



UNIVERSIDAD DE JAÉN

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS DOCTORAL



**INFLUENCIA DE LOS MÉTODOS DE
PROCESADO EN LA BIODIVERSIDAD
BACTERIANA Y LA RESISTENCIA A
ANTIMICROBIANOS EN ALIMENTOS
VEGETALES**

**PRESENTADA POR:
Javier Rodríguez López**

**DIRIGIDA POR:
Rosario Lucas López, María José Grande Burgos y Antonio
Gálvez del Postigo**

JAÉN, abril de 2022

INFLUENCIA DE LOS MÉTODOS DE PROCESADO EN LA BIODIVERSIDAD BACTERIANA Y LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN ALIMENTOS VEGETALES

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Jaén con
mención de Doctorado Internacional
Jaén, abril, 2022

RODRIGUEZ LOPEZ JAVIER - 26504384N
Firmado digitalmente por RODRIGUEZ LOPEZ JAVIER - 26504384N
Fecha: 2022.04.20 22:01:39 +02'00'

Fdo.: Javier Rodríguez López
Aspirante al Grado de Doctor

Los Directores del trabajo:

LUCAS LOPEZ MARIA DEL ROSARIO - 26018383R
Firmado digitalmente por LUCAS LOPEZ MARIA DEL ROSARIO - 26018383R
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, serialNumber=IDCES-26018383R, givenName=MARIA DEL ROSARIO, sn=LUCAS LOPEZ, cn=LUCAS LOPEZ MARIA DEL ROSARIO - 26018383R
Fecha: 2022.04.20 22:32:04 +02'00'

Fdo.: Rosario Lucas López

GRANDE BURGOS MARIA JOSE - 76145521L
Firmado digitalmente por GRANDE BURGOS MARIA JOSE - 76145521L
Fecha: 2022.04.20 22:21:43 +02'00'

Fdo.: María José Grande Burgos

GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ ANTONIO MIGUEL - 25041147N
Firmado digitalmente por GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ ANTONIO MIGUEL - 25041147N
Fecha: 2022.04.21 08:47:34 +02'00'

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud.
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.

Los directores de tesis **D^a. Rosario Lucas López, D^a. María José Grande Burgos y D. Antonio Gálvez del Postigo Ruiz**, pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

HACEN CONSTAR: Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: **“Influencia de los métodos de procesado en la biodiversidad bacteriana y la resistencia a antimicrobianos en alimentos vegetales”** presentado por **D. Javier Rodríguez López** ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Jaén con mención de Doctorado Internacional.

Jaén, abril de 2022

LUCAS LOPEZ
MARIA DEL
ROSARIO -
26018383R

Firmado digitalmente por LUCAS LOPEZ
MARIA DEL ROSARIO - 26018383R
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-26018383R,
givenName=MARIA DEL ROSARIO,
sn=LUCAS LOPEZ, cn=LUCAS LOPEZ
MARIA DEL ROSARIO - 26018383R
Fecha: 2022.04.20 22:32:34 +02'00'

Fdo.: Rosario Lucas López

GRANDE BURGOS
MARIA JOSE -
76145521L

Firmado digitalmente por
GRANDE BURGOS MARIA
JOSE - 76145521L
Fecha: 2022.04.20
22:22:32 +02'00'

Fdo.: María José Grande Burgos

GALVEZ DEL POSTIGO RUIZ
ANTONIO MIGUEL - 25041147N

Firmado digitalmente por GALVEZ DEL
POSTIGO RUIZ ANTONIO MIGUEL -
25041147N
Fecha: 2022.04.21 08:47:54 +02'00'

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

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).

ÍNDICE

1. Resumen/summary	1
2. Introducción	33
2.1. Alimentos vegetales	33
2.1.1. Guacamole	35
2.1.2. Arándanos	37
2.1.3. Vegetales mínimamente procesados (VMP)	37
2.2. Enfermedades de transmisión alimentaria. Resistencia antimicrobiana.	39
2.3. Alta presión hidrostática (APH)	52
2.4. Bacteriocina.....	60
2.5. Biodiversidad microbiana	62
2.5.1 Metagenómica. Secuenciación masiva.	64
3. Objetivos	70
4. Material y métodos	75
4.1. Materiales	75
4.2. Métodos	79
4.2.1. Alimentos objeto de estudio	79
4.2.2. Tratamientos	80
4.2.2.1. Alta presión hidrostática	80
4.2.2.2. Bacteriocina (AS-48).....	83
4.2.3. Análisis de las muestras	86
4.2.3.1 Estimación de la carga microbiana total	86
4.2.3.2. Determinación de la presencia de resistencias y multirresistencias a agentes antimicrobianos.	90
4.2.3.2.1 Aislamiento de cepas resistentes.....	90
4.2.3.2.2 Determinación de la resistencia a antibióticos	91
4.2.3.2.3 Determinación de la resistencia a biocidas.....	93
4.2.3.2.4. Extracción de ADN	95
4.2.3.2.5. Identificación bacteriana	97

4.2.3.2.5. Identificación bacteriana	97
4.2.3.2.6. Estudio de los determinantes de resistencia	98
4.2.3.3. Estimación de la biodiversidad bacteriana	101
4.2.4. Análisis estadístico	104
5. Resultados	107
5.1. Efecto de los tratamientos con alta presión hidrostática sobre el pH, la carga microbiana, la resistencia antimicrobiana y la diversidad bacteriana del guacamole	107
5.1.1. Estudio de la variación de pH y de la carga microbiana total..	107
5.1.2. Identificación y determinación de resistencias y multirresistencias de las cepas aisladas de los tratamientos	112
5.1.3. Estudio de los determinantes de resistencia	124
5.1.4. Estimación de la biodiversidad bacteriana de las muestras....	133
5.2. Efecto de los tratamientos con alta presión hidrostática sobre el pH, la carga microbiana, la resistencia antimicrobiana y la diversidad bacteriana del aliño.....	140
5.2.1. Estudio de la variación de pH y de la carga microbiana total..	140
5.2.2. Identificación y determinación de resistencias y multirresistencias de las cepas aisladas de los tratamientos	144
5.2.3. Estudio de los determinantes de resistencia	160
5.2.4. Estimación de la biodiversidad bacteriana de las muestras....	169
5.3. Efecto de los tratamientos con bacteriocina as-48 sobre la carga microbiana y diversidad bacteriana en arándanos	177
5.3.1. Estudio de la carga microbiana total	177
5.3.2. Estimación de la biodiversidad bacteriana de las muestras....	179
6. Discusión	189
7. Conclusiones/Conclusions	217
8. Referencias	225

RESUMEN

1. RESUMEN

Los productos alimentarios listos para el consumo pueden actuar como vehículos de transmisión de bacterias patógenas o toxigénicas de origen alimentario y pueden convertirse en vías de diseminación de resistencias antimicrobianas. En el presente estudio, elegimos dos productos alimenticios vegetales representativos listos para el consumo (guacamole y aderezo) que pueden ser estabilizados por alta presión hidrostática (APH), y aplicamos diferentes tratamientos APH para determinar su influencia en la carga microbiana total, la resistencia antimicrobiana y la biodiversidad bacteriana. También incluimos un tercer producto (arándanos) que no puede ser procesado por APH, y en su lugar elegimos un tratamiento de lavado con la bacteriocina enterocina AS-48 para determinar su influencia en la carga microbiana y la biodiversidad bacteriana de la fruta.

El guacamole es una salsa de aguacate muy apreciada por su agradable sabor y valor nutricional. El presente estudio abordó el impacto de los tratamientos de alta presión hidrostática (APH) sobre la seguridad del producto y la diversidad bacteriana. Se aplicaron cuatro tratamientos de APH, de 5 minutos cada uno: (A) 450 megapascales (MPa) a 22 °C; (B) 450 MPa a 50 °C; (C) 600 MPa a 22 °C; (D) 600 MPa a 50 °C. Los controles y las muestras tratadas se almacenaron en refrigeración durante 50 días.

Los recuentos viables de mesófilos aerobios totales en las muestras control aumentaron gradual y significativamente durante el almacenamiento refrigerado. Todos los tratamientos de alta presión redujeron significativamente los recuentos de células viables en comparación con los controles no tratados. La fracción residual

superviviente fue la más baja para el tratamiento de 600 MPa a 50 °C. Sólo se detectó crecimiento bacteriano en medios suplementados con antibióticos (cefotaxima e imipenem) o con el biocida cloruro de benzalconio en las muestras control, pero no en las tratadas a alta presión.

Una colección de 70 cepas, seleccionadas según su resistencia a los antimicrobianos, fueron identificadas a nivel de especie. El 62,9% se identificó como *Bacillus*, el 21,4% como *Leuconostoc*, el 4,3% como *Pseudomonas*, el 2,9% como *Enterobacter* y el 1,4% como *Rahnella*, *Azospirillum*, *Lelliottia*, *Pantoea*, *Escherichia* o *Bacterium* (sinónimo heterotípico). Para determinar el perfil de resistencia antimicrobiana de estas cepas, se realizaron estudios de resistencia fenotípica y genotípica. En el estudio de resistencia a los antibióticos, el 81% de las cepas mostraron resistencia a la ceftazidima (CAZ), el 71% a la cefotaxima (CTX), el 56% a la cefoxitina (FOX), el 49% a la eritromicina (E), el 46% a la sulfonamida (S3), 34% a meropenem (MEM), 24% a amoxicilina-clavulánico (AMC) y cloranfenicol (C) cada uno, 19% a ciprofloxacina (CIP), 10% a kanamicina (K), 6% a gentamicina (CN) y 4% a tetraciclina (TE). En el estudio de tolerancia a los biocidas, se observó una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 2 µg/mL para la mayoría de la población de estudio contra los biocidas ceftrimida (C), hexadecilpiridinio (APH) y triclosán (T). Para el cloruro de benzalconio (BC), la concentración de la MIC varió entre 2-32 µg/mL, para el digluconato de clorhexidina (CD) la MIC se dividió al 50% entre 32 y 64 µg/mL y para el hexaclorofeno (HC) se obtuvo la MIC más alta de 128 µg/mL para la mayoría de la población analizada. En el estudio genotípico de las resistencias se analizaron determinantes genéticos de resistencia a betalactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos, bombas de exporte y macrólidos. La detección, mediante PCR, de la presencia de genes de

resistencia fue la siguiente: para betalactámicos se observó el gen *bla*_{SHV} en 41 cepas, el gen *bla*_{TEM} en 19 cepas, el gen *bla*_{KPC} en 16 cepas, el gen *bla*_{ctxM} en 15 cepas, el gen *bla*_{ctxM2} en 10 cepas y el gen *bla*_{OXA-48-like} en 3 cepas; para tetraciclinas, gen *tet(A)* se observó en 40 cepas, los genes *tet(S)* y *tet(C)* en 12 cepas cada uno, *tet(E)* en 11 cepas, *tet(G)* en 8 cepas y el resto de genes [*tet(B)*, *tet(D)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*] fueron detectados en al menos 2 cepas cada uno; para aminoglucósidos se observó el gen *dfra12* en 21 cepas; para bombas de exporte se observó el gen *mepA* en 17 cepas y los genes *sdrM* y *mdeA*, en 3 y 2 cepas respectivamente; y para macrólidos se observó el gen *ereA* en 21 cepas.

Después de realizar el análisis de secuenciación masiva de los controles y las muestras presurizadas, encontramos que las muestras tratadas con APH mostraron los índices de diversidad de Shannon y Simpson más bajos.

Las diferentes unidades taxonómicas operativas (OTU) encontradas en las muestras de guacamole se agruparon en 6 filos, de los cuales las *Proteobacterias* fueron, con mucho, los principales representantes, seguidos por los *Firmicutes* y las *Actinobacterias*. Estos filos incluían representantes de 49 familias (más 2 taxones superiores). La composición bacteriana de las muestras control incluía principalmente miembros de la Fam. *Enterobacteriaceae*, pero cambió a una microbiota láctica durante el almacenamiento. Las OTU asignadas al género *Pantoea* aumentaron en los días 5 y 10 de almacenamiento. Los principales cambios detectados en las abundancias relativas de otras familias incluyeron un aumento de la Fam. *Leuconostocaceae* (gen. *Leuconostoc*) en los días 10 y 20, seguida de la Fam. *Burkholderiaceae* (gen. *Ralstonia*) en el día 30 y la Fam. *Lactobacillaceae* (gen. *Lactobacillus*) en los días 40 y 50.

En las muestras tratadas con APH, hubo una reducción general de la abundancia relativa de Fam. *Enterobacteriaceae* tanto después del tratamiento como durante el almacenamiento. *Ralstonia* se convirtió en el grupo predominante en la mayoría de las muestras presurizadas durante el almacenamiento, mientras que *Pantoea* disminuyó. El género *Methylobacterium* (Fam. *Beijerinckiaceae*) se convirtió en una OTU relevante al final del almacenamiento (días 40 y 50) en todas las muestras tratadas, independientemente del tratamiento. *Methylobacterium* presentó las abundancias relativas más altas (45,3% y 32,6%) en las muestras del tratamiento D en los días 40 y 50. Los miembros de las familias *Bacillaceae* y *Lactobacillaceae* tuvieron abundancias relativas muy bajas en las muestras tratadas con APH. La Fam. *Leuconostocaceae* estaba representada en las muestras tratadas por el género *Weissella* en lugar de *Leuconostoc*. *Weissella* se detectó en la mayoría de las muestras tratadas durante el almacenamiento temprano y medio con abundancias relativas de hasta el 5,3%.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) reveló que la mayoría de las muestras control mapeaban de forma separada de las muestras tratadas. También se observó que las muestras tratadas se agrupaban en subgrupos según el tiempo de almacenamiento y no según el tratamiento, como lo ejemplifican los subgrupos 1 (muestras A5-B5-C5-D5), 2 (muestras A10-B10-C10-D10), 3 (todas las muestras tratadas de los días 20 y 30), 4 (muestras A40-B40-C40) y 5 (muestras A50-C50-D50).

Los resultados del estudio indican que los tratamientos APH del guacamole a 50 °C muestran una mayor inactivación microbiana en comparación con los de 22 °C. Sin embargo, todos los tratamientos redujeron los niveles de *Enterobacteriaceae* y de bacterias tolerantes a

penem y proporcionaron estabilidad al producto frente a la acidificación por bacterias lácticas.

La contaminación microbiana de los alimentos puede producirse a través de diferentes fuentes. Los aderezos y condimentos se preparan a menudo en casa o en los servicios de restauración sin aplicar ningún tratamiento para inactivar los microorganismos. Esto puede dar lugar a un riesgo de deterioro o de proliferación de bacterias patógenas o toxigénicas para el ser humano durante el almacenamiento. En el presente estudio, se preparó un aderezo con cilantro y perejil como ingredientes principales. Una alícuota del preparado se utilizó sin ningún tratamiento, y el resto se trató mediante APH (5 min.), sola o en combinación con calor: 450 MPa a 22 °C; 450 MPa a 50 °C; C, 600 MPa a 22 °C; 600 MPa a 50 °C. Las muestras se almacenaron en refrigeración durante 20 días, con muestreos periódicos y análisis microbiológicos: mesófilos aerobios totales, enterobacterias, levaduras y mohos. Las muestras también se sembraron en medios que contenían antimicrobianos para la detección de la resistencia a los mismos. Para el análisis de la biodiversidad, se extrajo el ADN total de las muestras y se amplificó y secuenció la región variable V3-V4 del gen 16S rRNA. A continuación, tras el procesamiento de las secuencias, se realizó el análisis taxonómico.

El recuento de células viables de mesófilos aeróbicos totales en las muestras control aumentó gradual y significativamente de 5,49 a 6,58 log UFC/g durante el almacenamiento. Las muestras tratadas con APH mostraron recuentos de células viables comprendidos entre 1,02 y 1,84 log UFC/g que fueron significativamente menores en comparación con los controles no tratados, o incluso estuvieron por debajo del límite de

detección de 1,0 log UFC/g. Dados los bajos recuentos residuales obtenidos para las muestras tratadas, no fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con respecto a la presión o la temperatura. Los recuentos de presuntas *Enterobacteriaceae* aumentaron de 5,5 a 6,25 log UFC/g en el día 10, pero siguieron siendo significativamente inferiores en comparación con el total de mesófilos aerobios durante los días 2 a 20. No se obtuvieron recuentos viables en agar McConkey para ninguna de las muestras tratadas con APH. Las levaduras y los mohos se mantuvieron en niveles entre 5,19 y 5,5 log UFC/g para la mayoría de las muestras control. La mayoría de los recuentos de levaduras y mohos de las muestras tratadas con APH estaban por debajo del límite de detección.

Cuando se investigó la resistencia a los antimicrobianos, se observó crecimiento microbiano en la mayoría de las muestras control tras la incubación en medios suplementados con diferentes antimicrobianos (cloruro de benzalconio, cefotaxima, imipenem o la mezcla de antibióticos incluida en el agar KPC), pero los recuentos de células viables obtenidos fueron en la mayoría de los casos significativamente menores en comparación con los recuentos obtenidos sin antimicrobianos o incluso estuvieron por debajo de los niveles detectables. Cabe destacar que no se obtuvo ningún crecimiento microbiano en ninguno de los medios suplementados con antimicrobianos de ninguna de las muestras tratadas con APH durante todo el periodo de almacenamiento.

Una colección de 80 cepas, seleccionadas según su resistencia a los antimicrobianos, fueron identificadas a nivel de especie. El 38,75% fueron identificadas como *Pseudomonas*, el 15% *Paenibacillus*, el 12,5% *Lactobacillus*, el 2,5% *Obesumbacterium* y el 1,25% cada uno de los

Aerococcus, *Rahnella*, *Siccibacter* y *Staphylococcus*. Para determinar el perfil de resistencia antimicrobiana de estas cepas, se realizaron estudios de resistencia fenotípica y genotípica. En el estudio de resistencia a los antibióticos, el 90% de las cepas mostraron resistencia a la cefotaxima (CTX), el 74% a la ceftaxima (FOX), el 71% a la eritromicina (E), el 69% al amoxicilina-clavulánico (AMC), el 35% a la ceftazidima (CAZ), el 23% al cloranfenicol (C), el 20% a la kanamicina (K), el 19% a la sulfonamida (S3) y el 16% al meropenem (MEM). En el estudio de tolerancia a los biocidas, la concentración inhibitoria mínima (MIC) varió, aunque en la mayoría de la población se observó una MIC de 250 µg/mL para los biocidas cetrimida (C), cloruro de benzalconio (CB) y digluconato de clorhexidina (CD), una MIC de 2.5 µg/mL para el triclosán (T) y el hexaclorofeno (HC), una MIC de 25 µg/mL para el hexadecilpiridinio (APH) y una MIC de 2.500 µg/mL para el PHMG. En el estudio genotípico de las resistencias se utilizaron determinantes genéticos de resistencia a betalactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos, bombas de exporte y macrólidos. La detección, mediante PCR, de la presencia de genes de resistencia fue la siguiente: para betalactámicos, se observó el gen *bla*_{SHV} en 43 cepas, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TPSE} y *bla*_{ctxM2} en 2 cepas cada uno y *bla*_{TEM} en sólo una de las cepas; para las tetraciclinas, se observó *tet(M)* en 28 cepas, *tet(C)* en 9 cepas, *tet(K)* y *tet(L)* en 5 cepas cada uno y *tet(A)*, *tet(E)* y *tet(B)* se detectaron en al menos 2 cepas cada uno; para los aminoglucósidos, se observó *dfra12* en 5 cepas y *dfrA15* en una sola cepa; para las bombas de exporte, se observó *mdeA* en 45 cepas, *mepA* en 27 cepas, *smr* en 23 cepas, *norA* en 14 cepas, *norC* en 12 cepas, *sepA* en 6 cepas y *sdrM* en 27 cepas; y para los macrólidos, se observó *ereB* en 25 cepas y *ereA* en 24 cepas.

Para el análisis de la biodiversidad, el número de lecturas asignadas a unidades taxonómicas operativas (OTU) osciló entre 35.034 y 62.467. En las muestras de aderezo control, *Proteobacteria* (83,10%) fue el principal filo detectado, seguido de *Bacteroidetes* (9,95%), *Actinobacteriota* (3,85%) y *Firmicutes* (2,88%). Durante los primeros 10 días de almacenamiento refrigerado, la abundancia relativa de *Proteobacterias* aumentó hasta el 97,61%, mientras que los demás grupos disminuyeron. Al final del almacenamiento (día 20), las *Proteobacterias* disminuyeron hasta el 27,20%, mientras que los *Firmicutes* se convirtieron en el filo con mayor abundancia relativa (72,71%).

Las *Proteobacteria* en las muestras control de aliño estaban representadas principalmente por la Fam. *Pseudomonadaceae*, seguida de *Enterobacteriaceae* y *Moraxellaceae*. *Enterobacteriaceae* fue el grupo más abundante entre los días 2 y 10. El género *Pseudomonas* fue el principal representante en los tiempos 0 y 2, disminuyendo después su abundancia relativa. El principal representante de la Fam. *Enterobacteriaceae* en los tiempos 0 y 2 fue el gen. *Pantoea*, pero posteriormente (especialmente en los tiempos 5 y 10) *Serratia* y otros géneros no asignados fueron las OTUs más abundantes de este grupo. Al final del periodo de almacenamiento (día 20), la microbiota cambió a *Firmicutes* (Fam. *Lactobacillaceae*) con el gen. *Lactobacillus* como OTU más abundante. No obstante, también se detectaron *Serratia* y otras *Enterobacteriaceae*, con bajas abundancias relativas.

Los tratamientos de alta presión indujeron cambios importantes en la microbiota en comparación con los controles no tratados. Sin embargo, durante el periodo de almacenamiento, las abundancias relativas de los principales grupos en las muestras tratadas se mantuvieron bastante

estables. A nivel de filos, hubo diferencias observables entre las muestras presurizadas a 450 MPa y las tratadas a 600 MPa, pero no entre los tratamientos a 22°C y los tratamientos a 50°C. Por regla general, las *Proteobacteria* siguieron siendo el principal grupo taxonómico en todas las muestras tratadas, seguidas de los *Bacteroidetes*, *Actinobacteriota* y *Firmicutes*. En los tratamientos a menor presión (450 MPa), las *Proteobacteria* tuvieron abundancias relativas en los rangos de 45,74 a 62,59% y los *Bacteroidetes* fueron el segundo grupo más abundante con abundancias relativas entre 25,48 y 37,44%. En las muestras presurizadas a 600 MPa, las abundancias relativas de *Proteobacterias* fueron ligeramente superiores (54,01 a 80,23%).

En los rangos taxonómicos inferiores, también se observaron diferencias entre las muestras según el tratamiento de presión. En las muestras presurizadas a 450 MPa, las familias *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae* tuvieron abundancias relativas muy bajas, mientras que otras familias de *Proteobacterias* se hicieron más notables (principalmente *Moraxellaceae*, *Sphingomonadaceae* o *Burkholderiaceae*). Los *Bacteroidetes* estaban representados principalmente por *Flavobacteriaceae*, *Weeksellaceae* y *Sphingobacteriaceae*. *Flavobacterium*, *Acinetobacter* y *Sphingomonas* fueron los géneros con mayor abundancia relativa en las muestras presurizadas a 450 MPa.

La mayor proporción de *Proteobacteria* detectada en las muestras presurizadas a 600 MPa incluía principalmente *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Sphingomonadaceae* y *Burkholderiaceae*. La baja abundancia relativa de *Bacteroidetes* incluía principalmente las Fams. *Flavobacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae* y *Weeksellaceae*. Estas tres familias tenían una abundancia relativa significativamente menor en las

muestras presurizadas a 600 MPa en comparación con las de 450 MPa, al igual que sus géneros representativos *Flavobacterium* y *Chryseobacterium*.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) indicó un aumento de la distancia entre las muestras control a medida que avanzaba el tiempo de incubación, lo que concuerda con los resultados obtenidos sobre la diversidad bacteriana. Además, las muestras presurizadas mapearon por separado de las muestras control. La mayoría de las muestras presurizadas a 450 MPa mapearon estrechamente y se separaron del grupo de muestras presurizadas a 600 MPa, aunque hubo algunas excepciones. Estos resultados coinciden con las diferencias detectadas en las proporciones de *Proteobacterias* y *Bacteroidetes* y sus principales géneros representativos entre los dos grupos de muestras presurizadas y también entre las muestras presurizadas y los controles.

Las frutas frescas han estado implicadas en la transmisión de patógenos alimentarios. La enterocina AS-48 es una bacteriocina perteneciente al grupo de los péptidos antimicrobianos circulares que ha sido probada previamente para el control de la contaminación microbiana en productos frescos y frutas frescas. En el presente trabajo, se separaron cinco lotes diferentes de arándanos en dos alícuotas cada uno. Una alícuota de cada lote (designada como muestras "A") se lavó con solución salina estéril (SS) y la otra con enterocina AS-48 en SS (muestras "AB"). A continuación, se recuperó la microbiota de superficie de los controles (A) y de las muestras tratadas con bacteriocina (AB) y se utilizó para (i) la determinación de los recuentos viables, tanto en medios no selectivos como en medios selectivos, y (ii) la extracción del ADN total y el análisis de

la microbiota mediante la secuenciación parcial de alto rendimiento del ADNr 16S utilizando la tecnología Illumina.

Las concentraciones de células viables para las muestras A1 y A4 estaban por debajo de los niveles detectables ($<1,0$ log UFC/g) en todos los medios ensayados. El resto de muestras mostraron recuentos viables de mesófilos aerobios totales comprendidos entre 2,70 y 4,09 log UFC/g. Sólo las muestras A2 y A3 presentaron recuentos viables detectables en medios selectivos (*Enterobacteriaceae*, presunta *Salmonella* y coliformes), con valores comprendidos entre 2,84 y 3,81 log UFC/g. El tratamiento con bacteriocina redujo los recuentos de células viables para aerobios mesófilos totales a valores comprendidos entre 1,48 y 1,88 log UFC/g. Cabe destacar que las muestras A2B y A3B no produjeron ninguna célula viable cuando se sembraron en los medios selectivos utilizados en el estudio.

El análisis de secuenciación de alto rendimiento de la región V3-V4 del gen 16S rRNA arrojó valores de lecturas totales asignadas comprendidos entre 18.587 y 54.911. Sin embargo, una gran fracción de las lecturas asignadas pertenecían a cloroplastos. Tras eliminar las lecturas asignadas a cloroplastos y mitocondrias (que presumiblemente se debían a ADN contaminante de los arándanos), se utilizaron para el análisis de la biodiversidad las lecturas asignadas a procariotas (que estaban en el rango de 668 a 11.820). Las muestras A1B, A3B y A4B tratadas con bacteriocina mostraron valores del índice de biodiversidad Chao-1 inferiores a los de las correspondientes muestras control. Se observó un cambio similar en las muestras A1B, A3B, A4B y A5B en cuanto a los valores de diversidad de Shannon y Simpson.

La asignación taxonómica indicó grandes diferencias entre los distintos lotes de arándanos, detectándose un total de 16 filos para el conjunto de muestras. *Firmicutes* fue el filo más abundante en las muestras control A1 y A4, mientras que *Proteobacteria* fue el más abundante en las muestras A2, A3 y A5. *Actinobacteriota* fue el tercer filo más abundante detectado, especialmente en las muestras A1, A4 y A5. Los *Firmicutes* incluían principalmente miembros de la Fam. *Enterococcaceae* (especialmente en las muestras A1 y A4, con el gen. *Enterococcus* como principal representante), seguido de la Fam. *Bacillaceae* (muestra A1, género *Bacillus*) y *Staphylococcaceae* (muestra A5, género *Staphylococcus*). Las proteobacterias estaban representadas principalmente por *Enterobacteriaceae* (especialmente en las muestras A2 y A3) y el gen. *Erwinia* (muestra A3). Las actinobacterias estaban representadas principalmente por la Fam. *Micrococcaceae* y el gen. *Micrococcus*.

Las muestras tratadas con enterocina AS-48 mostraron, en general, mayores abundancias relativas de *Proteobacteria* (con excepción de la muestra AB5, que mostró una mayor abundancia relativa de *Firmicutes*). Los cambios observados también dependían de la muestra. En la muestra A1B, las familias con mayores abundancias relativas detectadas fueron *Enterobacteriaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Xanthomonadaceae*, mientras que las abundancias relativas de las familias *Enterococaceae* y *Bacillaceae* disminuyeron en comparación con los controles no tratados. La muestra A2B no mostró cambios importantes en comparación con los controles. La muestra A3B se caracterizó por una disminución de la abundancia relativa del gen. *Erwinia* y un aumento de Fam. *Enterobacteriaceae* en comparación con la muestra control A3. En la muestra A4B, los principales cambios incluyeron una disminución de Fam.

Enterococcaceae y un aumento de *Enterobacteriaceae* junto con otras familias de *Proteobacteria* con abundancias relativas más bajas. La muestra A5B fue la única que mostró un aumento de *Enterococcaceae*, mientras que otros grupos encontrados en las muestras control (como *Staphylococcaceae* y varias familias de *Proteobacteria*) disminuyeron en abundancia relativa.

El análisis de las coordenadas principales indicó que la mayoría de las muestras tratadas con bacteriocina (A1B a A4B) aparecían más próximas entre sí en comparación con los controles no tratados (excepto la muestra A2). Las muestras A1, A4 y A5B también mapearon estrechamente en un grupo separado, mientras que las muestras A3 y A5 mostraron la mayor separación entre ellas y también entre el resto de las muestras.

Los resultados del estudio indican grandes variaciones entre lotes en la microbiota de superficie de los arándanos. Estas diferencias también se observan en las muestras tratadas con bacteriocina AS-48. Aunque la mayoría de las muestras tratadas con bacteriocina muestran una menor abundancia relativa de *Firmicutes* y una mayor abundancia relativa de *Proteobacteria* (lo que podría considerarse como un efecto común del tratamiento), también puede ocurrir lo contrario. La mayor abundancia relativa de *Enterococcaceae* observada en una de las muestras podría interpretarse en términos de selección de enterococos resistentes a la bacteriocina. Dado que se ha descrito la producción de AS-48 y la inmunidad en varias cepas de enterococos de diferentes fuentes, es tentador sugerir que los enterococos resistentes a la bacteriocina también pueden encontrarse de forma natural en los alimentos vegetales.

SUMMARY

SUMMARY

Ready-to-eat food products may act as vehicles for transmission of foodborne pathogenic or toxigenic bacteria and they may become routes for dissemination of antimicrobial resistances. In the present study, we chose two representative ready-to-eat vegetable food products (guacamole and dressing) which can be stabilized by high-hydrostatic pressure (HP), and applied different HP treatments to determine their influence on total microbial load, antimicrobial resistance, and bacterial biodiversity. We also included a third product (blueberries) which cannot be processed by HP, and instead chose a washing treatment with the bacteriocin enterocin AS-48 in order to determine its influence on microbial load and bacterial biodiversity of the fruit.

Guacamole is an avocado sauce highly appreciated for its pleasant taste and nutritional value. The present study addressed the impact of high-hydrostatic pressure (HP) treatments on the product safety and bacterial diversity. Four HP treatments, 5 min each, were applied: (A) 450 megapascals (MPa) at 22 °C; (B) 450 MPa at 50 °C; (C) 600 MPa at 22 °C; (D) 600 MPa at 50 °C. Controls and treated samples were refrigerated stored for 50 days.

Viable counts for total aerobic mesophiles in the control samples increased gradually and significantly during refrigerated storage. All the high-pressure treatments reduced viable cell counts significantly compared with untreated controls. The residual surviving fraction was lowest for the 600 MPa treatment at 50 °C. Bacterial growth on media supplemented with antibiotics (cefotaxime and imipenem) or the biocide benzalkonium

chloride was detected only from control samples but not from HP-treated samples.

A collection of 70 strains, selected according to their antimicrobial resistance, were identified to species level. 62.9% were identified as *Bacillus*, 21.4% *Leuconostoc*, 4.3% *Pseudomonas*, 2.9% *Enterobacter* and 1.4% each *Rahnella*, *Azospirillum*, *Lelliottia*, *Pantoea*, *Escherichia* or *Bacterium* (heterotypic synonym). To determine the antimicrobial resistance profile of these strains, phenotypic and genotypic resistance studies were carried out. In the antibiotic resistance study, 81% of the strains showed resistance to ceftazidime (CAZ), 71% to cefotaxime (CTX), 56% to cefoxitin (FOX), 49% to erythromycin (E), 46% to sulphonamide (S3), 34% to meropenem (MEM), 24% to amoxicillin-clavulanate (AMC) and chloramphenicol (C) each, 19% to ciprofloxacin (CIP), 10% to kanamycin (K), 6% to gentamicin (CN) and 4% to tetracycline (TE). In the biocide tolerance study, a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2 µg/mL was observed for most of the study population against the biocides cetrimide (C), hexadecylpyridinium (HP) and triclosan (T). For benzalkonium chloride (BC) the MIC concentration varied between 2-32 µg/mL, for chlorhexidine digluconate (CD) the MIC was split 50/50 between 32 and 64 µg/mL and for hexachlorophene (HC) the highest MIC of 128 µg/mL was obtained for most of the tested population. Genetic determinants of resistance to beta-lactams, tetracyclines, aminoglycosides, export pumps and macrolides were used in the genotypic study of resistances. PCR screening for the presence of resistance genes was as follows: for beta-lactams, the *bla*_{SHV} gene was observed in 41 strains, *bla*_{TEM} in 19 strains, *bla*_{KPC} in 16 strains, *bla*_{ctxM} in 15 strains, *bla*_{ctxM2} in 10 strains and *bla*_{OXA-48-like} in 3 strains; for tetracyclines, *tet(A)* gene was observed in 40 strains, *tet(S)* and *tet(C)* genes

in 12 strains each, *tet(E)* in 11 strains, *tet(G)* in 8 strains and the remaining genes [*tet(B)*, *tet(D)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*] were detected in at least 2 strains each; for aminoglycosides *dfra12* was observed in 21 strains; for export pumps *mepA* was observed in 17 strains and *sdrM* and *mdeA* genes in 3 and 2 strains respectively; and for macrolides *ereA* was observed in 21 strains.

After performing high throughput sequencing analysis of controls and pressurized samples, we found that the samples treated by HP showed the lowest Shannon and Simpson diversity indices.

The different operational taxonomic units (OTUs) found in guacamole samples were grouped into 6 phyla, of which *Proteobacteria* were by far the main representatives, followed by *Firmicutes* and *Actinobacteria*. These phyla included representatives of 49 families (plus 2 higher taxons). The bacterial composition of control samples included mostly members of Fam. *Enterobacteriaceae*, but it changed to a lactic acid microbiota during storage. OTUs assigned to genus *Pantoea* increased at days 5 and 10 of storage. Major changes detected in the relative abundances of other families included an increase of Fam. *Leuconostocaceae* (gen. *Leuconostoc*) at days 10 and 20, followed by Fam. *Burkholderiaceae* (gen. *Ralstonia*) at day 30 and Fam. *Lactobacillaceae* (gen. *Lactobacillus*) at days 40 and 50.

In the HP treated samples, there was a general reduction in the relative abundance of Fam. *Enterobacteriaceae* both after treatment and during storage. *Ralstonia* became the predominant group in most of the pressurized samples during storage, while *Pantoea* decreased. *Methylobacterium* (Fam. *Beijerinckiaceae*) became a relevant OTU by the end of storage (days 40 and 50) in all treated samples, regardless of treatment. *Methylobacterium* showed highest relative abundances (45.3%

and 32.6%) in samples from treatment D at days 40 and 50. Members of families *Bacillaceae* and *Lactobacillaceae* had very low relative abundances in the HP-treated samples. Fam. *Leuconostocaceae* was represented in the treated samples by genus *Weissella* instead of *Leuconostoc*. *Weissella* was detected in most of the treated samples during early-to-mid storage at relative abundances up to 5.3%.

Principal Coordinates Analysis (PCoA) revealed that most of the control samples mapped separately from the treated samples. It was also observed that the treated samples mapped in subgroups according to storage time rather than treatment, as exemplified by the subgroups 1 (samples A5-B5-C5-D5), 2 (samples A10-B10-C10-D10), 3 (all treated samples from days 20 and 30), 4 (samples A40-B40-C40), and 5 (samples A50-C50-D50).

Results from the study indicate that HP treatments of guacamole at 50 °C show higher microbial inactivation compared to 22 °C. However, all treatments reduced the levels of *Enterobacteriaceae* and penem-tolerant bacteria and provided product stability against acidification by lactic acid bacteria.

Food microbial contamination may occur through different sources. Dressings and condiments are often prepared at home or at catering services without application of any treatment for inactivation of microorganisms. This may result in risk of spoilage or proliferation of human pathogenic or toxigenic bacteria during storage. In the present study, a dressing was prepared with coriander and parsley as main ingredients. One aliquot of the preparation was used without any treatment, and the rest

were treated by high-hydrostatic pressure (5 min.) singly or in combination with heat: 450 MPa at 22 °C; 450 MPa at 50 °C; C, 600 MPa at 22 °C; 600 MPa at 50 °C. Samples were refrigerated stored for 20 days, with periodic sampling and microbiological analysis: total aerobic mesophiles, Enterobacteriaceae, yeasts and molds. Samples were also plated on media containing antimicrobials for detection of antimicrobial resistance. For biodiversity analysis, total DNA was extracted from the samples and the V3-V4 variable region of the 16S rRNA gene was amplified and sequenced. Then, after processing of sequences, taxonomic analysis was performed.

The viable cell counts of total aerobic mesophiles in the control samples increased gradually and significantly from 5.49 to 6.58 log CFU/g during storage. Samples treated by HP showed viable cell counts comprised between 1.02 and 1.84 log CFU/g that were significantly lower compared to untreated controls, or even were below the detection limit of 1.0 log CFU/g. Given the low residual counts obtained for the treated samples, it was not possible to detect statistically significant differences between treatments with regard to pressure or temperature. Counts of presumptive Enterobacteriaceae increased from 5.5 to 6.25 log CFU/g at day 10, but still remained significantly lower compared to total aerobic mesophiles for days 2 to 20. No viable counts were obtained on McConkey agar for any of the HP-treated samples. Yeasts and molds remained at levels between 5.19 and 5.5 log CFU/g for most of the control samples. Most of the counts for yeasts and molds for the HP-treated samples were below the detection limit.

When antimicrobial resistance was investigated, microbial growth was observed for most of the control samples after incubation in media supplemented with different antimicrobials (benzalkonium chloride, cefotaxime, imipenem, or the antibiotic mixture included in KPC agar), but

the viable cell counts obtained were in most cases significantly lower compared to counts obtained without antimicrobials or even were below detectable levels. Remarkably, no microbial growth was obtained on any of the media supplemented with antimicrobials from any of the samples treated by HP during the complete storage period.

