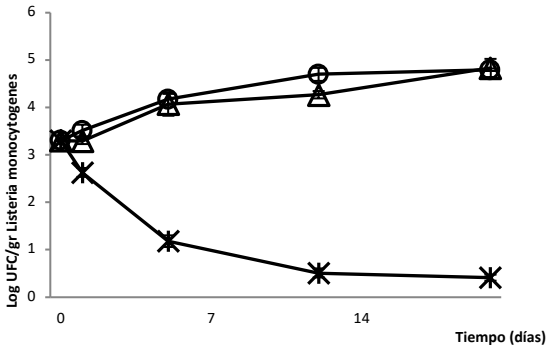


Figura 1: Evolución de *L. monocytogenes* en dados de melón IV gama conservado en MAP a 4ºC. (○) Control (Δ); Recubrimiento (X); Recubrimiento suplementado de bacteriocina de *L. paraplantarum* BPF-2. Los valores son el promedio ± SD (barras de error) de dos experimentos independientes.

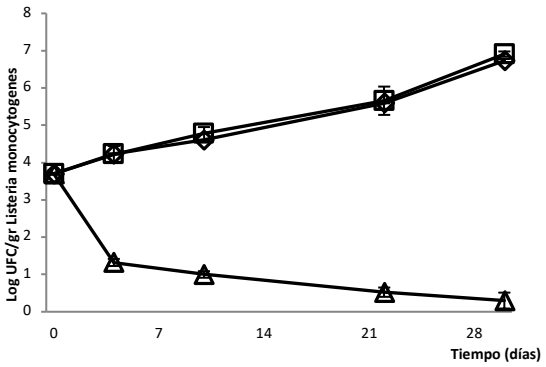


Figura 2: Evolución de *L. monocytogenes* en dados de aguacate IV gama conservado en MAP a 4ºC. (○) Control (Δ); Recubrimiento (X); Recubrimiento suplementado de bacteriocina *L. paraplantarum* BPF-2. Los valores son el promedio ± SD (barras de error) de dos experimentos independientes.

Basándonos en los resultados obtenidos y a falta de próximos estudios de eficacia en otros modelos alimentarios, podemos concluir que la incorporación de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas como *Lb. paraplantarum* BPF-2 en recubrimientos comestibles supone una potencial herramienta para la mejora de la calidad microbiológica y seguridad de frutas IV gama.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto BIOPROMEDFOOD. *Bio-protective cultures and bioactive extracts as sustainable combined strategies to improve the shelf-life of perishable Mediterranean food*. El proyecto está impulsado en España a través de CDTI con financiación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Convocatoria PRIMA-*Partnership on Research and Innovation in the Mediterranean Area.*

REFERENCIAS

[1] Temgire, S., Borah, D.A., Kumthekar, S., & Idate, A. (2021). Recent trends in ready to eat/cook food products: A review. *The Pharma Innovation*.

[2] Ricci, et al. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*, 16(1), e05134. PMid: 32760461.

[3]Martín I, Rodríguez A, Delgado J, Córdoba JJ. Strategies for Biocontrol of *Listeria monocytogenes* Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites in Ready-to-Eat Meat- and Dairy-Ripened Products. *Foods*. 2022; 11(4):542. https://doi.org/10.3390/foods11040542

[4]A.M. López de Lacey, M.E. López-Caballero, J. Gómez-Estaca, M.C. Gómez-Guillén, P. Montero. Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacterium bifidum incorporated to edible coatings and films. Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 16,2012, Pages 277-282, ISSN 1466-8564, https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.07.001.

[5]D. Khodaei, Z. Hamidi-Esfahani. Influence of bioactive edible coatings loaded with *Lactobacillus plantarum* on physicochemical properties of fresh strawberries. Postharvest Biology and Technology. Volume 156:2019https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110944.

[6]Tagg, J. R., & McGiven, A. R. (1971). Assay System for Bacteriocins. Applied Microbiology, 943.

NEBULIZACIÓN DE UN FORMULADO NATURAL PARA MEJORAR LA CALIDAD MICROBIANA DEL AIRE EN INSTALACIONES ALIMENTARIAS

Juan José Ariza[1, 2], J. David García-López[2], Abdelkader Boutine[2], Manuel Colmenero[2], Enrique Guillamón[2], Alberto Baños[1,2]

1 Universidad de Granada. Dpto. Microbiología. Av. de Fuente Nueva, s/n, 18071 Granada.
2 DMC Research. Camino de Jayena, 82, 18620 Alhendín, Granada.
abarjona@dmcrc.com

Los bioaerosoles están implicados en la transmisión de patógenos y otros microorganismos que reducen la vida útil de los alimentos, llegando a causar importantes pérdidas económicas [1,2]. Por ello, evaluar la calidad microbiológica del aire resulta una medida para garantizar la correcta calidad de los ambientes e instalaciones donde se producen alimentos [3]. En los últimos años se han desarrollado tecnologías para reducir los recuentos microbianos en el aire como la nebulización, que consiste en la dispersión en forma de neblina de una solución con poder desinfectante. Esta técnica se está utilizando como un novedoso sistema de microdifusión de desinfectantes [4,5]. Sin embargo, la aplicación de productos químicos no siempre está permitida en la presencia de alimentos o requiere de un aclarado posterior. Por lo que es de gran interés para la industria el desarrollo de soluciones de grado alimentario, como por ejemplo las basadas en extractos botánicos ricos en principios bioactivos [6,7].

Este trabajo tiene como objetivo evaluar la eficacia antimicrobiana de un formulado rico en flavonoides [8] mediante un sistema de desinfección por nebulización (SPRAY PRO®, DOMCA, España) (Figura 1). El análisis microbiológico del aire se realizó por el método de impactación en agar, determinando el recuento de bacterias totales, mohos y levaduras, según Masottie *et al.,* [9].

Para ello se recolectaron 100 L de aire por minuto, antes y después de aplicar el tratamiento (transcurridas 24 h), analizando un total de 420 muestras de aire, 210 antes de nebulizar y 210 después de nebulizar a una dosis del 10% del formulado. Los ensayos se realizaron en cámaras de 10 industrias alimentarias con un volumen aproximado de 2000 m^3durante un período de 5 meses.

Figura 1: Sistema de microdifusión y niebla formada mediante nebulización del formulado en presencia de alimentos (SPRAY PRO®, DOMCA).

Las tablas 1 y 2 muestran los resultados de eficacia del formulado utilizado como desinfectante natural de instalaciones alimentarias mediante nebulización. Para conocer el riesgo biológico en la industria de procesado de alimentos es necesario realizar un análisis microbiológico cuantitativo y cualitativo. En todas las instalaciones se obtuvieron reducciones microbianas superiores al 90% respecto a

los niveles de contaminación de partida ($p < 0.001$). A su vez, todos los recuentos analizados después de nebulizar con el formulado fueron inferiores a 100 UFC/m^3. Por ello, podemos afirmar que la nebulización de este formulado basado en extractos cítricos se postula como una tecnología prometedora, segura y natural para mejorar la calidad microbiológica del aire en las industrias alimentarias en presencia de alimentos.