A collection of 80 strains, selected according to their antimicrobial resistance, were identified to species level. 38.75% were identified as *Pseudomonas*, 15% *Paenibacillus*, 12.5% *Lactobacillus*, 2.5% *Obesumbacterium* and 1.25% each *Aerococcus*, *Rahnella*, *Siccibacter* and *Staphylococcus*. To determine the antimicrobial resistance profile of these strains, phenotypic and genotypic resistance studies were carried out. In the antibiotic resistance study, 90% of the strains showed resistance to cefotaxime (CTX), 74% to cefoxitin (FOX), 71% to erythromycin (E), 69% to amoxicillin-clavulanate (AMC), 35% to ceftazidime (CAZ), 23% to chloramphenicol (C), 20% to kanamycin (K), 19% to sulphonamide (S3) and 16% to meropenem (MEM). In the biocide tolerance study, the minimum inhibitory concentration (MIC) varied, although in most of the population a MIC of 250 µg/mL was observed for the biocides cetrimide (C), benzalkonium chloride (CB) and chlorhexidine digluconate (CD), a MIC of 2.5 µg/mL for triclosan (T) and hexachlorophene (HC), a MIC of 25 µg/mL for hexadecylpyridinium (HP) and a MIC of 2.500 µg/mL for PHMG. Genetic determinants of resistance to beta-lactams, tetracyclines, aminoglycosides, export pumps and macrolides were used in the genotypic study of resistances. PCR screening for the presence of resistance genes was as follows: for beta-lactams, the *bla*_{SHV} gene was observed in 43 strains, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TPSE} and *bla*_{ctxM2} in 2 strains each and *bla*_{TEM} in only one of the strains; for tetracyclines, *tet(M)* was observed in 28 strains, *tet(C)* in 9

strains, *tet(K)* and *tet(L)* in 5 strains each and *tet(A)*, *tet(E)* y *tet(B)* were detected in at least 2 strains each; for aminoglycosides, *dfra12* was observed in 5 strains and *dfra15* in only one strain; for export pumps, *mdeA* was observed in 45 strains, *mepA* in 27 strains, *smr* in 23 strains, *norA* in 14 strains, *norC* in 12 strains, *sepA* in 6 strains and *sdrM* in 27 strains; and for macrolides, *ereB* was observed in 25 strains and *ereA* in 24 strains.

For the biodiversity analysis, the numbers of reads assigned to operational taxonomic units (OTUs) ranged from 35.034 to 62.467. In the control dressing samples, *Proteobacteria* (83.10%) was the main phylum detected followed by *Bacteroidetes* (9.95%), *Actinobacteriota* (3.85%) and *Firmicutes* (2.88%). During the first 10 days of refrigerated storage, the relative abundance of *Proteobacteria* increased up to 97.61%, while the other groups decreased. At the end of storage (day 20), *Proteobacteria* decreased down to 27.20% while *Firmicutes* became the phylum with highest relative abundance (72.71%).

Proteobacteria in the control dressing samples were represented mainly by Fam. *Pseudomonadaceae*, followed by *Enterobacteriaceae* and *Moraxellaceae*. *Enterobacteriaceae* was the most abundant group between days 2 and 10. Gen. *Pseudomonas* was the main representative at times 0 and 2, decreasing afterwards in relative abundance. The main representative of Fam. *Enterobacteriaceae* at times 0 and 2 was gen. *Pantoea*, but later on (specially times 5 and 10) *Serratia* and other unassigned genera were the most abundant OTUs in this group. At the end of the storage period (day 20), the microbiota shifted to *Firmicutes* (Fam. *Lactobacillaceae*) with gen. *Lactobacillus* as most abundant OTU. Nevertheless, *Serratia* and other *Enterobacteriaceae* were also detected, with low relative abundances.

The high-pressure treatments induced major changes in the microbiota compared with untreated controls. However, during the storage period, the relative abundances of the main groups in the treated samples remained quite stable. At phylum level, there were observable differences between samples pressurized at 450 MPa and those treated at 600 MPa, but not between treatments at 22°C and treatments 50°C. As a general rule *Proteobacteria* remained the main taxonomic group in all treated samples followed by *Bacteroidetes*, *Actinobacteriota* and *Firmicutes*. For the lower pressure treatments (450 MPa), *Proteobacteria* had relative abundances in the ranges of 45.74 to 62.59% and *Bacteroidetes* was the second most abundant group with relative abundances between 25.48 and 37.44%. In the samples pressurized at 600 MPa, the relative abundances of *Proteobacteria* were slightly higher (54.01 to 80.23%).

At lower taxonomic ranks, there were also observable differences between samples according to pressure treatment. In the samples pressurized at 450 MPa, the families *Pseudomonadaceae* and *Enterobacteriaceae* had very low relative abundances, while other families of *Proteobacteria* became more noticeable (mainly *Moraxellaceae*, *Sphingomonadaceae* or *Burkholderiaceae*). *Bacteroidetes* were represented mainly by *Flavobacteriaceae*, *Weeksellaceae* and *Sphingobacteriaceae*. *Flavobacterium*, *Acinetobacter* and *Sphingomonas* were the genera with highest relative abundances in the samples pressurized at 450 MPa.

The higher proportion of *Proteobacteria* detected in the samples pressurized at 600 MPa included mainly *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Sphingomonadaceae* and *Burkholderiaceae*. The low relative abundance of *Bacteroidetes* involved mainly the Fams.

Flavobacteriaceae, *Sphingobacteriaceae* and *Weeksellaceae*. These three families had significantly lower relative abundances in the samples pressurized at 600 MPa compared to 450 MPa as also did their representative genera *Flavobacterium* and *Chryseobacterium*.

Principal Coordinates Analysis (PCoA) indicated an increase of distance between control samples as incubation time proceeded, which is in agreement with the results obtained on bacterial diversity. Also, the pressurized samples mapped separately from control samples. Most of the samples pressurized at 450 MPa mapped closely and separated from the group of samples pressurized at 600 MPa, although there were some exceptions. These results agree with the differences detected in the proportions of *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* and their main representative genera between the two groups of pressurized samples and also between pressurized samples and controls.

Fresh fruits have been involved in transmission of foodborne pathogens. Enterocin AS-48 is a bacteriocin belonging to the group of circular antimicrobial peptides that has been previously tested for control of microbial contamination in fresh produce and fresh fruits. In the present work, five different batches of blueberries were separated in two aliquots each. One aliquot from each batch (designated as “A” samples) was washed with sterile saline solution (SSS) and the other one with enterocin AS-48 in SSS (“AB” samples). Then, the surface microbiota of controls (A) and bacteriocin-treated samples (AB) was recovered and used for (i) determination of viable counts both on non-selective and on selective

media, and (ii) extraction of total DNA and analysis of the microbiota by partial 16S rDNA high-throughput sequencing using Illumina technology.

Viable cell concentrations for samples A1 and A4 were below detectable levels (<1.0 log CFU/g) in all media tested. The rest of samples showed viable counts of total aerobic mesophiles comprised between 2.70 and 4.09 log CFU/g. Only the samples A2 and A3 yielded detectable viable counts on selective media (*Enterobacteriaceae*, presumptive *Salmonella* and coliforms), with values comprised between 2.84 and 3.81 log CFU/g. The bacteriocin treatment reduced viable cell counts of total aerobic mesophiles to values comprised between 1.48 and 1.88 log CFU/g. Remarkably, samples A2B and A3B did not yield any viable cells when plated on the selective media used in the study.

High-throughput sequencing analysis of V3-V4 region of the 16S rRNA gene yielded values of total assigned reads comprised between 18.587 and 54.911. However, a large fraction of the assigned reads belonged to chloroplasts. After removal of the reads assigned to chloroplasts and mitochondria (which presumably were due to contaminant DNA from the blueberries), the reads assigned to prokaryotes (which were in the range of 668 to 11.820) were used for biodiversity analysis. The bacteriocin-treated samples A1B, A3B and A4B showed Chao-1 biodiversity index values lower than the corresponding control samples. A similar change was observed for samples A1B, A3B, A4B and A5B regarding Shannon and Simpson diversity values.

Taxonomic assignment indicated large differences between the different batches of blueberries, with a total of 16 phyla being detected for the set of samples. *Firmicutes* was the most abundant phylum in control

samples A1 and A4, while *Proteobacteria* were the most abundant in samples A2, A3 and A5. *Actinobacteriota* was the third most abundant phylum detected, especially in samples A1, A4 and A5. *Firmicutes* included mainly members of Fam. *Enterococcaceae* (specially in samples A1 and A4, with gen. *Enterococcus* as main representative), followed by Fam. *Bacillaceae* (sample A1, gen. *Bacillus*) and *Staphylococcaceae* (sample A5, gen. *Staphylococcus*). *Proteobacteria* were represented mainly by *Enterobacteriaceae* (specially in samples A2 and A3) and gen. *Erwinia* (sample A3). *Actinobacteriota* were represented mainly by Fam. *Micrococcaceae* and gen. *Micrococcus*.

The samples treated with enterocin AS-48 showed, in general, higher relative abundances of *Proteobacteria* (with exception of sample AB5, which showed a higher relative abundance of *Firmicutes*). The observed changes also depended on the sample. In sample A1B, the families with higher relative abundances detected were *Enterobacteriaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* and *Xanthomonadaceae*, while the relative abundances of families *Enterococaceae* and *Bacillaceae* decreased compared to the untreated controls. Sample A2B did not show major changes compared to controls. Sample A3B was characterised by a decrease in the relative abundance of gen. *Erwinia* and an increase of Fam. *Enterobacteriaceae* compared to control sample A3. In sample A4B, the main changes included a decrease of Fam. *Enterococcaceae* and an increase of *Enterobacteriaceae* together with other families of *Proteobacteria* with lower relative abundances. Sample A5B was the only sample showing an increase of *Enterococcaceae*, while other groups found in the control samples (such as *Staphylococcaceae* and several families of *Proteobacteria*) decreased in relative abundances.

Principal coordinates analysis indicated that most samples treated with bacteriocin (A1B to A4B) mapped closer to each other compared to untreated controls (except for sample A2). Sample A1, A4 and A5B also mapped closely in a separate group, while samples A3 and A5 showed the largest separation between them and also between the rest of the samples.

The results of the study indicate large batch-to-batch variations in the surface microbiota of blueberries. These differences can also be observed in the samples treated with bacteriocin AS-48. While most of the bacteriocin-treated samples show lower relative abundances of *Firmicutes* and higher relative abundances of *Proteobacteria* (which could be considered as a common effect of treatment), the opposite may also occur. The observed higher relative abundance of *Enterococcaceae* in one of the samples could be interpreted in terms of selection of enterococci resistant to the bacteriocin. Since AS-48 production and immunity has been described in several strains of enterococci from different sources, it is tempting to suggest that bacteriocin-resistant enterococci may also be found naturally in vegetable foods.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ALIMENTOS VEGETALES

Los hábitos alimentarios de la población han experimentado un cambio notable en los últimos años, de tal forma que ya no sólo se busca la acción de alimentarse y disfrutar por medio de la comida, sino que también buscamos que dichos alimentos contribuyan a mejorar nuestra salud y bienestar (Gómez P. et al., 2007). Los alimentos vegetales son mundialmente considerados como saludables (Slavi J.L. y Lloyd B., 2012) además de ser un componente esencial en la dieta humana (Blekkenhorst L.C. et al., 2018; Boeing H. et al., 2012). La mayoría de países presentan recomendaciones dietéticas que promueven el consumo de frutas y verduras, contando además con el apoyo de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde donde se recomienda una ingesta diaria de 400-600 g de dichos alimentos (Rodríguez-Casado A., 2014; Parzanese M., 2012).

Son numerosos los estudios que sostienen el importante papel que juegan los alimentos vegetales en la prevención de enfermedades crónicas, enfermedades cardiovasculares (Zhan J. et al., 2015), cáncer (Wang Y. et al., 2015), diabetes (Wu Y. et al., 2015), enfermedad de Alzheimer, cataratas, etc. (Willett W.C., 2002; Collese T.S. et al., 2017; Wang X. et al., 2014; Shin J.Y. et al., 2015).

Desde el punto de vista nutricional, los alimentos vegetales proporcionan una amplia gama de nutrientes y diferentes compuestos bioactivos de interés, tales como compuestos fitoquímicos, vitaminas

(principalmente B y C), minerales y fibra (Boeing H. et al., 2012; Alissa E.M. et al., 2015; Liu R.H., 2013). Dentro de dichos compuestos fitoquímicos, también conocidos como fitonutrientes, encontramos una gran variedad, entre los que destacan los polifenoles, terpenos, resveratrol, flavonoides, isoflavonoides, carotenoides, limonoides, glucosinolatos, fitoestrógenos, fitosteroles, antocianinas, o ácidos grasos ω -3 entre otros (Santos A.P. et al., 2010; Gupta C. y Prakash D., 2014; Howes M.J. y Simmonds M.S., 2014; Nanasombat S. et al., 2015). Todos estos componentes están estrechamente relacionados con las numerosas propiedades beneficiosas para la salud que se les atribuye a los alimentos de origen vegetal, originando un mayor interés por parte de la población, lo cual se traduce en un gran aumento de su consumo (Younnus M. et al., 2020; USDA, 2011; Falguera V. et al., 2012).

En los últimos años están apareciendo nuevas formas de consumir productos tradicionales, como los derivados de frutas, verduras y hortalizas, que se están introduciendo como productos nuevos en el mercado. Un ejemplo de ello son las mezclas de jugos de vegetales y frutas o leche (también conocidos como *smoothies*), que además de mejorar el sabor de las materias primas de forma individual permiten un mejor aprovechamiento de los productos agrícolas (Bhardwaj R.L. y Pandey S., 2011). Los componentes bioactivos y el sabor de los alimentos pueden resultar afectados por los tratamientos térmicos (Cardello A. et al., 2007), por lo que muchos de estos alimentos se consumen frescos o mínimamente procesados. La demanda de productos listos para el consumo individual es cada vez mayor en nuestra sociedad.

2.1.1. Guacamole

Entre los diferentes alimentos objeto de estudio en esta tesis doctoral cabe destacar el aguacate (*Persea americana Mill.*). Este fruto presenta una gran riqueza nutricional siendo fuente de vitaminas, minerales, folatos, potasio y fibra, además de presentar una composición lipídica única (Tabeshpour J. et al., 2017; Slater G.G. et al., 1975; USDA, 2011). Dentro de los componentes vitamínicos encontramos los siguientes: β -caroteno, vitamina E, retinol, ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina y ácido fólico (Siddiq M. et al, 2012; Duarte P.F. et al., 2016; Araújo R.G. et al., 2018). También presenta altos niveles de compuestos fitoquímicos bioactivos, destacando tocoferoles, carotenoides y esteroides, los cuales poseen actividad antioxidante y de eliminación de radicales libres (Lee J. et al., 2004; Ortiz J. et al., 2018).

Uno de los productos alimenticios más populares elaborados con aguacate es el guacamole. La salsa de guacamole es originaria de la cocina mexicana, aunque actualmente se distribuye en todo el mundo y se consume de manera regular. El guacamole se obtiene de la pulpa del aguacate, y consiste en una salsa que puede ser totalmente molida o contener pequeños trozos de aguacate. La fórmula del guacamole se basa en la pulpa procesada con el mejor tratamiento que incluye la adición de antioxidantes y conservantes, mezclando las especias y condimentos necesarios en diferentes proporciones. El proceso de preparación del guacamole industrial a grandes rasgos consiste en primer lugar en la selección y lavado del fruto de aguacate maduro, su posterior corte, retirado de la semilla y pelado, homogenización de la pulpa y adicción de sal, especias, condimentos y conservantes y, por último, el envasado, etiquetado y almacenamiento (Figura 1).

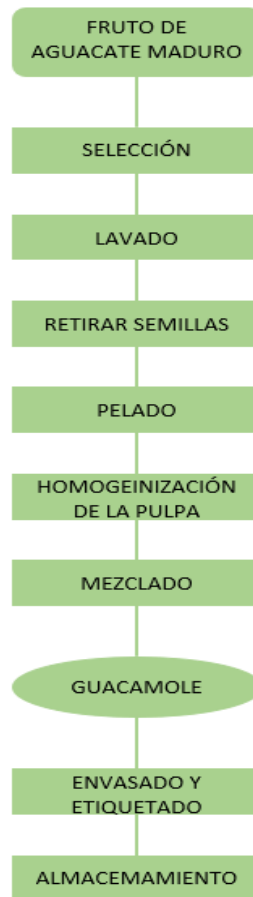


Figura 1. Obtención del guacamole. (Fuente: Elaboración propia).

Dicha salsa final, contiene pulpa de aguacate triturada mezclada con diversos condimentos tales como cebolla, pimienta, cilantro y lima. Su agradable sabor y valor nutricional hace que se haya convertido en un apreciado alimento, tanto que es fácil encontrarlo ya preparado en los supermercados. Otra de las características a su favor que presenta la salsa de guacamole es que se trata de un alimento mínimamente procesado, elaborado a partir de ingredientes de origen vegetal en crudo, lo cual le permite mantener todos los fitonutrientes existentes en dichos ingredientes además de unas propiedades sensoriales de calidad (Gómez P. et al., 2007).

2.1.2. Arándanos

Otro de los alimentos vegetales objeto de estudio son los arándanos (*Vaccinium myrtillus*). Este fruto es rico en compuestos bioactivos, representados principalmente por polifenoles del tipo flavonoides, especialmente antocianidinas y flavonoles (Wood E. et al., 2019), así como por antioxidantes, tales como vitamina C, complejo B, E y A (Silva S. et al., 2018), y ácidos fenólicos, destacando entre estos los ácidos hidroxicinámicos (Miller K. et al., 2019), lo que hace de los arándanos un alimento de gran interés para promover la salud humana.

2.1.3. Vegetales mínimamente procesados (VMP)

Como se ha comentado anteriormente para el guacamole, las principales ventajas que presentan los vegetales mínimamente procesados (VMP) en general es que, a consecuencia de no experimentar tratamientos térmicos complejos durante su procesado, mantienen la totalidad de fitonutrientes presentes en ellos y sus propiedades organolépticas (Sant'Anna P.B. et al., 2020). Los tratamientos que se llevan a cabo durante el procesamiento de dichos alimentos son técnicas físicas simples, suaves y no térmicas, tales como el lavado, troceado, desinfección y envasado (Francis G.A. et al., 1999). Esto ha originado un notable aumento en el mercado de este tipo de alimentos conocidos como "listos para consumo". Además, otro de los factores que mayor influencia ha tenido durante los últimos años sobre el aumento del consumo de VMP es la escasez de tiempo del que dispone la población en general para la preparación de alimentos (Gómez P. et al., 2007; Parzanese M., 2012).

Junto a la conservación de las propiedades organolépticas y nutricionales de los VMP, es fundamental garantizar su inocuidad. Por esto es necesario definir un proceso en el cual se controlen y minimicen todos aquellos factores que afectan o provocan cambios negativos sobre la estructura y las propiedades sensoriales, nutritivas y microbiológicas de los vegetales (Sant'Anna P.B. et al., 2020). Los tratamientos llevados a cabo durante el procesado de los VMP pueden no ser eficientes para eliminar la contaminación de dichos alimentos listos para el consumo (Gleeson E. y O'Beirne D., 2005; Aguado V. et al., 2004). Durante dicho procesamiento, el riesgo microbiológico aumenta considerablemente debido a la alteración de las barreras naturales del tejido vegetal y la contaminación cruzada (Berger C.N. et al., 2010). Además de la contaminación a partir de la recolección de los productos, esta también se puede llevar a cabo durante el cultivo de los mismos a través de la fertilización con estiércol animal, suelo y agua de riego (Seo S. y Matthews K.R., 2014; Santamaría J. y Toranzos G.A., 2003). Por lo tanto, el desarrollo de tratamientos cuya finalidad sea reducir la carga microbiana de este tipo de alimentos es crucial para garantizar la seguridad alimentaria del producto (Berger C.N. et al., 2010). Además de un correcto procesado es fundamental llevar a cabo un posterior control exhaustivo de las condiciones de almacenamiento y distribución del producto, evitando romper la cadena de frío (Khalil R.K. y Frank J.F., 2010; Hsu W.Y. et al., 2006).

La creciente popularidad del consumo de vegetales frescos unido al suministro a nivel global de dichos alimentos origina una amplia diseminación de microorganismos (patógenos o no) entre diferentes zonas geográficas, lo cual presenta un riesgo de gran magnitud (Hadjilouka A. y Tsaltas D., 2020; Liu B.T. et al., 2018; Jung Y. et al., 2014). Esto convierte a

los VMP en perfectos vehículos de microorganismos capaces de provocar enfermedades asociadas al consumo de alimentos, siendo numerosos los estudios que lo demuestran (Beuchat L.R., 1998; Critzer F.J. y Doyle M.P., 2010; Teplitski M. et al., 2011; Hoelzer K. et al., 2012).

2.2. ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.

Las enfermedades de transmisión alimentaria se originan por la ingestión de alimentos contaminados por sustancias químicas o microorganismos, principalmente patógenos bacterianos (Soto Varela Z. et al., 2016). En los últimos años han aparecido diferentes brotes de enfermedades asociadas al consumo de alimentos a consecuencia de praxis inadecuadas durante el procesado de los productos o fruto de la contaminación ambiental agravada por la influencia antrópica. Estas enfermedades se caracterizan de forma general por una serie de síntomas gastrointestinales leves (náuseas, diarrea, vómitos y dolor abdominal) aunque en algunas ocasiones pueden presentar síntomas más graves llegando incluso a ocasionar la muerte. Independientemente de la causa de dichos brotes, el resultado para la salud humana ha sido nefasto, de tal forma que dichas enfermedades de transmisión alimentaria se han convertido en un grave problema de salud pública a nivel mundial. (González E. y Carroza E., 2019).

Los microorganismos pueden sobrevivir a las operaciones de lavado y desinfección de los vegetales por diversos mecanismos: internalizados en estomas, como endófitos, formando biopelículas o bien desarrollando

formas de resistencia. Desde el punto de vista microbiológico, la seguridad alimentaria 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 (Doyle M.E., 2015). Las verduras y hortalizas pueden contener microorganismos patógenos (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Aeromonas*, ...) (Beuchat L.R., 2002; Burnett S.L. y Beuchat L.R., 2000 y 2001; Heaton J.C. y Jones K., 2008; FDA, 2009; Park S. et al., 2012) y saprofitos (como especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Rahnella*, *Pantoea*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Leuconostoc*, ...) (Al-Kharousi Z.S. et al., 2016), y algunos de dichos microorganismos (tanto patógenos como saprofitos) pueden crecer bajo refrigeración. Las frutas y sus derivados (tales como fruta troceada o en forma de pulpas, purés o salsas) también pueden contener microorganismos patógenos, causantes de brotes infecciosos (Beuchat L.R., 2002; Park S. et al., 2012).

A su vez, la seguridad alimentaria debe tener en cuenta que los alimentos frescos de origen vegetal no solo son susceptibles de transmitir microorganismos patógenos que originen enfermedades como tal en el ser humano, sino que también pueden servir como vehículo de microorganismos no patógenos portadores de genes de resistencia a agentes antimicrobianos (Liu B.T. et al., 2018). En el sector agrícola, la principal fuente de contaminación que sufren dichos alimentos se produce a través del uso de estiércol (de origen animal) o lodos de depuradora (de origen humano) en el terreno de cultivo para su fertilización y, por otro lado, mediante la aplicación de aguas residuales (tratadas o no) utilizadas

para el riego (Moodley A. y Guardabassi L., 2009; Reinthaler F.F. et al., 2010). Por lo tanto, el hecho de que los VMP, los cuales presentan una demanda creciente en su consumo como se ha mencionado anteriormente, actúen como reservorio de genes de resistencia a antimicrobianos, principalmente antibióticos, hace que el creciente problema de seguridad alimentaria que presentan se vea agravado (Zurfluh K. et al., 2015).

Tanto 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 (Quiñones Pérez D., 2017; World Health Organization, 2014). Además, este tema fue incluido, en 2016, en la 71ª sesión de la Asamblea General de las Naciones Unidas como uno de los objetivos a tratar, siendo la cuarta vez en la historia que las Naciones Unidas incluyeron un tema de salud en su agenda (Badau E., 2021). La búsqueda de soluciones frente al problema de la resistencia a antibióticos al que nos enfrentamos hace que surja el concepto de “One Health” con la finalidad de aportar una solución integral viable a partir de un enfoque global del problema. Este enfoque global del problema implica definir y estudiar las relaciones existentes entre las diferentes variables que forman parte del problema, siendo en este caso la salud humana, la salud animal, el medio ambiente y la alimentación los dominios que contribuyen a la aparición, evolución y propagación de microorganismos resistentes a los antibióticos (Aslam B. et al., 2021). El hecho de que la emergencia, transmisión y adquisición de genes de resistencia a antibióticos presentes en microorganismos esté vinculado en la interfaz humano-animal-medio ambiente, requiere, a su vez, de un abordaje multidisciplinario y coordinado, basado en los principios de “One Health”, siendo indispensable la participación en

conjunto de profesionales de la salud humana, de la salud animal y ambientales (Hernando-Amado S. et al., 2019). Por parte de la Asamblea General de las Naciones Unidas se estableció el uso inadecuado y desmesurado de antibióticos en la salud humana, la salud animal, la agricultura y la ganadería, la alimentación y la acuicultura como la principal causa de aparición de resistencias a antibióticos, con la consecuente propagación de microorganismos multirresistentes entre los microbiomas de los dominios implicados (salud humana, salud animal y medio ambiente) (Shankar P., 2016; Klein E.Y. et al 2018). El uso desmesurado de antibióticos origina una gran cantidad de residuos en dichos dominios, los cuales van a transmitirse entre sus microbiomas. Esta propagación de residuos antibióticos se ve incrementada si atendemos a un cuarto dominio, el de alimentación (Figura 2).

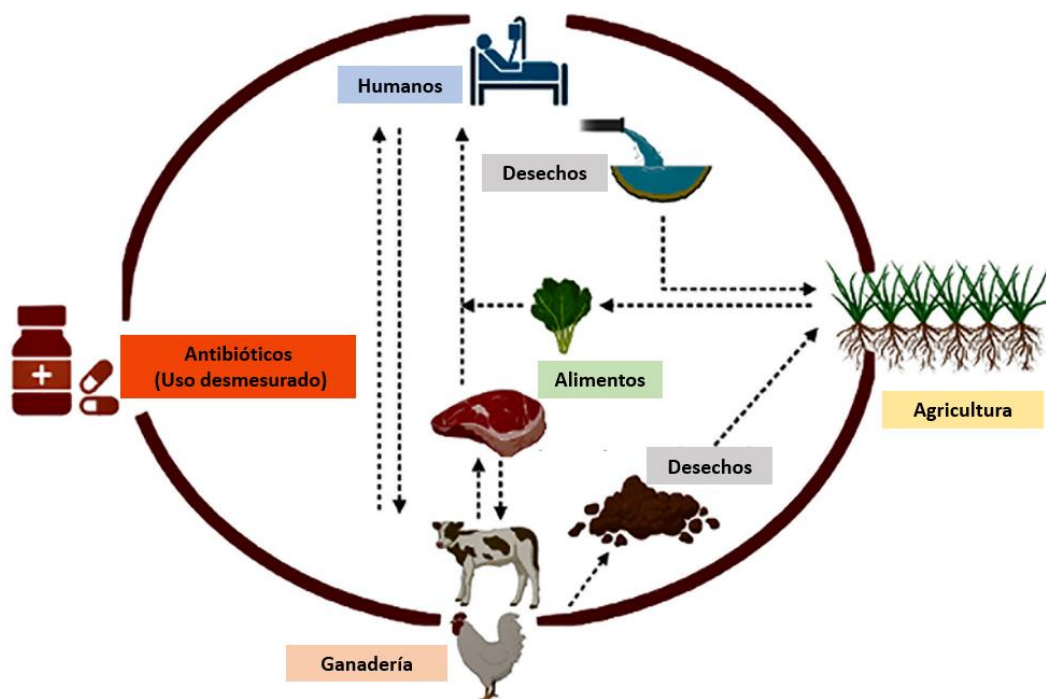


Figura 2. Transmisión de residuos antibióticos. (Fuente: Elaboración propia).

Como se ha comentado anteriormente, el crecimiento exponencial que ha experimentado la industria alimentaria a nivel mundial, tanto con la exportación de alimentos de origen animal como vegetal, unido a una mayor movilidad por parte del ser humano en todo el mundo, lo que conlleva un intercambio cultural y gastronómico, origina un aumento de dicha transmisión de genes de resistencia a antibióticos emergentes o ya existentes a través de las fronteras. Todas estas interconexiones a nivel global son abarcadas dentro del concepto “One World” (Robinson T.P. et al., 2016). Esto implica la necesidad de conocer en detalle los roles que presentan cada uno de estos dominios, de forma individual y en conjunto, atendiendo a la evolución de las bacterias resistentes, sus determinantes genéticos, las rutas de transmisión y como interactúan entre sí y con el resto de bacterias resistentes (Figura 3). Solo de esta manera se podrá hacer frente, de forma sostenible y eficaz, a esta amenaza (Harbarth S. et al., 2015).

Normalmente, han existido un grupo de antibióticos reservados para uso exclusivo humano con la finalidad de tratar enfermedades clínicas, de uso profiláctico o utilizados tras llevar acabo un tratamiento quirúrgico (Prestinaci F. et al., 2015). Por otra parte, también existen antibióticos cuyo uso se recomienda específicamente en el ámbito de la veterinaria y la salud animal, lo cual está justificado en caso de detección de posibles brotes infecciosos y no para la prevención de enfermedades en animales sanos (Landers T.F. et al., 2012).

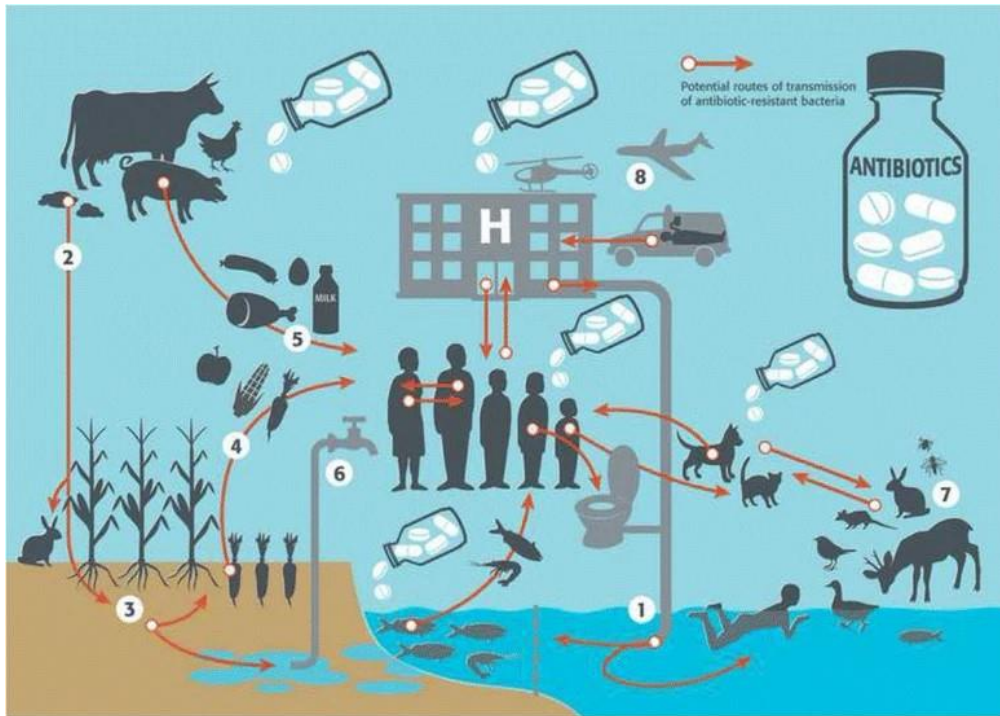


Figura 3. Posibles vías de transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos.

(Fuente: Harbarth S. et al., 2015).

Leyenda: Propagación en el medio ambiente a través de diferentes vías, como los sistemas de saneamiento del agua (1), ya que las instalaciones de tratamiento de aguas residuales no eliminan por completo las bacterias resistentes a los antibióticos antes de liberar el agua en el medio ambiente. Otra vía habitual es la aplicación de estiércol en campos con cultivos (2), donde las bacterias resistentes a los antibióticos pueden desarrollarse fácilmente en las plantas (3). La absorción de estas bacterias resistentes puede producirse a través de la cadena alimentaria, cuando los seres humanos consumen posteriormente estas plantas (4) o la carne contaminada de animales y peces que albergan bacterias resistentes (5). Como las bacterias pueden llegar fácilmente a las reservas de agua, las infraestructuras de distribución de agua también son una vía potencial para la propagación de estos gérmenes (6). Incluso la fauna, los insectos y otros animales son potenciales portadores de resistencia a los antimicrobianos (7). A través de las fronteras, el turismo, las migraciones y las importaciones de alimentos (8) son la vía más rápida de propagación de cepas bacterianas resistentes. En los centros sanitarios, las bacterias resistentes pueden propagarse por contacto entre pacientes o con el personal sanitario, o a través de superficies y dispositivos médicos contaminados.

El uso inadecuado de antibióticos se debe, en primer lugar, a que la mayoría de las clases de antimicrobianos utilizados para tratar infecciones bacterianas en humanos también se utilizan tanto en animales (animales domésticos, ganado y piscifactorías), como es el caso de las cefalosporinas de tercera generación y las fluoroquinolonas (Van Boeckel T.P. et al., 2015), como en agricultura, con el uso de la colistina, tetraciclinas y macrólidos (Vidaver A.K., 2002). Otra de las causas de mayor relevancia implicada en la resistencia a antimicrobianos y relacionada con las malas praxis en cuanto la administración de antibióticos es su uso como aditivo alimentario con la finalidad de promover el crecimiento de animales destinados a la producción de diferentes tipos de alimentos (Aslam B. et al., 2021). Son numerosos los casos en los que se lleva a cabo la administración imprudente de fármacos promotores del crecimiento en animales, sin ningún tipo de prescripción médica y durante un tiempo prolongado, lo cual facilita la aparición de nuevas resistencias a dichos medicamentos. A su vez, los microorganismos que presentan dichos genes de resistencia van a propagarse por el medio ambiente o a través de la cadena alimentaria hasta que finalmente son adquiridos por el ser humano (Prestinaci F. et al., 2015; Hoelzer K. et al., 2017; Aslam B. et al., 2018).

Entre las principales medidas destinadas a mantener la eficacia de los antimicrobianos existentes de importancia en la salud humana encontramos las siguientes, atendiendo a los diferentes dominios implicados.

-En el sector humano es fundamental minimizar el uso excesivo de antibióticos y llevar a cabo un desarrollo y mejora en el control y prevención de infecciones.

-En el sector ganadero se debe erradicar el uso de fármacos, principalmente aquellos de vital importancia en la salud humana, en todos aquellos casos que no impliquen un riesgo de infección de los animales.

-En el sector agrícola, al igual que en el ganadero, se debe erradicar el uso a largo plazo de aquellos compuestos antimicrobianos destinados a promover el crecimiento de los diferentes productos de origen vegetal, además de evitar el uso de antibióticos de interés clínico en el ser humano para el tratamiento de infecciones bacterianas de los cultivos.

Todos estos sectores se desarrollan dentro de un mismo ambiente, el cual actúa como reservorio de resistencias, tanto intrínsecas de cada dominio como adquiridas entre sí. Por lo tanto, es indispensable llevar a cabo las medidas que sean necesarias para evitar la contaminación bacteriana ambiental y, a su vez, la expansión del resistoma (o conjunto de genes de resistencia). Para esto se requiere de un tratamiento adecuado de los diferentes desechos producidos en los diferentes sectores y que confluyen en nuestro medio ambiente, como los desechos residenciales producidos por el ser humano, los desechos procedentes de la industria, principalmente la farmacéutica y todos aquellos ámbitos en los que se utilizan fármacos, de la agricultura, con el tratamiento adecuado de aguas de riego y fertilizantes y, de la ganadería, con la correcta gestión de los desechos originados por los animales (McEwen S.A. y Collignon P.J., 2018).

Por otro lado, y a un nivel más general, se establecen otra serie de acciones destinadas de igual modo a preservar la eficacia de los antibióticos de interés clínico actuales y evitar la aparición y/o propagación de nuevos genes de resistencia a dichos antibióticos. Entre estas acciones cabe destacar la regulación y política del uso de antimicrobianos, la vigilancia y

control de brotes infecciosos y el desarrollo de alternativas a los antimicrobianos (McEwen S.A. y Collignon P.J., 2018).

Los mecanismos de resistencias a antimicrobianos por parte de los microorganismos están codificados por numerosos genes, los cuales pueden transmitirse entre bacterias. En general, podemos clasificarlos en dos tipos: mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos. Por un lado, tenemos los mecanismos intrínsecos de resistencia, mediante los cuales las bacterias son capaces de resistir a la acción de los antibióticos debido a los diferentes componentes estructurales y a las características funcionales del microorganismo. Estas resistencias pueden deberse a la ausencia de estructuras diana en determinadas bacterias, como por ejemplo en el caso de los micoplasmas, que no presentan pared celular y por lo tanto no son susceptibles a las penicilinas y otros antibióticos que actúan sobre esta estructura (Taylor-Robinson D. y Bébéar C., 1997). Por otro lado, encontramos los mecanismos de resistencia adquiridos, cuyos genes de resistencia que presentan las bacterias les han sido transferidos, lo cual les permite restringir la acción de determinados antibióticos (Blair J.M. et al., 2014).

La evolución genética originada por constantes mutaciones en el material genético bacteriano actúa como una fuente de nuevos genes de resistencia que codifican para nuevos mecanismos de resistencia, los cuales son transmitidos. Dichas mutaciones son más frecuentes en aquellas bacterias, denominadas como bacterias hipermutadoras, cuyo sistema de reparación de ADN no es del todo óptimo (Oliver A. et al., 2000). La diversificación genética que se origina se ve favorecida por la presión selectiva de los antibióticos a causa de su uso inadecuado y excesivo en los últimos años, siendo numerosos los genes de resistencia que le confieren,

a las bacterias que los presentan en su código genético, la capacidad de resistencia frente a determinados antibióticos (Alós J.I., 2015). Dichos genes de resistencia codifican numerosas proteínas capaces de llevar a cabo diferentes tipos de mecanismos de resistencia. Los principales grupos de genes de resistencia a antibióticos estudiados son los beta-lactámicos, del tipo *ampC*, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{VIM}, y *bla*_{IMP}; tetraciclinas, de los grupos I [*tet(B)*, *tet(C)* y *tet(D)*], II [*tet(A)*, *tet(E)* y *tet(G)*] y III [*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* y *tet(S)*]; macrólidos, del tipo *erm(B)*, *erm(T)*, *ere(A)* y *ere(B)*; aminoglucósidos, del tipo *strA*, *strB*, *aadA*, *aphA-1AB* y *aac(6′)-Ib*; y sulfonamidas, *sul1*, *sul2* y *sul3* entre otros. También hay descritos otro tipo de genes de resistencia a biocidas derivados del amonio cuaternario, como es el caso de los genes *qacAB*, *smr*, *qacE*, *qacEΔ1*, *qacF*, *qacH* y *qacJ*, genes codificantes para inhibidores de la dihidrofolato reductasa, como *dfra12* y *dfra15*, y genes que codifican para bombas de exporte, tales como *acrB*, *mdfA*, *efrA*, *efrB*, *mdeA*, *mepA*, *norA*, *norB*, *norC*, *sdrM* y *sepA* entre otros, algunos de los cuales también son de interés para nuestro trabajo.