Instalaciones alimentarias	Hongos totales (UFC/m³)	Reducción (%)
Sala de procesado 1. Antes	2308.66 ± 68.69	97.51
Sala de procesado 1. Después	57.26 ± 9.79	
Cámara de maduración 1. Antes	1700.73 ± 64.60	95.42
Cámara de maduración 1. Después	77.8 ± 6.59	
Sala de procesado 2. Antes	1332.4 ± 45.51	97.72
Sala de procesado 2. Después	30.33 ± 6.67	
Sala de refrigeración 3. Antes	1348.93 ± 36.67	98.50
Sala de refrigeración 3. Después	20.13 ± 5.26	
Sala de procesado 4. Antes	1757.13 ± 56.94	95.74
Sala de procesado 4. Después	74.8 ± 4.93	
Sala de refrigeración 4. Antes	2105.47 ± 57.09	95.66
Sala de refrigeración 4. Después	91.33 ± 7.05	
Sala de procesado 5. Antes	2258 ± 60.47	95.82
Sala de procesado 5. Después	94.27 ± 4.41	
Sala de procesado 6. Antes	1434.67 ± 59.13	96.86
Sala de procesado 6. Después	45.07 ± 10.02	
Cámara de maduración 7. Antes	1127.67 ± 59.78	99.88
Cámara de maduración 7. Después	1.27 ± 1.49	
Sala de procesado 8. Antes	2469.93 ± 68.95	96.53
Sala de procesado 8. Después	85.6 ± 9.67	
Sala de refrigeración 8. Antes	2308.33 ± 105.38	96.26
Sala de refrigeración 8. Después	86.27 ± 5.79	
Sala de procesado 9. Antes	1432.27 ± 67.89	98.36
Sala de procesado 9. Después	23.47 ± 4.69	
Cámara de maduración 10. Antes	1647.13 ± 77.98	98.68
Cámara de maduración 10. Después	21.67 ± 3.68	
Sala de refrigeración 10. Antes	1062.07 ± 49.58	99.93
Sala de refrigeración 10. Después	0.73 ± 0.96	

Tabla 1: Hongos totales en el aire de instalaciones alimentarias.

Instalaciones alimentarias	Aerobios mesófilos totales (UFC/m³)	Reducción (%)
Sala de procesado 1. Antes	2031.13 ± 74.80	94.43
Sala de procesado 1. Después	72.53 ± 6.19	
Cámara de maduración 1. Antes	1493 ± 115.08	95.81
Cámara de maduración 1. Después	62.47 ± 9.26	
Sala de procesado 2. Antes	1012.8 ± 46.34	99.93
Sala de procesado 2. Después	0.73 ± 0.96	
Sala de refrigeración 3. Antes	974.27 ± 110.11	99.94
Sala de refrigeración 3. Después	0.6 ± 1.12	
Sala de procesado 4. Antes	1849.13 ± 92.73	96.73
Sala de procesado 4. Después	60.4 ± 6.63	
Sala de refrigeración 4. Antes	2197.6 ± 85.74	96.26
Sala de refrigeración 4. Después	82.07 ± 4.7	
Sala de procesado 5. Antes	1727.13 ± 45.35	95.21
Sala de procesado 5. Después	82.67 ± 6.08	
Sala de procesado 6. Antes	1256.73 ± 63.16	98.74
Sala de procesado 6. Después	15.8 ± 5.32	
Cámara de maduración 7. Antes	755.73 ± 45.61	99.91
Cámara de maduración 7. Después	0.67 ± 0.82	
Sala de procesado 8. Antes	2041.53 ± 50.86	96.51
Sala de procesado 8. Después	71.27 ± 6.54	
Sala de refrigeración 8. Antes	2029.4 ± 63.06	96.95
Sala de refrigeración 8. Después	62.4 ± 5.69	
Sala de procesado 9. Antes	667.93 ± 48.25	99.94
Sala de procesado 9. Después	0.4 ± 0.63	
Cámara de maduración 10. Antes	1178.6 ± 42.27	99.96
Cámara de maduración 10. Después	0.47 ± 0.64	
Sala de refrigeración 10. Antes	837.53 ± 87.08	99.94
Sala de refrigeración 10. Después	0.47 ± 0.74	

Tabla 2: Aerobios mesófilos totales en aire de instalaciones alimentarias.

REFERENCIAS

1. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.***2021**, *19*.
2. Oliveira, M.; Tiwari, B.K.; Duffy, G. Emerging Technologies for Aerial Decontamination of Food Storage Environments to Eliminate Microbial Cross-Contamination. *Foods***2020**
3. Stobnicka-Kupiec, A.; Gołofit-Szymczak, M.; Górny, R. Microbial contamination level and microbial diversity of occupational environment in commercial and traditional dairy plants. *Annals Agric. Environ. Med.***2019**, *26*, 555–565,
4. Oh, S.W.; Gray, P.M.; Dougherty, R.H.; Kang, D.H. Aerosolization as novel sanitizer delivery system to reduce food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.***2005**, *41*, 56–60.
5. Ban, G.H.; Kang, D.H. Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. *Food Microbiol.***2016**, *55*, 47–54.
6. Wang, F.; You, H.; Guo, Y.; Wei, Y.; Xia, P.; Yang, Z.; Ren, M.; Guo, H.; Han, R.; Yang, D. Essential oils from three kinds of fingered citrons and their antibacterial activities. *Ind. Crops Prod.***2020**, *147*, 112172.
7. Fancello, F.; Petretto, G.L.; Marceddu, S.; Venditti, T.; Pintore, G.; Zara, G.; Mannazzu, I.; Budroni, M.; Zara, S. Antimicrobial activity of gaseous Citrus limon var pompia leaf essential oil against Listeria monocytogenes on ricotta salata cheese. *Food Microbiol.***2020**, *87*.
8. Ariza, J.J.; García-López, D.; Sánchez-Nieto, E.; Guillamón, E.; Baños, A.; Martínez-Bueno, M. Antilisterial Effect of a Natural Formulation Based on Citrus Extract in Ready-To-Eat Foods. *Foods 2021, Vol. 10, Page 1475***2021**, *10*, 1475.
9. Masotti, F.; Vallone, L.; Ranzini, S.; Silvetti, T.; Morandi, S.; Brasca, M. Effectiveness of air disinfection by ozonation or hydrogen peroxide aerosolization in dairy environments. *Food Control***2019**, *97*, 32–38.

FORMACIÓN DE BIOFILM EN *PAENIBACILLUS* Y MÉTODO DE MARCADO CON PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE

Mena Ordóñez L., Grande Burgos M.J., Gálvez del Postigo A.
Universidad de Jaén/Facultad Ciencias experimentales /Departamento Ciencias de la salud /Microbiología. Campus Las Lagunillas s/n. 23071 - Jaén
lmena@ujaen.es

El estudio de la formación de biofilms en la industria alimentaria es de especial interés debido a los problemas que pueden producir las biopelículas en diversos escenarios, ambientales, de salud pública y médicos [1,2]. La aparición de biopelículas, durante el procesamiento de los alimentos puede causar una contaminación que genere una reducción de la vida útil reducida del producto, así como facilitar la contaminación por patógenos alimentarios [3].

El biofilm es una asociación de microorganismos que se une de forma irreversible a una superficie, contenidos en una matriz de sustancia polimérica extracelular [4]. En la actualidad, la gran cantidad de técnicas en el marcaje fluorescente de cepas y las nuevas herramientas de imagen han demostrado ser una excelente herramienta para el estudio de los biofilms [5]. Entender cómo se forman los biofilms puede ayudarnos a combatir la aparición de patógenos en los alimentos.

En este trabajo, se ha estudiado una cepa aislada de la piel de zanahoria que presentaba actividad antimicrobiana frente a otras bacterias y a través de la secuenciación por 16S se determinó que es la cepa: *Paenibacillus dendritiformis*.

El objetivo general de este estudio es observar la producción de biofilms en *Paenibacillus dendritiformis* y marcarlo con GFP por conjugación para observar la formación de los mismos a través del microscopio de fluorescencia y, posteriormente, poder observar y compararlo frente a diferentes patógenos mediante microscopía electrónica con fluorescencia.

La cuantificación de la producción de biofilms se realizó con medio TSB y medio LB en una placa de microtitulación que tiene una tapadera con salientes a los que se adhiere el biofilms formado para poder ser teñido con cristal violeta.

Se observó que a las 24 h no había formación de biopelículas sino una gran producción de gránulos y agregados que se perdían después durante los lavados, lo que se observa en la gran desviación que se produce a las 24h, mientras que a las 48 h sí se observaba una fuerte formación de biofilms, sobre todo en el medio TSB ya que se puede cuantificar bien y no se despega en los lavados de la tinción.

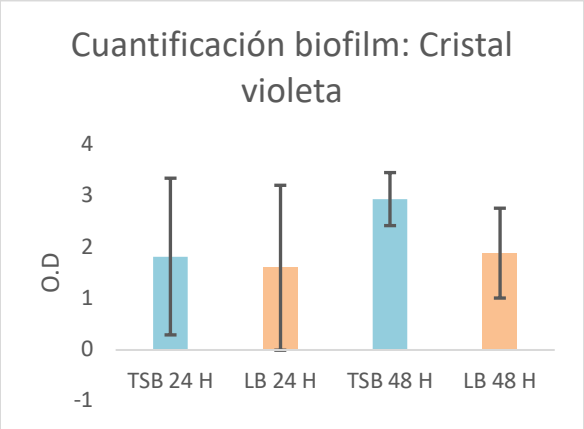


Figura 1: Cuantificación de biofilm con Cristal violeta en TSB y LB a las 24 h y 48 h.

También se observó la producción de películas en *Paenibacillus dendritiformis* en superficie en diferentes medios como TSB,

50% de TSB, BHI, LB, LB+gly+Mn y MSgg mediante microscopía.
Con 50% de TSB, BHI y LB la formación en superficie disminuye a las 48 h mientras que con LB+gly+Mn y MSgg la formación aumenta, con TSB se mantiene más o menos igual.

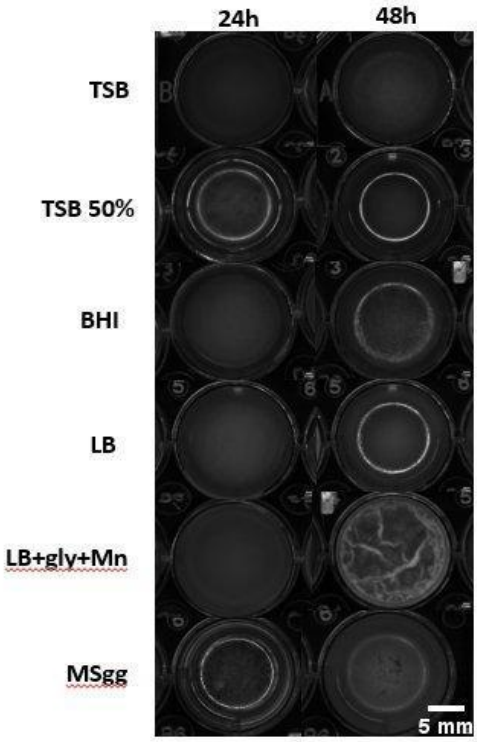


Figura 2: Observación de la formación de biofilm en superficie con diferentes medios de cultivo a las 24 h y 48 h.

El proceso de marcado se realizó mediante conjugación bacteriana, siendo la cepa donante elegida una *Escherichia coli* con *pJOE9734.1* y *pDTUB184*. Los plásmidos tienen un origen de transferencia (oriT) y una nickasa que reconoce el oriT e interactúa con la proteína de transferencia en la conjugación. La cepa donante creció y se resuspendió junto a la cepa receptora y la mezcla de ambas se depositó en una placa de agar LB suplementado con glucosa. Después de 24 horas, se recogió la masa celular y la dilución adecuada se sembró en una placa que contenía kanamicina como agente selectivo del plásmido y polimixina para eliminar *E. coli*.
Los resultados mostraron el marcaje de la cepa de *Paenibacillus*, aunque la fluorescencia era más fuerte en colonia sobre placa que en medio líquido.

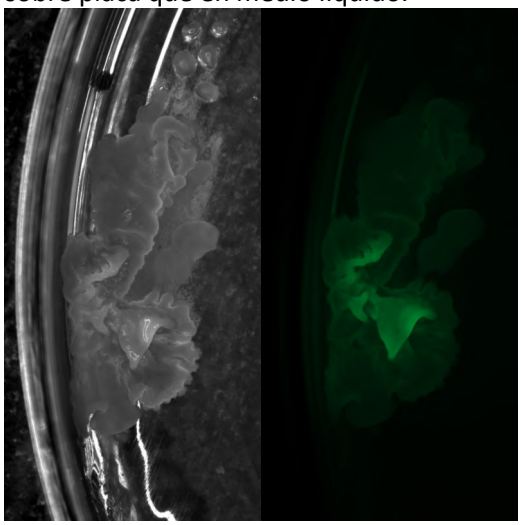


Figura 3: *Paenibacillus* marcado con GFP mediante conjugación bacteriana.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de Interacciones bacterianas y evolución de Ákos T. Kovács en la Universidad técnica de Dinamarca (DTU) por aceptarme para realizar mi estancia y enseñarme todo lo aprendido sobre los biofilms. Y a la beca predoctoral Acción 9 asociada al Programa Ramón y Cajal de la Universidad de Jaén.