En cuanto a los antibióticos pueden ser definidos como cualquier molécula orgánica que inhibe el crecimiento o causa la muerte celular microbiana debido a interacciones específicas con dianas bacterianas. Estos compuestos se utilizan para tratar infecciones bacterianas debido a su efecto bacteriostático o bactericida. A su vez, existen diferentes mecanismos de defensa por parte de las bacterias frente a los antibióticos (Figura 4). Por un lado, encontramos la producción de enzimas bacterianas capaces de desactivar a los antibióticos, como es el caso de las diversas clases de beta-lactamasas. Otro mecanismo de defensa bacteriana implica la disminución de la concentración intracelular del antibiótico, ya sea

debido a la inhibición total o parcial de su entrada o al favorecer su expulsión desde el interior de la célula, de tal forma que el efecto antimicrobiano frente a este tipo de bacterias va a ser nulo o mínimo. Un último mecanismo de defensa bacteriana a destacar consiste en la modificación o alteración de la diana del antibiótico (Kakoullis L. et al., 2021).

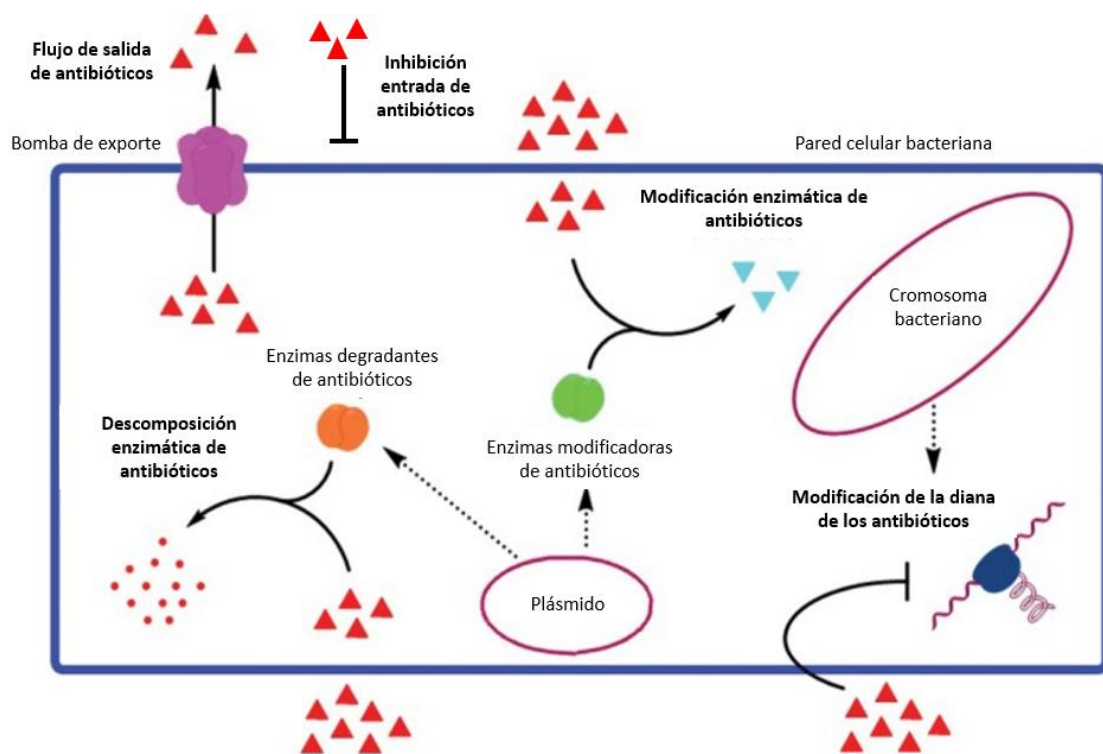


Figura 4. Mecanismos de resistencia bacteriana frente antibióticos. (Fuente: Elaboración propia).

Los alimentos de origen vegetal que se consumen crudos son un motivo creciente de preocupación, ya que la ingesta de microorganismos portadores de genes 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 (Blaak H. et al., 2014;

Bhutani N. et al., 2015). En un estudio sobre bacterias aisladas de vegetales se encontró que los mayores porcentajes de resistencia a beta-lactámicos aparecían en *Pantoea agglomerans* y *Enterobacter gergoviae* (Schwaiger K. et al., 2011). Así mismo, se ha descrito la presencia de bacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido a partir de vegetales para consumo, así como agua y suelo (representadas principalmente por las especies ambientales *Rahnella aquatilis* y *Serratia fonticola*, y en menor medida *Pantoea agglomerans*), y se han encontrado enterobacterias propias del tracto digestivo resistentes a cefalosporinas en un 2.7% de los productos vegetales adquiridos en supermercado y en un 1.3% de las muestras de lechuga Iceberg adquiridas en el campo (pertenecientes a los géneros *Citrobacter* y *Enterobacter*) (Blaak H. et al., 2014). Por otra parte, en infecciones oportunistas se han descrito cepas de estos grupos bacterianos (como *Enterobacter* spp., *Pantoea agglomerans*, y *Serratia marcescens*) resistentes a antibióticos (Markovska R.D. et al., 2014). En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, *Pantoea* fue el principal grupo encontrado en la fracción superviviente en pulpa de chirimoya tratada por altas presiones (junto con *Rahnella* y *Serratia* en mucha menor abundancia relativa), grupo que además fue capaz de proliferar durante el almacenaje del alimento en refrigeración (Pérez Pulido R. et al., 2015). En espárragos, el grupo de *Enterobacteriaceae* fue el más abundante (Toledo Del Árbol J. et al., 2016b). Los enterococos también se han detectado en estudios de biodiversidad realizados por nuestro grupo sobre pulpa de chirimoya y de espárragos, aunque en baja proporción. Sin embargo, mediante aislamiento directo pudimos detectar la presencia de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* en agua, suelo y alimentos vegetales, con incidencias variables de resistencias (Abriouel H. et al., 2008;

Burgos M.J.G. et al., 2013; Sánchez Valenzuela A. et al., 2013). Un estudio sobre enterococos de vegetales, suelo y agua de riego demostró una elevada incidencia de resistencia a ciprofloxacina (60%) y en menor medida a eritromicina, tetraciclina y kanamicina (Ben Said L. et al., 2015). Estos resultados demuestran la importancia que tiene esta bacteria como reservorio de resistencias en alimentos de origen vegetal.

Otro aspecto que despierta inquietud es el uso de biocidas, ya que podría originar resistencias cruzadas con antibióticos (Ortega Morente E. et al., 2013). El empleo intensivo de biocidas en la industria alimentaria, en ambientes clínicos y en el ámbito doméstico, genera múltiples oportunidades para la aparición de cepas adaptadas a diferentes tipos de agentes antimicrobianos. En bacterias Gram-negativas se han descrito genes de resistencia a biocidas codificados por plásmidos, como *qacE*, *qacEΔ1*, *qacF* y *qacG*. De ellos, *qacEΔ1* parece estar ampliamente diseminado (*Pseudomonas* sp., *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., *Enterobacter cloacae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas* spp., *Morganella morganii*, *P. stuartii*, *Proteus vulgaris*), asociándose con el fenotipo de resistencia a antibióticos ASSuT (ampicilina, estreptomina, sulfamidas, tetraciclina) al menos en *Salmonella* (De Toro M. et al., 2011). En bacterias Gram-positivas, los principales genes descritos incluyen *qacA*, *qacB* y *qacC* (*smr*), casi todos ellos en *S. aureus* (Ortega Morente E. et al., 2013). El tratamiento repetido con biocidas en la industria alimentaria puede seleccionar la implantación de cepas tolerantes a los mismos, así como a otros tratamientos físicos y químicos (Taormina P.J. y Beuchat L.R., 2001; Holah J.T. et al., 2002). Más preocupante aún es la aparición de cepas tolerantes a biocidas que

muestran también resistencia a antibióticos de uso clínico como ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina, nitrofurantoina y otros (Nikaido H., 1998; Braoudaki M. y Hilton A.C., 2004; Karatzas K.A. et al., 2007; Randall L.P. et al., 2004 y 2007; Middleton J.H. y Salierno J.D., 2013).

En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en la Universidad de Jaén sobre aislados procedentes de alimentos ecológicos, se encontraron bajos porcentajes (0,3-5%) de cepas tolerantes a biocidas, si bien casi todas ellas eran también resistentes a algún antibiótico. La mayoría pertenecían a *Pantoea* sp. y *Enterobacter* sp., seguido de *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella oxytoca* y *Salmonella* (Fernández-Fuentes M.A. et al., 2012). Además de portar genes de resistencias a antibióticos, también se detectaron genes de resistencia a biocidas como *qacAB*, *qacC*, *qacE*, *qacEΔ1* y *qacJ* (Fernández-Fuentes M.A. et al., 2014a y 2014b).

2.3. ALTA PRESION HIDROSTÁTICA (APH)

Centrándonos en nuestros alimentos objeto de estudio y volviendo al tema de la seguridad alimentaria, existen estudios que han relacionado la salsa de guacamole fresca con brotes de enfermedades asociadas a su consumo en Estados Unidos (Kendall M.E. et al., 2013). La aplicación de tratamientos no térmicos, que nos permitan mantener las propiedades nutricionales y organolépticas del producto, pero a su vez, nos garanticen la reducción de la carga microbiana y la concentración de microorganismos resistentes presentes en los alimentos, es esencial para mejorar la

seguridad del producto y su vida útil. Dentro de este tipo de técnicas aplicadas en alimentos destaca los tratamientos con altas presiones hidrostáticas como métodos de conservación, cuya aplicación ha experimentado un crecimiento exponencial en la última década (Considine K.M. et al., 2008; Corbo M.R. et al., 2009; Rendueles E. et al., 2011; Balasubramaniam V.M. et al., 2015; Georget E. et al., 2015; Aganovic K. et al., 2021). El Comité Asesor Nacional de Estados Unidos sobre Criterios Microbiológicos para Alimentos ha incluido APH como una técnica de pasteurización no térmica que puede reemplazar a la pasteurización tradicional. Por otro lado, la agencia de Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos también han aprobado oficialmente el uso de APH para alimentos (Barbosa-Cánovas G.V. y Juliano P., 2008).

Este tipo de tratamiento se lleva a cabo en una máquina de grandes dimensiones específica de altas presiones (Figura 5) y consiste en sumergir un producto bajo el agua, la cual actúa como medio de transferencia de presión, y someterlo en un circuito cerrado a una presión hidrostática de entre 100-600 megapascuales (MPa) dentro de un recipiente resistente a alta presión. El producto se envasa de forma hermética, comúnmente al vacío, y se mantiene bajo presión durante ciertos tiempos, hasta la descompresión (Balasubramaniam V.M. et al., 2015).



Figura 5. Máquina altas presiones de la Universidad de Jaén. (Fuente: Elaboración propia).

Para los tratamientos se deben tener en cuenta varios factores a la hora de seleccionar los materiales de embalaje de los productos. El envase debe poseer la capacidad de soportar las presiones operativas, suficiente termosellabilidad, suficiente capacidad de protección para evitar el deterioro de la calidad de los alimentos durante el tratamiento y elasticidad en al menos un lado del envase para facilitar la transmisión de la presión. Las bolsas, latas, bandejas y botellas poliméricas blandas son materiales de embalaje comúnmente utilizados para productos alimenticios tratados con APH. Los materiales de embalaje rígidos hechos de metal y vidrio no son adecuados para este tipo de tratamiento, ya que son propensos a deformarse y romperse bajo alta presión. Como se ha mencionado anteriormente, el envasado al vacío es el tipo de envasado más común utilizado para los productos tratados con APH, ya que el aire residual en un

envase sellado posee una mayor compresibilidad en comparación con el producto alimenticio dentro del envase. Dado que la exposición a altas presiones puede conducir a la deformación del paquete, el envasado al vacío puede reducir la presión física innecesaria ejercida sobre el paquete por los gases del interior del mismo (Ayvaz H. et al., 2016).

La técnica de APH se rige bajo dos principios básicos, el principio isostático y el principio de Pascal, los cuales determinan la aplicación uniforme de presión sobre los productos alimenticios en el recipiente sellado. Según el principio isostático, cuando se aplica presión a un medio líquido en un entorno cerrado, los objetos que se encuentran en cualquier punto del entorno reciben la misma presión, independientemente de su forma o tamaño. El principio de Pascal establece que el cambio de presión causado por la aplicación de una fuerza externa a un fluido en reposo en un recipiente cerrado se transmite uniformemente y sin pérdida a cada porción del fluido y a las paredes del recipiente (Huang H.W. et al., 2020). El hecho de que el producto a tratar esté dentro de un recipiente sellado impide su contacto directo con los dispositivos de procesamiento, lo que evita la contaminación secundaria de los alimentos después de ser tratados. Además, el aumento de presión durante el tratamiento genera calor de compresión en el medio de transmisión, lo que provoca un aumento de temperatura dentro de la cámara. Cuando se utiliza agua pura como medio de transmisión, un aumento de 100 MPa en la presión conduce a un aumento de aproximadamente 3°C en la temperatura del agua. Para evitar este aumento de temperatura a la que se sometería el producto, los sistemas de APH generalmente están equipados con un sistema de almacenamiento de agua a una temperatura controlada entre 5 y 10 °C, lo que permite la introducción de agua a baja temperatura en la cámara

presurizada durante el procesamiento. En consecuencia, la temperatura dentro de la cámara se puede mantener por debajo de los 30°C incluso cuando la presión haya alcanzado los 600 MPa, de tal forma que los sabores naturales de los productos alimenticios no se verán afectados por un aumento de la temperatura (Muntean M.V. et al 2016).

Esta tecnología de APH garantiza la seguridad microbiana de los alimentos sin la adición de conservantes y permite que los alimentos procesados mantengan los sabores naturales y el valor nutricional del producto en fresco (Huang H.W. et al., 2017). Esto se debe a que este tipo de técnica no térmica solo influye en los enlaces no covalentes, como los enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y enlaces hidrofóbicos, induciendo cambios en las propiedades fisicoquímicas y actividades funcionales de macromoléculas de productos alimenticios, e incluso puede originar la desnaturalización de proteínas, desactivación de enzimas e inactivación de microorganismos. Por el contrario, los compuestos de bajo peso molecular, como los compuestos volátiles, los pigmentos, las vitaminas y otros compuestos relacionados con los aspectos sensoriales, nutricionales y que promueven la salud, como polifenoles y flavonoides (los cuales poseen una alta actividad antioxidante, protegiendo al organismo del daño oxidativo), no se ven tan afectados por tratamientos con APH (Martínez-Monteagudo S.I. y Saldana M.D., 2014; Chaikham P. y Prangthip P., 2015).

Los principales objetivos al llevar a cabo un tratamiento de APH sobre un producto alimentario son, por un lado, la eliminación de microorganismos, como bacterias, virus y parásitos de interés para la salud humana, y por otro lado la extensión de su vida útil, mediante la inactivación de microorganismos e inactivación parcial de enzimas (Huang H.W. et al., 2014). Además, los tratamientos por APH resultan muy

adecuados para la conservación de determinados alimentos vegetales (como jugos, extractos, cremas o salsas), por el bajo impacto que tienen sobre los nutrientes y las propiedades organolépticas del alimento. En frutas y vegetales, permiten inactivar microorganismos y enzimas y prolongar la vida útil del producto a la vez que mantiene sus propiedades organolépticas, sensoriales y nutritivas, y conservan los componentes bioactivos de los alimentos, lo que resulta de gran interés en el desarrollo de alimentos funcionales (Rastogi N.K. et al., 2007; Lopes M.L. et al., 2010). Estos tratamientos se aplican a nivel industrial en el procesado de numerosos productos vegetales, incluyendo salsa de guacamole, zumos de frutas y smoothies (Oey I. et al., 2008; Keenan D. et al., 2012; Vega-Gálvez et al., 2014; Jiménez-Sánchez C. et al., 2016; Pinela J. y Ferreira I.C., 2015). Son numerosos los estudios realizados sobre los efectos de los tratamientos de APH en la carga microbiana, los aspectos bioquímicos y sensoriales o la actividad polifenoloxidasas en el guacamole o la pasta de aguacate (López-Malo A. et al., 1998; Palou E. et al., 2000; Jacobo-Velázquez D.A. et al., 2010; Jacobo-Velázquez D.A. et al., 2011). Además, estudios anteriores realizados en medios de cultivo o en otros sistemas alimentarios han demostrado que la eficacia de los tratamientos de APH puede aumentar en combinación con calor moderado (Patterson M.F., et al., 1998; Krebbers B. et al., 2003; Moerman F. et al., 2001; Murano E.A. et al., 1999; Evelyn y Silva F.V.M., 2019). Sin embargo, no se ha encontrado ningún informe publicado previo al desarrollado en nuestro proyecto (Rodríguez-López J. et al., 2020) sobre la aplicación de APH en combinación con calor en el guacamole. Mejorar la eficacia de los tratamientos con APH puede ser importante para reducir la fracción microbiana superviviente que a menudo permanece en las muestras tratadas. La fracción microbiana superviviente en las muestras

tratadas con APH merece mayor atención, no sólo porque estos microorganismos activos podrían proliferar y estropear el producto tratado en condiciones inadecuadas (como, por ejemplo, la interrupción de la cadena de frío) reduciendo así su vida útil, sino también por el riesgo de transmisión de rasgos no deseados, como la resistencia a los antimicrobianos, a través del producto tratado. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria es esencial definir las mejores condiciones de tratamiento con APH para reducir tanto la carga microbiana como la concentración de cepas multirresistentes presente en alimentos.

También existen estudios sobre la aplicación de tratamientos de APH en el procesado de otros alimentos como por ejemplo jugo de brócoli (Mandelová L. y Totusek J., 2007), calabaza (Zhou L. et al., 2014a; González-Cebrino F. et al., 2015) o pepino (Zhao L. et al., 2014b). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se centran en las propiedades físico-químicas o en la inactivación de patógenos en el producto tratado. El impacto de los tratamientos por APH en la biodiversidad microbiana de los alimentos y en la resistencia a antibióticos es un aspecto escasamente estudiado. Tampoco se han hecho estudios en profundidad sobre las poblaciones que proliferan en los alimentos tratados durante la vida útil del producto, algunas de las cuales pueden alcanzar concentraciones elevadas a medida que se aproxima la fecha de caducidad. Esta cuestión es fundamental, debido a que a los tratamientos por APH pueden sobrevivir células con daños subletales, así como mutantes resistentes a la presión (como es el caso de *E. coli*; Gänzle M. y Liu Y., 2015).

Nuestro grupo de investigación adquirió en 2010 un equipo de altas presiones, que le ha permitido mejorar su experiencia previa en la aplicación de esta tecnología en la inactivación de microorganismos patógenos en

alimentos (como cárnicos, en combinación con enterocina AS-48; Ananou S. et al., 2010) y abordar nuevos temas como la estabilización por APH de alimentos parcialmente fermentados como la aceituna Aloreña de cámara (Abriouel H. et al., 2014), la inactivación de *Salmonella* en tortilla de patata (Toledo Del Árbol J. et al., 2012) o de *S. aureus* resistentes a meticilina en arroz con leche (Pérez Pulido R. et al., 2012). También se ha trabajado en la inactivación de bacterias patógenas y toxigénicas en zumos y pulpas de frutas mediante tratamientos por APH, determinando el efecto potenciador de la bacteriocina AS-48 frente a patógenos en los tratamientos combinados. Los resultados obtenidos indican una eficacia elevada de los tratamientos por APH en la inactivación de patógenos, pero también la presencia de una fracción superviviente importante (dependiente de la intensidad del tratamiento), capaz de proliferar en los alimentos tratados. Mediante pirosecuenciación, se ha determinado el efecto de los tratamientos por APH en la biodiversidad bacteriana de pulpa de chirimoya, mango, zumo de melocotón, así como en espárragos, y los cambios que se producen en la misma durante el almacenaje bajo refrigeración (Pérez Pulido R. et al., 2015; Toledo Del Árbol J. et al., 2016b; López Aguayo M.D.C. et al., 2016). Este tipo de aproximación fue pionera en su momento en cuanto que permite conocer los cambios que se producen en la microbiota de los alimentos después del tratamiento. No obstante, y dado que muchos de los microorganismos detectados podrían ser portadores de genes de resistencias o corresistencias a antimicrobianos (como antibióticos de uso clínico y/o a biocidas), es importante ampliar el estudio y caracterizar la fracción superviviente a los tratamientos por APH, y en especial la microbiota que prolifera durante la vida útil del alimento refrigerado.

2.4. BACTERIOCINA

El uso tradicional de conservantes químicos en alimentos supone un riesgo para la salud humana, lo cual es algo de lo que cada vez la población en general es más consciente, por lo que el uso de conservantes naturales se está abriendo paso dentro de las diferentes industrias alimentarias. Otro tipo de método de conservación de alimentos que nos permita mantener las propiedades nutricionales y organolépticas del producto, y que, a su vez, nos garantice su seguridad y la prolongación de su vida útil sería el tratamiento con bacteriocina. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosómica, producidos por determinadas cepas bacterianas, y que pueden ser degradados por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal de los mamíferos, por lo que pueden considerarse como bioconservantes alimentarios seguros (Mills S. et al., 2011). Dichos péptidos pueden matar a otras bacterias que estén estrechamente relacionadas (espectro estrecho) o distantes (espectro amplio) con la bacteria productora (Cotter P. D. et al., 2005). En cuanto al tratamiento con este tipo de bioconservantes, se puede llevar a cabo con preparaciones de bacteriocina producidas ex situ, o mediante la inoculación con la cepa bacteriana productora de bacteriocina en condiciones que favorezcan la producción de bacteriocina in situ (Cleveland J. et al., 2001).

Los distintos tipos de bacteriocina han sido clasificados de diferentes formas, adaptando una primera clasificación establecida por Klaenhammer T. R., en 1993. Según la reciente clasificación propuesta por Alvarez-Sieiro P. et al., en 2016, atendiendo a los mecanismos de biosíntesis y su actividad biológica, encontramos, a grandes rasgos, 3 clases de bacteriocinas, siendo cada clase a su vez subdividida en subclases:

- Clase I → Pequeños péptidos (<10 kDa), modificados y termoestables.
- Clase II → Pequeños péptidos no modificadas y termoestables.
- Clase III → Péptidos más grandes (>10 kDa) y termolábiles.

Por lo general, las bacteriocinas, una vez son excretadas extracelularmente por la bacteria que las produce, presentan un mecanismo de acción bactericida, con o sin lisis celular, o bacteriostático, inhibiendo el crecimiento celular, frente a otras bacterias con posible potencial patógeno y/o alterante (da Silva Sabo S. et al., 2014). Las principales características de estos péptidos son su estabilidad a pH ácido y a altas temperaturas, lo cual hace que sean de interés para las industrias alimentarias ya que estos compuestos van a resistir a los diferentes tratamientos térmicos que se lleven a cabo en los alimentos además de a las matrices ácidas que presenten determinados alimentos (Chen H. y Hoover D., 2003). También cabe mencionar que, por su naturaleza proteica, las bacteriocinas, una vez son ingeridas por el ser humano en conjunto con el alimento, van a resistir a los ácidos que se excretan en el estómago para llevar a cabo la digestión del alimento, pero una vez lleguen al tracto intestinal, dichas proteínas van a ser desnaturalizadas por las proteasas presentes (Therdtatha P. et al., 2016). Además de su grado de estabilidad a pH bajos y al calor, otras propiedades tales como su actividad a bajas concentraciones y un amplio espectro de acción, son importantes de cara al interés por ser utilizadas como agentes antimicrobianos y conservantes (Wu C.W. et al., 2004).

La bacteriocina con la que se han llevado a cabo los tratamientos de nuestro alimento objeto de estudio pertenece al grupo de las enterocinas,

las cuales son producidas por distintos tipos de enterococos. Se trata de la enterocina AS-48, la cual es una bacteriocina cíclica de clase IIc, producida por *E. faecalis* y que presenta actividad bactericida contra un gran número de bacterias Gram-positivas de importancia en alimentos como *Listeria*, *Bacillus* y *Clostridium* sp. (Lucas R. et al., 2006; Grande Burgos M.J. et al., 2014). Esta bacteriocina ha sido muy estudiada en nuestro grupo de investigación durante los últimos años, de tal forma que podemos confirmar su gran estabilidad a pH ácidos y a altas temperaturas, lo cual le confiere un alto potencial para ser utilizada para el tratamiento de diversos tipos de alimentos (Muñoz A. et al., 2007).

2.5. BIODIVERSIDAD MICROBIANA

Los tratamientos de APH influyen en la diversidad bacteriana que conforman la microbiota de los alimentos y en la dinámica de las poblaciones microbianas durante el almacenamiento de dichos alimentos tratados (Toledo Del Árbol J. et al., 2016a). Una de las principales preocupaciones que limitaría la vida útil de los alimentos tratados es la proliferación de las poblaciones bacterianas que sobreviven en dichas muestras tratadas durante su almacenamiento. Por lo tanto, el estudio de los cambios en las poblaciones microbianas tras el tratamiento con APH y durante el almacenamiento de los productos tratados es muy importante para comprender la efectividad del tratamiento y determinar las mejores condiciones de almacenamiento (Toledo Del Árbol J. et al., 2016b). La dinámica de las poblaciones microbianas presentes en los alimentos se puede monitorear con un alto nivel de sensibilidad mediante técnicas de

secuenciación masiva, con el fin de examinar las poblaciones microbianas dominantes y minoritarias presentes en el alimento tras ser tratado con APH y en los diferentes tiempos durante su almacenamiento (Ercolini D., 2013). Además, este tipo de técnicas también nos permiten realizar una comparación de la biodiversidad microbiana presente en el alimento dependiendo del tipo de almacenamiento que se lleve a cabo, lo cual nos permite establecer la temperatura de refrigeración óptima a la cual almacenar un alimento determinado con la finalidad de obtener un tiempo de vida útil lo más prolongado posible (Pérez-Pulido R. et al., 2015). El uso de técnicas de secuenciación de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés High-Throughput Sequencing) permite el estudio de la ecología microbiana y la diversidad taxonómica a alta resolución y puede revelar, con un mayor potencial, una microbiota no cultivable de forma tradicional en medios de cultivo (Cocolin L. y Ercolini D., 2015).

No se han encontrado estudios previos al desarrollado en nuestro proyecto (Rodríguez-López J. et al., 2020) basado en técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés Next-Generation Sequencing) sobre el impacto de los tratamientos de APH en la diversidad bacteriana del guacamole. Por lo tanto, la caracterización de la composición microbiana de la fracción superviviente nos arroja luz sobre los cambios en las poblaciones microbianas del guacamole que se producen tras la aplicación de los tratamientos con APH y los posibles cambios en la fracción superviviente que pueden producirse durante el almacenamiento.

2.5.1 Metagenómica. Secuenciación masiva.

La secuenciación masiva de alto rendimiento (HTS) o secuenciación de nueva generación (NGS) ha cambiado la forma en que se estudia la microbiología de los alimentos, permitiendo la exploración de la microbiota total y el metagenoma (Mardis E.R., 2008; Mehdi Kchouk et al., 2017). Su potencial con las nuevas herramientas bioinformáticas es enorme, lo que permite abrir un amplio campo de investigación como los estudios de la población microbiana presente en una muestra o los estudios de genómica comparativa y el descubrimiento de genes de interés (Quijada N.M. et al., 2020; Suárez Moya A., 2017). Tradicionalmente, los estudios de caracterización microbiana de una muestra se basan en el aislamiento de los microorganismos en medios de cultivo y la purificación de su ADN, o en la extracción directa del ADN de la muestra. HTS presenta una serie de ventajas respecto a la caracterización tradicional de la biodiversidad bacteriana (Bokulich N.A. y Mills D.A., 2012; Ercolini D., 2013), ya que es independiente del cultivo, requiere poco ADN de la muestra, tiene suficiente profundidad para identificar microorganismos poco representados y permite el estudio simultáneo de varias muestras a bajo coste y en poco tiempo (Hernández M. et al., 2020; Song E.J. et al., 2018). Un experimento de secuenciación masiva se compone de 4 pasos principales: la extracción del ADN de la muestra, la preparación de las librerías de ADN, la secuenciación propiamente dicha y el análisis bioinformático y la interpretación de los resultados (Kumar K.R. et al., 2019). Tras la extracción del ADN y antes de introducir una muestra en el secuenciador, es necesario preparar las librerías. Para ello, se fragmenta el ADN o se amplifican fragmentos de ADN específicos mediante PCR. Posteriormente, estos fragmentos de ADN se marcan para poder

secuenciar múltiples muestras al mismo tiempo. Una vez finalizada la secuenciación, se obtiene un archivo de datos FASTQ. A partir de este archivo FASTQ, se realiza un filtrado de calidad, en el que se deben evaluar diferentes parámetros como el phred, la longitud, el contenido de GC, los primers, los códigos de barras, etc. (Mayo B. et al., 2014). La etapa de análisis de datos implica una serie de pasos: análisis primario (generación y control de calidad), análisis secundario (alineación sobre bases de datos específicas y ensamblaje de referencia o de novo) y análisis terciario (generación de datos a partir de los resultados de la etapa de análisis secundario: anotación, búsqueda de mutaciones puntuales o SNPs, determinantes de resistencia, etc.) (Goldfeder R.L. et al., 2017).

De las numerosas aplicaciones que se pueden llevar a cabo con el uso de dichas técnicas descritas, cabe destacar las siguientes, las cuales son de interés para nuestro proyecto.

-Por un lado, la aplicación de HTS sería útil, como se ha mencionado anteriormente, para caracterizar la población microbiana de cualquier alimento objeto de estudio.

-También nos permitiría establecer, con mayor rapidez y profundidad, las posibles variaciones en la población microbiana, tanto en carga bacteriana como en diversidad (de Filippis F. et al., 2021), provocadas por los diferentes tratamientos de alta presión realizados.

-Además, sería posible comparar la composición microbiana de las diferentes muestras (tratadas o no) a lo largo de su tiempo de almacenamiento, realizando estudios seriados que nos proporcionarían una gran cantidad de información de interés sobre la evolución de la diversidad bacteriana presente en los alimentos (Bottari B. et al., 2020).

Para ello, se llevaría a cabo lo que se conoce como "secuenciación dirigida". Esta técnica consiste en secuenciar pequeños fragmentos de ADN específicos de cada bacteria presente en una muestra. Estos genes específicos, conocidos como "relojes moleculares" (en las bacterias el gen 16S rRNA), se amplifican previamente por PCR antes de la secuenciación. De la secuenciación masiva se obtiene un archivo, en formato FASTQ, con todas las "lecturas" de las secuencias presentes en la muestra. El análisis de los datos obtenidos permitirá conocer la composición microbiana de cada muestra. El resultado será la representación en taxones de lo que se conoce como unidades taxonómicas operativas (OTU) y que se obtienen agrupando secuencias idénticas con un 97-99% de identidad (Laiola M. et al., 2020).

-Otra aplicación de interés utilizando técnicas de secuenciación masiva y metagenómica, serían la caracterización de genomas completos de cepas bacterianas de interés (multirresistentes), lo que permitiría descubrir nuevos determinantes de resistencia a antibióticos (Milanović V. et al., 2020) o confirmar la presencia de genes de resistencia a antibióticos ya conocidos a través de la genómica comparativa (Pasolli E. et al., 2020).

Para ello, se llevaría a cabo lo que se conoce como "secuenciación por disparo". Esta técnica consiste en la secuenciación completa del genoma de las bacterias tras una fragmentación aleatoria previa de su ADN total. La fragmentación del ADN microbiano puede realizarse por métodos físicos o bioquímicos y el ADN debe ser previamente purificado, ya que este método es muy susceptible de contaminación. Tras la secuenciación, se obtiene un archivo, en formato FASTQ, con las secuencias o "reads", que serán filtradas según su calidad. Las secuencias seleccionadas se ensamblan en unidades mayores o "contigs", obteniendo como resultado final, en formato FASTA, un borrador del genoma formado por varios contigs que

cubren el 95-99% del genoma. Este documento abre un amplio abanico de posibilidades a la hora de realizar diferentes análisis de metagenómica, ya que proporciona información sobre todas las funciones moleculares codificadas en el genoma (De Angelis M. et al., 2020).

Quijada N.M. et al., en 2020 explican ambas técnicas, la "secuenciación dirigida" (del inglés targeted sequencing) y la "secuenciación por disparo" (del inglés shotgun sequencing).

La secuenciación masiva ha demostrado ser una herramienta útil para determinar la biodiversidad y la abundancia de genes de resistencia a antimicrobianos en diferentes ambientes, como fangos activados (Zhang T. et al., 2011), aguas residuales (Karkman A. et al., 2016), agua potable (Shi P. et al., 2013), suelo (Monier J.M. et al., 2011; Hu H.W. et al., 2015), o las excretas de humanos y animales (van Schaik W., 2015; Ma L. et al., 2015). Sin embargo, apenas existen estudios sobre la aplicación de tecnologías de secuenciación masiva en el estudio de biodiversidad en alimentos de origen vegetal, como los realizados por Leff J.W. y Fierer N., en 2013; Jackson C.R. et al., en 2013; Dees M.W. et al., en 2015; y Ottesen A.R. et al., en 2014; o los publicados por nuestro grupo (Pérez Pulido R. et al., 2015; Toledo Del Árbol J. et al., 2016a y 2016b). Tampoco se han encontrado estudios sobre resistomas en alimentos de origen vegetal.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

La exposición a sustancias antimicrobianas de diverso tipo contribuye a que los microorganismos, con independencia de su poder patógeno, tiendan a desarrollar y acumular mecanismos de resistencia. También acumulan resistencias cruzadas, en las que un mismo mecanismo molecular proporciona protección frente a diferentes tipos de antimicrobianos, y co-resistencias, en las cuales un agente antimicrobiano puede seleccionar resistencia a otro no relacionado si los determinantes genéticos de ambos están ligados físicamente.

Dado que los alimentos de origen vegetal están expuestos a contaminación con microorganismos procedentes de ambientes bióticos y abióticos donde se emplean agentes antimicrobianos (bien sean antibióticos o biocidas), cabría esperar que puedan actuar como portadores de bacterias resistentes o multirresistentes. Puesto que muchos de estos alimentos se consumen crudos o poco procesados, existe un riesgo potencial de transmisión de bacterias portadoras de genes de resistencia.

Los tratamientos por altas presiones (APH) son útiles para mejorar la calidad microbiológica de los alimentos, rebajando la carga microbiana y prolongando su vida útil, cabría esperar que contribuyan también a mejorar la seguridad de los alimentos de forma indirecta reduciendo la carga de microorganismos portadores de genes de resistencia a antimicrobianos

Como objetivo general de la Tesis, se plantea conocer la biodiversidad bacteriana y el resistoma en materias primas de origen

vegetal destinadas a la elaboración de alimentos mínimamente procesados listos para consumo y mejorar su seguridad disminuyendo la carga de microorganismos portadores de genes de resistencia, mediante tratamientos por alta presión hidrostática o en algún caso con la combinación con bacteriocina. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

1.-Conocer la biodiversidad bacteriana de tres alimentos de origen vegetal listos para consumo: dos alimentos procesados (salsa de guacamole y aliño), y una fruta (arándanos).

2.-Conocer el efecto de los tratamientos por altas presiones en la biodiversidad bacteriana de los alimentos procesados objeto de estudio (guacamole y aliño) y el efecto de los tratamientos con bacteriocina en los arándanos, así como los cambios posteriores en la biodiversidad durante el almacenaje bajo refrigeración de los alimentos procesados.

3.-Determinar la presencia de cepas multirresistentes a diferentes antibióticos y biocidas antes del tratamiento por altas presiones y durante el almacenamiento de las muestras tratadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES.

Medios de cultivo.

A continuación, se detallan los medios de cultivos, tanto generales como selectivos que se han utilizado en los diferentes experimentos.

Caldo Tripticaseína de Soja (Tryptic Soy broth, TSB)

Este medio de cultivo líquido fue empleado para el cultivo general de bacterias. El preparado comercial deshidratado (Scharlab) se disolvió a razón de 30 g/L de agua destilada. Su composición es la siguiente (g/L):

Peptona de caseína.....	17
Peptona de soja.....	3
Cloruro sódico.....	5
Fosfato dipotásico.....	2,5
Dextrosa.....	2,5
pH final a 25 °C, 7,3 ±0,2	

Agar Triptona y Soja (Tryptic Soy agar, TSA)

Este medio de cultivo sólido fue empleado para el crecimiento general de bacterias y el recuento de células viables. El preparado comercial deshidratado (Scharlab) se disolvió a razón de 40 g/L de agua destilada. Su composición es la siguiente (g/L):

Peptona de caseína.....	15
Peptona de soja.....	5
Cloruro sódico.....	5
Agar.....	15
pH final a 25 °C, 7,3 ±0,2	

Agar MacConkey

Este medio de cultivo selectivo y diferencial se utilizó para aislamiento de enterobacterias, principalmente *Salmonella* y bacterias coliformes, presentes en las muestras de alimentos utilizadas. El preparado comercial deshidratado (Scharlab) se disolvió a razón de 51,5 g/L de agua destilada. Su composición es la siguiente (g/L):

Digerido pancreático de gelatina.....	17
Peptona de carne.....	1,5
Peptona de caseína.....	1,5
Lactosa monohidrato.....	10
Sales biliares.....	1,5
Cloruro sódico.....	5
Rojo neutro.....	0,03
Cristal violeta.....	0,001
Agar.....	15
pH final a 25 °C, 7,1 ±0,2	

Agar Eosina-Azul de Metileno (Eosina Methylene Blue Agar, EMB Agar).

Este medio de cultivo selectivo y diferencial se utilizó para el cultivo, aislamiento y recuento de bacterias coliformes. El preparado comercial deshidratado (Scharlab) se disolvió a razón de 37,5 g/L de agua destilada. Su composición es la siguiente (g/L):

Peptona.....	10
Lactosa.....	10
Fosfato dipotásico.....	2
Eosina amarilla.....	0,4
Azul de metileno.....	0,065
Agar.....	15
pH final a 25 °C, 7,1 ±0,2	

Agar glucosa de levadura con adición de cloranfenicol (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar, YGC)

Este medio de cultivo se utilizó para aislamiento selectivo y recuento de levaduras y hongos. El preparado comercial deshidratado (Sigma Aldrich) se disolvió a razón de 40 g/L de agua destilada. Su composición es la siguiente (g/L):

D(+)-glucose.....	20
Agar.....	14,9
Extracto de levadura.....	5
Cloranfenicol.....	0,1

pH: 6.6 ± 0.2 at 25 °C.

Agar Mueller-Hinton (Medio Deshidratado, MH)

Este medio de cultivo se utilizó para llevar a cabo los ensayos de resistencia a antibióticos. El preparado comercial deshidratado (PanReac AppliChem) se disolvió a razón de 21 g/L de agua destilada. Su composición es la siguiente (g/L):

Almidón.....1,5

Infusión de Carne.....2

Peptona de Caseína Hidrolizada.....17,5

Agar.....17

pH: $7,4 \pm 0,2$

Agar Verde Brillante (Brilliant Green Agar, BGA)

Este medio de cultivo selectivo y diferencial se utilizó para el aislamiento de *Salmonella*. El preparado comercial deshidratado (Scharlab) se disolvió a razón de 53 g/L de agua destilada. Su composición es la siguiente (g/L):

Peptona de carne.....5

Peptona de caseína.....5

Cloruro sódico.....5

Extracto de levadura.....3

Lactosa.....	10
Sacarosa.....	10
Rojo fenol.....	0,08
Verde brillante.....	0,0125
Agar.....	15
pH final a 25 °C, 6,9 ±0,2	

4.2. MÉTODOS.

4.2.1. Alimentos objeto de estudio.

Se han utilizado 3 alimentos diferentes para llevar a cabo los distintos estudios desarrollados durante la tesis.

Por un lado, la salsa de guacamole, elaborada por una empresa local que se encarga de fabricar dicho producto. La producción de la salsa de guacamole se lleva a cabo a partir de pasta de aguacate, como ingrediente principal, junto con otros ingredientes de aderezo que cumplen la normativa para el guacamole mediterráneo del sur de España. Además, el producto no fue sometido a ningún tratamiento de calor o presión. El guacamole nos fue proporcionado justo después de su elaboración y, durante su transporte al laboratorio, fue conservado en hielo. Una vez recibimos el producto este fue almacenado en una cámara fría a 4°C para ser procesado al día siguiente. Justo antes de la aplicación de los diferentes tratamientos se llevó a cabo la preparación de las muestras de guacamole de tal forma que se distribuyó en bolsas de polietileno-poliamida

termoselladas, aptas para el tratamiento por alta presión, en lotes duplicados de 10 gramos por bolsa.

El siguiente alimento objeto de estudio es un aderezo o aliño compuesto de una mezcla de cilantro y perejil troceado (60%), aceite de oliva virgen extra (30%), agua (8,2%), zumo natural de limón (1%) y sal (0,8%). Cada uno de los diferentes ingredientes fueron adquiridos a su vez en distintos establecimientos de venta, justo antes de ser procesados, y se organizaron en lotes de procedencia variada. La elaboración del aliño fue propia y se realizó en el laboratorio mediante la mezcla de las diferentes materias primas de los distintos lotes, su posterior licuado (con Thermomix o equivalente) y tamizado en condiciones asépticas. Como resultado se obtuvo un pool general del aderezo, el cual se distribuyó en alícuotas de 10 gramos, que fueron envasadas en bolsas de polietileno-poliámida termoselladas.

Por último, se utilizaron arándanos adquiridos a granel en 5 fruterías distintas justo antes de ser procesados. A partir de cada lote de arándanos, correspondiente a los diferentes establecimientos donde se adquirió el producto, se prepararon 2 muestras de 10 gramos, una de ellas destinada a ser tratada con bacteriocina, durante un tiempo y con una concentración determinadas, y la otra como control. Finalmente se obtuvieron un total de 10 muestras, de las cuales 5 eran controles y las 5 restantes tratadas. Además, las diferentes muestras se envasaron en tubos Falcon de propileno estériles de 50 mililitros para su posterior procesado.

4.2.2. Tratamientos.

4.2.2.1. Alta presión hidrostática.

Los tratamientos de alta presión hidrostática (APH) se llevaron a cabo utilizando un equipo de APH de Stansted Fluid Power LTD (SFP, Harlow, Reino Unido) propiedad de nuestro grupo de investigación, adaptado con un recipiente de 2,5 L capaz de operar en un rango de presión de 0 a 700 megapascales (MPa), en el cual se introducen las muestras a tratar. El sistema estaba dotado de una unidad de calentamiento eléctrico (SFP) que operaba en un rango de temperatura que iba desde la temperatura ambiente hasta los 90 °C. Teniendo en cuenta que, por un lado, los tratamientos de intensidad más baja son más rentables desde el punto de vista industrial, pero el riesgo de que queden células bacterianas intactas o con daños subletales es mayor comparado con tratamientos de mayor presión y, por otro lado, dado que el calor moderado potencia la inactivación de los microorganismos por altas presiones, se aplicaron los siguientes tratamientos de APH, complementados o no con calor moderado, durante 5 minutos:

- Tratamiento A → 450 MPa a 22 °C.
- Tratamiento B → 450 MPa a 50 °C.
- Tratamiento C → 600 MPa a 22 °C.
- Tratamiento D → 600 MPa a 50 °C.

En todos los tratamientos la velocidad de aumento de presión fue de 75 MPa/min y la descompresión fue casi inmediata. Además, cabe mencionar que el fluido de presurización utilizado fue agua con un 10% de propilenglicol añadido (Panreac, Madrid, España).

Una vez realizados los diferentes tratamientos las muestras de alimento, sometidas o no a tratamientos por APH, se colocaron en una cesta con hielo durante 30 minutos y posteriormente se almacenaron en

refrigeración (4 °C) durante 20 días en el caso del aliño, y durante 50 días en el caso del guacamole. A diferentes tiempos de almacenamiento (0, 2, 5, 10 y 20 días para el aliño; o bien 0, 5, 10, 20, 30, 40, y 50 días, para el guacamole) se tomaron alícuotas para realizar los análisis correspondientes, según se describe en el esquema general de trabajo presentado en la Figura 6. Las diferentes muestras a ensayar fueron previamente homogeneizadas con agua de peptona tamponada empleando un homogeneizador de alimentos (Stomacher) obteniendo así una suspensión madre de alimento la cual servirá de material de partida para los diferentes tipos de análisis.

Las alícuotas tomadas a diferentes tiempos se obtuvieron por duplicado de tal forma que, para una de las alícuotas de cada muestra, tratada o no, se realizó una extracción de su ADN total con la finalidad de realizar un estudio de su biodiversidad microbiana.

La segunda alícuota de cada muestra se destinó a la realización de su análisis microbiológico, mediante la siembra en medios de cultivo generales y posterior recuento de microorganismos viables totales para conocer así la carga microbiana total presente en la muestra y, mediante la siembra en medios de cultivo selectivos, suplementados con compuestos antimicrobianos (antibióticos y biocidas), cuyo objetivo fue llevar a cabo el aislamiento e identificación de microorganismos resistentes y su posterior análisis de multirresistencias.

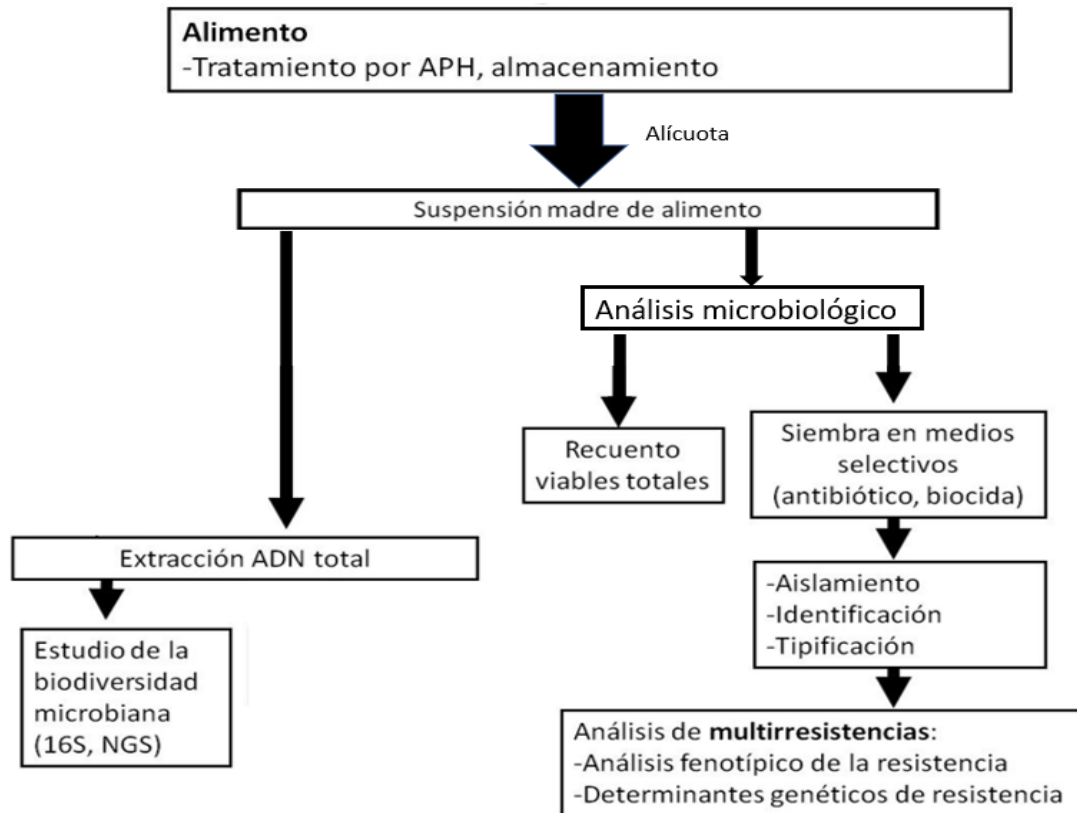


Figura 6. Esquema general de trabajo para los tratamientos con APH.

4.2.2.2. Bacteriocina (AS-48).

Para llevar a cabo el tratamiento con la enterocina AS-48 fue necesario realizar su extracción y purificación previa a partir de la bacteria que la produce, *E. faecalis* S-48. Una vez obtenidos los diferentes eluidos de bacteriocina, mediante columna de cromatografía de intercambio iónico con fase sólida y gel CM25 a distintas concentraciones de NaCl 0.5M y 1.5M, se realizó una selección de tal forma que se eligieron aquellos eluidos cuya concentración era de 50 microgramos/mL. Antes de llevar a cabo el tratamiento, el eluido de bacteriocina seleccionado debe ser esterilizado mediante filtración con un filtro nanopore de 0,2 micras, evitando así que queden restos celulares que puedan interferir en los resultados. La solución resultante se almacenó en varios tubos Falcon de propileno estériles de 50

mL para su posterior uso. El tratamiento con bacteriocina consistió en sumergir por completo los arándanos en una solución de enterocina AS-48 durante 10 minutos (o en una solución equivalente carente de bacteriocina para las muestras control). Para esto se vertió un volumen de 10 mL de dicha solución bactericida dentro de los Falcon en los que se encontraban envasadas las 5 muestras a tratar. Pasado el tiempo de tratamiento se decantó la totalidad del volumen de solución de bacteriocina vertida sobre las diferentes muestras, para posteriormente ser desechado, y dichas muestras se dejaron secando, dentro de su envase, durante 1 hora a temperatura ambiente. Cada una de las 5 muestras, procedentes de los 5 lotes adquiridos, fue tratada con una solución de bacteriocina diferente, evitando así reutilizar una misma solución de dicha bacteriocina en más de una muestra.

Posteriormente se procedió a almacenar en refrigeración, a 4°C, durante 24 horas la totalidad de las muestras (tratadas o no). Pasado el tiempo de almacenamiento se procedió al lavado superficial de las muestras por separado, con 10 mL de solución salina estéril al 0,9%, con la finalidad de obtener la suspensión resultante o suspensión madre del alimento, la cual contendría toda la carga microbiana presente en la superficie de la fruta. Dicho lavado se debe de hacer cuidadosamente procurando que la fruta no se disgregue. La suspensión resultante fue recogida en un tubo para centrifuga del tipo Falcon estéril de 15 mL, de tal forma que 2 mL del volumen total obtenido fue separado en un tubo del tipo Eppendorf de 2 mL y el volumen restante (8 mL aproximadamente*) se mantuvo en el tubo Falcon.

*Volumen no del todo exacto entre las diferentes muestras debido a la pequeña cantidad de suspensión resultante del lavado que queda en el envase o es absorbida por la fruta.

Como resultado, para cada una de las 10 muestras, se obtuvieron un tubo Eppendorf con 2 mL de suspensión resultante del lavado de las muestras y un tubo Falcon con unos 8 mL de la misma suspensión resultante del lavado, ambos destinados a llevar a cabo sus análisis correspondientes, según se describe en el esquema general de trabajo presentado en la Figura 7. Por un lado, el Eppendorf con 2 mL de suspensión se utilizó para realizar el análisis microbiológico de cada muestra mediante su siembra en diferentes medios de cultivo, tanto generales como específicos, y sus posteriores recuentos de microorganismos viables totales. Por otro lado, el Falcon con el volumen restante de la suspensión obtenida fue destinado a la realización de la extracción del ADN bacteriano total presente en cada muestra y su posterior análisis de abundancia y biodiversidad.

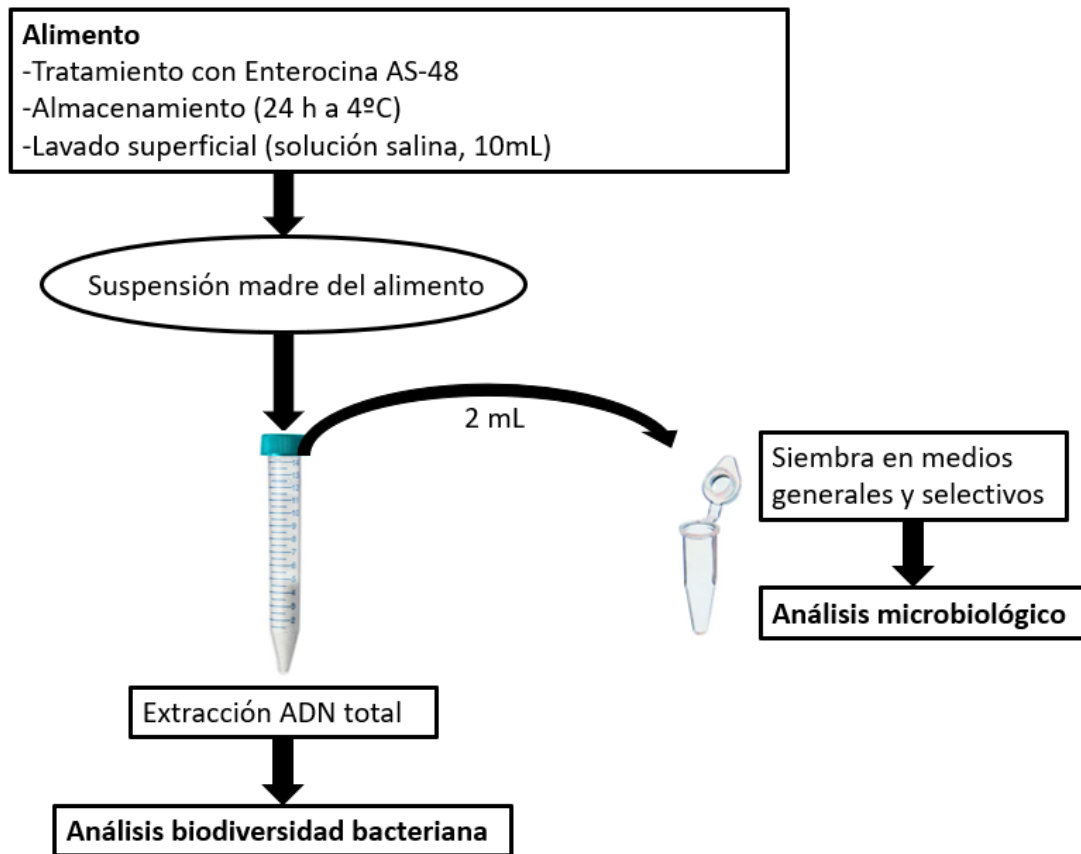


Figura 7. Esquema general de trabajo para los tratamientos con bacteriocina.

4.2.3. Análisis de las muestras.

4.2.3.1 Estimación de la carga microbiana total.

En el caso del guacamole y el aliño, inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos con APH (tiempo 0) y durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C (días 5, 10, 20, 30, 40 y 50 para el guacamole; o bien días 2, 5, 10 y 20 para el aliño), se tomaron dos lotes de las muestras control y dos lotes de las muestras tratadas con APH, utilizando uno de los lotes para llevar a cabo su análisis microbiológico (el otro lote se utilizó paralelamente para el estudio de la biodiversidad bacteriana). Para realizar dicho análisis microbiológico, el contenido de cada bolsa donde se envasaron las muestras se mezcló individualmente con

20 mL de solución salina estéril al 0,9% y se homogeneizó en un Stomacher 400 (Seward, Worthing, Reino Unido) durante 1 minuto. Posteriormente, se vertió en tubos Falcon estériles de 50 mL y se realizó una dilución seriada en solución salina estéril al 0,9%, de los homogeneizados (solución madre) y dichas diluciones se sembraron por triplicado en placas (Figura 8) con los siguientes medios de cultivo:

- Agar tripticasa de soja (TSA; Scharlab, Barcelona), para el recuento de mesófilos aerobios totales.
- Agar MacConkey (Scharlab), para enterobacterias.
- Agar glucosa de levadura con adición de cloranfenicol (YGC; Sigma Aldrich, Madrid) a una concentración de 100 mg/L, para las levaduras y los hongos.

El periodo de incubación fue de 24 h a 37 °C para los medios de cultivo de TSA y MacConkey, y de 48 h a 28 °C para el medio de cultivo YGC. Al final de la incubación, se contó el número de colonias en las diferentes placas y los datos se utilizaron para calcular los recuentos de células viables, expresados como Unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ UFC/ml} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{FD}}{\text{V (ml)}}$$

FD = Inversa de la dilución correspondiente a la placa donde se ha realizado el recuento.

V = Volumen de la muestra que se siembra en placa.

Cabe mencionar que para el guacamole y el aliño se realizó la medida del pH de las diferentes soluciones madre (a diferentes tiempos de

almacenamiento) justo antes de llevar a cabo su dilución y siembra en placas. El pH de dichos homogeneizados se midió con un medidor de pH (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España) y su finalidad fue observar posibles variaciones del pH de las muestras durante su almacenamiento.

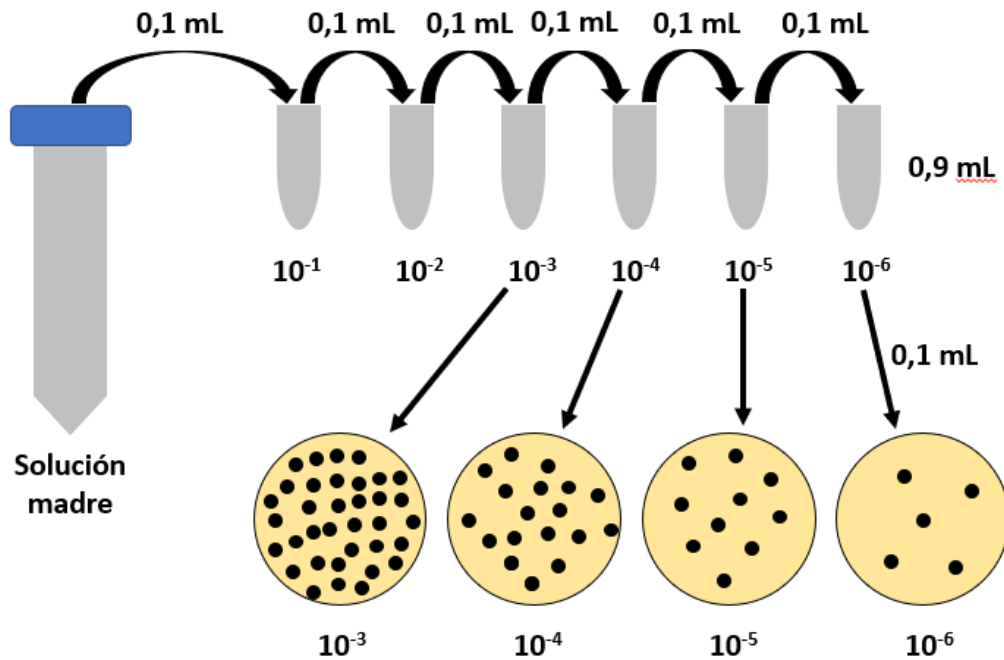


Figura 8. Dilución y siembra. Para llevar a cabo una dilución seriada partimos de una solución madre. En un tubo del tipo Eppendorf con solución salina al 0,9% (volumen de medio 0,9 mL) se añade 0,1 mL del inóculo original, de manera que tenemos un volumen final de 1 mL. Así, si se ha añadido 0,1 mL del cultivo en un volumen final de 1 mL la relación será 1:10 y por lo tanto la suspensión bacteriana inicial se habrá diluido 10 veces (dilución 10^{-1}). De este último tubo transferiremos 0,1 mL de la suspensión a otro tubo con solución salina con lo que conseguiremos la dilución 10^{-2} , y así repetiremos el mismo procedimiento sucesivamente con el objeto de efectuar las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . Para realizar la siembra de las diferentes diluciones transferimos 0,1 mL de cada dilución a su respectiva placa de Petri (por triplicado), extendiendo el inóculo de forma homogénea en la superficie del medio sólido mediante la utilización del asa de siembra estéril.

Para los arándanos, una vez realizado el tratamiento con bacteriocina de 5 de las 10 muestras totales y la posterior recogida de la suspensión madre resultante del lavado de la totalidad de las muestras se tomó una alícuota de 2 mL a partir de dicha suspensión madre, la cual iba a ser utilizada para llevar a cabo la determinación de la carga bacteriana total presente en cada muestra. Para ello, a partir de la solución madre, se prepararon una serie de diluciones utilizando solución salina estéril al 0,9%, como se describe en la Figura 8, y posteriormente se sembraron, por triplicado, en placas con los siguientes medios de cultivo:

- Agar tripticasa de soja (TSA), para el recuento de mesófilos aerobios totales.
- Agar MacConkey, para bacterias coliformes.
- Agar Verde Brillante (VB), para *Salmonella*.
- Agar eosina-azul de metileno o Agar EMB, para enterobacterias.

El periodo de incubación fue de 24 h a 37 °C para todos los medios de cultivo. Pasada la incubación, se realizó el recuento de las colonias presentes en las diferentes placas. Estos datos se utilizaron para calcular los microorganismos viables totales, expresados como unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra (mediante la fórmula que se ha descrito anteriormente).

4.2.3.2. Determinación de la presencia de resistencias y multirresistencias a agentes antimicrobianos.

4.2.3.2.1 Aislamiento de cepas resistentes.

El aislamiento de cepas resistentes únicamente se llevó a cabo en el guacamole y el aliño. Al igual que se realizó la siembra en los diferentes medios de cultivo explicados anteriormente, de forma paralela las diluciones obtenidas a partir de las suspensiones madre de los diferentes lotes de alimentos (tratados o no) a diferentes tiempos de almacenamiento también fueron sembradas en los siguientes medios de cultivo suplementados con diferentes compuestos antimicrobianos:

- Agar Mueller-Hinton (Scharlab) suplementado con cloruro de benzalconio (Sigma-Aldrich; a 200 mg/L de concentración final) para la selección de cepas tolerantes a este biocida. Las placas se incubaron por triplicado, a 30°C durante 24h, tanto en condiciones aerobias como en condiciones anaerobias (empleando campanas de anaerobiosis).
- Agar MacConkey (Scharlab) suplementado con cefotaxima (Laboratorios Normon, Madrid; a 64 mg/L de concentración final) o imipenem (Aurovitas, Madrid; a 4 mg/L de concentración final), para la selección de cepas tolerantes a estos antibióticos. Las placas se incubaron por triplicado, a 37°C durante 24h en ambos casos.
- Agar *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) con suplemento añadido para el medio KPC ChormoSelect Agar Supplement (Sigma-Aldrich). Las placas se incubaron por triplicado, a 37°C durante 24h, tanto en condiciones de aerobiosis como anaerobiosis.

De las placas correspondientes, se aislaron colonias individuales, que fueron cultivadas nuevamente en placas que contenían el mismo agente antimicrobiano con el fin de confirmar su tolerancia. Una vez confirmadas, se procedió a la determinación de posibles resistencias frente a una serie de antibióticos y biocidas con la finalidad de realizar una selección de cepas multirresistentes de interés, que posteriormente iban a ser identificadas.

4.2.3.2.2 Determinación de la resistencia a antibióticos.

La determinación del fenotipo de resistencia a antibióticos de las cepas aisladas se llevó a cabo mediante el método de difusión en disco descrito por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). El ensayo del antibiograma con discos se realizó en placas de Agar Mueller-Hinton (PanReac AppliChem). Tras la incubación de las placas se midió el diámetro de los halos de inhibición alrededor de los discos de antibióticos (Figura 9). Los resultados se expresaron en milímetros y, según los estándares del CLSI (2015), las cepas ensayadas se clasificaron como resistentes (R), intermedios (I) o sensibles (S).

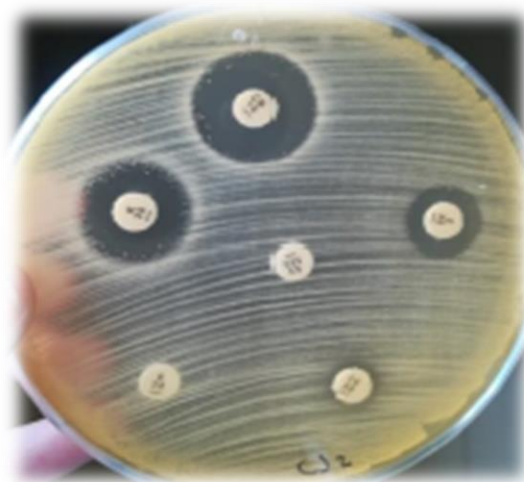


Figura 9. Antibiograma.

Los discos de antibióticos empleados (Oxoid, antimicrobial susceptibility test discs) vienen descritos a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Discos de antibióticos utilizados para la determinación de la resistencia a antibióticos.

Antibiótico	Código	Concentración (µg)
Cefotaxima	CTX	30
Amoxicilina clavulánico	AMC	30
Ceftazidima	CAZ	30
Cefoxitina	FOX	30
Meropenem	MEM	10
Ciprofloxacino	CIP	5
Eritromicina	E	30
Tetraciclina	TE	30
Cloranfenicol	C	30
Gentamicina	CN	10
Kanamicina	K	30
Sulfonamida	S3	300

4.2.3.2.3 Determinación de la resistencia a biocidas.

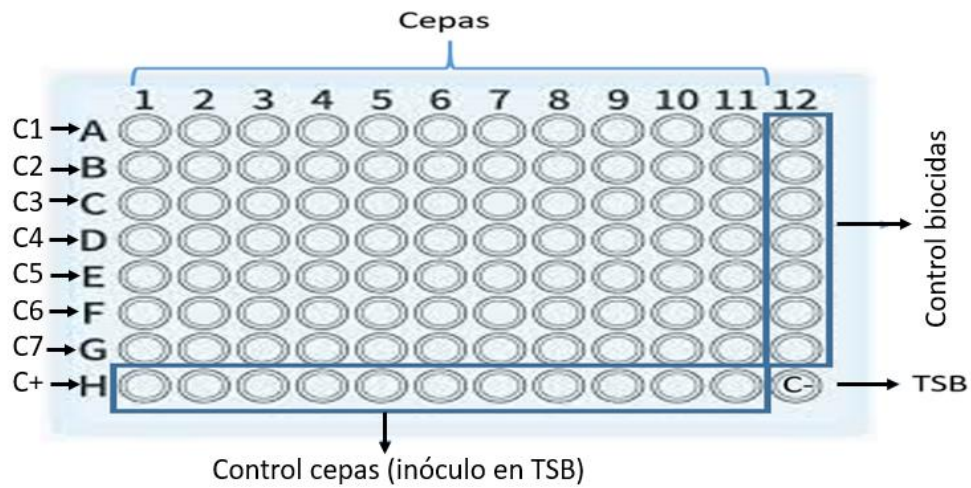
La determinación del fenotipo de resistencia a biocidas de las cepas aisladas se llevó a cabo mediante ensayos de microtitulación en placas de 96 pocillos. Para realizar dicho ensayo primero se prepararon las distintas soluciones iniciales, al 10%, de los diferentes biocidas usados en cada alimento (descritos en la Tabla 2), utilizando para ello medio nutritivo líquido estéril (TSB) en todos los biocidas excepto en el caso del hexaclorofeno y el triclosán que, en su solución inicial, se utilizó alcohol etílico de 96° para facilitar la disolución del compuesto.

Tabla 2. Biocidas utilizados.

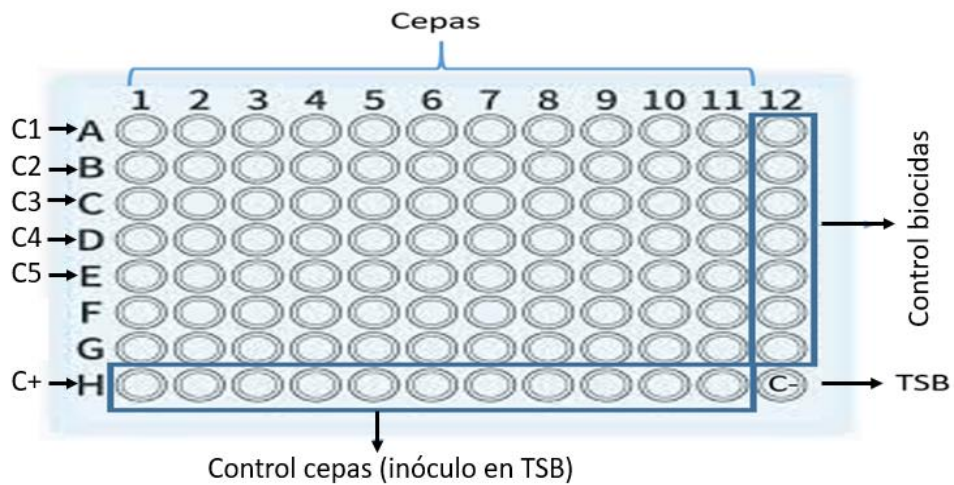
Biocida	Código	Ensayo guacamole	Ensayo aliño
Cloruro de benzalconio	CB	✓	✓
Cetrimida	C	✓	✓
Hexadecilpiridinio	HP	✓	✓
Triclosán	T	✓	✓
Hexaclorofeno	HC	✓	✓
Clorhexidina digluconato	CD	✓	✓
Polihexametilen-guanidina	PHMG		✓

En el ensayo de guacamole se prepararon 7 diluciones a partir de la solución inicial al 10% de cada biocida, cuya concentración fue de 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL y 2 µg/mL, mientras que para el aliño se prepararon 5 diluciones, cuya concentración fue de 10.000 µg/mL, 2.500 µg/mL, 250 µg/mL, 25 µg/mL y 2,5 µg/mL. Cada placa de microtitulación se corresponde con un biocida diferente a ensayar y en cada pocillo de la placa se añaden 180 µL de la dilución del biocida y se inoculan con 20 µL de la dilución 1/10 del cultivo overnight de cada cepa, obteniendo un volumen final de 200 µL en cada pocillo. En todas las placas se pone un control positivo, con el inóculo de cada cepa, y controles negativos del medio TSB y de los diferentes biocidas, siendo de igual forma el volumen final de los pocillos control de 200 µL. Una vez rellena la placa, según viene representado en la Figura 10, se procede a su incubación a 37°C durante 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación se realizó la lectura de cada microplaca con el lector “Microplate Reader” (BIO-RAD), a 595 nm. Para el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias de los biocidas sometidos a estudio se tomaron como puntos de corte los valores referidos en estudios previos de nuestro grupo y otros (Morrissey I. et al., 2014).



A



B

Figura 10. Ensayo de resistencia a biocidas en placa de microtitulación. A: Guacamole.
B: Aliño

4.2.3.2.4. Extracción de ADN.

Una vez realizados los ensayos de determinación de resistencias a antibióticos y biocidas se seleccionaron aquellas cepas bacterianas que mostraron multirresistencias y seguidamente se procedió a extraer su ADN. Para ello, se partió de un cultivo overnight en TSB (2mL) cuyo inóculo fue traspasado a un tubo Eppendorf y se centrifugó (Eppendorf Centrifuge

5424R) a 13.500 g durante 5 minutos, desechando posteriormente el sobrenadante y conservando el sedimento, donde se encuentran las células microbianas. A partir del sedimento resultante se llevó a cabo la extracción del ADN total de las cepas, empleando un kit comercial de Sigma-Aldrich (GenElute Bacterial Genomic DNA Kit) que ya ha dado buenos resultados en experimentos previos para este tipo de análisis. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. El sedimento fue resuspendido en 180 μ L de la solución de Lisozima y se incubó durante 30 minutos a 55 °C, buscando debilitar así la pared celular de las gran positivas.
2. Se agregaron 20 μ L de ARNasa y se dejó reposar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
3. Luego se agregó 20 μ L de solución de proteinasa K y después 200 μ L de solución de lisis C, y se mezclaron completamente en el vórtex durante 15 segundos. Seguidamente se incubó la mezcla durante 10 minutos a 55 °C.
4. Durante la incubación se preparan las columnas de la extracción. Se colocan las columnas en tubos Eppendorf de 2 mL, se le agregan 500 μ L de solución de preparación de columna y posteriormente se centrifugan los tubos a 12.000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente se desecha el sobrenadante y se mantienen las columnas para continuar con el siguiente paso.
5. Después de la incubación se adicionaron al líquido lisado 200 μ L de alcohol etílico al 98% y se mezcló bien en un vórtex durante 10 segundos.

6. Se transfirió la mezcla a la columna y se centrifugó a 6.500 rpm durante 1 minuto. Después de la centrifugación se coloca la columna en un nuevo tubo de 2 mL.
7. Se lavó el ADN con 500 mL de la solución de lavado 1 y se centrifugó la columna a 6.500 rpm durante 1 minuto.
8. A continuación, se realizó el segundo lavado del ADN con 500 mL de la solución de lavado y se centrifugó la columna a 6.500 rpm durante 3 minutos. Pasamos nuevamente la columna a otro tubo de 2 mL.
9. Como último paso se adicionaron 200 mL de la solución de elución en el filtro de la columna dejándolo durante 2 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 6.500 rpm durante 1 minuto. El ADN resultante fue almacenado en un criotubo de 2 mL.

El ADN obtenido fue cuantificado y se evaluó su pureza mediante un espectrofotómetro del tipo Nanodrop 2000 (UV-Spectrophotometer, Thermo Scientific) y mediante electroforesis en gel de agarosa. También se valoró su calidad y se midió su concentración en el Qubit (Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific), en cada una de las muestras, y posteriormente se almacenó en congelación (-20°C) hasta su próxima utilización.

4.2.3.2.5. Identificación bacteriana.

Una vez extraído el ADN total de las cepas de interés seleccionadas se procedió a su identificación mediante amplificación y secuenciación de la región 16S rDNA. El ADNr 16S se amplificó mediante PCR usando el cebador [GAGTTTGATCMTGGCTCAG] para S1627F y

[ACGGYTACCTTGTTACGACTT] para S161492R. La PCR se realizó en un termociclador Mastercycler® pro Thermal Cycler (Eppendorf, EE.UU.), siendo el programa de PCR utilizado el siguiente:

- Desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94 °C.
- 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto.
- Anillado a 55 °C durante 1 minuto.
- Extensión a 72 °C durante 1 minuto.
- Extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR comercial ExoProStart (GE Healthcare, Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y fueron posteriormente secuenciados en una empresa externa (Sistemas Genómicos, Valencia, España). Las secuencias de ARNr 16S recibidas se alinearon mediante el programa Bioedit y se compararon en la base de datos GenBank utilizando las herramientas de búsqueda de alineación local básica de NCBI BLAST.

4.2.3.2.6. Estudio de los determinantes de resistencia.

Este análisis se realizó mediante amplificación por PCR (o PCR multiplex) empleando como material de partida ADN total extraído, como se ha descrito en el apartado 3.1.2.4, de las cepas de interés seleccionadas. Los cebadores empleados para determinar la presencia de genes de resistencia se describen a continuación en la Tabla 3 y los protocolos de PCR utilizados se encuentran en la literatura científica correspondiente (citas en paréntesis, recogidas en el listado de Bibliografía).

Dentro de la determinación de la presencia de genes de resistencia a antibióticos encontramos los siguientes:

- Los genes de resistencia a betalactámicos investigados fueron ***bla*_{TEM}** (Sáenz Y. et al., 2004), ***bla*_{PSE}** (Chiu C.H. et al., 2006), ***bla*_{CTX-M}** y ***bla*_{CTX-M-2}** (Bertrand S. et al., 2006), ***bla*_{KPC}** (Yigit H. et al., 2001), ***bla*_{SHV}** y ***bla*_{OXA-48-like}** (Poirel L. et al., 2011).
- Los genes de resistencia a tetraciclinas investigados fueron *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(K)*, *tet(I)*, *tet(M)* y *tet(S)* (Amachawadi R.G. et al., 2011; Gómez-Sanz E. et al., 2013; Li X. y Wang H.H., 2010; Ng L.K. et al., 2001).
- Los genes de resistencia a macrólidos investigados fueron *ere(A)* y *ere(B)* (Sutcliffe J. et al., 1996).

Para la determinación de la presencia de bombas de exporte o sus componentes los genes utilizados fueron *mdeA*, *mepA*, *norA*, *norC*, *sdrM*, *sepA* (Patel D. et al., 2010). Los genes codificantes de inhibidores de la dihidrofolato reductasa investigados utilizados fueron *dfra12* y *dfra15* (Yu T. et al., 2022). Por último, para la determinación de la presencia de genes de resistencia a biocidas derivados de amonio cuaternario se utilizó el gen *smr* (Smith K. et al., 2007).

El equipo investigador ha puesto a punto previamente los protocolos para la determinación de los genes de resistencia mencionados en este apartado (Fernández-Fuentes M.A. et al., 2012, 2014a, 2014b), por lo que su ejecución se considera viable desde el punto de vista técnico.

Tabla 3. Cebadores de PCR utilizados para determinar la presencia de genes de resistencia.