REFERENCIAS

[1] *P. Gilbert, A.J. McBain, A.H. Rickard. IBB,* ***2003****, 51, 245–248.*

[2] *L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley. NRMACK,* ***2004****, 2(2),95-108.*

[3] *M.J. Grande, R. Pérez, A. Gálvez, R. Lucas. LWT,* ***2017****, 77, 80-84.*

[4] *C. Carrascosa, D. Raheem, F. Ramos, A. Saraiva, A. Rasposo. IJERPH,* ***2021****, 18(4).*

[5] *T. Abee, Á.T. Kovács, O. P. Kuipers, S. Van der Veen. COBIOT,* ***2011****, 22(2), 172–179.*

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN COMPUESTO PARCIALMENTE PURIFICADO DE ORIGEN NATURAL FRENTE A PATÓGENOS ALIMENTARIOS.

Grande Burgos M.J., Mena Ordóñez L., Gálvez del Postigo A.
Universidad de Jaén/Facultad Ciencias experimentales /Departamento Ciencias de la salud /Microbiología. Campus Las Lagunillas s/n. 23071 - Jaén
mjgrande@ujaen.es

La bioconservación de alimentos empleando ingredientes naturales como las bacteriocinas es una tendencia cada vez mayor en la industria alimentaria para garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos. Puesto que las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos naturales de síntesis ribosómica o no ribosómica producidas por bacterias productoras [1,2,3] y además son estables en condiciones variables de pH y temperatura [4], es una tendencia creciente el hecho de ser utilizadas en el procesamiento de los alimentos para aumentar el periodo de vida útil de los mismos. El uso de Bioconservantes naturales a base de péptidos antimicrobianos como los producidos por *Bacillus* o *Paenibacillus* podría ser una alternativa a los conservantes químicos. Si bien los péptidos producidos por especies del grupo *Bacillus* han sido escasamente estudiados. Los péptidos antimicrobianos, solos o combinados con otras barreras como conservantes químicos, sirven para inhibir el desarrollo de patógenos y también de bacterias alterantes en los alimentos [5]. Las bacterias pertenecientes al género *Paenibacillus* se han aislado de ambientes muy diversos, desde las regiones polares a los trópicos, pasando por ambientes acuáticos y, hasta los desiertos más secos, la mayoría de ellos se encuentran en suelo, a menudo asociados con las raíces de las plantas. Muchas especies de *Paenibacillus* compiten con otros microorganismos a través de la producción de una amplia gama de compuestos antimicrobianos. Los antimicrobianos producidos por *Paenibacillus* incluyen péptidos (AMPs), enzimas y compuestos orgánicos volátiles [6].

En este trabajo, estudiamos el potencial de la cepa de *Paenibacillus thiaminolyticus* como productora de AMPs con alta actividad antimicrobiana frente a miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y otros patógenos alimentarios con el objetivo de utilizarla en la bioconservación de alimentos.
Se han realizado diferentes ensayos de antagonismo cruzado para determinar el espectro antimicrobiano frente a microorganismos alterantes que son transmitidos por los alimentos. Las principales bacterias indicadoras utilizadas han sido: *Enterococcus faecalis* S-47, *Escherichia coli* CECT 432, *Listeria innocua* CECT 910, *Staphylococcus aureus* CECT 192, *Salmonella* sp. y *Bacillus cereus* LWL1. El crecimiento y cultivo de la cepa de estudio, fue en medio complejo (Glucosa, BHI, casaminoácidos, YNB). Inicialmente, se realizó una etapa de purificación mediante extracción en fase sólida sobre un gel de sílice activado C18 para la extracción del péptido antimicrobiano producido por *Paenibacillus thiaminolyticus* y posteriormente se llevaron a cabo ensayos de cuantificación, así como su concentración mediante liofilización y posterior análisis por HPLC. Los eluidos tienen una gran actividad frente a *Salmonella, Escherichia coli, Listeria* y *Bacillus cereus*.

Fue seleccionado para este trabajo un eluido que presentaban un diámetro de halo de inhibición de 11 mm frente a *Salmonella* y *E. coli* en ensayos realizados en torrecillas Oxford, mediante la técnica con pocillos desarrollada por Tagg y McGiven [7] para determinar la actividad antimicrobiana presente en muestras líquidas. Este mismo eluido se probó in vitro frente a estas bacterias en medios de cultivo, comprobándose que a una concentración de 200 µl de eluido/ml de medio, disminuye el crecimiento por debajo del límite de detección de *Escherichia coli* y de *Salmonella* desde las 24h del inicio del tratamiento hasta después de 7 días de almacenamiento. En el caso de *E. coli* funciona incluso a una concentración de 150 µ/ml.

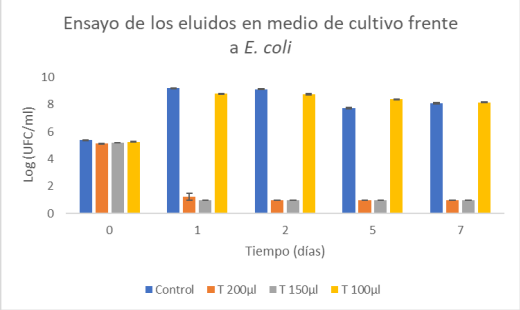


Figura 1: Ensayo de un eluido frente a *E. coli* a unas concentraciones de 200 µl/ml de medio, 150 µl/ml y 100 µl/ml.

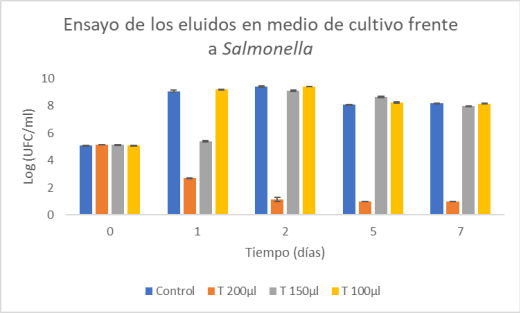


Figura 2: Ensayo de un eluido frente a *Salmonell*a unas concentraciones de 200 µl/ml de medio, 150 µl/ml y 100 µl/ml.

Además, al ensayar el eluido en leche inoculada con *Listeria innocua* al 1% (11 mm de halo frente a *Listeria*) se ha comprobado que a una concentración de eluido de 300 µl/ml de leche, disminuye el crecimiento por debajo del límite de detección desde las 24h iniciales hasta después de 15 días a temperaturas de 22ºC y 4ºC. Con una concentración de eluido de 150 µl/ml de leche, a 22ºC disminuye el crecimiento por debajo del límite de detección a partir de los 7 días, en cambio, a 4ºC, aunque disminuye el crecimiento no lo llega a inhibir completamente.