GEN	Cebador (5' - 3')	Amplicón (bp)
<i>bla_{KPC}</i>	TGCTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	882
<i>bla_{OXA-48-like}</i>	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	438
<i>bla_{SHV}</i>	AAGATCCACTATCGCCAGCAG ATTCAGTTCGGTTTCCAGCGG	231
<i>bla_{TEM}</i>	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC ACGCTCAGTGGAAACGAAAAC	1150
<i>bla_{PSE}</i>	GGCAATCACACTCGATGATGCGT GGCTCAATACGGTCTAGACGAGT	156
<i>bla_{CTX-M}</i>	RATGTGCAGYACCAAGTAA CGCRATATCRITGGTGGTG	540
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	ATGATGACTCAGAGCATTTCG TCAGAAACCGTGGGTTAC	876-859
<i>tet(B)</i>	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG	659
<i>tet(C)</i>	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG ATGGTCGTCATCTACCTGCC	418
<i>tet(D)</i>	AAACCATTACGGCATTCTGC GACCGGATACACCATCCATC	787
<i>tet(A)</i>	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210
<i>tet(E)</i>	AAACCACATCCTCCATACGC AAATAGGCCACAACCGTCAG	278
<i>tet(G)</i>	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC AGCAACAGAATCGGGAACAC	468
<i>tet(K)</i>	TCGATAGGAACAGCAGTA CAGCAGATCCTACTCCTT	155
<i>tet(S)</i>	CATAGACAAGCCGTTGACC ATGTTTTTGAACGCCAGAG	650
<i>tet(M)</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTCACACAC	406
<i>tet(L)</i>	TCGTTAGCGTGCTGTCATTC GTATCCCACCAATGTAGCCG	229

GEN	Cebador (5' - 3')	Amplicón (bp)
<i>dfrA15</i>	GTGAAACTATCACTAATGG CCCTTTTGCCAGATTTGG	473
<i>dfrA12</i>	ACTCGGAATCAGTACGCA GTGTACGGAATTACAGCT	462
<i>ere(A)</i>	AACACCCTGAACCCAAGGGACG CTTCACATCCGGATTCGCTCGA	426
<i>ere(B)</i>	AGAAATGGAGGTTTACTACTACCA CATATAATCATCACCAATGGCA	650
<i>smr</i>	ATAAGTACTGAAGTTATTGGAAGT TTCCGAAAATGTTTAACGAAACTA	406
<i>norC</i>	CAGGCAGGATACTTATCAATTAC ATACCAATGACCACAATGAATG	229
<i>norA</i>	TTTGTTTTCAGTGTGAGAATTTATGTTTG GGCTTGGTGAAATATCAGCTATTAAAC	95
<i>sdrM</i>	CAACATGGCATTGGTTATTCTAC ACAGCTGTTGGTTTAATAAAGC	126
<i>sepA</i>	GAAGTATGTACGATAACCTATTATATTATGGC AAAGTCGCGCCTCTAAAATATGC	103
<i>mepA</i>	ATGGTATAGGTTTCTTGTTTACTGGTATG AATGATAATTGCACCTTGAAAATGGC	198
<i>mdeA</i>	CTTTCAGGTTACCTTGTTGAATATTTAAAC ATCAATAGGTACTTTAATTGTAGTTCCAAC	155

4.2.3.3. Estimación de la biodiversidad bacteriana.

En el caso del guacamole y el aliño, para cada tiempo de muestreo, se preparó cada homogeneizado, como se describe en el apartado 4.2.3.1., en tubos Falcon estériles de 50 mL y se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos, en una centrífuga del tipo Beckman GS-6R, para eliminar los posibles sólidos presentes en las muestras. A continuación, se transfirió una alícuota (1,5 mL) del sobrenadante resultante a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 13.500 g durante 5 minutos para recuperar las células

microbianas. Dicha centrifugación nos permitió diferenciar dos fases, una líquida que corresponde al sobrenadante y una sólida que se corresponde con el soluto. Los sedimentos resultantes se resuspendieron con 0,5 mL de solución salina estéril (0,9%) cada uno y, a partir de dicha suspensión, se procedió al estudio de la biodiversidad bacteriana de cada muestra.

En el caso del aliño, el Falcon con la suspensión resultante del lavado de las muestras obtenida, según se describe en la Figura 7, fue destinado a su centrifugación, al igual que en el caso del guacamole descrito anteriormente, a 600 g durante 5 minutos. Una alícuota (1,5 mL) del sobrenadante obtenido fue recuperada y transferida a un tubo del tipo Eppendorf y se centrifugó a 13.500 g durante 5 minutos. Tras decantar el sobrenadante y obtener el soluto resultante, donde se encuentran presentes las bacterias de interés, se llevó a cabo la resuspensión del sedimento con 1 mL de solución salina estéril al 0,9%. A partir de dicha suspensión se realizó la extracción del ADN bacteriano total presente en cada muestra y su posterior análisis de abundancia y biodiversidad.

El análisis de la biodiversidad bacteriana de los diferentes alimentos objetos de estudio se llevó a cabo del siguiente modo:

En primer lugar, se realizó un tratamiento con monoazida de propidio (PMA, GenIUL, S.L, Barcelona, España) para bloquear la amplificación por PCR del ADN de las células muertas o dañadas, según se describe en el protocolo de Nocker A. et al., 2007. La viabilidad de este procedimiento ha sido comprobada a lo largo del desarrollo del proyecto AGL2012-38708.

Posteriormente, el ADN de las muestras tratadas con PMA fue extraído utilizando el kit de extracción GenElute Bacterial Genomic DNA Kit

(Sigma-Aldrich) y, seguidamente, se determinó su calidad y concentración según el procedimiento descrito anteriormente en el apartado 3.1.2.4.

A partir del ADN total extraído en cada muestra se amplificaron las regiones V3-V4 del gen 16S rDNA bacteriano siguiendo el protocolo de preparación de bibliotecas de secuenciación metagenómica de Illumina (Illumina, Inc., San Diego, CA, EE.UU.). Como cebadores de PCR para el gen 16S rDNA se utilizaron las siguientes secuencias (Klindworth A. et al., 2012):

- Cebador directo:

5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG;

- Cebador inverso:

5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTA
ATCC;

Para iniciar el protocolo, se utilizó ADN genómico microbiano (5 ng/L en 10 mM Tris pH 8,5) y, tras la amplificación del gen 16S rDNA, se realizó el paso de multiplexación utilizando el Nextera XT Index Kit (Illumina). Con 1µl del producto de PCR se verificó el tamaño correcto en un chip Bioanalyzer DNA 1000, siendo el tamaño esperado de 550 pb aproximadamente.

Después de la verificación del tamaño, las librerías se secuenciaron utilizando una secuencia de 2x300 pb de extremo emparejado en un secuenciador MiSeq según las instrucciones del fabricante (Illumina). La posterior evaluación de la calidad se realizó mediante el uso del programa prinseq-lite (Schmieder R. y Edwards R., 2011).

Los datos de la secuencia se analizaron utilizando qiime2 pipeline (Caporaso J.G. et al., 2011) y la eliminación de errores, la unión de los extremos emparejados y la eliminación de quimeras se realizaron, a partir de los datos de los extremos emparejados, utilizando la herramienta DADA2 (Callahan B.J. et al., 2016). Las alineaciones taxonómicas se asignaron utilizando el Naive Bayesian classifier integrado en los plugins de qiime2 y la base de datos SILVA_release_132 (Quast C. et al., 2012). Por último, el análisis estadístico se realizó con el software SPSS versión 24 (IBM Corp., Foster City, CA, USA).

Los análisis de secuenciación masiva y análisis bioinformático fueron realizados por un servicio externo (Fisabio, Valencia, España), en colaboración con el profesor Danilo Ercolini (Univ. Federico II de Nápoles).

4.2.4. Análisis estadístico.

Mediante tests de ANOVA y análisis de componentes principales (SPSS, Xlstat, Rstudio), se determinó si existe alguna correlación entre la biodiversidad microbiana de las muestras, la resistencia fenotípica y los posibles genes de resistencia detectados. También se determinó si existe correlación entre intensidad de los tratamientos, recuperación de la microbiota superviviente y niveles de resistencia al final de la vida útil del alimento.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA SOBRE EL PH, LA CARGA MICROBIANA, LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y LA DIVERSIDAD BACTERIANA DEL GUACAMOLE.

5.1.1. Estudio de la variación de pH y de la carga microbiana total.

Los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales (TSA) en las muestras control aumentaron de forma gradual y significativa ($p < 0,05$) durante el almacenamiento bajo refrigeración (Tabla 4). Todos los tratamientos con alta presión hidrostática (APH) redujeron significativamente los recuentos de células viables ($p < 0,05$) en comparación con las muestras control, no tratadas. Las reducciones que se obtuvieron para las muestras tratadas a 22°C fueron de aproximadamente 2,3 ciclos logarítmicos para presiones de 450 y 600 MPa, sin diferencias significativas entre ambos tratamientos de presión.

Las reducciones más altas en los recuentos de células viables se observaron en las muestras tratadas a 50°C, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las reducciones obtenidas a 450 MPa (2,8 ciclos logarítmicos) y 600 MPa (3,30 ciclos logarítmicos). En comparación con las muestras control, los recuentos de células viables en las muestras tratadas con APH sólo aumentaron ligeramente durante el almacenamiento (alcanzando entre 3,30 y 3,94 log UFC/g para las muestras presurizadas a 22°C o de 2,50 a 3,39 log UFC/g para las muestras presurizadas a 50°C).

Además, en comparación con el resto de las muestras, las muestras tratadas a 600 MPa y 50°C mostraron los recuentos viables más bajos durante todo el período de almacenamiento, observándose también una disminución en los recuentos al final del almacenamiento.

Con el fin de detectar la presencia de enterobacterias las muestras se sembraron en el medio agar McConkey. Los recuentos en las muestras control no aumentaron durante su almacenamiento en frío, sino que disminuyeron gradualmente ($p < 0,05$) llegando a estar por debajo del límite de detección ($<1,48 \log \text{ UFC/g}$) en el día 40 o ligeramente por encima (1,55) en el día 50 (Tabla 4). En el caso de las muestras tratadas con APH se observó una reducción en los recuentos de células viables de presuntas enterobacterias, quedando por debajo del límite de detección para todos los tiempos de almacenamiento.

La presencia de levaduras y mohos se observó en el medio de cultivo YGC, siguiendo estos una tendencia similar a la de los aerobios mesófilos totales para las muestras control (Tabla 4). Los recuentos obtenidos en YGC aumentaron gradualmente durante el almacenamiento de las muestras control, alcanzando concentraciones (5,87 a 6,46 $\log \text{ UFC/g}$) que fueron similares a los recuentos de aerobios mesófilos totales en los días 20 y 30 de almacenamiento. Los recuentos viables de levaduras y mohos en las muestras tratadas se vieron reducidos y dicha reducción dependía de la intensidad de la presión de los tratamientos. El tratamiento de menor intensidad (450 MPa a 22°C) no logró reducir los recuentos viables por debajo de los niveles de detección (1,48 $\log \text{ UFC/g}$) en los días 0, 20 y 40, presentando una proliferación por debajo de 3,24 $\log \text{ UFC/g}$, mientras que en los días 5, 10, 30, y 50 la población superviviente en las muestras tratadas estuvo por debajo de los niveles detectables. En el caso del

tratamiento a 600 MPa a 22°C, los recuentos viables sólo estaban por encima del nivel de detección el día 20. Si las muestras eran sometidas a tratamientos con presión a 50°C, los recuentos de levaduras y mohos estaban por debajo del límite de detección en todos los puntos de muestreo.

El pH de las muestras control disminuyó gradual y significativamente ($p < 0,05$) de 4,53 en el tiempo 0 a 4,07 en el día 50 (Tabla 4). Ninguno de los tratamientos de presión indujo una disminución significativa en el pH de las muestras ($p > 0,05$ en T0). Además, el pH de las muestras presurizadas no disminuyó significativamente durante el almacenamiento (con la excepción del tratamiento A en el día 40). En el día 50, todas las muestras tratadas mostraron valores de pH similares comprendidos entre 4,34 y 4,35.

Tabla 4. Recuento de células viables y pH de las muestras de guacamole tratadas o no por APH.

Aerobios mesófilos	T0	T5	T10	T20	T30	T40	T50
Control	4.89 ± 0.09	5.03 ± 0.11	5.98 ± 0.13 ^a	5.79 ± 0.21 ^a	6.70 ± 0.12 ^a	6.55 ± 0.06 ^a	6.25 ± 0.19 ^a
Tratamiento A	2.57 ± 0.14 ^b	3.29 ± 0.10 ^b	3.24 ± 0.14 ^b	3.30 ± 0.18 ^b	3.27 ± 0.15 ^b	3.21 ± 0.27 ^b	3.24 ± 0.13 ^b
Tratamiento B	2.07 ± 0.12 ^{b,c}	2.70 ± 0.14 ^{b,c}	2.85 ± 0.17 ^b	2.51 ± 0.17 ^{b,c}	2.59 ± 0.09 ^{b,c}	3.39 ± 0.13 ^b	2.43 ± 0.10 ^{b,c}
Tratamiento C	2.60 ± 0.11 ^b	3.34 ± 0.16 ^b	3.32 ± 0.14 ^b	3.40 ± 0.08 ^b	3.42 ± 0.14 ^b	3.94 ± 0.20 ^b	3.14 ± 0.21 ^b
Tratamiento D	1.55 ± 0.15 ^{b,d}	2.08 ± 0.15 ^{b,d}	2.50 ± 0.16 ^{b,d}	2.12 ± 0.13 ^{b,d}	2.42 ± 0.11 ^{b,d}	1.82 ± 0.26 ^{b,d}	1.75 ± 0.20 ^{b,d}
Enterobacterias	T0	T5	T10	T20	T30	T40	T50
Control	4.63 ± 0.14	4.48 ± 0.12	4.17 ± 0.14 ^e	3.61 ± 0.13 ^e	2.55 ± 0.12 ^e	<1.48	1.55 ± 0.15 ^e
Tratamiento A	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48
Tratamiento B	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48
Tratamiento C	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48
Tratamiento D	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48
Levaduras y hongos	T0	T5	T10	T20	T30	T40	T50
Control	2.55 ± 0.12	2.83 ± 0.27	4.79 ± 0.10 ^a	5.87 ± 0.18 ^a	6.46 ± 0.16 ^a	5.60 ± 0.29 ^a	5.33 ± 0.20 ^a
Tratamiento A	1.82 ± 0.26 ^f	<1.48	<1.48	2.17 ± 0.22 ^f	<1.48	3.24 ± 0.24 ^f	<1.48
Tratamiento B	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48
Tratamiento C	<1.48	<1.48	<1.48	1.60 ± 0.09	<1.48	<1.48	<1.48
Tratamiento D	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48
pH	T0	T5	T10	T20	T30	T40	T50
Control	4.53 ± 0.01	4.34 ± 0.02 ^g	4.35 ± 0.03 ^g	4.33 ± 0.01 ^g	4.30 ± 0.01 ^g	4.23 ± 0.01 ^g	4.07 ± 0.08 ^g
Tratamiento A	4.47 ± 0.01	4.41 ± 0.01	4.44 ± 0.03	4.41 ± 0.01	4.35 ± 0.08	4.25 ± 0.10 ^h	4.35 ± 0.01
Tratamiento B	4.41 ± 0.01	4.43 ± 0.01	4.45 ± 0.01	4.43 ± 0.01	4.43 ± 0.03	4.34 ± 0.03	4.35 ± 0.03
Tratamiento C	4.46 ± 0.01	4.42 ± 0.03	4.44 ± 0.01	4.42 ± 0.06	4.42 ± 0.03	4.33 ± 0.04	4.34 ± 0.01
Tratamiento D	4.42 ± 0.04	4.45 ± 0.01	4.43 ± 0.01	4.45 ± 0.01	4.45 ± 0.03	4.36 ± 0.06	4.35 ± 0.04

Los diferentes tratamientos con APH son: A, 450 MPa a 22 °C; B, 450 MPa a 50 °C; C, 600 MPa a 22 °C; y D, 600 MPa a 50 °C. El tiempo de almacenamiento en días viene indicado por (T). El límite de detección se calculó teniendo en cuenta el factor de dilución del guacamole en el homogeneizado. Significación estadística ($p < 0.05$): a, significativamente mayor que los recuentos obtenidos en el tiempo 0; b, significativamente menor que los controles no tratados (en todos los puntos de muestreo); c, significativamente menor que el Tratamiento A en el mismo tiempo de almacenamiento; d, significativamente menor que el Tratamiento C en el mismo tiempo de almacenamiento; e, significativamente menor que los recuentos obtenidos en el tiempo 0 (Enterobacteriaceae); f, significativamente menor que los controles (levaduras y mohos) en el mismo tiempo de almacenamiento; g, pH significativamente menor en comparación con el tiempo 0; y h, pH significativamente menor en comparación con las muestras A0 a A20.

Con el fin de detectar la presencia de microorganismos tolerantes a betalactámicos, las muestras homogeneizadas y sus diluciones se sembraron en placas de medios que contenían los antibióticos imipenem y cefotaxima. Los recuentos viables obtenidos en agar McConkey suplementado con cefotaxima fueron bajos, aunque se detectaron células viables en los días 20, 30 y 40 (Tabla 5). El crecimiento en agar McConkey complementado con imipenem sólo se detectó en los días 10, 20 y 30. Los recuentos viables en agar KPC con suplemento agregado e incubado en condiciones aeróbicas aumentaron hasta el día 30, siendo dicho aumento más notable de los días 20 a 30 (similar al aumento del recuento viable detectado en TSA) y aún permaneció alto en el día 50. Las colonias eran de color verde azulado y blanco. Por el contrario, solo se detectó crecimiento en agar KPC incubado en condiciones anaeróbicas durante los días 0 a 10 (solo colonias rosadas), siendo los recuentos fueron muy bajos (Tabla 5).

Para probar la tolerancia a los biocidas, las muestras también se sembraron en Agar Mueller-Hinton suplementado con cloruro de benzalconio. Sin embargo, el crecimiento solo se obtuvo a partir de muestras control en el día 0 y los recuentos fueron muy bajos (Tabla 5).

Tabla 5. Recuento de células viables de las muestras de guacamole sin tratar en medios que contienen antimicrobianos.

Antimicrobianos	T0	T5	T10	T20	T30	T40	T50
Cefotaxima	<1.48	<1.48	<1.48	2.85 ± 0.07	2.84 ± 0.16	1.50 ± 0.03 ^a	<1.48
Imipenem	<1.48	<1.48	1.87 ± 0.12	3.13 ± 0.25 ^b	1.63 ± 0.21	<1.48	<1.48
KPC aerobiosis	3.26 ± 0.12	4.13 ± 0.07 ^c	4.63 ± 0.23 ^c	5.64 ± 0.12 ^c	6.17 ± 0.13 ^c	6.05 ± 0.18 ^c	5.49 ± 0.13 ^c
KPC anaerobiosis	2.52 ± 0.05 ^d	1.79 ± 0.10 ^d	2.06 ± 0.15 ^d	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48
Cloruro de benzalconio	2.55 ± 0.05	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48	<1.48

El tiempo de almacenamiento en días viene indicado por (T). No se detectaron células viables en los medios suplementados con antimicrobianos para ninguna de las muestras tratadas con APH. Significación estadística ($p < 0,05$): a, significativamente inferior a otros recuentos de cefotaxima; b, significativamente superior a otros recuentos de imipenem; c, significativamente superior a los recuentos de aerobiosis de KPC en el tiempo 0; y d, significativamente inferior a los recuentos obtenidos para la aerobiosis de KPC.

5.1.2. Identificación y determinación de resistencias y multirresistencias de las cepas aisladas de los tratamientos.

De todos los recuentos anteriores y de cada una de las muestras y medios ensayados, se aislaron un total de 234 colonias de los diferentes tiempos. Una vez estudiada su resistencia a antibióticos se seleccionó una colección de 70 aislados de los cuales el 17,2% se aisló del medio TSA con tratamiento de 450 MPa/22°C, el 10% venía del medio TSA tratado a 450 MPa/50°C, un 15,7% se aisló tanto del medio TSA con tratamiento de 600 MPa/22°C, como de TSA tratado a 600 MPa/50°C. De los medios Mueller Hinton suplementado con cloruro de benzalconio a 200 mg/L e incubado a 30°C en anaerobiosis y McConkey agar suplementado con cefotaxima a 64mg/L e incubados en aerobiosis se aislaron un 4,3% de la colección en cada uno de ellos, y un 2,9% de los aislados provenían de McConkey agar suplementado con 4 mg/L de imipenem, incubado a 37°C en aerobiosis. De los medios KPC agar incubados en aerobiosis a 37°C se aislaron un 20%, del medio KPC agar en anaerobiosis a 37°C un 7,4%, y por último el 2,8% restante se aisló de KPC agar incubado en anaerobiosis a 37°C con tratamiento de 450 MPa/22°C.

Una vez realizada la extracción de ADN la colección de 70 aislados fue identificada a nivel de especie mediante secuenciación del gen ribosómico 16S (rDNA). 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 11).

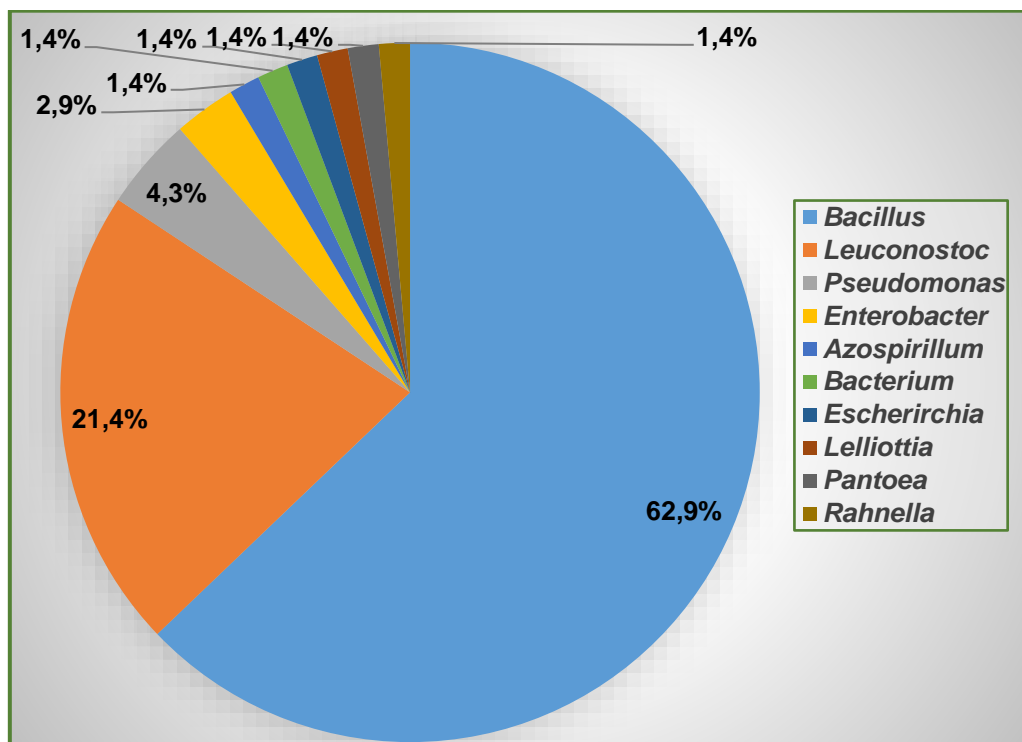


Figura 11. Identificación de especies aisladas en guacamole.

El grupo predominante en población bacteriana aislada del guacamole está formado por bacilos y lo conforman especies pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Lysinbacillus*. Como se muestra en la Figura D1, existe una distribución bien definida marcada por el grado de similitud entre especies de los diferentes géneros. El segundo grupo bacteriano con mayor abundancia está formado por especies del género *Leuconostoc*, las cuales comparten entre sí en su totalidad que fueron aisladas a partir de muestras control (Figura D2).

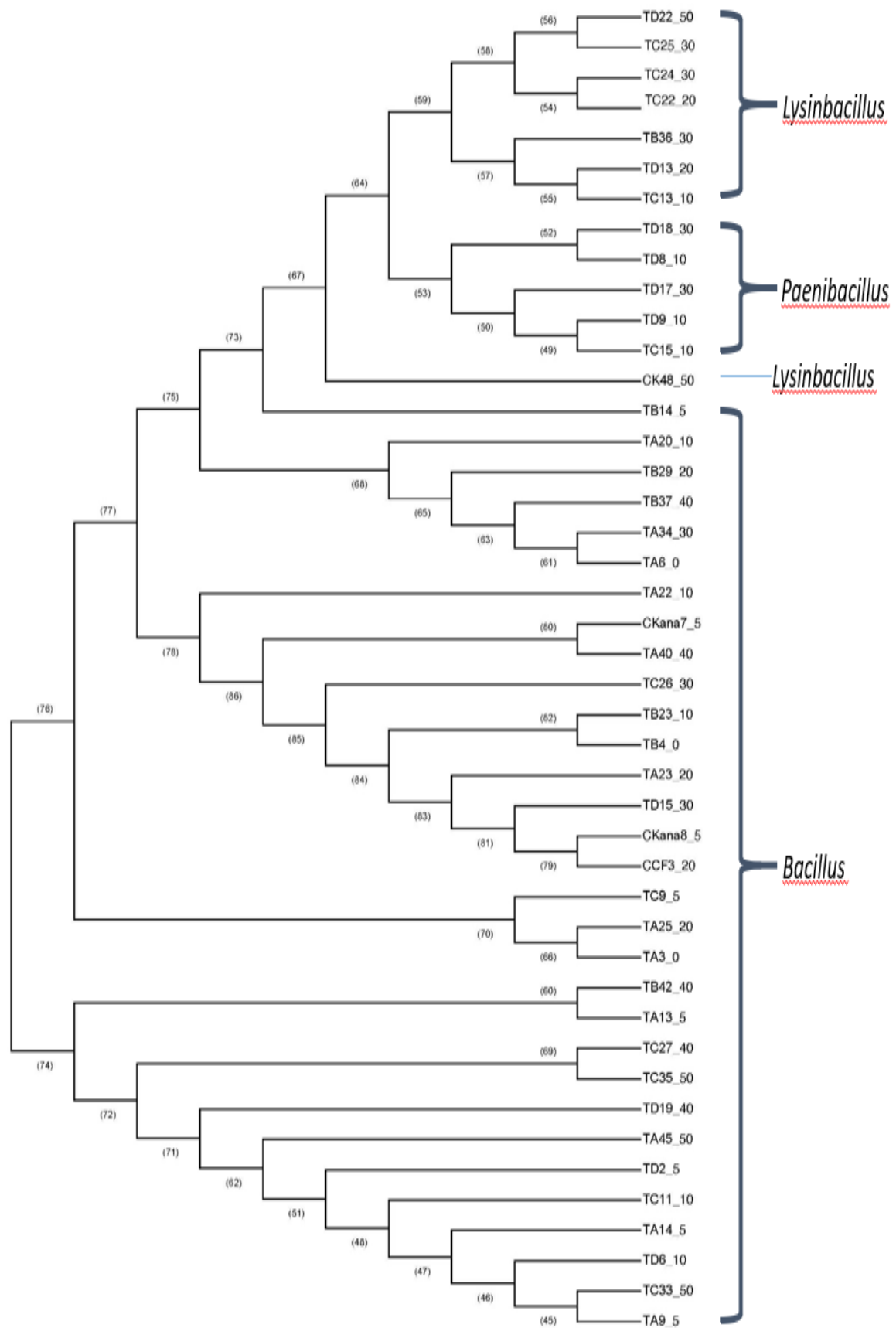


Figura D1. Dendrograma de especies aisladas en guacamole pertenecientes a *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Lysinbacillus*.

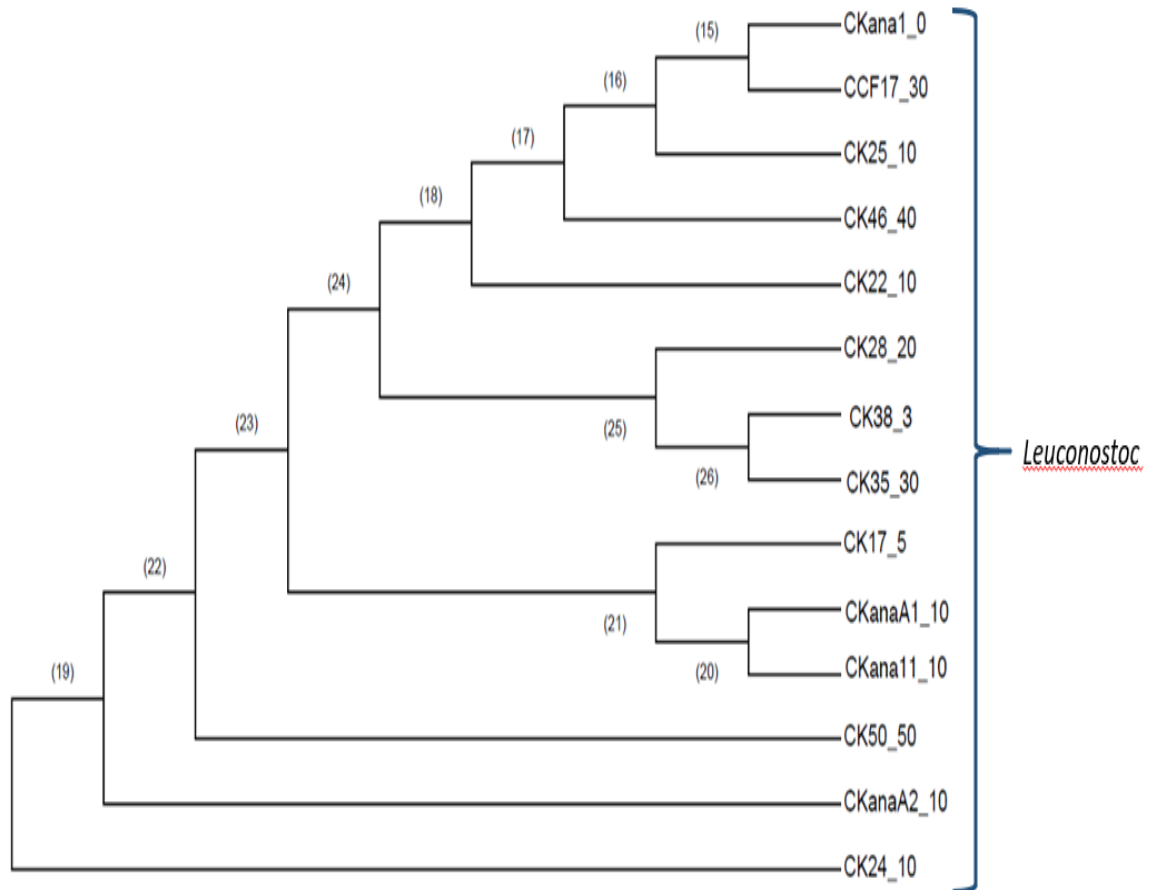


Figura D2. Dendrograma de especies aisladas en guacamole pertenecientes al género *Leuconostoc*.

Posteriormente una vez identificadas las cepas se ensayó la resistencia a antibióticos, teniendo en cuenta el halo de inhibición determinado por el CLSI, y la tolerancia a biocidas, determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) en placas de microtitulación.

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 12).

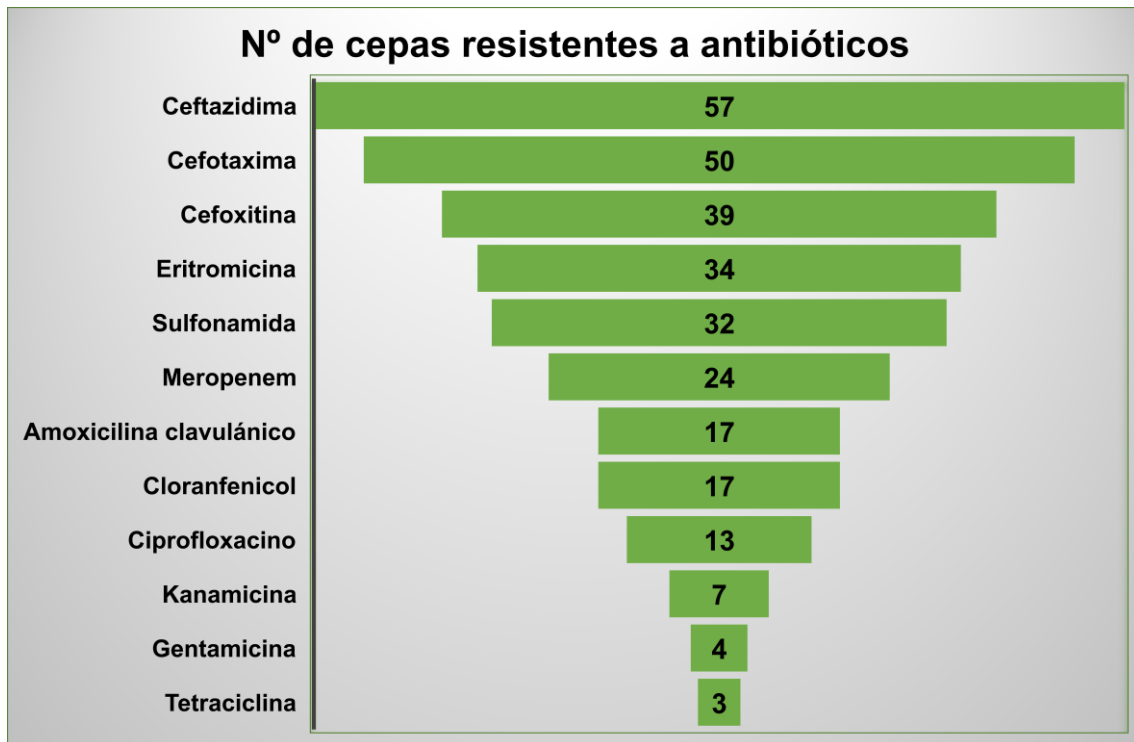


Figura 12. Número de especies aisladas del guacamole que mostraron resistencia a los diferentes antibióticos utilizados.

Treinta del total de las cepas (43%) mostraron resistencia a cinco o más antibióticos. Cabe destacar las cepas CF1 y K26, identificadas como *Enterobacter soli* y *Escherichia sp.* respectivamente, las cuales presentaron resistencia a 11 de los 12 antibióticos ensayados. En la siguiente tabla se exponen las diferentes resistencias mostradas por las 70 cepas aisladas (Tabla 6).

Tabla 6. Resistencias a antibióticos detectadas en las cepas bacterianas aisladas del guacamole.

Nº cepa	Código cepa	Identificación	Resistencia a antibióticos
TSA tratamiento A=450 MPa/22°C			
1	TA3	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	CAZ, CTX, C, E
2	TA6	<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC 100820	CAZ, CTX, C
3	TA9	<i>Bacillus enclensis</i> strain SGD-1123	CTX, C, E
4	TA13	<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	CAZ, FOX, CTX, C
5	TA14	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	AMC, CAZ, CTX, C, E
6	TA20	<i>Bacillus safensis</i> FO-36b	CAZ, CTX
7	TA22	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> strain NBRC 101239	S3
8	TA23	<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	MEM
9	TA25	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	CAZ, CTX, C, E
10	TA34	<i>Bacillus aerius</i> strain 24K	CAZ, CTX, C, E
11	TA40	<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	CAZ
12	TA45	<i>Bacillus licheniformis</i> strain SA091	CAZ, CTX
TSA tratamiento B=450 MPa/50°C			
13	TB4	<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	CAZ, C, K,
14	TB14	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	AMC, CAZ, FOX CTX
15	TB23	<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	CAZ, FOX, E
16	TB29	<i>Bacillus aerius</i> strain 24K	CAZ, CTX, S3
17	TB36	<i>Lysinibacillus pakistanensis</i> strain NCCP-54	CIP, CAZ, E
18	TB37	<i>Bacillus aerius</i> strain 24K	CAZ, CTX, C, E
19	TB42	<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	CIP,
TSA tratamiento C=600 MPa/22°C			
20	TC9	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	CAZ, FOX, E
21	TC11	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	CAZ, E
22	TC13	<i>Bacillus pumilus</i> strain MUR5	CAZ, FOX, CTX, K, E
23	TC15	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959	CAZ, FOX, CTX, C, K
24	TC22	<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474	CAZ, S3
25	TC24	<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474	CIP, CAZ, S3, E
26	TC25	<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474	CAZ, S3
27	TC26	<i>Bacillus mojavensis</i> strain ifo 15718	CAZ, FOX, S3
28	TC27	<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	E
29	TC33	<i>Bacillus sonorensis</i> strain SRA1	AMC, CAZ, CTX, C, E
30	TC35	<i>Bacillus</i> sp. JBS-6	CAZ, CTX, E

Nº cepa	Código cepa	Identificación	Resistencia a antibióticos
TSA tratamiento D=600 MPa/50°C			
31	TD2	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	CAZ, C, E
32	TD6	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	CAZ, FOX, CTX, E
33	TD8	<i>Paenibacillus faecis</i> strain CIP 101062	K
34	TD9	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959	CAZ, FOX, CTX, C
35	TD13	<i>Lysinibacillus pakistanensis</i> strain NCCP-54	CIP, CAZ,
36	TD15	<i>Bacillus mojavensis</i> strain ifo 15718	CAZ, FOX, CTX, MEM, C, TE,
37	TD17	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959	CAZ, FOX, CTX, C, K, E
38	TD18	<i>Paenibacillus relictisesami</i> strain KB0549	CIP, CAZ, FOX, CTX, MEM, TE, K, E
39	TD19	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	AMC, CAZ, CTX, C, E
40	TD21	<i>Azospirillum lipoferum</i> strain OS-2	CAZ, CTX, E
41	TD22	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain LF 41M	CAZ, CTX, K
Mueller Hinton + cloruro benzalconio a 200 mg/L a 30°C anaerobiosis			
42	CBA2	<i>Enterobacter soli</i> ATCC BAA-2102 strain LF7	AMC, CAZ, FOX, CTX, CN, S3, E
43	CBA5	<i>Lelliottia amnigena</i> strain JCM1237	AMC, FOX, S3, E
44	CBA8	<i>Pantoea</i> sp. strain EnB33	AMC, FOX, S3, E
McConkey agar + cefotaxima a 64 mg/L aerobiosis			
45	CF1	<i>Enterobacter soli</i> ATCC BAA-2102 strain LF7	AMC, CIP, CAZ, FOX, CTX, MEM, C, K, CN, S3, E
46	CF3	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> strain BGSC 3A28	AMC, CIP, CAZ, FOX, CTX, CN, S3, E
47	CF17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain I307.27	CAZ, FOX, CTX, MEM, S3
McConkey agar + 4 mg/L Imipenen 37°C aerobiosis			
48	CI2	<i>Pseudomonas</i> sp. PP007	AMC, FOX, E
49	CI11	<i>Rahnella</i> sp. strain S 13	CTX, S3, E
KPC agar aerobiosis 37°C			
50	K4	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i> strain T5916-2-1b	AMC, CAZ, FOX, CTX, MEM, S3, E
51	K10	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i> strain T5916-2-1b	AMC, CIP, CAZ, FOX, CTX, MEM, S3, E
52	K16	<i>Bacterium</i> strain BS0793	AMC, CAZ, FOX, CTX, MEM, S3, E
53	K17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293	CAZ, FOX, CTX, MEM, S3, E
54	K22	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain DY16	CAZ, FOX, CTX, MEM, S3
55	K24	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293	CAZ, FOX, CTX, MEM, S3, E
56	K25	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. MGC2-3	CIP, CAZ, FOX, CTX, MEM, S3
57	K26	<i>Escherichia</i> sp. PP001	AMC, CAZ, FOX, CTX, MEM, C, TE, K, CN, S3, E
58	K28	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MR8	CAZ, FOX, CTX, MEM, S3
59	K35	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain CTC6578	CAZ, FOX, CTX, MEM, S3
60	K38	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293	FOX, CTX, MEM, S3
61	K46	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain C14	CIP, CAZ, FOX, CTX, MEM, S3
62	K48	<i>Lysinibacillus</i> sp. strain DST198	CIP, CAZ, FOX, CTX, MEM, S3
63	K50	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MFL25	CIP, CAZ, FOX, CTX, MEM, S3

Nº cepa	Código cepa	Identificación	Resistencia a antibióticos
KPC agar anaerobiosis, 37°C			
64	Kana1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293	AMC, CAZ, FOX, CTX, MEM, S3, E
65	Kana4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain TO09b	CIP, FOX, CTX, MEM, S3
66	Kana7	<i>Bacillus subtilis</i> strain ASU9	AMC, FOX,
67	Kana8	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain ARP23	AMC, CAZ, CTX,
68	Kana11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain SKL-6	CAZ, FOX, CTX, MEM, S3
KPC agar anaerobiosis, 37°C, tratamiento A=450 MPa/22°C			
69	KanaA1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MR5	CAZ, FOX, CTX, MEM, S3
70	KanaA2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain SKL-6	CAZ, FOX, CTX, MEM, S3

De igual forma se estudió de forma general la tolerancia de los 70 aislados totales frente a los diferentes biocidas ensayados, determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) en $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 7). Como se observa en la Figura 13, para los biocidas cetrimida (C), hexadecilpiridinio (HP) y triclosán (T) la MIC se encuentra en 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para casi la totalidad de las cepas en el caso de C y HP (69 y 68 cepas respectivamente) y para la mayor parte de cepas (55 aislados) en el caso del T. En el caso del cloruro de benzalconio (CB) la concentración varió más, estando entre 2 y 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aunque se observó de forma mayoritaria (hasta en 33 de los aislados) una MIC de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso de la clorhexidina digluconato (CD) la MIC estuvo repartida al 50% entre 32 y 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con 35 cepas sensibles para cada concentración. Por último, con el hexaclorofeno (HC) se obtuvieron las MIC más altas, de 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en 42 de los aislados.

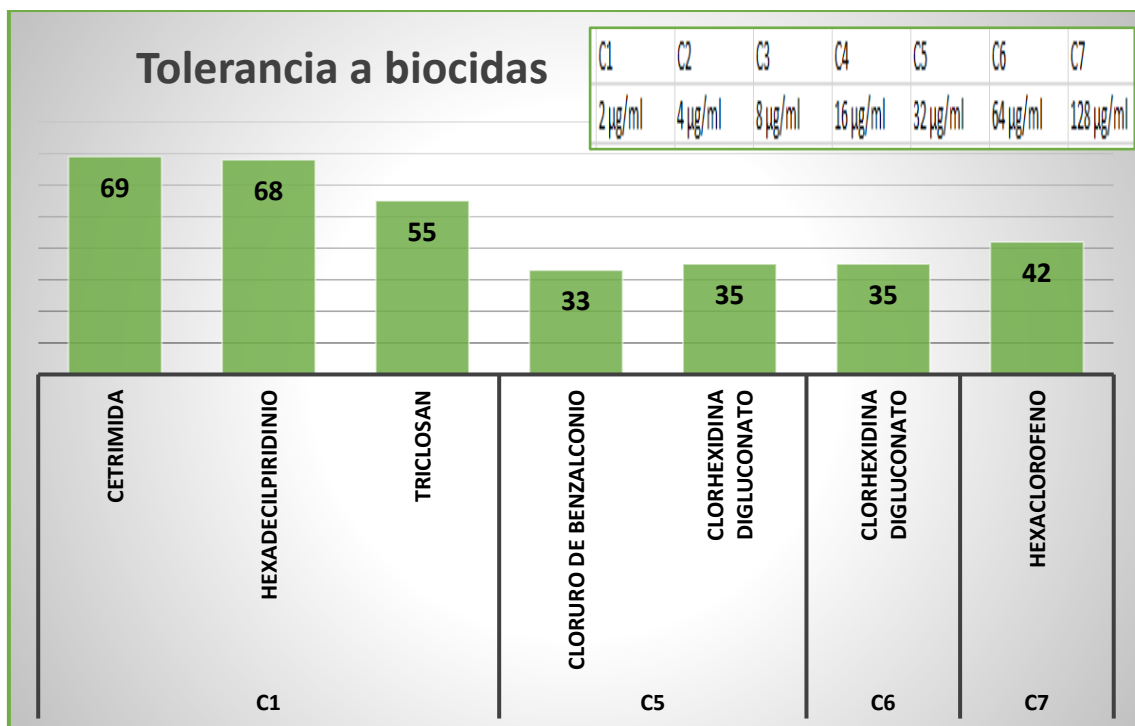


Figura 13. Grado de tolerancia a los diferentes biocidas por parte de las cepas aisladas del guacamole.

Tabla 7. Grado de tolerancia a los diferentes biocidas en las cepas bacterianas aisladas del guacamole.

Tolerancia a biocidas (MIC, µg/mL)						
Identificación	C	CB	CD	HC	HP	T
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	2	2	32	128	2	2
<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC 100820	2	4	32	128	2	2
<i>Bacillus enclensis</i> strain SGD-1123	2	2	32	128	2	2
<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	2	8	32	128	2	2
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	2	8	64	128	2	2
<i>Bacillus safensis</i> FO-36b	2	8	32	128	2	2
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> strain NBRC 101239	2	16	32	128	2	2
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	2	16	32	128	2	2
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	2	16	32	128	2	2
<i>Bacillus aerius</i> strain 24K	2	16	32	128	2	2
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	2	16	32	128	2	2
<i>Bacillus licheniformis</i> strain SA091	2	16	32	128	2	2
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	2	8	64	64	2	2
<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	2	16	32	64	2	4

Identificación	C	CB	CD	HC	HP	T
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	2	16	32	64	2	4
<i>Bacillus aerius</i> strain 24K	2	32	32	64	2	4
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i> strain NCCP-54	2	16	64	64	2	4
<i>Bacillus aerius</i> strain 24K	2	16	32	64	2	4
<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	2	32	64	64	2	4
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	2	32	64	128	2	4
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	2	32	64	128	2	4
<i>Bacillus pumilus</i> strain MUR5	2	32	64	128	2	2
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959	2	16	64	128	2	2
<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474	2	16	32	128	2	2
<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474	2	16	32	128	2	2
<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474	2	32	32	128	2	2
<i>Bacillus mojavensis</i> strain ifo 15718	2	32	32	128	2	2
<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	2	16	32	128	2	2
<i>Bacillus sonorensis</i> strain SRA1	4	2	64	128	4	4
<i>Bacillus</i> sp. JBS-6	2	32	64	128	2	2
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	2	16	32	128	2	2
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	2	32	32	128	2	2
<i>Paenibacillus faecis</i> strain CIP 101062	2	32	32	128	2	2
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959	2	8	32	128	2	2
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i> strain NCCP-54	2	16	64	128	2	2
<i>Bacillus mojavensis</i> strain ifo 15718	2	16	64	128	2	2
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959	2	16	64	128	2	2
<i>Paenibacillus relictisesami</i> strain KB0549	2	32	64	128	2	2
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	2	32	64	128	2	2
<i>Azospirillum lipoferum</i> strain OS-2	2	32	64	128	2	2
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain LF 41M	2	32	32	128	2	2
<i>Enterobacter soli</i> ATCC BAA-2102 strain LF7	2	32	64	64	2	2
<i>Lelliottia amnigena</i> strain JCM1237	2	32	64	64	2	2
<i>Pantoea</i> sp. strain EnB33	4	16	64	64	4	4
<i>Enterobacter soli</i> ATCC BAA-2102 strain LF7	2	4	64	128	2	4
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> strain BGSC 3A28	2	2	64	64	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain I307.27	2	2	32	64	2	2
<i>Pseudomonas</i> sp. PP007	2	32	32	64	2	2
<i>Rahnella</i> sp. strain S 13	2	16	64	128	2	2
<i>Stenotrophomonas tumulicola</i> strain T5916-2-1b	2	32	32	32	2	2
<i>Stenotrophomonas tumulicola</i> strain T5916-2-1b	2	32	32	64	2	2
<i>Bacterium</i> strain BS0793	2	2	64	128	2	4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293	2	32	64	64	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain DY16	2	32	64	64	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293	2	2	64	128	2	4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. MGC2-3	2	2	32	64	2	2

Identificación	C	CB	CD	HC	HP	T
<i>Escherichia</i> sp. PP001	2	16	32	64	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MR8	2	32	64	64	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain CTC6578	4	32	32	32	4	4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293	2	32	32	64	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain C14	2	32	64	64	2	2
<i>Lysinibacillus</i> sp. strain DST198	2	32	64	128	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MFL25	2	32	64	128	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293	2	32	64	64	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain TO09b	2	32	64	128	2	2
<i>Bacillus subtilis</i> strain ASU9	2	32	32	32	2	2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain ARP23	2	32	32	64	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain SKL-6	2	32	64	64	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MR5	2	32	64	64	2	2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain SKL-6	2	4	64	128	2	4

Además, se realizó el estudio de tolerancia a los biocidas ensayados de forma más específica, atendiendo a los grupos bacterianos mayoritarios dentro de la población seleccionada. En el caso de los *Bacillus*, de las 44 cepas que conforman este grupo bacteriano dentro de la población, en la mayoría de las cepas se observó una MIC de 2 µg/mL para los biocidas cetrimida (C), en un 100%; hexadecilpiridinio (HP), en un 98%; y triclosán (T), en un 80% de los *Bacillus*. Por otro lado, la MIC para para la mayor parte de los bacilos (41%) frente al biocida cloruro de benzalconio (CB) fue de 16 µg/mL, mientras que frente al biocida clorhexidina digluconato (CD) la MIC fue de 32 µg/mL, para un 61% de *Bacillus*. Por último, frente al biocida hexaclorofeno (HC), la mayor parte de los bacilos, representados en un 77%, presentaron la MIC más concentrada, de 128 µg/mL (Figura 14).

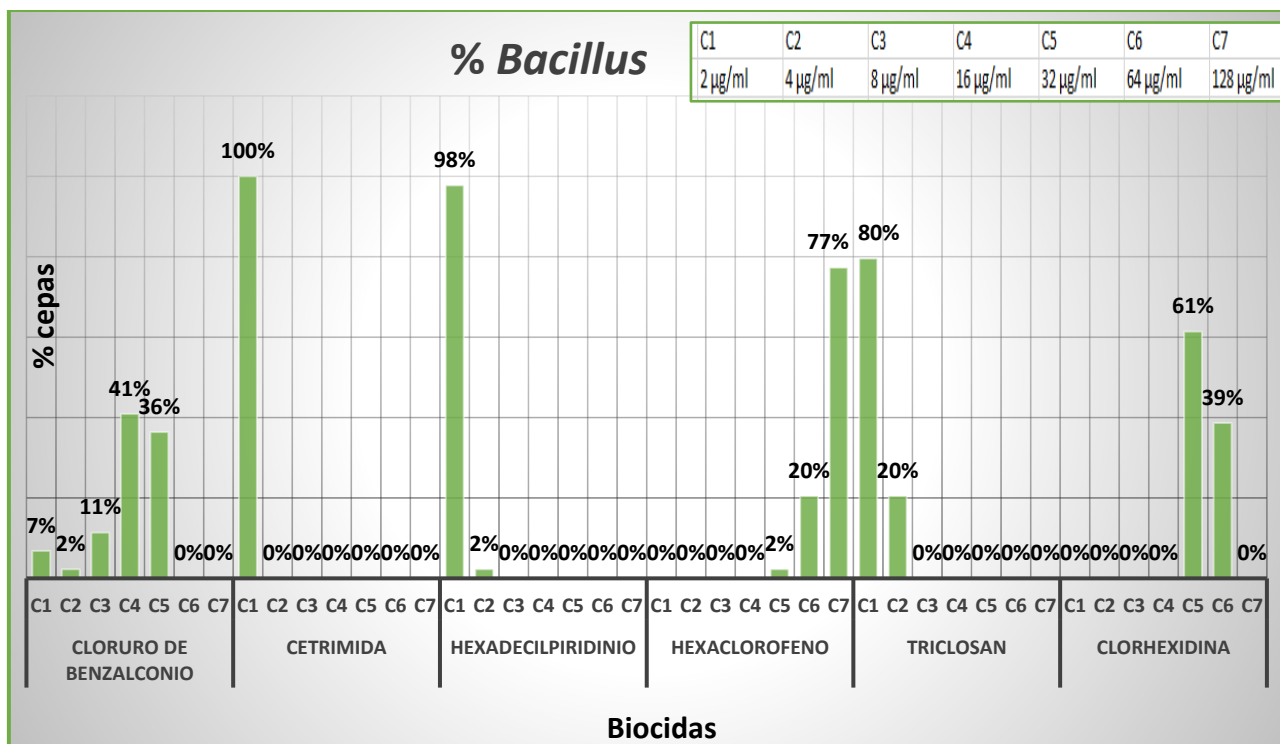


Figura 14. Grado de tolerancia a los diferentes biocidas por parte de los *Bacillus* aislados del guacamole.

En los 15 *Leuconostoc* presentes en la población total (Figura 15), la MIC observada fue de 2 µg/mL para la mayoría de las cepas frente a los biocidas C y HP, con un 93% cada uno; y T, con un 80% de los *Leuconostoc* totales. La MIC a 32 µg/mL afectaba a la mayoría de las cepas en el caso del CB, inhibiendo el crecimiento del 73% de los *Leuconostoc*, mientras que la MIC a 64 µg/mL no fue tolerada por el 67 y el 73% de los *Leuconostoc* con los biocidas HC y CD respectivamente.

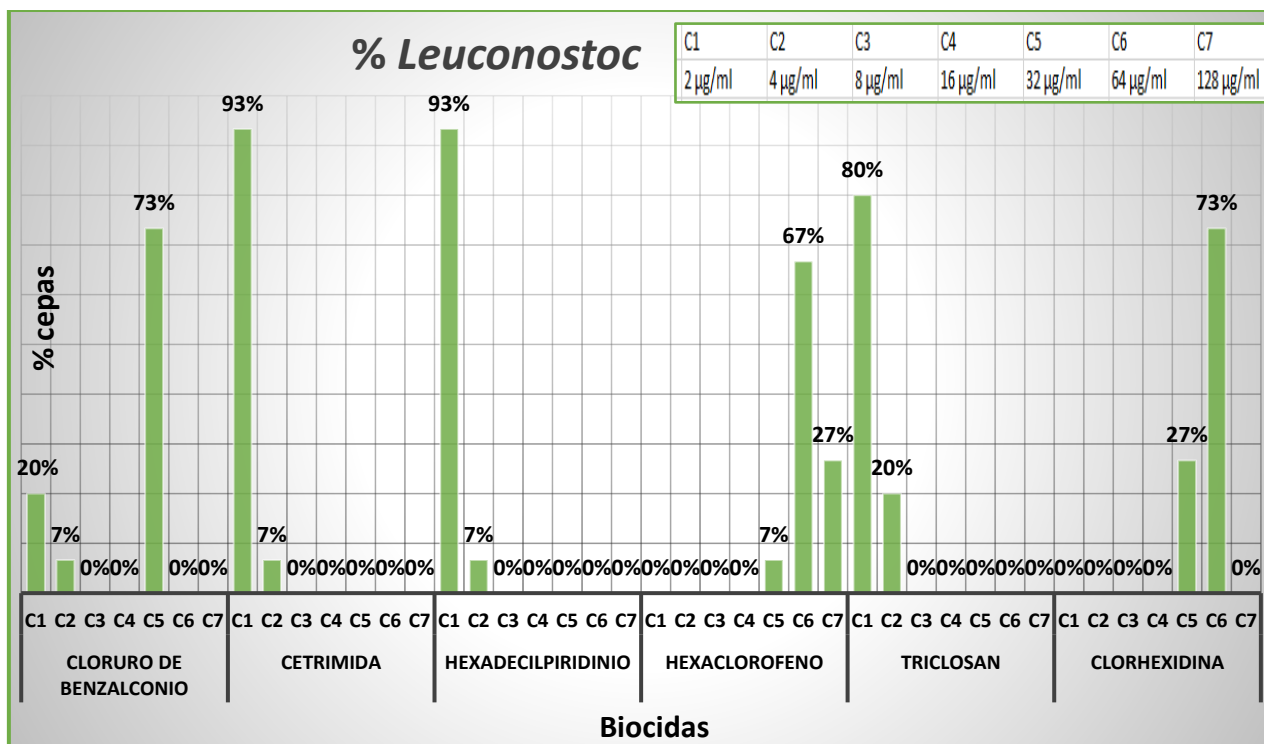


Figura 15. Grado de tolerancia a los diferentes biocidas por parte de los *Leuconostoc* aislados del guacamole.

5.1.3. Estudio de los determinantes de resistencia.

Al mismo tiempo se realizaron ensayos mediante PCR para determinar la presencia de genes de resistencia a antibióticos en las 70 cepas seleccionadas.

Se detectaron alguno de los 7 genes de resistencia a betalactámicos ensayados en 58 de las 70 cepas totales, lo cual representa un 83%, siendo así el grupo de genes de resistencia de mayor presencia. La detección de dichos genes, en orden descendente, fue la siguiente: el gen *bla_{SHV}*, en 41 cepas; el gen *bla_{TEM}*, en 19 cepas; el gen *bla_{KPC}*, en 16 cepas; el gen *bla_{ctxM1}*, en 15 cepas; el gen *bla_{ctxM2}*, en 10 cepas; y el gen *bla_{OXA-48-like}* en 3 cepas. No se detectó la presencia del gen *bla_{TPSE}* (Tabla 8).

Cabe destacar las cepas TB14, K48 y K50, identificadas como *Bacillus wiedmannii*, *Lysinibacillus* sp. y *Leuconostoc mesenteroides* respectivamente, las cuales mostraron cuatro de los siete genes ensayados (Tabla 8).

Tabla 8. Presencia de genes de resistencia a betalactámicos en las cepas bacterianas aisladas del guacamole.

Identificación	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTXM2}
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	+		+			
<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC 100820	+					
<i>Bacillus enclensis</i> strain SGD-1123	+			+		
<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	+					
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	+		+			+
<i>Bacillus safensis</i> FO-36b	+		+	+		
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> NBRC 101239				+		
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	+			+		
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	+					+
<i>Bacillus aerius</i> strain 24K	+	+				
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	+					
<i>Bacillus licheniformis</i> strain SA091	+			+		
<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	+			+	+	+
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	+					
<i>Bacillus aerius</i> strain 24K	+					
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i> strain NCCP-54						+
<i>Bacillus aerius</i> strain 24K	+	+				
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	+					+
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	+	+				+
<i>Bacillus pumilus</i> strain MUR5						+
<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474	+				+	
<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474	+				+	
<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474	+				+	+
<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	+					
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	+			+		
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	+					
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959	+					

Identificación	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTXM2}
<i>Bacillus mojavensis</i> strain ifo 15718	+			+		
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959	+			+		
<i>Paenibacillus relictisesami</i> strain KB0549				+		
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327				+		
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> BGSC 3A28	+					
<i>Bacillus subtilis</i> strain ASU9	+			+		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain ARP23					+	
<i>Bacillus licheniformis</i> strain SA091	+			+		
<i>Bacillus sonorensis</i> strain SRA1	+	+				
<i>Bacillus</i> sp. JBS-6	+	+				
<i>Lysinibacillus</i> sp. strain DST198	+	+		+	+	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain I307.27		+				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293		+				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain DY16		+				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293	+					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MR8		+				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain CTC6578		+				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293	+				+	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain C14		+			+	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293		+		+	+	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain TO09b		+			+	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain SKL-6		+			+	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MR5	+	+			+	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain SKL-6		+			+	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MFL25	+	+		+	+	
<i>Pseudomonas</i> sp. PP007	+					
<i>Stenotrophomonas tumulicola</i> strain T5916-2-1b	+					
<i>Enterobacter soli</i> ATCC BAA-2102 strain LF7	+					+
<i>Rahnella</i> sp. strain S 13					+	
<i>Azospirillum lipoferum</i> strain OS-2	+	+				
<i>Lelliottia amnigena</i> strain JCM1237	+					+

En referencia a la presencia de genes codificadores para posible resistencia a las tetraciclinas se detectaron alguno de los 10 genes ensayados en 56 de las 70 cepas totales, lo cual representa un 80% de la población, siendo así el segundo grupo de genes de resistencia de mayor presencia. El gen más detectado fue el gen *tet(A)*, presente en 40 cepas, seguido de *tet(S)* y *tet(C)*, observados en 12 cepas, *tet(E)* el cual fue detectado en 11 cepas, y *tet(G)*, presente en 8 cepas. El resto de genes fueron detectados en al menos 2 cepas cada uno (Tabla 9).

Cabe destacar las cepas TC11, K48 y CBA8, identificadas como *Bacillus haynesii*, *Lysinibacillus* sp. y *Pantoea* sp. respectivamente, las cuales mostraron genes de resistencia en los tres grupos de tetraciclinas (Tabla 9).

Tabla 9. Presencia de genes de resistencia a tetraciclinas en las cepas bacterianas aisladas del guacamole.

Identificación	TET (B)	TET (C)	TET (D)	TET (A)	TET (E)	TET (G)	TET (K)	TET (L)	TET (M)	TET (S)
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327				+						
<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC 100820				+						
<i>Bacillus enclensis</i> strain SGD-1123				+						+
<i>Bacillus safensis</i> FO-36b										+
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> strain NBRC 101239				+						
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327			+							
<i>Bacillus aerius</i> strain 24K				+		+				
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b				+	+					
<i>Bacillus licheniformis</i> strain SA091				+	+					
<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169				+						
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b				+	+					
<i>Bacillus aerius</i> strain 24K				+		+				
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i> strain NCCP-54										+
<i>Bacillus aerius</i> strain 24K				+	+	+			+	
<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118				+	+					+

Identificación	TET (B)	TET (C)	TET (D)	TET (A)	TET (E)	TET (G)	TET (K)	TET (L)	TET (M)	TET (S)
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327				+	+	+				
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	+	+		+						+
<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474						+		+		
<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474						+		+		
<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474								+		
<i>Bacillus Mojavensis</i> strain ifo 15718							+			
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327			+	+	+					
<i>Paenibacillus faecis</i> strain CIP 101062	+									
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i> strain NCCP-54		+								
<i>Bacillus Mojavensis</i> strain ifo 15718							+			
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959				+			+			
<i>Paenibacillus relictisesami</i> strain KB0549					+					
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327										+
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> strain BGSC 3A28				+						
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain ARP23		+			+					
<i>Bacillus licheniformis</i> strain SA091					+					+
<i>Bacillus sonorensis</i> strain SRA1				+					+	+
<i>Bacillus</i> sp. JBS-6				+	+					+
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain LF 41M						+			+	
<i>Lysinibacillus</i> sp. strain DST198		+		+						+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain I307.27				+						
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293		+		+						
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain DY16		+		+						
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293				+						
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> strain MGC2-3		+		+						
<i>Escherichia</i> sp. PP001				+						
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MR8		+		+						
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain CTC6578				+				+		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293				+						

Identificación	TET (B)	TET (C)	TET (D)	TET (A)	TET (E)	TET (G)	TET (K)	TET (L)	TET (M)	TET (S)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain C14				+						
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain ATCC 8293		+		+						
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MR5		+								
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain TO09b		+		+						
<i>Bacillus subtilis</i> strain ASU9				+						
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MFL25				+						+
<i>Pseudomonas</i> sp. PP007				+						
<i>Stenotrophomonas tumulicola</i> strain T5916-2-1b				+						
<i>Rahnella</i> sp. strain S 13				+		+				
<i>Azospirillum lipoferum</i> strain OS-2				+					+	+
<i>Pantoea</i> sp. strain EnB33		+		+					+	
<i>Bacterium</i> strain BS0793				+						

En cuanto a los genes de resistencia a inhibidores de la dihidrofolato reductasa se detectó alguno de los dos genes que representaban este grupo en 21 de las 70 cepas totales aisladas, lo que representa un 30% de la población. Estas 21 cepas presentaban el gen *dfra12*, pero en ninguna de ellas se detectó la presencia del gen *dfra15* (Tabla 10).

Entre los 7 genes ensayados que codifican para las bombas de eflujo encargadas de la resistencia a, entre otros, fluoroquinolonas, bromuro de etidio o derivados del amonio cuaternario se detectó alguno de los mismos en 21 de las 70 cepas totales aisladas, es decir, en un 30% de la población. Cabe destacar la presencia del gen *mepA*, en 17 de los aislados, y los genes *sdrM* y *mdeA*, en 3 y 2 cepas respectivamente. No se detectó la presencia de los genes *smr*, *norA* o *norC* en ninguna de las cepas identificadas (Tabla 10).

En cuanto a la resistencia frente a macrólidos, se detectó alguno de los dos genes ensayados de este grupo en 22 de las 70 cepas totales aisladas, lo que representa un 31% de la población. El único gen encontrado de este grupo fue el *ereA*, presente en 22 cepas, ya que no se detectó la presencia del gen *ereB* (Tabla 10).

Tabla 10. Presencia de genes de resistencia a inhibidores de la dihidrofolato reductasa, macrólidos y bombas de exporte en las cepas bacterianas aisladas del guacamole.

Identificación	<i>dfrA12</i>	<i>ereA</i>	<i>mdeA</i>	<i>mepA</i>	<i>sdrM</i>
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327		+		+	
<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC 100820				+	
<i>Bacillus enclensis</i> strain SGD-1123		+		+	
<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118		+			
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327		+		+	
<i>Bacillus safensis</i> FO-36b				+	
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> strain NBRC 101239		+		+	
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b		+			
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327		+		+	
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b		+		+	
<i>Bacillus licheniformis</i> strain SA091 16S		+			
<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b		+			
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i> strain NCCP-54	+			+	
<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118		+	+		
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327		+			
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327		+			
<i>Bacillus pumilus</i> strain MUR5		+			+
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959				+	+
<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474				+	
<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474				+	
<i>Bacillus mojavenensis</i> strain ifo 15718	+				
<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118		+			
<i>Bacillus</i> sp. JBS-6 16S		+			
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327				+	
<i>Paenibacillus faecis</i> strain CIP 101062	+	+			
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959	+				+
<i>Lysinibacillus pakistanensis</i> strain NCCP-54				+	
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NBRC 15959	+			+	
<i>Paenibacillus relictisesami</i> strain KB0549		+			

Identificación	<i>dfrA12</i>	<i>ereA</i>	<i>mdeA</i>	<i>mepA</i>	<i>sdrM</i>
<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	+			+	
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> strain BGSC 3A28	+	+			
<i>Bacillus subtilis</i> strain ASU9 16S		+			
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain ARP23	+				
<i>Bacillus sonorensis</i> strain SRA1			+		
<i>Bacillus licheniformis</i> strain SA091		+			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain DY16	+				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> strain MGC2-3	+				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MR8	+				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain CTC6578	+				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain C14	+				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain MR5	+				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> strain SKL-6	+				
<i>Stenotrophomonas tumulicola</i> strain T5916-2-1b	+				
<i>Stenotrophomonas tumulicola</i> strain T5916-2-1b	+				
<i>Enterobacter soli</i> ATCC BAA-2102 strain LF7	+				
<i>Rahnella</i> sp. strain S 13	+	+		+	
<i>Lelliottia amnigena</i> strain JCM1237	+				
<i>Bacterium</i> strain BS0793	+				

Atendiendo a los diferentes grupos bacterianos encontrados, dentro del 83% de cepas identificadas que presentan alguno de los genes de resistencia frente a betalactámicos, encontramos que, de forma mayoritaria con un 65,5%, dichas cepas se corresponden con el grupo *Bacillus*, seguido de un 24,1% representado por el grupo *Leuconostoc*, un 3,4% por *Pseudomonas* y, en menor grado, encontramos las cepas de *Enterobacter*, *Rahnella*, *Azospirillum* y *Lelliottia*, con un 1,7% para cada una (Figura 16).

En cuanto a la resistencia a tetraciclinas, dentro del 80% de cepas identificadas que presentan alguno de dichos genes de resistencia, encontramos que más de la mitad de dicha población (64,3%) se corresponde con cepas del grupo *Bacillus*, seguido de un 23,2%

representado por el grupo *Leuconostoc*, un 3,6% por *Pseudomonas* y, en menor grado, encontramos las cepas de *Rahnella*, *Azospirillum*, *Pantoea*, *Escherichia* y *Bacterium* (sinónimo heterotípico), con un 1,8% correspondiente a cada una (Figura 16).

Del 31% de cepas identificadas que presentan alguno de los genes de resistencia frente a macrólidos, encontramos que casi en su totalidad (95,5%) se corresponde con cepas del grupo *Bacillus*, siendo el 4,5% restante atribuido a la cepa *Rahnella*. Muy similar fue el caso de las bombas de exporte ya que del 30% de cepas identificadas que presentan alguno de estos genes, encontramos que un 95,2% se correspondía con cepas del grupo *Bacillus* y el 4,8% restante con la cepa *Rahnella* (Figura 16).

Por último, dentro del 30% de cepas identificadas que presentaban alguno de los genes de resistencia frente a inhibidores de la dihidrofolato reductasa, encontramos que un 38,1% se correspondía con *Bacillus*, seguido de muy cerca por *Leuconostoc*, representado con un 33,3%. En menor grado encontramos un 9,5% de *Pseudomonas* y un 4,8% para cada una de las cepas de *Enterobacter*, *Rahnella*, *Lelliottia* y *Bacterium* en las que se detectó alguno de estos genes de resistencia (Figura 16).

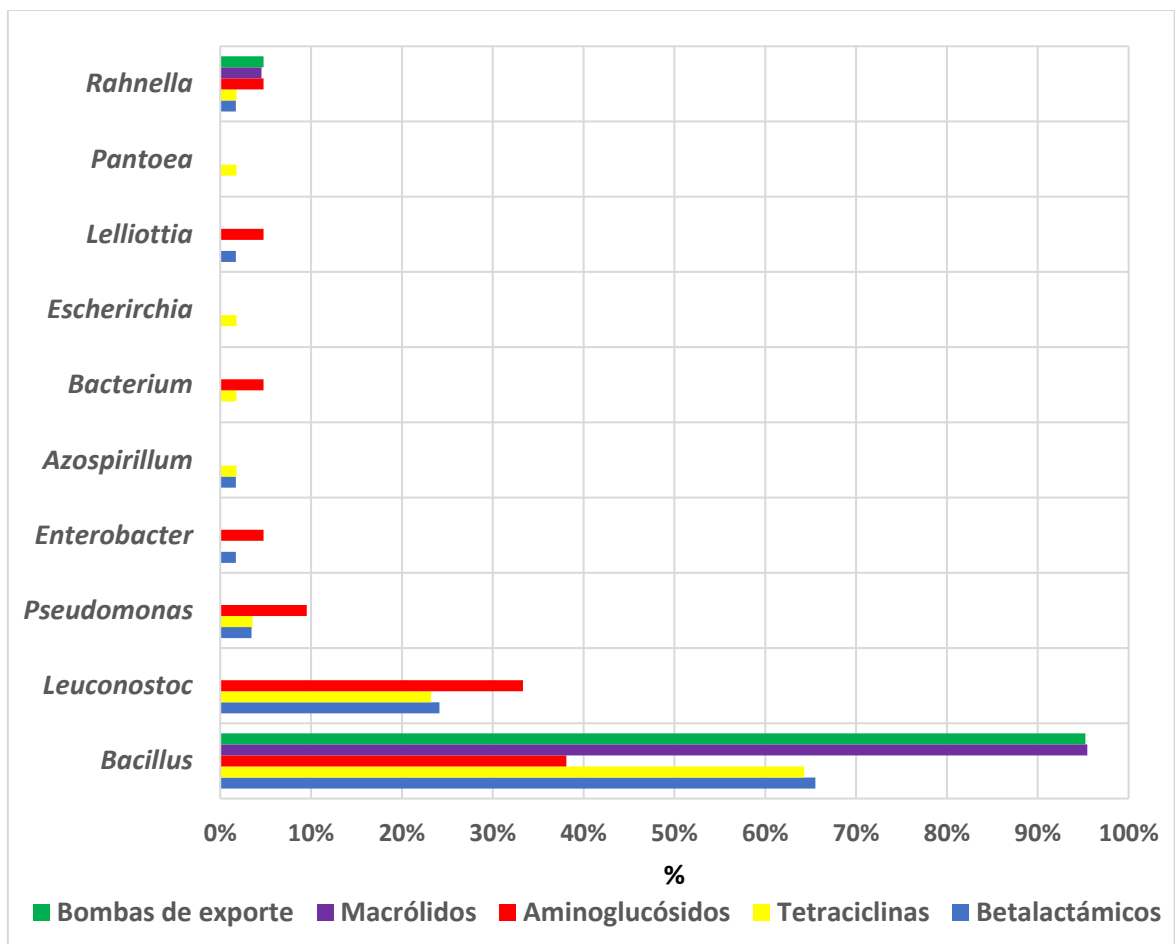


Figura 16. Porcentaje de grupos bacterianos aislados del guacamole que presentan los diferentes tipos de genes de resistencia.

5.1.4. Estimación de la biodiversidad bacteriana de las muestras.

La diversidad bacteriana presente en las muestras de guacamole, tratadas o no y almacenadas en frío, se determinó mediante la secuenciación Illumina de las regiones variables V3-V4 del gen 16S rRNA. El número de lecturas asignadas y los índices de diversidad alfa de los controles y las muestras tratadas se muestran en la Tabla 11. Los índices de diversidad de Shannon y Simpson más bajos se observaron en las muestras tratadas con APH.

Tabla 11. Número de lecturas e índices de diversidad alfa a nivel de género de las muestras de guacamole tratadas o no por alta presión hidrostática (APH).

Muestras	Número de lecturas	Chao1	Shannon	Simpson
U0	3478	35	0.67	0.36
U5	3440	37	0.62	0.34
U10	9275	48	0.81	0.35
U20	7689	34	0.87	0.39
U30	4641	33	0.43	0.17
U40	69978	19	0.87	0.47
U50	162425	23	0.51	0.26
A0	2926	38	0.49	0.24
A5	2987	44	0.38	0.16
A10	2483	36	0.52	0.26
A20	2823	40	0.4	0.17
A30	2384	28	0.36	0.16
A40	4474	42	0.5	0.2
A50	3294	44	0.54	0.24
B0	2113	36	0.43	0.21
B5	4865	55	0.4	0.15
B10	1876	31	0.42	0.2
B20	2571	39	0.38	0.15
B30	2312	30	0.38	0.17
B40	3750	39	0.41	0.16
B50	4096	45	0.4	0.15
C0	2948	33	0.53	0.29
C5	1689	41	0.41	0.19
C10	6809	51	0.47	0.19
C20	1565	36	0.38	0.17
C30	1968	24	0.29	0.13
C40	2074	36	0.44	0.21
C50	8033	62	0.51	0.2
D0	7764	52	0.61	0.24
D5	4082	43	0.41	0.16
D10	4209	43	0.49	0.2
D20	3967	41	0.39	0.15
D30	5623	41	0.43	0.17
D40	4514	35	0.45	0.18
D50	6665	39	0.48	0.19

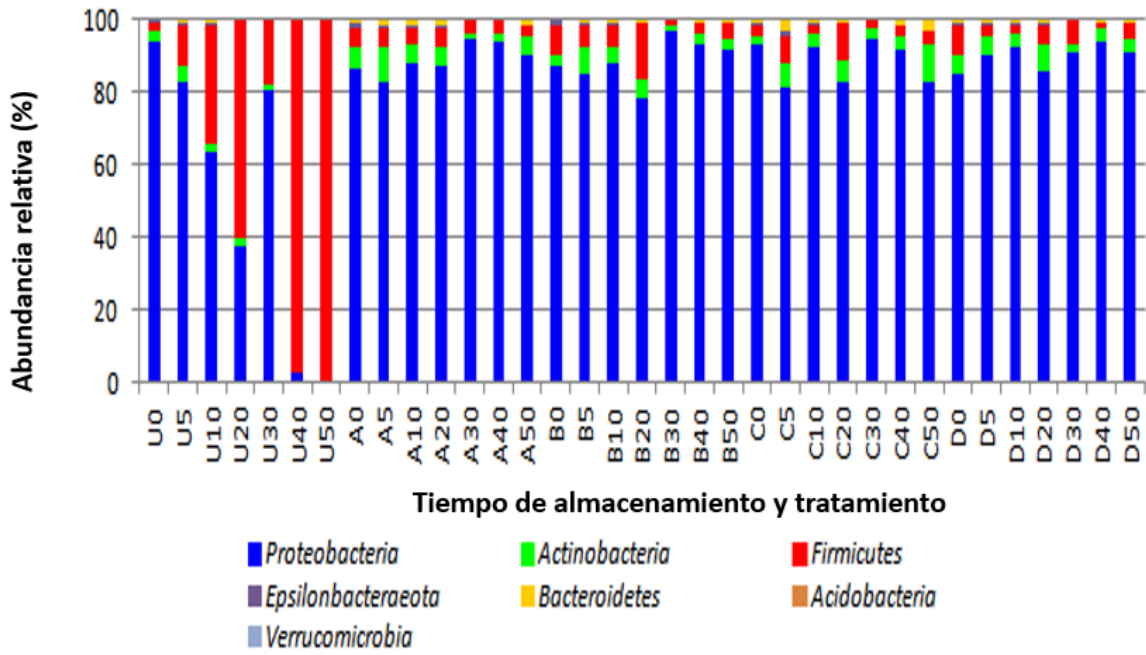
Las muestras U se corresponden con los controles (no tratados). Los diferentes tratamientos con APH son: A, 450 MPa a 22 °C; B, 450 MPa a 50 °C; C, 600 MPa a 22 °C; y D, 600 MPa a 50 °C. Los números indican el tiempo de almacenamiento (días). Chao 1 es un estimador de la riqueza de especies basado en la abundancia. Los índices de Shannon y Simpson son estimadores tanto de la riqueza como de la uniformidad de las especies, con más énfasis en la riqueza (Shannon) o en la uniformidad (Simpson).

Las diferentes unidades taxonómicas operativas (OTU) encontradas en las muestras de guacamole se agruparon en 6 filos (Figura 17A), de las cuales *Proteobacteria* fueron, con diferencia, los principales representantes, seguidos de *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Estos filos incluían representantes de 49 familias (más 2 taxones superiores). De ellas, 14 familias con abundancias relativas de al menos 2% cubrieron entre 93 y 99,9% de OTUs (Figura 17B). A nivel de género, se detectaron un total de 98 géneros (más 6 taxones superiores). De ellos, 20 tuvieron abundancias relativas de al menos 2% y cubrieron entre 87,2 y 99,9% de las OTUs (Figura 17C).