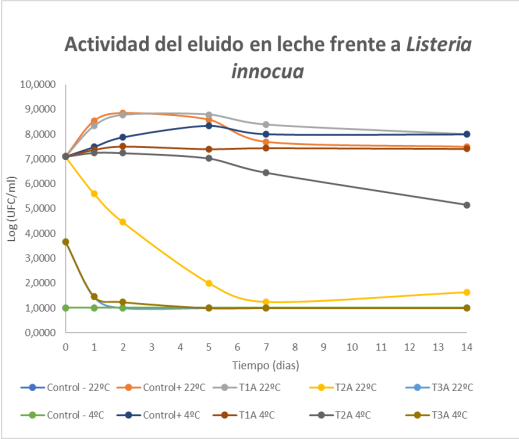


Figura 3: Actividad del eluido en leche inoculada con *Listeria innocua*. T1A: 50 µl de eluido por ml de leche, T2A: 150 µl/ml, T3A: 300 µl/ml. Se realizó el tratamiento durante 14 días y a dos temperaturas diferentes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por una beca predoctoral Acción 9 asociada al Programa Ramón y Cajal de la Universidad de Jaén.

REFERENCIAS

[1] *F. Toldrá, J. Wu "Biologically active peptides: From basic science to applications for human health" (Elsevier, 2021).*

[2] *P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross, NRMACK,* ***2005****, 3, 777-788.*

[3] *A. Gálvez, H. Abriouel, R.L. López, N.B. Omar. IJFM,* ***2007****, 120, 51-70.*

[4] *A. Galvez, R.L. López, R.P. Pulido, M.J.G. Burgos. "Food biopreservation" (Springer, 2014).*

[5] *H. Abriouel, C.M.A.P. Franz, N.B. Omar, A. Galvez. FEMSMR,* ***2011****, 35(1), 201–232.*

[6] *E.N. Grady, J. MacDonal, L. Liu, A. Richman, Z.C. Yuan. BMC,* ***2016****, 15(1), 1–18.*

[7] *J.R. Tagg, A.R. McGiven. JGAMA9,* ***1971****, 21(5), 943.*

OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE CALENTAMIENTO DE MATRICES SÓLIDAS MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEAV): EFECTO EN LA SUPERVIVENCIA DE *Listeria monocytogenes* 5672

Astráin-Redín, L., Raso, J., Cebrián, G., Álvarez, I.
Universidad de Zaragoza/Facultad de Veterinaria/Tecnología de los Alimentos/Instituto AgroAlimentario de Aragón (IA2) Calle Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza
astrain@unizar.es

El tratamiento de alimentos sólidos por sistemas tradicionales de calentamiento conlleva velocidades lentas de calentamiento lo que supone una distribución no uniforme de temperaturas, pero sobre todo un sobretratamiento de la superficie del alimento. Es por ello que se buscan nuevos sistemas de calentamiento rápido y volumétrico del producto. Los PEAV aplicados a alta intensidad (E>1 kV/cm) en base a una nueva forma de aplicar calentamientos óhmicos puede ser una de estas nuevas estrategias. Sin embargo, apenas hay datos sobre ello. Es por esto que el objetivo de este trabajo fue evaluar la uniformidad del calentamiento y el efecto letal de los PEAV como un nuevo sistema térmico de inactivación microbiana en matrices sólidas.

Para ello, en una primera etapa, se investigó la uniformidad y velocidad del calentamiento en distintos puntos de cilindros (2 cm x 2 cm) de agar técnico aplicando PEAV (2,5 kV/cm; 50 Hz) en una cámara cuyos electrodos se termostataron (25, 32, 39 °C y sin termostatar) midiendo la temperatura del agar con sondas de fibra óptica (Figura 1).
Posteriormente, se determinó la termorresistencia de *Listeria monocytogenes* 5672, en base a los parámetros D_t y z, con los que se simuló su inactivación tras los calentamientos generados por los PEAV termostatando o no los electrodos.

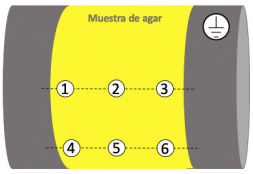


Figura 1. Cilindro de agar con los puntos de muestreo estudiados.

La Figura 2A muestra la rampa de calentamiento del cilindro sin termostatar los electrodos cuando se aplicó el calentamiento por PEAV en el punto 2 (P2) y 4 (P4) que fueron los que más rápido y más lento se calentaron. Como se observa, la aplicación de PEAV permitió aumentar la temperatura del cilindro de agar hasta 75 °C en 50 s observándose gradientes de temperatura de 10,5 °C entre el centro del cilindro (zona caliente, P2) y las proximidades con los electrodos (zona fría, P4). La uniformidad del calentamiento mejoró al termostatar los electrodos consiguiéndose los mejores resultados a una temperatura de 39 °C (Figura 2B). Tras 28 s de tratamiento por PEAV, se alcanzaron 73,4 °C en el punto más frío (P4) con un gradiente de temperaturas de 1,7 °C con respecto al centro de la muestra (P2).

Los resultados se validaron para la inactivación de *L. monocytogenes*, utilizando valores de D_{60} = 0,630 min y z =

5,37 °C determinados experimentalmente, para calcular la inactivación teórica alcanzada con los calentamientos PEAV.

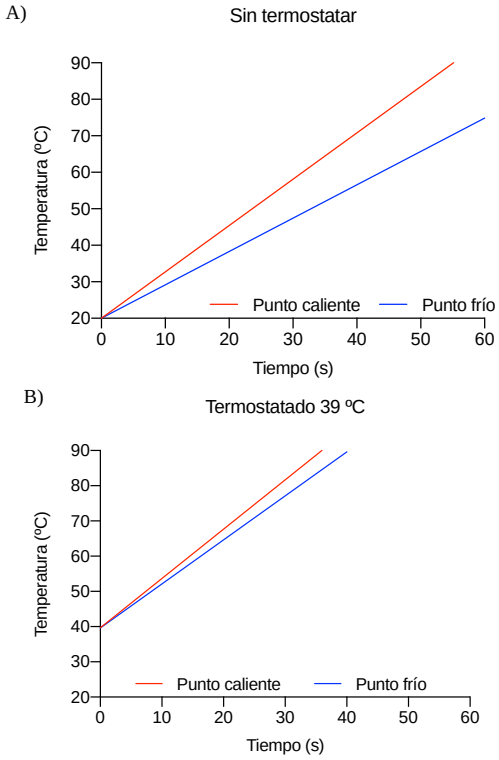


Figura 2. Curvas de calentamiento del cilindro de agar al aplicar un calentamiento de PEAV (2,5 kV/cm; 50 Hz): A) sin termostatar los electrodos; B) termostatando los electrodos a 39 °C.