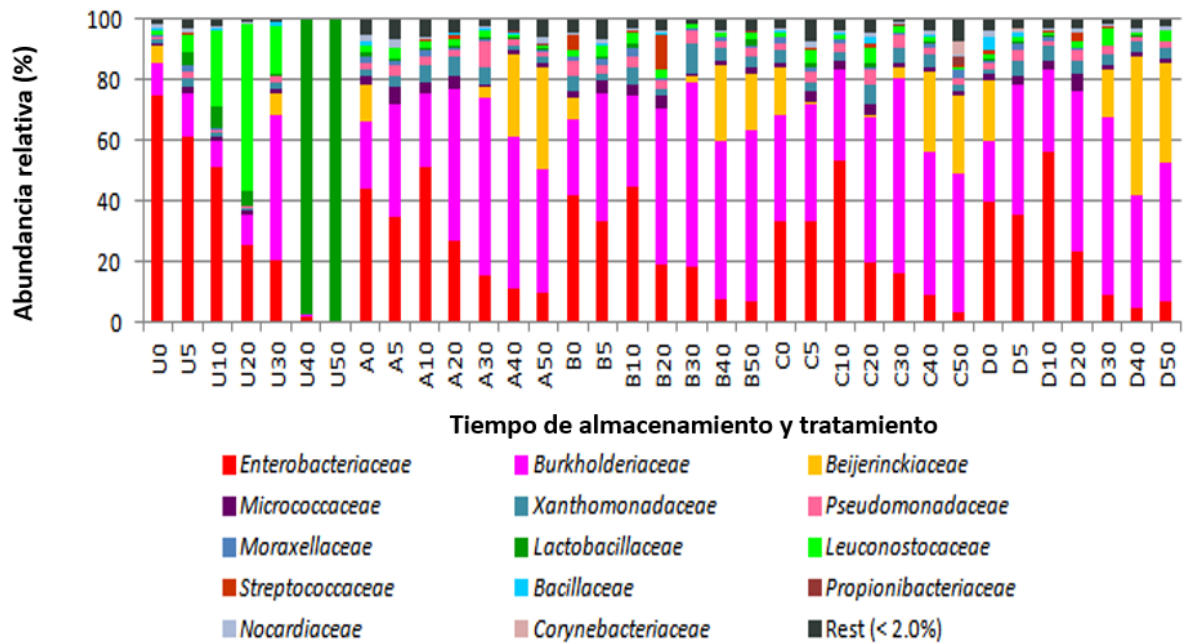
La familia *Enterobacteriaceae* fue el principal grupo bacteriano encontrado en las muestras control en el tiempo 0. A nivel de género, predominaron las OTUs asignadas a *Enterobacteriaceae* (géneros no identificados), seguidas por las OTUs asignadas al género *Pantoea*. Durante el almacenamiento, se produjo una marcada disminución en la abundancia relativa de la familia *Enterobacteriaceae* y, en particular, de las OTUs asignadas a *Enterobacteriaceae*, mientras que las OTUs asignadas al género *Pantoea* aumentaron en los días 5 y 10. Los principales cambios detectados en las abundancias relativas de otras familias incluyeron un aumento de la familia *Leuconostocaceae* (género *Leuconostoc*) en los días 10 y 20, seguido

de la familia *Burkholderiaceae* (género *Ralstonia*) en el día 30 y la familia *Lactobacillaceae* (género *Lactobacillus*) en los días 40 y 50.

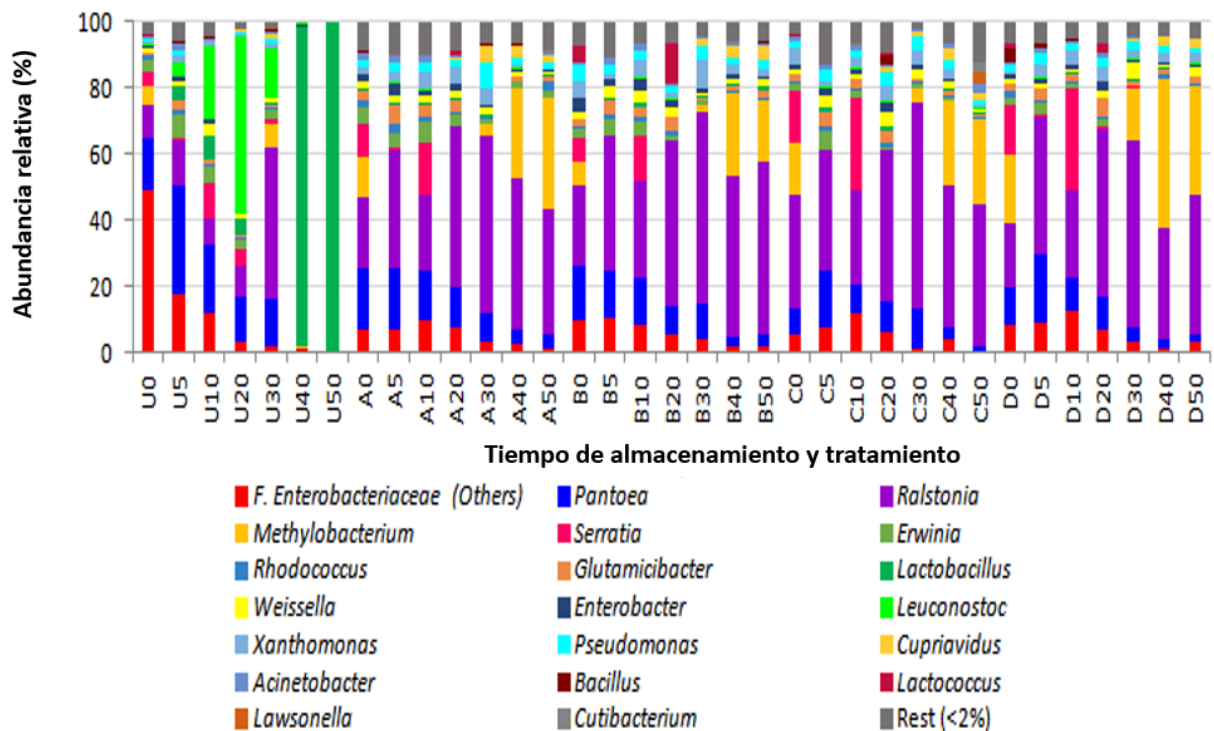
En las muestras tratadas con APH, hubo una reducción general en la abundancia relativa de la familia *Enterobacteriaceae*, tanto después del tratamiento como durante el almacenamiento. Dentro de esta familia, las muestras tratadas se caracterizaron por una reducción general en la abundancia relativa de las OTUs asignadas a *Enterobacteriaceae* y un aumento temprano en la abundancia relativa de las OTUs asignadas al género *Pantoea*. La abundancia relativa de *Burkholderiaceae* (representada por el género *Ralstonia*) aumentó tanto después del tratamiento como durante el almacenamiento. *Ralstonia* se convirtió en el grupo predominante en la mayoría de las muestras durante el almacenamiento, mientras que *Pantoea* disminuyó durante el almacenamiento. *Methylobacterium* (representante de la familia *Beijerinckiaceae*) se convirtió en un género relevante al final del almacenamiento (días 40 y 50) en todas las muestras tratadas, independientemente del tratamiento. *Methylobacterium* mostró sus abundancias relativas más altas en los días 40 y 50 (45,3 % y 32,6 %) en las muestras del tratamiento D. Los miembros de las familias *Bacillaceae* y *Lactobacillaceae* tuvieron abundancias relativas muy bajas en las muestras tratadas con APH. La familia *Leuconostocaceae* estuvo representada en las muestras tratadas por el género *Weissella* en lugar de *Leuconostoc*. Se detectó *Weissella* en la mayoría de los tratados durante el almacenamiento temprano a medio, en abundancias relativas de hasta el 5,3 %.



(A)



(B)



(C)

Figura 17. Diversidad bacteriana de las muestras de guacamole a nivel de filo (A), familia (B) y género (C). Las muestras U se corresponden con los controles (no tratados). Los diferentes tratamientos con APH son: A, 450 MPa a 22 °C; B, 450 MPa a 50 °C; C, 600 MPa a 22 °C; y D, 600 MPa a 50 °C. Los números indican el tiempo de almacenamiento (días).

El análisis de coordenadas principales (PCoA) reveló que la mayoría de las muestras control se mapearon por separado de las muestras tratadas (Figura 18). Además, las muestras control U20, U40 y U50 no mostraron correlaciones positivas significativas ($p > 0,05$) con ninguna de las muestras tratadas. También se pudo observar que las muestras tratadas se mapearon en subgrupos según el tiempo de almacenamiento en lugar del tratamiento, como lo ejemplifican los subgrupos 1 (muestras A5-B5-C5-D5), 2 (muestras A10-B10-C10-D10), 3 (todas las muestras tratadas de los días 20 y 30), 4 (muestras A40-B40-C40) y 5 (muestras A50-C50-D50).

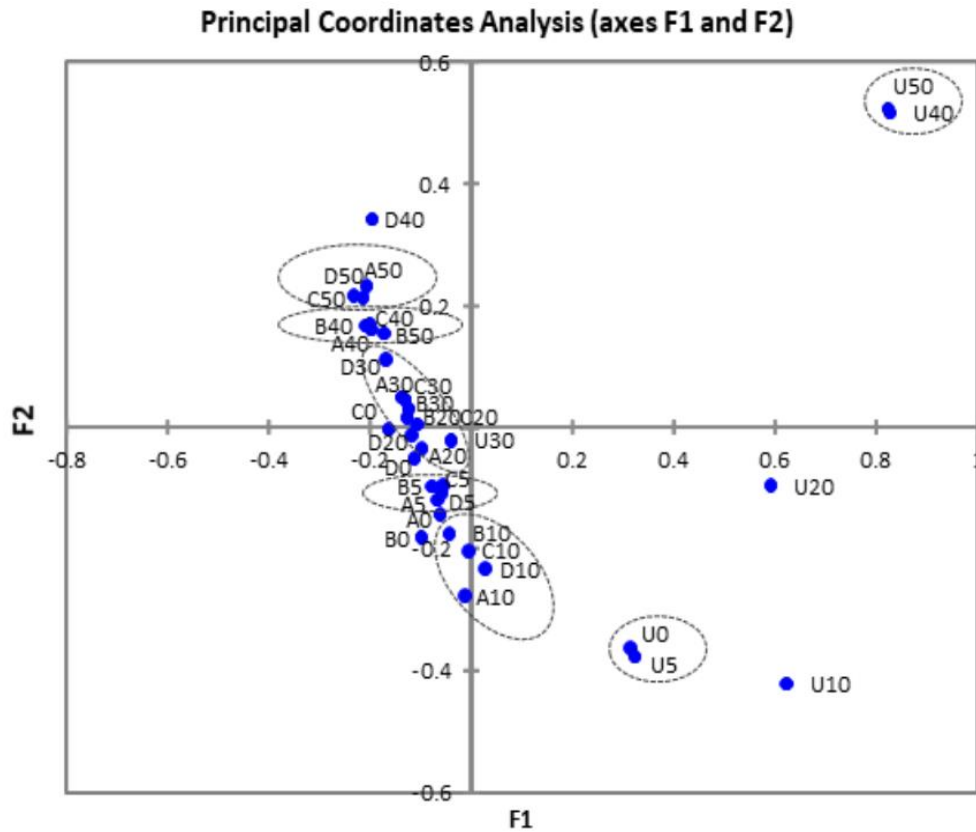


Figura 18. Análisis de coordenadas principales de las muestras de guacamole tratadas o no por APH. Las muestras U se corresponden con los controles (no tratados). Los diferentes tratamientos con APH son: A, 450 MPa a 22 °C; B, 450 MPa a 50 °C; C, 600 MPa a 22 °C; y D, 600 MPa a 50 °C. Los números indican el tiempo de almacenamiento (días).

5.2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA SOBRE EL PH, LA CARGA MICROBIANA, LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y LA DIVERSIDAD BACTERIANA DEL ALIÑO.

5.2.1. Estudio de la variación de pH y de la carga microbiana total.

Los recuentos de células viables de mesófilos aeróbicos totales en las muestras control, cultivadas en TSA, aumentaron de manera gradual y significativa ($p < 0,05$) de 5,49 a 6,58 log UFC/g durante el almacenamiento. Las muestras tratadas por APH mostraron recuentos de células viables comprendidos entre 1,02 y 1,84 log UFC/g significativamente más bajos ($p < 0,05$) en comparación con los controles no tratados, o incluso por debajo del límite de detección de 1,0 log UFC/g (como en el caso de tres muestras tratadas a 50°C; Tabla 12). Dados los bajos recuentos residuales obtenidos para las muestras tratadas, no fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cuanto a presión o temperatura.

Los recuentos de presuntas enterobacterias, obtenidas en agar McConkey, aumentaron de 5,5 a 6,25 en el día 10, pero aún permanecieron significativamente más bajos ($p < 0,05$) en comparación con los mesófilos aerobios totales durante los días 2 a 20. No se obtuvieron recuentos viables en agar McConkey para ninguno de las muestras tratadas (Tabla 12).

Las levaduras y mohos se mantuvieron en niveles entre 5,19 y 5,5 para la mayoría de las muestras de control, con diferencias significativas solo para el tiempo de almacenamiento 10. La mayoría de los recuentos de levaduras y mohos obtenidos fueron significativamente más bajos que los mesófilos aerobios totales. En el caso de las muestras tratadas con APH, la

mayoría estuvieron por debajo del límite de detección, excepto el tiempo 0 en muestras tratadas a 450 MPa y 50 °C (Tabla 12).

El pH de las muestras control (no tratadas con APH) disminuyó significativamente de 5,06 en el tiempo 0 a 4,66 en el día 10, seguido de un aumento en el día 20 (Tabla 12). Por el contrario, los valores de pH de las muestras tratadas con APH permanecieron muy estables durante el almacenamiento (entre 4,94 y 5,11), sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras (independientemente del tratamiento o el tiempo de almacenamiento).

Tabla 12. Recuento de células viables y pH de las muestras de aliño tratadas o no por APH.

Aerobios mesófilos	T0	T2	T5	T10	T20
Control	5.49 ± 0.15	6.13 ± 0.12 a	6.49 ± 0.04a	6.57 ± 0.15a	6.50 ± 0.16a
Tratamiento A	1.30 ± 0.14b	1.65 ± 0.21b,d	1.30 ± 0.04b	1.84 ± 0.43b	1.54 ± 0.10b
Tratamiento B	1.02 ± 0.07b	1.39 ± 0.13b	1.30 ± 0.15b	1.30 ± 0.11b	< 1.00
Tratamiento C	1.02 ± 0.02b	1.17 ± 0.03b	1.17 ± 0.15b	1.74 ± 0.24b,c,d	1.77 ± 0.20b,c,d
Tratamiento D	1.30 ± 0.22b	1.54 ± 0.14b	< 1.00	1.17 ± 0.17b	< 1.00
Enterobacterias	T0	T2	T5	T10	T20
Control	5.50 ± 0.07 e	5.78 ± 0.23 e	5.55 ± 0.22 e	6.25 ± 0.19f	6.04 ± 0.11
Tratamiento A	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
Tratamiento B	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
Tratamiento C	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
Tratamiento D	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
Levaduras y hongos	T0	T2	T5	T10	T20
Control	5.19 ± 0.27	5.54 ± 0.10 h	5.17 ± 0.13h	4.32 ± 0.20g,h	5.49 ± 0.05h
Tratamiento A	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
Tratamiento B	1.01 ± 0.02 b	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
Tratamiento C	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
Tratamiento D	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
pH	T0	T2	T5	T10	T20
Control	5.06 ± 0.05	4.89 ± 0.05	4.85 ± 0.07	4.66 ± 0.05i	5.53 ± 0.11j
Tratamiento A	5.09 ± 0.08	4.94 ± 0.04	5 ± 0.07	4.94 ± 0.08	5.01 ± 0.05
Tratamiento B	4.98 ± 0.02	5.11 ± 0.08	4.95 ± 0.07	4.96 ± 0.05	4.95 ± 0.08
Tratamiento C	5.02 ± 0.02	5.03 ± 0.05	5.01 ± 0.04	5.02 ± 0.01	5.01 ± 0.00
Tratamiento D	4.99 ± 0.01	4.97 ± 0.05	4.98 ± 0.01	4.98 ± 0.02	4.94 ± 0.02

Los diferentes tratamientos con APH son: A, 450 MPa a 22 °C; B, 450 MPa a 50 °C; C, 600 MPa a 22 °C; y D, 600 MPa a 50 °C. El tiempo de almacenamiento en días viene indicado por (T). Significación estadística ($p < 0.05$): a, significativamente superior a los recuentos del control obtenidos en el tiempo 0; b, significativamente inferior a los controles no tratados (todos los puntos de muestreo); c, significativamente superior a los recuentos del mismo tratamiento en el tiempo 0; d, significativamente superior a los recuentos del tratamiento a 450 MPa, 50°C, tiempo 0; e, significativamente inferior a los mesófilos aeróbicos totales en los tiempos 5, 10 y 20; f, significativamente más alto dentro de su grupo en los tiempos 0 y 5; g, significativamente más bajo que las otras muestras dentro del grupo; h, significativamente más bajo que los mesófilos aeróbicos totales (tiempos 2 a 20); i, pH significativamente más bajo que todas las muestras tratadas y también los controles en el tiempo 0; j, pH significativamente más alto que todas las otras muestras.

Cuando se investigó el crecimiento en medios que contenían diferentes antimicrobianos, no se obtuvo crecimiento microbiano de ninguna de las muestras tratadas con APH durante todo el período de almacenamiento. En las muestras de control (no tratadas con APH), se observó crecimiento microbiano para la mayoría de las muestras después de la incubación en medios con diferentes antimicrobianos, pero los recuentos de células viables obtenidos fueron en la mayoría de los casos significativamente más bajos en comparación con los recuentos obtenidos sin antimicrobianos, con algunas excepciones, que se señalan a continuación.

Tabla 13. Recuento de células viables de las muestras de aliño sin tratar en medios que contienen antimicrobianos.

Antimicrobianos	T0	T2	T5	T10	T20
Cefotaxima	2.57 ± 0.18 a	3.76 ± 0.33 a	3.26 ± 0.09 a	3.70 ± 0.25 a	< 1.00
Imipenem	4.47 ± 0.09 a,c	5.15 ± 0.15 b,c	5.17 ± 0.19 b,c	5.12 ± 0.11b,c	3.07 ± 0.12 a
KPC aerobiosis	5.11 ± 0.10 c	5.20 ± 0.05c	5.05 ± 0.12c	4.81 ± 0.22c	2.88 ± 0.06
KPC anaerobiosis	< 1.00	2.39 ± 0.13d	2.34 ± 0.03d	3.56 ± 0.18 d	< 1.00
Cloruro de benzalconio	< 1.00	1.02 ± 0.02	2.32 ± 0.21	< 1.00	< 1.00

KPC, agar *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase con suplemento añadido. T, tiempo de almacenamiento (días). No se detectaron células viables en los medios suplementados con antimicrobianos para ninguna de las muestras tratadas con APH. Significación estadística ($p < 0,05$): a, significativamente inferior a los recuentos obtenidos en agar McConkey sin antimicrobianos (tomando como referencia los recuentos de *Enterobacteriaceae* indicados en la Tabla 12); b, significativamente inferior a los recuentos obtenidos en agar McConkey sin antimicrobianos en los tiempos 2, 10 y 20; c, significativamente superior a los recuentos obtenidos en cefotaxima; d, significativamente inferior a los recuentos obtenidos para KPC en aerobiosis en los tiempos 0 a 10.

En el caso de los medios con el biocida cloruro de benzalconio, sólo se observó crecimiento en los días 2 y 5 de almacenamiento, y fueron bastante bajos (1 y 2.3 log UFC/g). Los recuentos viables obtenidos en agar McConkey suplementado con cefotaxima oscilaron entre 2,58 y 3,70 log UFC/g (días 2 a 10) o estaban por debajo de los niveles de detección (día 20; Tabla 13). Los recuentos en medios con cefotaxima fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) en comparación con los recuentos obtenidos en el mismo medio sin antibiótico. Los recuentos viables obtenidos en agar McConkey suplementado con imipenem fueron altos para la mayoría de los días de almacenamiento (4,47 a 5,18 log CFU/g)

excepto el día 20 (3,08 log CFU/g) y fueron significativamente más altos ($p < 0,05$) en comparación con cefotaxima. Los recuentos obtenidos con imipenem en los días 2, 5 y 10 no difirieron significativamente de los recuentos obtenidos en el tiempo 0 en TSA o los tiempos 0 y 5 en agar McConkey sin antibiótico.

Los recuentos viables obtenidos en agar KPC incubado en condiciones aerobias fueron similares a los obtenidos en agar McConkey más imipenem. De hecho, ambos resultados no difirieron significativamente en varios puntos de muestreo. Sin embargo, la capacidad de crecer en agar KPC en condiciones anaerobias se redujo notablemente. No se obtuvo crecimiento para los tiempos de almacenamiento 0 y 20, y los recuentos viables obtenidos para los días 2 a 10 (2,40 a 3,57 log CFU/g) fueron significativamente más bajos ($p < 0,05$) en comparación con los recuentos obtenidos después de la incubación en aerobiosis en el mismo medio durante los 10 primeros días de almacenamiento.

5.2.2. Identificación y determinación de resistencias y multirresistencias de las cepas aisladas de los tratamientos.

De todos los recuentos anteriores y de cada una de las muestras y medios ensayados, se aislaron un total de 208 cepas de los diferentes tiempos. Una vez estudiada su resistencia a antibióticos se seleccionó una colección de 80 aislados, de los cuales, el 10% se aisló del medio TSA con tratamiento de 450 MPa/22°C, un 7,5% venía del medio TSA tratado a 450 MPa/50°C, el 6,25% se aisló del medio TSA con tratamiento de 600 MPa/22°C, y un 3,75% de TSA tratado a 600 MPa/50°C. De los medios KPC agar incubados en aerobiosis y KPC agar en anaerobiosis a 37°C se aislaron

el 13,75% de cada uno. Del medio Mueller Hinton suplementado con cloruro benzalconio a 200 mg/L e incubado a 30°C en anaerobiosis un 3,75% y de McConkey agar suplementado con cefotaxima a 64 mg/L e incubado en aerobiosis se aislaron un 17,5%. Por último, un 23,75% de los aislados provenían de McConkey agar suplementado con imipenen a 4 mg/L e incubado a 37°C en aerobiosis.

Posteriormente se realizó la extracción de ADN de cada una de las cepas para identificarlas 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 19).

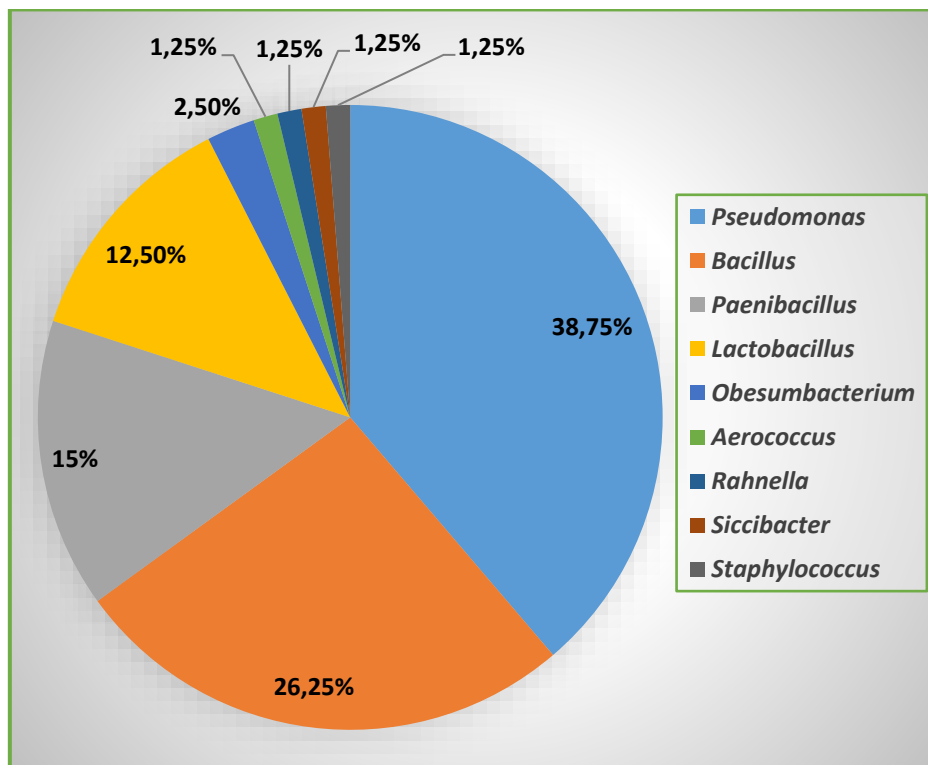


Figura 19. Identificación de especies aisladas en aliño.

El grupo predominante en la población bacteriana aislada del aliño está formado por especies del género *Pseudomonas*, aisladas a partir de muestras control en su totalidad (Figura D3). Los siguientes grupos más representativos estaban formados por especies pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Lactobacillus*. Como se muestra en la Figura D4, existe una marcada separación entre las especies tratadas o no de *Bacillus*, estando los bacilos aislados de muestras tratadas claramente separados del resto de especies tanto del mismo género como del resto de géneros. Además, también se observa una marcada agrupación entre especies de los diferentes géneros, lo que nos confirma un alto grado de similitud entre sí, encontrando casi en su totalidad especies aisladas de muestras tratadas, en el caso de los *Paenibacillus*, y especies aisladas de muestras control, para *Lactobacillus*.

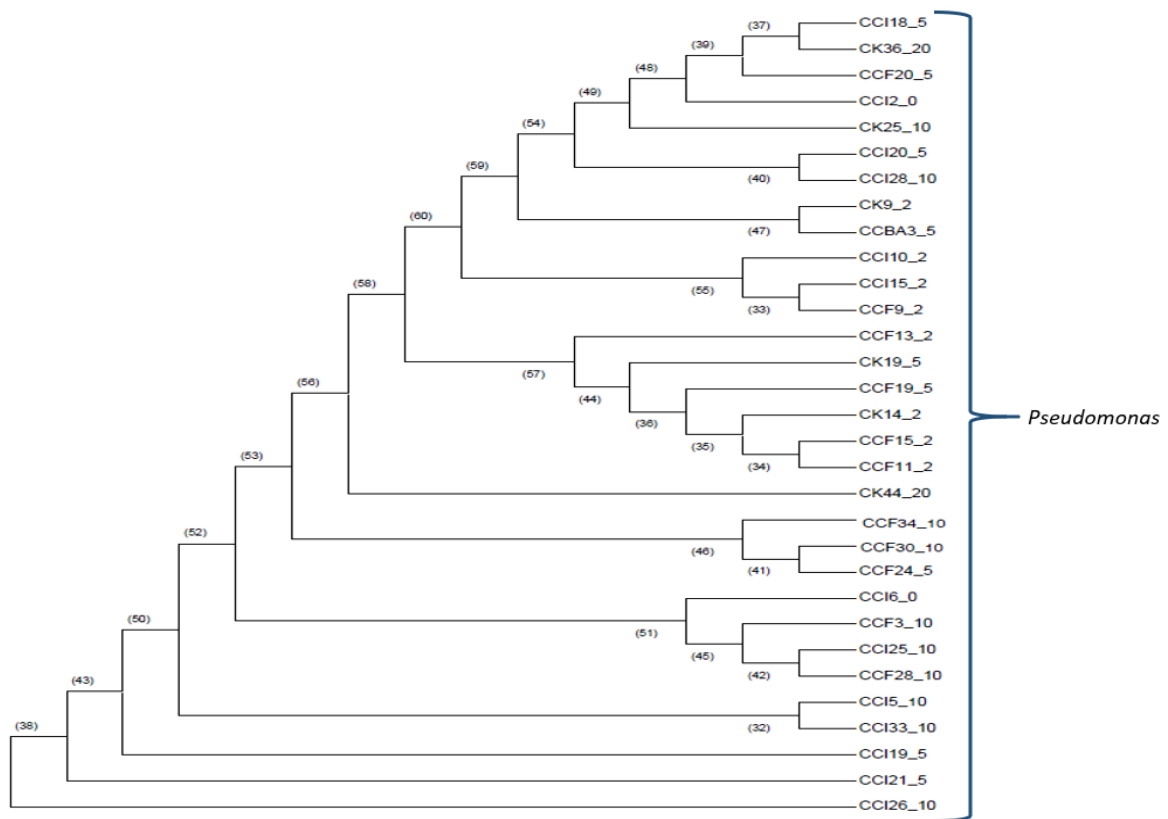


Figura D3. Dendrograma de especies aisladas en aliño pertenecientes al género *Pseudomonas*.

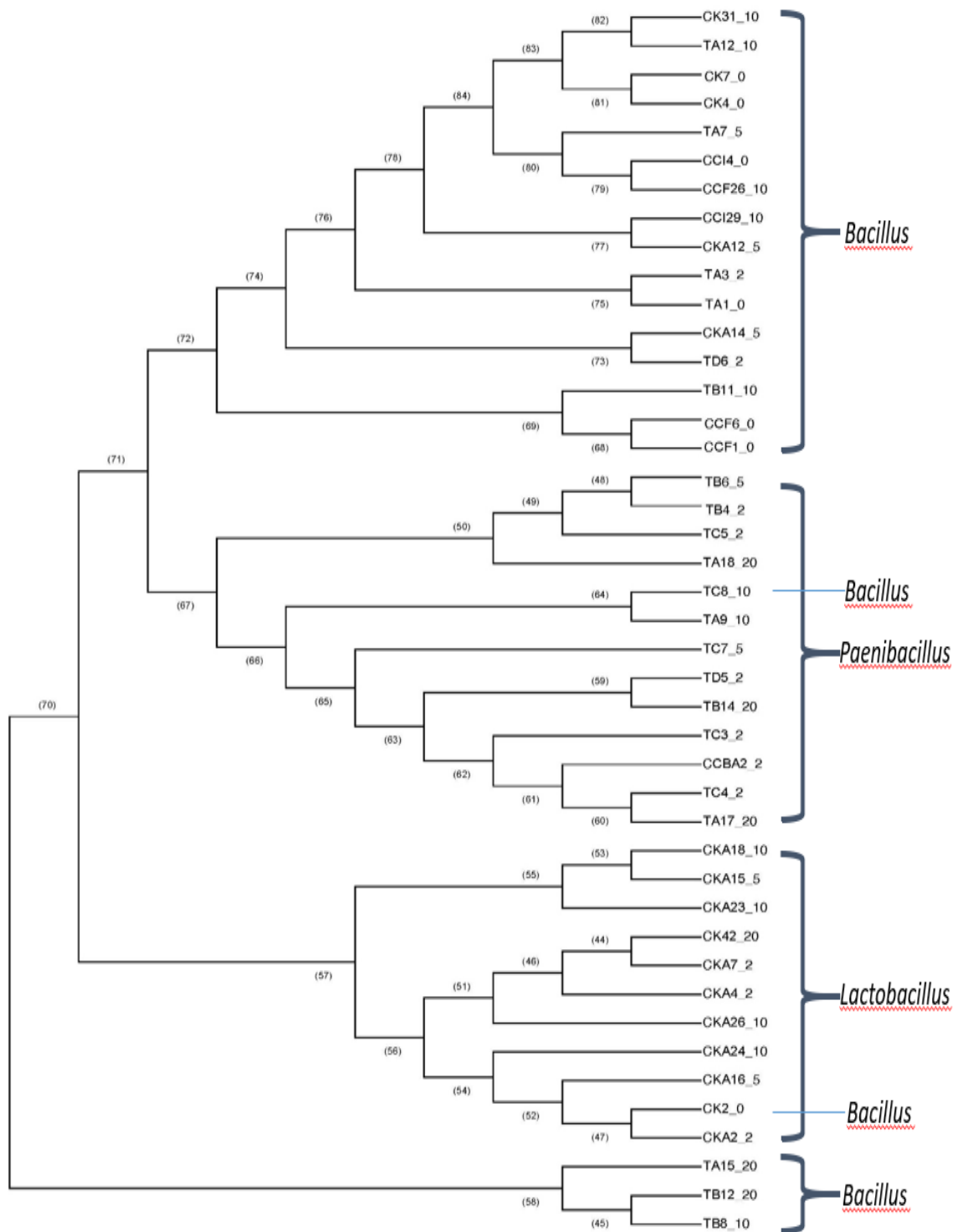


Figura D4. Dendrograma de especies aisladas en aliño pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Lactobacillus*.

Una vez identificadas las cepas se ensayó la resistencia a antibióticos en placas de Mueller Hinton, teniendo como referencia el halo de inhibición en cada disco determinado según el CLSI 2015 y modificaciones posteriores. También se estudió la tolerancia a diferentes biocidas determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) en placas de microtitulación.

En referencia a la resistencia de antibióticos, 72 cepas mostraron resistencia a cefotaxima (CTX), 59 a cefoxitina (FOX), 57 a eritromicina (E), 55 a amoxicilina clavulánico (AMC), 28 a ceftazidima (CAZ), 18 de los aislados mostraron resistencia al cloranfenicol (C), 16 a kanamicina (K), 15 a las sulfonamidas (S3), 13 a meropenem (MEM), y ninguno de los aislados mostró resistencia al ciprofloxacino (CIP), gentamicina (CN) o tetraciclina (TE) (Figura 20).

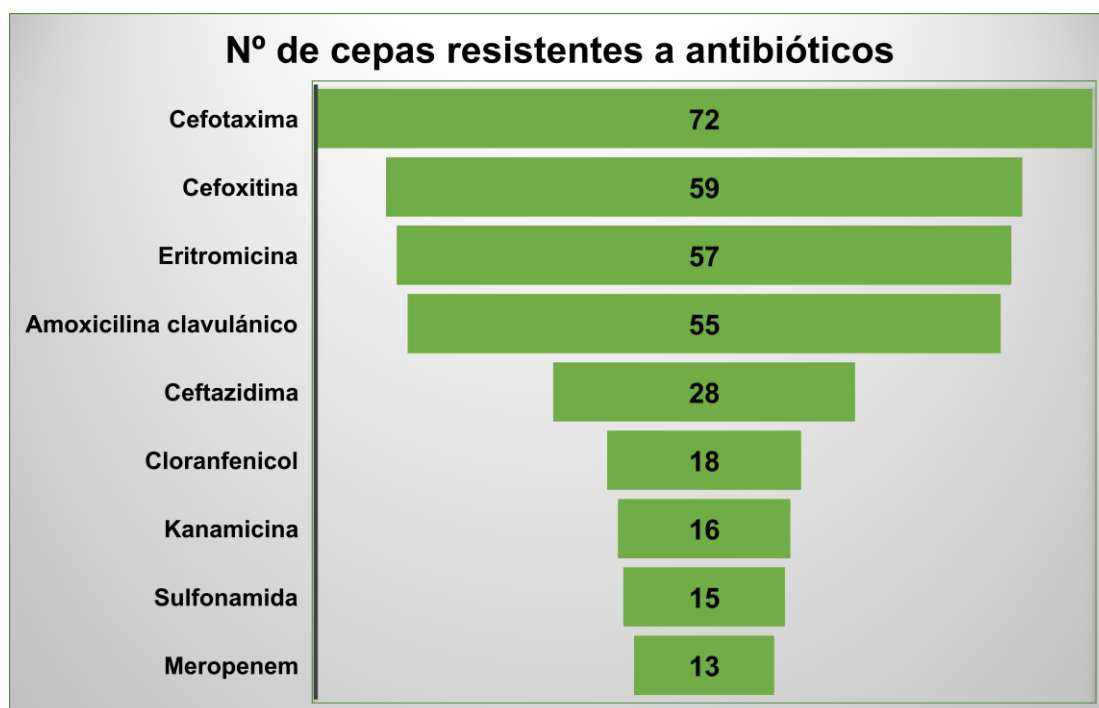


Figura 20. Número de cepas aisladas del aliño que mostraron resistencia a los diferentes antibióticos utilizados.

Uno de los aislados (CI10), identificado como *Pseudomonas paralactis*, mostró resistencia a 7 de los 12 antibióticos ensayados, seguido de 13 cepas que mostraron resistencia a 6 de los antibióticos (Tabla 14).

Tabla 14. Resistencias a antibióticos detectadas en las cepas bacterianas aisladas del año.

Nº cepa	Código cepa	Identificación	Resistencia a Antibióticos
TSA tratamiento A=450 MPa/22°C			
1	TA1	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	CAZ, CTX, E
2	TA3	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	CAZ, CTX,
3	TA7	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	CTX
4	TA9	<i>Paenibacillus taichungensis</i> strain BCRC 17757	CAZ, FOX, CTX
5	TA12	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	CAZ, CTX
6	TA15	<i>Bacillus simplex</i> strain LMG 11160	CAZ, CTX, E
7	TA17	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	CAZ, FOX, CTX,
8	TA18	<i>Bacillus filamentosus</i> strain SGD-14	CTX, E
TSA tratamiento B=450 MPa/50°C			
9	TB4	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NRRL NRS-1356	CAZ, CTX
10	TB6	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	CAZ
11	TB8	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> strain MCCC 1A08372	E
12	TB11	<i>Bacillus safensis</i> FO-36b	CAZ, CTX
13	TB12	<i>Bacillus simplex</i> strain LMG 11160	CAZ, CTX
14	TB14	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	AMC, CAZ, CTX, C, S3
TSA tratamiento C=600 MPa/22°C			
15	TC3	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	CAZ, CTX
16	TC4	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	E
17	TC5	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> strain B22a	CAZ, FOX, CTX
18	TC7	<i>Paenibacillus tundrae</i> strain A10b	CAZ, FOX, CTX
19	TC8	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	CAZ, CTX
TSA tratamiento D=600 MPa/50°C			
20	TD5	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	CAZ, CTX
21	TD6	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	CAZ, CTX, S3, E
22	TD7	<i>Aerococcus viridans</i> strain NBRC 12219	FOX, S3
Mueller Hinton + cloruro benzalconio a 200 mg/L a 30°C anaerobiosis			
23	CBA1	<i>Rahnella aquatilis</i> CIP 78.65 strain DSM 4594	FOX, S3, E
24	CBA2	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	AMC, FOX, CTX, MEM,
25	CBA3	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, K, E

Nº cepa	Código cepa	Identificación	Resistencia a Antibióticos
KPC agar anaerobiosis 37°C			
26	KA2	<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	AMC, FOX, CTX, C, S3, E
27	KA4	<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	AMC, FOX, CTX, C, E
28	KA7	<i>Lactobacillus curvatus</i> strain NBRC 15884	AMC, FOX, CTX, C, S3, E
29	KA12	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	AMC, FOX, CTX, MEM, K, E
30	KA14	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	AMC, FOX, CTX, C, S3, E
31	KA15	<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	AMC, FOX, CTX, K, E
32	KA16	<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	AMC, FOX, CTX, MEM, E
33	KA18	<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	AMC, FOX, CTX, C, E
34	KA23	<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	AMC, FOX, CTX, C, E
35	KA24	<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	CAZ, CTX, S3
36	KA26	<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	AMC, CAZ, FOX, CTX,
KPC agar aerobiosis 37°C			
37	k2	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	AMC, FOX, CTX, E
38	K4	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	AMC, CAZ, FOX, CTX, E
39	K7	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	AMC, FOX, CTX, S3, E
40	K9	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, MEM, K, E
41	K14	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, K, E
42	K19	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, K, E
43	K25	<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	AMC, FOX, CTX, MEM, E
44	K31	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	AMC, CAZ, FOX, CTX, E
45	K36	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, K, E
46	K42	<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	AMC, FOX, CTX, C, E
47	K44	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, MEM, C, E
McConkey agar + cefotaxima a 64 mg/L aerobiosis			
48	CF1	<i>Bacillus oceanisediminis</i> strain H2	AMC, FOX, CTX, K, E
49	CF3	<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	AMC, CAZ, FOX, CTX, S3, E
50	CF6	<i>Bacillus oceanisediminis</i> strain H2	AMC, FOX, CTX, C, E
51	CF9	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, MEM, E
52	CF11	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, E
53	CF13	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, MEM, C, E
54	CF15	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, MEM, E
55	CF19	<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	FOX, CTX, E
56	CF20	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, MEM, E
57	CF24	<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	AMC, FOX, CTX, C, E
58	CF26	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	AMC, FOX, CTX, E
59	CF28	<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	AMC, CAZ, FOX, CTX, C, E
60	CF30	<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	AMC, CAZ, FOX, CTX, C, E
61	CF34	<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	AMC, FOX, CTX, C,

Nº cepa	Código cepa	Identificación	Resistencia a Antibióticos
McConkey agar + 4 mg/L Imipenen 37°C aerobiosis			
62	CI2	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, MEM, K, E
63	CI4	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	AMC, FOX, CTX, C, S3, E
64	CI5	<i>Pseudomonas trivialis</i> strain P 513/19	AMC, CAZ, FOX, CTX, E
65	CI6	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, K
66	CI10	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, CAZ, FOX, CTX, K, S3, E
67	CI14	<i>Staphylococcus capitis</i> strain ATCC 27840	AMC, CAZ, FOX, CTX, E
68	CI15	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, K, E
69	CI18	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, K, E
70	CI19	<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	AMC, FOX, CTX, S3
71	CI20	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, K, E
72	CI21	<i>Pseudomonas koreensis</i> strain Ps 9-14	AMC, FOX, CTX, C, K, E
73	CI25	<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	AMC, FOX, CTX, C, E
74	CI26	<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	AMC, FOX, CTX, MEM, K, E
75	CI28	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	AMC, FOX, CTX, MEM, E
76	CI29	<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	AMC, FOX, CTX, C, E
77	CI33	<i>Pseudomonas lurida</i> strain P 513/18	AMC, CAZ, FOX, CTX,
78	CI36	<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42	AMC, E
79	CI39	<i>Siccibacter turicensis</i> LMG 23730	S3, E
80	CI43	<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42	AMC, S3, E

De igual forma se estudió de forma general la tolerancia de los 80 aislados totales frente a los diferentes biocidas ensayados, determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) en $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla 15). Como se ve representado en la Figura 20, se observó una MIC de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 46 de las cepas con cloruro de benzalconio, en 47 de los aislados con cetrimida y en 27 cepas con clorhexidina digluconato. Una MIC de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 38 de las cepas para el biocida hexadecilpiridinio, de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 41 de las cepas con hexaclorofeno y en 25 aislados frente a triclosán. La MIC mayor, de 2.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se observó en 35 de las cepas con PHMG.