Así, la Figura 3 muestra la inactivación experimental (símbolos azules), la temperatura registrada durante el calentamiento (líneas gruesas) y la predicción matemática de la inactivación microbiana (líneas finas) en el punto P4 (punto frío) de la muestra. Se observa cómo la termostatación a 39 °C permitió inactivar 5 ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* en 24,5 ± 1,5 s mientras que sin termostatar el tiempo necesario fue de 57 ± 11 s, reduciendo, por lo tanto, el tiempo de tratamiento en un 57%.

En conclusión, la termostatación de los electrodos sería una estrategia interesante para la mejora de la uniformidad de los calentamientos rápidos y volumétricos de matrices sólidas utilizando los PEAV como una nueva forma de aplicar calentamientos óhmicos de pasteurización. No obstante, son necesarios más estudios en matrices alimentarias para evaluar el impacto en la calidad sensorial de los alimentos.

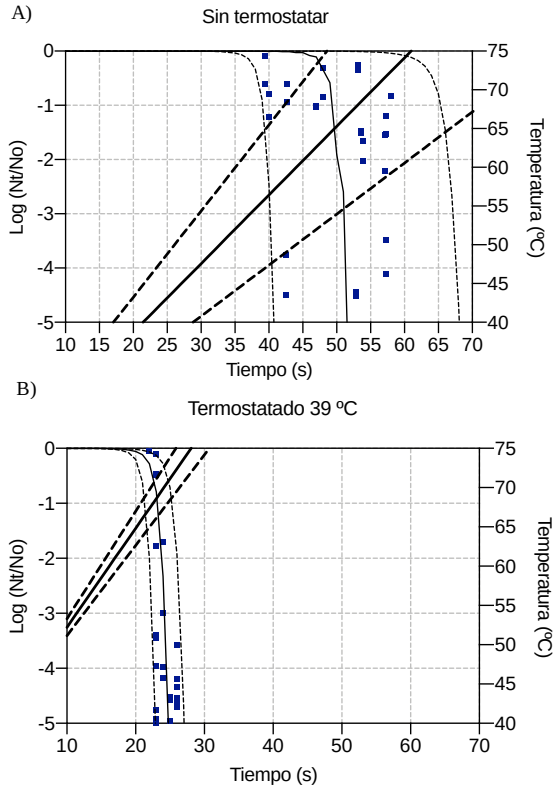


Figura 3. Temperatura e inactivación de *L. monocytogenes* (líneas sólidas y punteadas que representan la media y el intervalo de confianza del 95%) del punto frío (P4) para los estudios sin termostatar (A) y termostatando los electrodos a 39 °C (B) al aplicar tratamientos PEF a 2,5 kV/cm y 50 Hz: (■) valores experimentales de inactivación; (-) predicción de la inactivación; (-) evolución de la temperatura del agar calentado por PEF en las diferentes posiciones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación del Proyecto iNOBox (Proyecto número 281106) del Consejo de Investigación de Noruega y del Departamento de Ciencia, Universidad y Sociedad del Conocimiento del Gobierno de Aragón, así como del Fondo Social Europeo. L.A. agradece su beca FPU al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

SOLUCIÓN NATURAL HIGIENIZANTE PARA LA ELIMINACIÓN DE *BIOFILMS* EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Abdelkader Boutine[1,2], Juan José Ariza[1, 2], Ainhoa Bilbao[3], J. David García-López[1], Enrique Guillamón[1], Eva Valdivia[2], Manuel Martínez-Bueno[2], Alberto Baños[1,2]

1 DMC Research. Camino de Jayena, 82, 18620 Alhendín, Granada.
2 Universidad de Granada. Dpto. Microbiología. Av. de Fuente Nueva, s/n, 18071 Granada.
3 GAIKER Technology Centre, Basque Research and Technology Alliance (BRTA). Parque Tecnológico de Bizkaia, 202, 48170 Zamudio, España.
abarjona@dmcrc.com

Las biopelículas o *biofilms* son comunidades microbianas que se encuentran embebidas en una matriz polimérica que ellas mismas producen y que les mantienen unidas entre sí y a las superficies. En la actualidad es muy común la formación de *biofilms* en distintas superficies de la industria alimentaria, siendo la principal causa de contaminación cruzada de alimentos. Para su eliminación se requiere aplicar procedimientos de limpieza y desinfección efectivos, aunque el uso regular de desinfectantes químicos está fomentando la aparición de resistencias. Además, algunos de estos productos no se pueden aplicar en presencia de alimentos o requieren de un aclarado posterior. Por lo que el desarrollo de soluciones naturales de grado alimentario, como las basadas en ácidos orgánicos y extractos de plantas, se presentan como una alternativa para el control de *biofilms*.

En el presente trabajo se evaluó la eficacia anti-*biofilms* de un formulado de aplicación superficial de alimentos (CYCROM PRO®, DOMCA, Granada, España) elaborado a base de citroflavonoides. Para ello, se estudió su efectividad frente a *biofilms* de *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 6538 y *P. aeruginosa* ATCC 15442. Para determinar la eficacia antimicrobiana del formulado se realizaron diferentes pruebas *in vitro* como test de difusión en agar, reducción de células viables en medio líquido y concentración mínima bactericida (Tabla 1).

Cepas	CMB (mg/L)	Halo de inhibición (mm)	Actividad en medio líquido (mm)
P. aeruginosa	50.000	12 ± 1	12 ± 1
L. monocytogenes	5.000	13 ± 1	13 ± 1
S. aureus	20.000	13 ± 1	13 ± 1

Tabla 1: Resultados de los ensayos *in vitro* realizados frente a las cepas diana.

Además, basándonos en la capacidad de formación de *biofilms* de las cepas diana seleccionadas se realizaron ensayos *in vitro* en placas de 96 pocillos. Para ello, una vez formados los *biofilms* de 24 h, según Camargo *et al.,* [1] se añadieron distintas concentraciones del formulado (2.5, 5 y 10%) y tras 15 min de contacto se determinó las células viables (Figura 1).

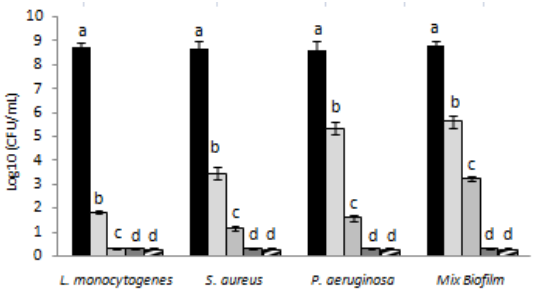


Figura 1: Actividad anti-*biofilm in vitro* en placas *microtiter* frente a las cepas diana después de 15 min de contacto de CYCROM PRO: ■ Control negativo, ■ 2.5 %, ■ 5 %, ■ 10 % y ◪ 3 % Ácido peracético (Control positivo).

Además, se realizó otro ensayo para determinar la eficacia *in vitro* frente a *biofilms* formados por dos especies diferentes (*L. monocytogenes* y *S. aureus*). Estos *biofilms* mixtos presentan un

crecimiento y metabolismo diferentes y son comúnmente producidos en entornos de procesado de alimentos. La Figura 1 muestra una disminución de la concentración bacteriana de una forma dosis-dependiente. Los resultados en todos los ensayos mostraron un efecto bactericida ($p < 0.001$) a los 15 min de exposición a una concentración del 10 %, reduciendo los recuentos bacterianos por debajo del límite de detección (0.3 Log_{10} UFC/mL). Asimismo, se observó un efecto antimicrobiano significativo ($p < 0.001$) para las dosis de 2,5 y 5 %, sobre todo frente a *Listeria*. Además, este efecto *anti-biofilm* fue verificado mediante imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 2).

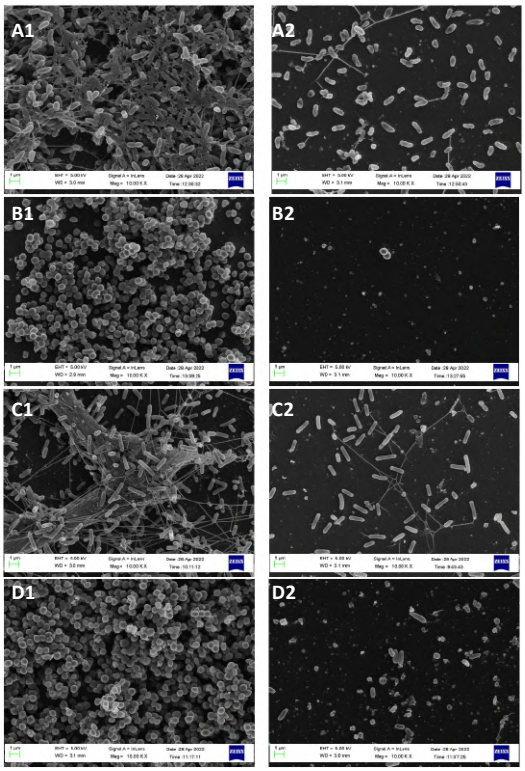


Figura 2: Imágenes obtenidas por SEM, con aumento de 10.000 X, de *biofilms* de: A) *P. aeruginosa*, B) *S. aureus*, C) *L. monocytogenes* y D) *Biofilm* mixto de *L. monocytogenes* y *S. aureus*. (1) Antes del tratamiento y (2) después de aplicar CYCROM PRO al 10 % durante 15 min.

Finalmente, para confirmar las propiedades anti-*biofilm* de CYCROM PRO se realizó un ensayo de eficacia sobre superficies de acero inoxidable, material ampliamente utilizado en la industria alimentaria. Para ello, sobre cupones de acero se formaron *biofilms* de *Listeria* los cuales fueron expuestos durante 15 min al producto (10%). Tras este tiempo se observó mediante Microscopía Confocal Láser de Barrido (CLSM) (Figura 3) la viabilidad celular, diferenciando las bacterias vivas (en verde) de las muertas (rojo) presentes en el *biofilm*.

En base a los resultados presentados, se puede afirmar que este formulado a base de flavonoides de cítricos posee un marcado efecto frente a *biofilms*, pudiéndose considerar como una herramienta natural para su control en presencia de alimentos.

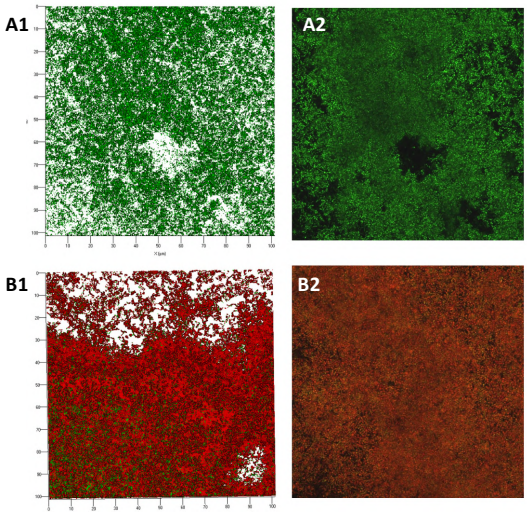


Figura 3: Imágenes obtenidas por CLSM, con aumento de 63 X, de *biofilms* de *L. monocytogenes*: A) Antes del tratamiento y B) Después de aplicar CYCROM PRO al 10 % durante 15 min.

REFERENCIAS

1. Camargo, A.C.; de Paula, O.A.L.; Todorov, S.D.; Nero, L.A. In Vitro Evaluation of Bacteriocins Activity Against Listeria monocytogenes Biofilm Formation. *Appl. Biochem. Biotechnol. 2015 1786* **2015**, *178*, 1239–1251.

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN QUESO DE CABRALES POR TÉCNICAS METAGENÓMICAS Y DE CULTIVO

Javier Rodríguez[1,2], Ana González-Guerra[3], José A. Valenzuela[1], Lucía Vázquez[1,2], Raúl Fernández-López[3], Ana Belén Flórez[1,2], Fernando de la Cruz[3] y Baltasar Mayo[1,2]*

[1]Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Paseo Río Linares s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias; [2]Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Avenida de Roma s/n, 33011-Oviedo, Asturias; [3]Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Universidad de Cantabria-CSIC, C/Albert Einstein 22, 39011-Santander, Cantabria

*baltasar.mayo@ipla.csic.es

INTRODUCCIÓN

Las propiedades sensoriales del queso dependen del tipo de leche, la alimentación animal, las prácticas de elaboración y maduración y la composición cualitativa y cuantitativa de su microbiota. La enorme diversidad de tipos de queso hace muy diversa también la microbiota de cada variedad. Sin embargo, las variaciones en la composición de la microbiota particular de cada tipo queso conducen, con frecuencia, a defectos tecnológicos y sensoriales o a problemas de seguridad alimentaria. La industria quesera precisa de más conocimiento científico de la micro-biota (y sus componentes) para enfrentarse a los desafíos tecnológicos.

Las modernas técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos han permitido descubrir en el queso ADN de innumerables taxones, incluyendo microorganismos tecnológicamente relevantes, alterantes y patógenos. Sin embargo, algunos tipos microbianos se detectan únicamente mediante cultivo, lo que sugiere que ambos tipos de técnicas son complementarias en la caracterización microbiana del queso. Además, la posible utilización de biotipos como fermentos o cultivos de maduración exige, antes de introducirlos en la cadena alimentaria, la recuperación en cultivo, su completa caracterización y la producción de masa microbiana.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo, se da cuenta de la diversidad microbiana y la frecuencia de los microorganismos en una muestra de queso de Cabrales maduro mediante metagenómica filogenética (amplificación y secuenciación de fragmentos del ADNr) y tras cultivo en distintos medios selectivos y no selectivos incubados en diferentes condiciones. Procedentes de los cultivos, se aislaron 393 colonias bacterianas y 98 colonias eucariotas. Estas se identificaron por técnicas moleculares. La diversidad microbiana por debajo del nivel de especie se estimó en algunas de las poblaciones mayoritarias mediante una tipificaron RADP con varios oligonucleótidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante amplificación de ADNr bacteriano, secuenciación y comparación de secuencias en las bases de datos, se identificaron en el ADN microbiano total de la corteza (rind) del queso 52 OTUs (operational taxonomic units) al 97% de homología (nivel de especie) con una frecuencia superior al 0,01% (Figura 1). De estos, solo 20 de ellos presentaban una frecuencia superior al 1% y constituían el 90% de los OTUs. De igual manera, se identificaron 39 OTUs en el interior (paste) del queso, de los que solo siete presentaban una frecuencia superior al 1%.

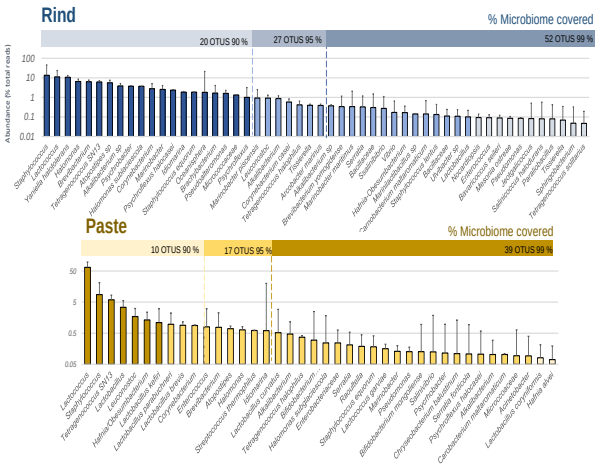


Figura 1. Perfil taxonómico filogenético del microbioma bacteriano del queso Cabrales.

Los OTUs identificados pertenecían a 31 géneros diferentes, de los que *Lactococcus*, *Staphylococcus* y *Tetragenococcus* resultaron dominantes, tanto en corteza como en interior del queso.

Tras identificar las colonias de los cultivos, se determinó la presencia de unas 26 especies bacterianas (Tabla 1).

Tabla 1. Bacterias identificadas en cultivo de queso de Cabrales.

Género/especie	**Número de aislados**
Tetragenococcus koreensis	133
Staphylococcus equorum	81
Corynebacterium variabile	31
Enterococcus faecalis	31
Enterococcus gilvus	23
Lactiplantibacillus plantarum/ L. paraplantarum	20
Brevibacterium linens	14
Corynebacterium flavescens	11
Lactococcus lactis	10
Staphylococcus saprophyticus	8
Enterococcus dispar	7
Enterococcus spp.	6
Enterococcus malodoratus	3
Enterococcus saigonensis/E. dispar	2
Leuconostoc mesenteroides	2
Brevibacterium iodinum	2
Enterococcus avium	1
Enterococcus durans	1
Enterococcus italicus	1
Enterococcus italicus/E. hirae	1
Kocuria rhizophila	1
Lactococcus brevis	1
Microbacterium oxydans	1
Pseudomonas poae	1
Staphylococcus hominis	1
Total	**393**

Tetragenococcus koreensis y *Staphylococcus equorum* resultaron las especies bacterianas dominantes, seguidas por especies de *Enterococcus* spp. y *Corynebacterium variabile*. La técnica molecular detectó mayor diversidad, pero algunos biotipos se identificaron solo en los cultivos. Entre los eucariotas, se identificaron 16 especies de las que *Candida zeylanoides* y *Yarrowia lipolytica* fueron mayoritarias. Por el momento, se desconoce el significado tecnológico y de seguridad de la enorme diversidad microbiana en queso.

En la actualidad estamos caracterizan-do las propiedades tecnológicas y de seguridad de biotipos mayoritarios. En ellos, se ha detectado una enorme diversidad intraespecífica, como se muestra en la Figura 2 para 53 aislados de *S. equorum,* en los que determinamos la presencia de 27 cepas distintas.

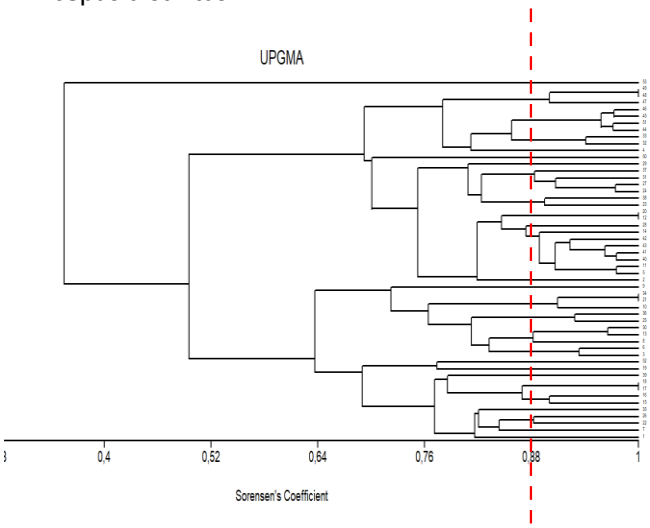


Figura 2. Perfiles de RAPD con tres oligonucleótidos de 57 aislados de *S. equorum*. La línea roja separa cepas distintas.

CONCLUSIONES

1. La microbiota del Cabrales maduro está compuesta por una gran diversidad de organismos procariotas y eucariotas.
2. La diversidad se detecta a niveles interespecíficos e intraespecíficos.
3. Las técnicas moleculares y de cultivo son complementarias para caracterizar la microbiota del queso.
4. La detección molecular de biotipos no cultivados posibilita el desarrollo de estrategias para su aislamiento selectivo.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo se financia con el proyecto PID2019-110549RB-I00/AEI/10.13039/501100011033. JR disfruta de una beca del Programa Severo Ochoa del Principado de Asturias (BP19-098).

Organizan

Universidad de Jaén

Microbiología de los Alimentos
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA

Colaboradores

Facultad de Ciencias Experimentales

BRUKER

Colegio Oficial de Biólogos de Andalucía

Federation of European Microbiological Societies

Colegio Oficial de Médicos Jaén

ICOVJ Jaén
Colegio Oficial de Veterinarios de Jaén

Colegio Oficial de Farmacéuticos Jaén