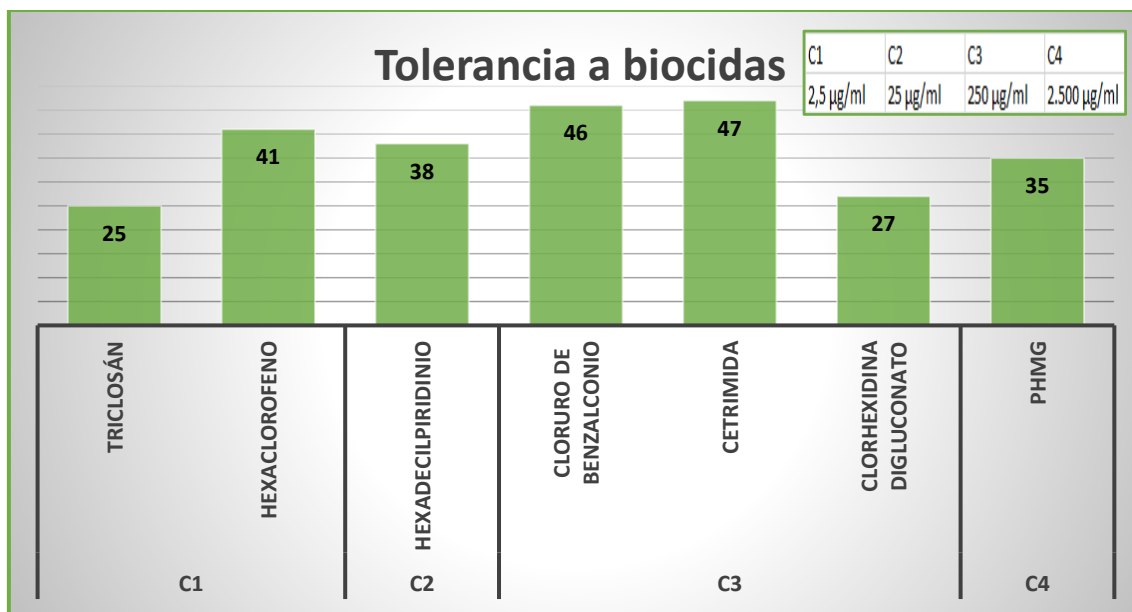


Figura 20. Grado de tolerancia a los diferentes biocidas por parte de las cepas aisladas del aliño.

Tabla 15. Grado de tolerancia a los diferentes biocidas en las cepas bacterianas aisladas del aliño.

Tolerancia a biocidas (MIC, µg/mL)							
Identificación	CB	C	HP	HC	T	CD	PHMG
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	25	2,5
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	25	2,5	25	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Paenibacillus taichungensis</i> strain BCRC 17757	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Bacillus simplex</i> strain LMG 11160	250	25	25	250	2.500	250	2,5
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	25	25	2,5	2,5	2,5	25	2,5
<i>Bacillus filamentosus</i> strain SGD-14	250	25	25	250	2.500	250	2,5
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NRRL NRS-1356	25	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	2,5	2,5	25	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> strain MCCC 1A08372	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Bacillus safensis</i> FO-36b	25	25	25	25	250	250	2,5
<i>Bacillus simplex</i> strain LMG 11160	25	25	25	25	250	250	2,5
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	25	25	25	25	250	25	2,5
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	25	25	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Identificación	CB	C	HP	HC	T	CD	PHMG
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Paenibacillus xylanexedens</i> strain B22a	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Paenibacillus tundrae</i> strain A10b	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	2,5	25	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Aerococcus viridans</i> strain NBRC 12219	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Rahnella aquatilis</i> strain DSM 4594	250	250	250	25	2,5	250	2,5
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	250	250	25	25	25	250	2,5
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	250	250	250	25	2.500	25	2,5
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	250	250	250	25	25	2.500	2.500
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	250	250	25	25	2,5	2.500	250
<i>Lactobacillus curvatus</i> strain NBRC 15884	250	250	250	25	2,5	2.500	250
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	250	250	25	25	250	250	2.500
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	250	250	250	25	25	25	2.500
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	250	250	250	25	250	25	2.500
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	250	250	250	25	250	25	2.500
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	250	250	250	25	25	25	2.500
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	250	250	250	25	25	25	2.500
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	25	25	2,5	2,5	25	250	2.500
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	250	250	25	25	25	25	2.500
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	250	250	25	2,5	25	2,5	25
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	250	250	250	2,5	25	25	25
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	250	250	25	2,5	2,5	2,5	25
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	250	250	250	25	2,5	2.500	250
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	250	250	25	2,5	2,5	2.500	2,5
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	250	250	250	2,5	2.500	250	250
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	250	250	250	2,5	2.500	250	250
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	250	250	25	2,5	2.500	250	250
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	250	250	250	25	10.000	250	2,5
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	25	250	25	25	2,5	250	25
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	250	250	250	25	2.500	250	2,5
<i>Bacillus oceanisediminis</i> strain H2	250	250	250	2,5	10.000	250	2.500

Identificación	CB	C	HP	HC	T	CD	PHMG
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	250	250	250	2,5	2.500	250	2.500
<i>Bacillus oceanisediminis</i> strain H2	250	250	250	2,5	2.500	250	2.500
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	25	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	25	25	25	25	25	2,5	2,5
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	25	25	2,5	25	2,5	2,5	2,5
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	25	25	25	25	25	25	2,5
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	250	25	25	2,5	2,5	25	2,5
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	250	250	250	2,5	10.000	250	2.500
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	250	250	25	2,5	10.000	250	2.500
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	250	25	25	2,5	10.000	2.500	2.500
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	250	250	250	2,5	2.500	250	2.500
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	250	250	250	2,5	2.500	250	2.500
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	25	250	25	2,5	10.000	250	2.500
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	25	250	25	25	2.500	25	2.500
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	250	250	250	25	25	25	2.500
<i>Pseudomonas trivialis</i> strain P 513/19	25	25	25	2,5	250	25	2.500
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	250	250	250	25	2.500	25	2.500
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	2,5	250	25	2,5	25	2,5	2.500
<i>Staphylococcus capitis</i> strain ATCC 27840	2,5	25	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	2,5	250	25	2,5	2.500	250	2.500
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	250	250	250	25	2.500	25	2.500
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	25	250	25	25	250	25	2.500
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	250	250	250	25	2.500	25	2.500
<i>Pseudomonas koreensis</i> strain Ps 9-14	250	250	250	25	250	25	2.500
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	250	250	250	25	25	25	2.500
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	250	2.500	250	25	10.000	25	2.500

Identificación	CB	C	HP	HC	T	CD	PHMG
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	250	250	250	25	Crece	25	2.500
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	250	250	250	25	25	250	2.500
<i>Pseudomonas lurida</i> strain P 513/18	25	25	25	2,5	250	25	2.500
<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42	250	250	250	25	250	250	250
<i>Siccibacter turicensis</i> LMG 23730	250	250	25	250	250	250	2.500
<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42	250	250	25	250	250	250	2.500

Además, se realizó el estudio de tolerancia a los biocidas ensayados de forma más específica, atendiendo a los grupos bacterianos mayoritarios dentro de la población seleccionada. En el caso de las *Pseudomonas*, como se muestra en la Figura 21, la tolerancia a los biocidas por parte de las 31 cepas de *Pseudomonas*, referida como la concentración mínima inhibitoria (MIC) en $\mu\text{g/mL}$, en la mayoría de las cepas está en torno a 250 $\mu\text{g/mL}$ para los biocidas cloruro de benzalconio (CB), en un 65%; cetrimida (C), en un 74%; y hexadecilpiridinio (HP), en un 55% de las *Pseudomonas*. Por otro lado, la MIC para para la mayoría de las cepas frente a los biocidas hexaclorofeno (HC) y clorhexidina (CD) es de 25 $\mu\text{g/mL}$, con un 52 y 45% respectivamente, mientras que frente a los biocidas PHMG y triclosán (T) la MIC es de 2.500 $\mu\text{g/mL}$, con unos porcentajes del 61 y 35%.

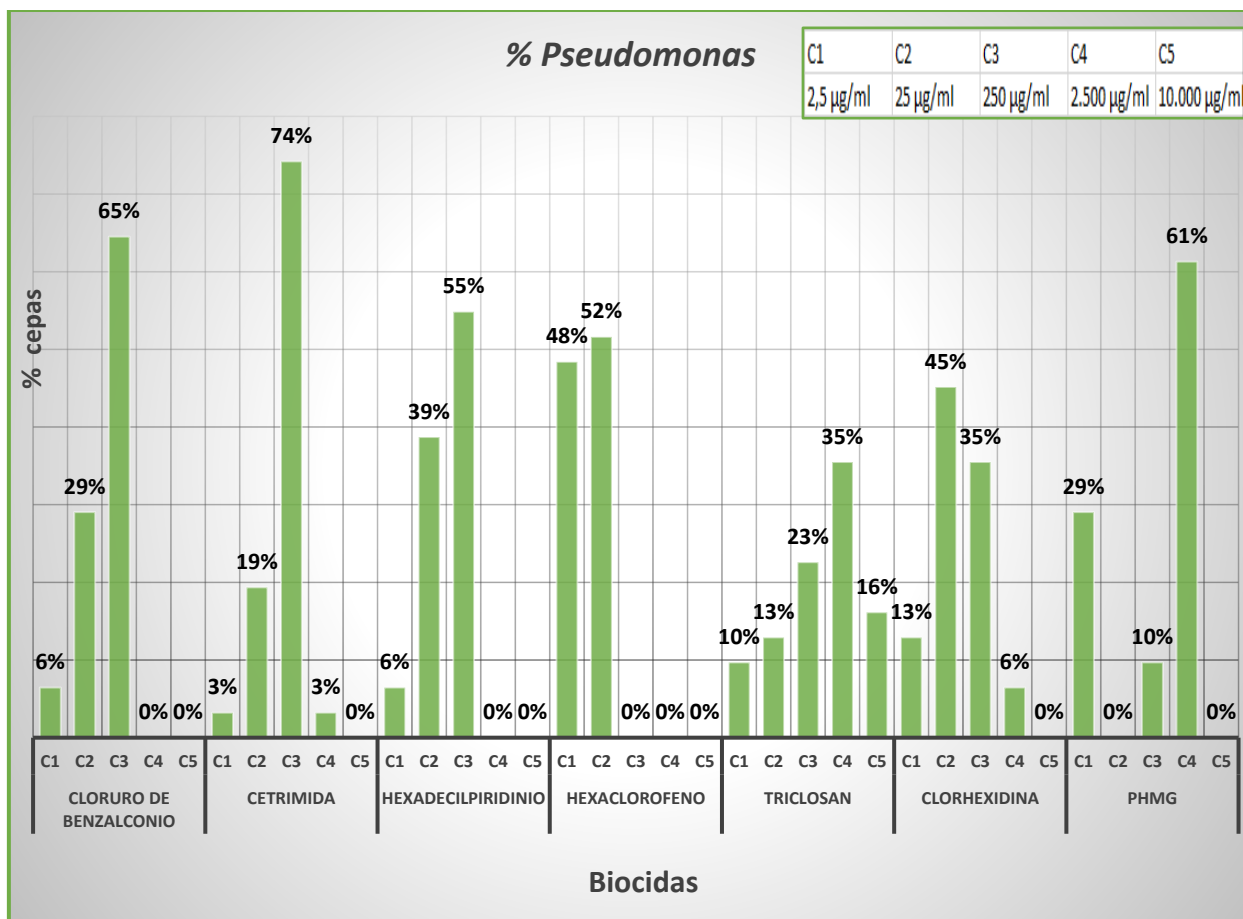


Figura 21. Grado de tolerancia a los diferentes biocidas por parte de las *Pseudomonas* aisladas del aliño.

En los 21 *Bacillus* (Figura 22), la MIC se observó en torno a 2,5 µg/mL para la mayoría de las cepas frente a los biocidas HC, con un 62%; T, con un 29%; y PHMG, con un 48%. La MIC a 25 µg/mL afectaba a la mayoría de las cepas en el caso del HP, inhibiendo el crecimiento del 52% de los *Bacillus*, mientras que la MIC a 250 µg/mL no fue tolerada por el 43% de los bacilos con la CD, el 48% con la C y el 62% con el CB.

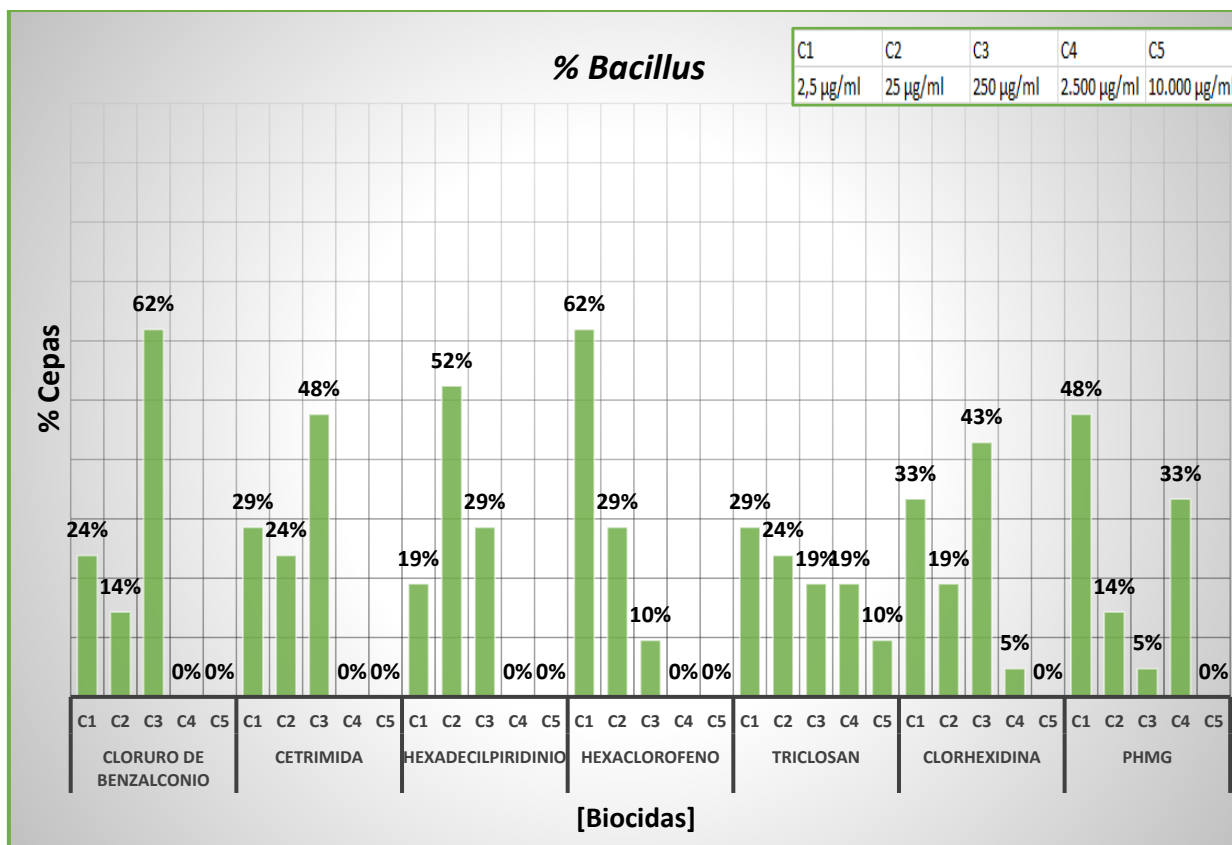


Figura 22. Grado de tolerancia a los diferentes biocidas por parte de los *Bacillus* aisladas del aliño.

En referencia a las 12 cepas de *Paenibacillus* (Figura 23), se obtuvo una MIC de 2,5 µg/mL en la mayoría de las cepas frente a todos los biocidas (CB, 58%; C, 58%; HC, 83%; T, 83%; CD, 75%; y PHMG, 100%) a excepción del HP, en el cual el 75% mostraron una MIC de 25 µg/mL.

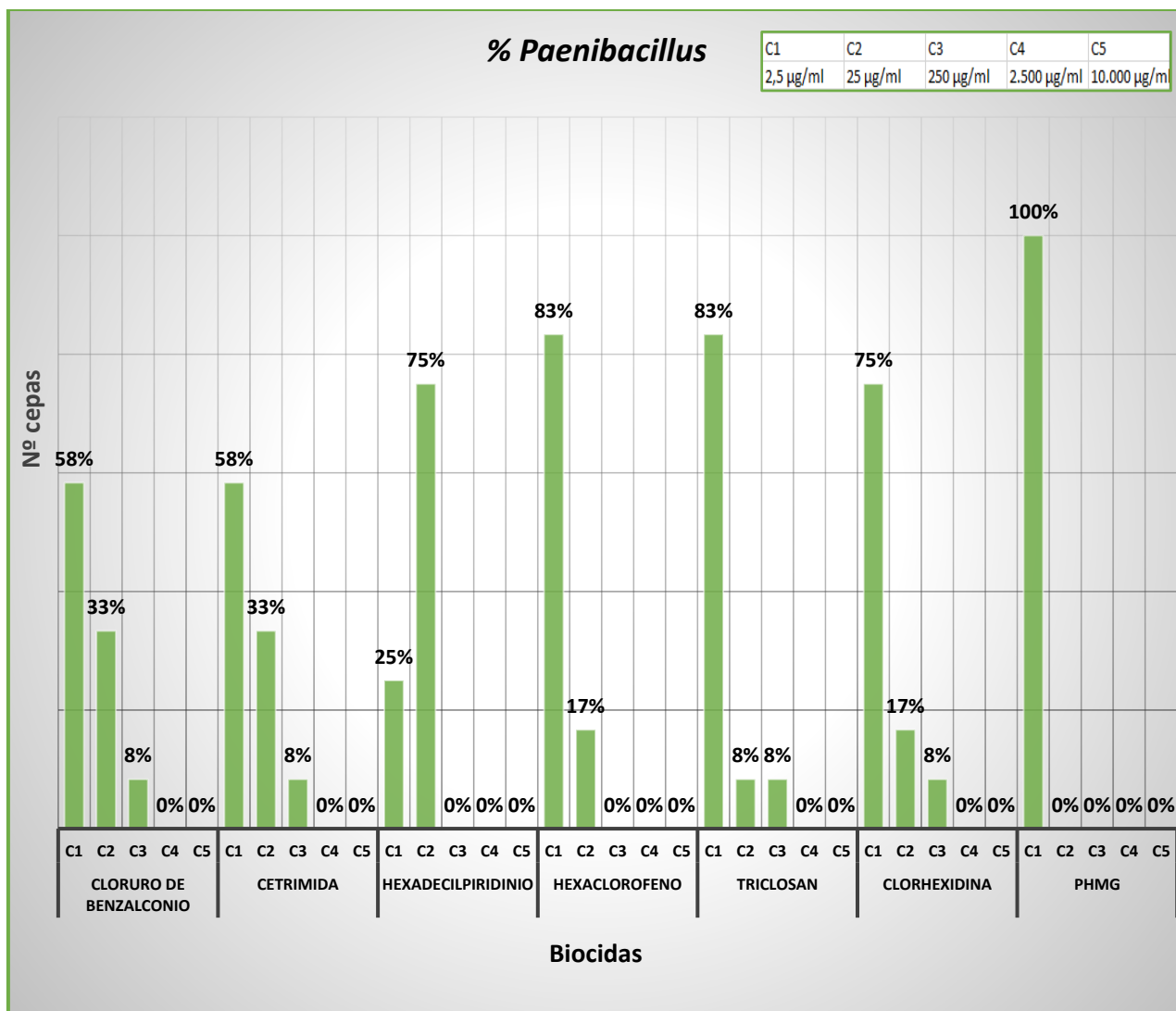


Figura 23. Grado de tolerancia a los diferentes biocidas por parte de los *Paenibacillus* aisladas del aliño.

Respecto a los 10 *Lactobacillus*, la MIC de la mayoría de las cepas fue de 250 µg/mL frente a los biocidas CB, en un 80%; C, en un 90%; y HP, en un 70% de los lactobacilos. Con la MIC a 25 µg/mL no se produjo crecimiento para la mayoría de cepas frente a T, en un 50%; HC, en un 90%; y CD, en un 50%. Por último, con la MIC a 2.500 µg/mL se observó la inhibición del crecimiento del 70% de *Lactobacillus* frente al biocida PHMG (Figura 24).

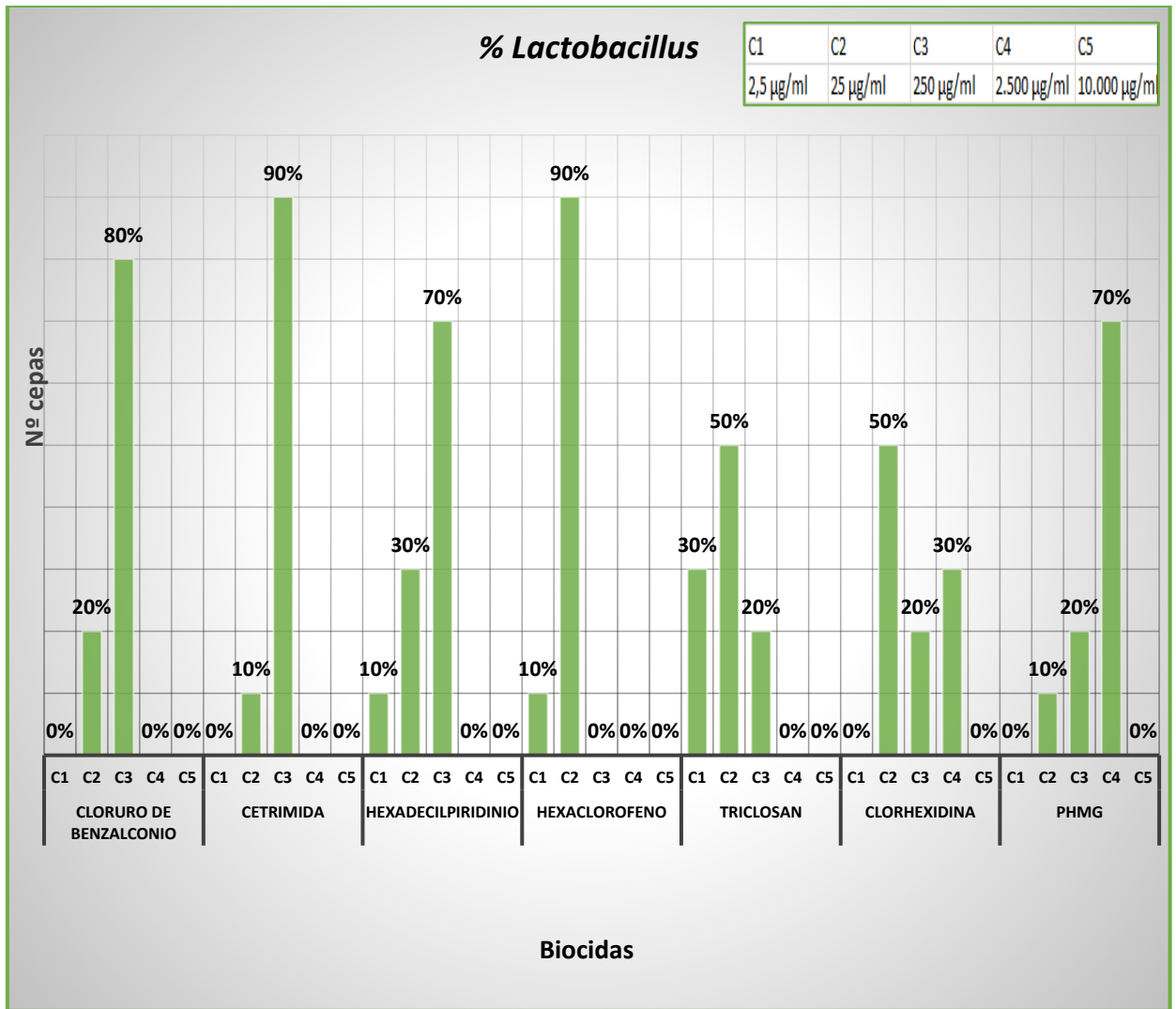


Figura 24. Grado de tolerancia a los diferentes biocidas por parte de los *Lactobacillus* aisladas del aliño.

5.2.3. Estudio de los determinantes de resistencia

Al mismo tiempo se iban realizando estudios de PCR para poder detectar la presencia de genes de resistencia a antibióticos en la colección de 80 aislados.

Si nos centramos en cada grupo de genes, en cuanto a los betalactámicos (Tabla 16), se detectaron alguno de los 7 genes de resistencia ensayados en 47 de las 80 cepas totales, lo cual representa un 59% de la población, siendo así el segundo grupo de genes de resistencia con mayor presencia. El gen más detectado fue el *bla*_{SHV}, presente en 43 cepas. Los genes *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TPSE} y *bla*_{ctxM2} se observaron en dos cepas cada uno, mientras que el gen *bla*_{TEM} se observó sólo en una de las cepas. No se detectó la presencia del gen *bla*_{ctxM}.

Cabe mencionar la cepa KA7, identificada como *Lactobacillus curvatus*, la cual mostró tres de los siete genes ensayados (Tabla 16).

Tabla 16. Presencia de genes de resistencia a betalactámicos en las cepas bacterianas aisladas del aliño.

Identificación	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{TPSE}	<i>Bla</i> _{CTXM2}
<i>Paenibacillus taichungensis</i> strain BCRC 17757						+
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	+					
<i>Paenibacillus xylanexedens</i> strain B22a	+					+
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	+					
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> strain NRRL NRS 1356	+					
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14					+	
<i>Bacillus simplex</i> strain LMG 11160	+					
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	+					
<i>Aerococcus viridans</i> strain NBRC 12219				+		
<i>Rahnella aquatilis</i> strain DSM 4594	+					
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	+					

Identificación	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{TPSE}	<i>Bla</i> _{CTXM2}
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	+					
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	+					
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+					
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+					
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	+					
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	+					
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	+					
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	+					
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	+					
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+					
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+					
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+					
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+					
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+		+			
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164			+			
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	+					
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	+	+				
<i>Bacillus oceanisediminis</i> strain H2	+					
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+					
<i>Pseudomonas koreensis</i> strain Ps 9 14	+					
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+					
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+					
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+					
<i>Pseudomonas lurida</i> strain P 513/18	+					
<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42	+					
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+					
<i>Pseudomonas trivialis</i> strain P 513/19	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+					
<i>Lactobacillus curvatus</i> strain NBRC 15884	+			+	+	

En referencia a la presencia de genes codificadores para posible resistencia a tetraciclinas se detectaron alguno de los 10 genes ensayados en 37 de las 80 cepas totales, lo cual representa un 46% de la población. El gen más detectado fue el gen *tet(M)*, presente en 28 cepas, seguido de *tet(C)*, observado en 9 cepas. Los genes *tet(K)* y *tet(L)* fueron detectados en 5 cepas cada uno, siendo 4 de ellas portadoras de ambos genes de resistencia. Los genes *tet(A)*, *tet(E)* y *tet(B)* fueron detectados en al menos 2 cepas cada uno mientras que los genes *tet(D)*, *tet(G)* y *tet(S)* no fueron observados en ninguna cepa (Tabla 17).

Cabe destacar la cepa CI39, identificada como *Siccibacter turicensis* LMG 23730, la cual mostró genes de resistencia en los tres grupos de tetraciclinas (Tabla 17).

Tabla 17. Presencia de genes de resistencia a tetraciclinas en las cepas bacterianas aisladas del aliño.

Identificación	TET (B)	TET (C)	TET (A)	TET (E)	TET (K)	TET (L)	TET (M)
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT		+					
<i>Aerococcus viridans</i> strain NBRC 12219					+		
<i>Rahnella aquatilis</i> strain DSM 4594		+				+	+
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)		+					
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)							+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164							+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164							+
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167							+
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT							+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164							+
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)					+	+	+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164							+
<i>Bacillus oceanisediminis</i> strain H2							+
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167							+
<i>Bacillus oceanisediminis</i> strain H2							+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164							+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164					+	+	+

Identificación	TET (B)	TET (C)	TET (A)	TET (E)	TET (K)	TET (L)	TET (M)
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164					+	+	+
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167					+	+	+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164							+
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167							+
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167		+					+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164							+
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167							+
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167							+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164		+					+
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT							+
<i>Pseudomonas lurida</i> strain P 513/18							+
<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42	+	+	+	+			
<i>Siccibacter turicensis</i> LMG 23730		+	+				+
<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42		+	+	+			
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164							+
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+						
<i>Pseudomonas trivialis</i> strain P 513/19							+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164		+					
<i>Staphylococcus capitis</i> strain ATCC 27840			+				
<i>Lactobacillus curvatus</i> strain NBRC 15884				+			

Con respecto a los genes ensayados de resistencia a inhibidores de la dihidrofolato reductasa (Tabla 18), la presencia fue mínima, observándose alguno de los dos genes que representaban este grupo en 6 de las 80 cepas totales aisladas, lo que representa un 8% de la población. El gen *dfrA12* se detectó en 5 cepas y el gen *dfrA15* en una sola cepa.

Tabla 18. Presencia de genes de resistencia a inhibidores de la dihidrofolato reductasa en las cepas bacterianas aisladas del aliño.

Identificación	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA15</i>
<i>Bacillus oceanisediminis</i> strain H2		+
<i>Bacillus safensis</i> FO036b	+	
<i>Paenibacillus taichungensis</i> strain BCRC 17757	+	
<i>Paenibacillus tundrae</i> strain A10b	+	
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	+	
<i>Pseudomonas trivialis</i> strain P 513/19	+	

En cuanto a la presencia de genes portadores de resistencia a macrólidos, el gen *ereA* y *ereB*, se observaron en 25 de los 80 aislados, es decir, en un 31% de la población, y todas las cepas excepto una (que no presentaba el gen *ereA*), mostraron ambos genes (Tabla 19).

Tabla 19. Presencia de genes de resistencia a macrólidos en las cepas bacterianas aisladas del aliño.

Identificación	<i>ere(A)</i>	<i>ere(B)</i>
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+	+
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+	+
<i>Bacillus safensis</i> FO036b	+	+
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> strain MCCC 1A08372	+	+
<i>Lactobacillus curvatus</i> strain NBRC 15884		+
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	+	+
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)	+	+
<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42	+	+
<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42	+	+
<i>Paenibacillus xylanexedens</i> strain B22a	+	+
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14	+	+
<i>Pseudomonas koreensis</i> strain Ps 9014	+	+
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+	+
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+	+
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+	+
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+	+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+
<i>Rahnella aquatilis</i> strain DSM 4594	+	+
<i>Staphylococcus capitis</i> strain ATCC 27840	+	+

Por último, se detectó la presencia de alguno de los 7 genes de resistencia a bombas de eflujo en 67 de las 80 cepas totales, lo cual representa un 84% de la población, siendo así el grupo de genes de resistencia de mayor presencia. Todos los genes de resistencia de este grupo estuvieron presentes en alguna de las cepas y la detección de dichos genes, en orden descendente, fue la siguiente: el gen *mdeA*, en 45 cepas; el gen *mepA*, en 27 cepas; el gen *smr*, en 23 cepas; el gen *norA*, en 14 cepas; el gen *norC*, en 12 cepas; el gen *sepA*, en 6 cepas; y el gen *sdrM* en 3 cepas (Tabla 20).

Cabe destacar las cepas CI20 y CF26, identificadas como *Pseudomonas paralactis* y *Bacillus endophyticus* respectivamente, las cuales mostraron cinco de los siete genes de resistencia ensayados (Tabla 20).

Tabla 20. Presencia de genes de resistencia correspondientes a bombas de exporte en las cepas bacterianas aisladas del aliño.

Identificación	<i>smr</i>	<i>mdeA</i>	<i>mepA</i>	<i>norA</i>	<i>norC</i>	<i>sdrM</i>	<i>sepA</i>
<i>Aerococcus viridans</i> strain NBRC 12219			+				
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT			+		+		
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT			+				
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT			+				
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT			+				
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT		+	+				
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT		+	+		+		
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT			+		+		
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT		+	+				
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT		+	+	+			
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT		+	+	+			
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT			+				
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+	+		+		+	+
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT	+	+					
<i>Bacillus endophyticus</i> strain 2DT		+					
<i>Bacillus filamentosus</i> strain SGD014		+			+		

Identificación	smr	mdeA	mepA	norA	norC	sdrM	sepA
<i>Bacillus oceanisediminis</i> strain H2	+	+		+			
<i>Bacillus oceanisediminis</i> strain H2	+	+		+			
<i>Bacillus safensis</i> FO036b		+					
<i>Bacillus simplex</i> strain LMG 11160			+		+		
<i>Bacillus simplex</i> strain LMG 11160			+				
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> MCCC 1A08372		+					
<i>Lactobacillus curvatus</i> strain NBRC 15884	+						
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)					+		
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)					+		+
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)					+		
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)			+		+		
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)			+		+		
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)			+		+		
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)			+				
<i>Lactobacillus graminis</i> strain G90 (1)		+					
<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42	+	+					
<i>Obesumbacterium proteus</i> strain 42	+	+					
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> NRRL NRS01356		+	+				
<i>Paenibacillus xylanexedens</i> strain B22a		+	+				
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14		+	+				
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14		+					
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14			+				
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14		+	+				
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14		+	+				
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14		+	+				
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> strain XIL14		+	+				
<i>Pseudomonas koreensis</i> strain Ps 9014	+	+		+		+	
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+	+					
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+	+		+			
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+	+		+			
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167		+					
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167		+					
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+						
<i>Pseudomonas lactis</i> strain DSM 29167	+						
<i>Pseudomonas lurida</i> strain P 513/18	+	+		+			+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164		+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164		+		+			
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164		+		+			
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+		+			+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+		+			+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+						

Identificación	<i>smr</i>	<i>mdeA</i>	<i>mepA</i>	<i>norA</i>	<i>norC</i>	<i>sdrM</i>	<i>sepA</i>
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+		+		+	+
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164	+	+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164		+					
<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM 29164		+					
<i>Rahnella aquatilis</i> strain DSM 4594		+					
<i>Siccibacter turicensis</i> LMG 23730	+	+					
<i>Staphylococcus capitis</i> strain ATCC 27840	+	+					

Atendiendo a los diferentes grupos bacterianos encontrados, como se observa en la figura 25, dentro del 59% de cepas identificadas que presentan alguno de los genes de resistencia frente a betalactámicos, encontramos que un 34% se corresponde con cepas del grupo *Pseudomonas*, seguido por los grupos *Bacillus* y *Lactobacillus*, los cuales están representados con un 21,3% cada uno. El 17% lo conforman las cepas de *Paenibacillus* y, en menor grado, encontramos las cepas de *Obesumbacterium*, *Aerococcus* y *Rahnella*, con un 2,1% correspondiente a cada una.

En cuanto a la resistencia a tetraciclinas, dentro del 46% de cepas identificadas que presentan alguno de dichos genes de resistencia, encontramos que un 56,8% se corresponde con *Pseudomonas*, seguido de un 16,2% representado por el grupo *Bacillus*, un 10,8% por *Lactobacillus*, un 5,4% por *Obesumbacterium* y con un 2,7% cada una, encontramos las cepas *Aerococcus*, *Rahnella*, *Siccibacter* y *Staphylococcus* (Figura 25).

Del 31% de cepas identificadas que presentan alguno de los genes de resistencia frente a macrólidos, encontramos que casi la mitad (un 48%) se corresponde con cepas del grupo *Pseudomonas*, un 16% está representado por el grupo *Bacillus*, un 12% por *Lactobacillus*, seguido por los grupos *Paenibacillus* y *Obesumbacterium*, los cuales están representados con un

8% cada uno y, en menor grado encontramos las cepas *Rahnella* y *Staphylococcus*, con una representación del 4% cada una (Figura 25).

Respecto a los genes de resistencia frente a inhibidores de la dihidrofolato reductasa, los cuales fueron minoritarios, siendo detectados únicamente en el 8% de la población total seleccionada, encontramos que la mitad de estas cepas (50%) se correspondían con *Paenibacillus*, un 33,3% lo conformaban cepas del grupo *Bacillus* y, en menor grado, encontramos el 16,7% restante representado por *Pseudomonas* (Figura 25).

Por último, para el grupo de genes de resistencia que codifican para las bombas de exporte, del 84% de las cepas totales seleccionadas que presentaron alguno de dichos genes de resistencia, se observó que más de la mitad de las mismas se trataban de cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus*, con una representación del 31,3% cada grupo bacteriano. Con un porcentaje menor se encontraron cepas del grupo de *Lactobacillus*, con un 14,9%, seguido de muy cerca por *Paenibacillus*, con un 13,4% y, en menor grado, con un 1,5% cada una, encontramos las cepas *Aerococcus*, *Rahnella*, *Siccibacter* y *Staphylococcus* (Figura 25).

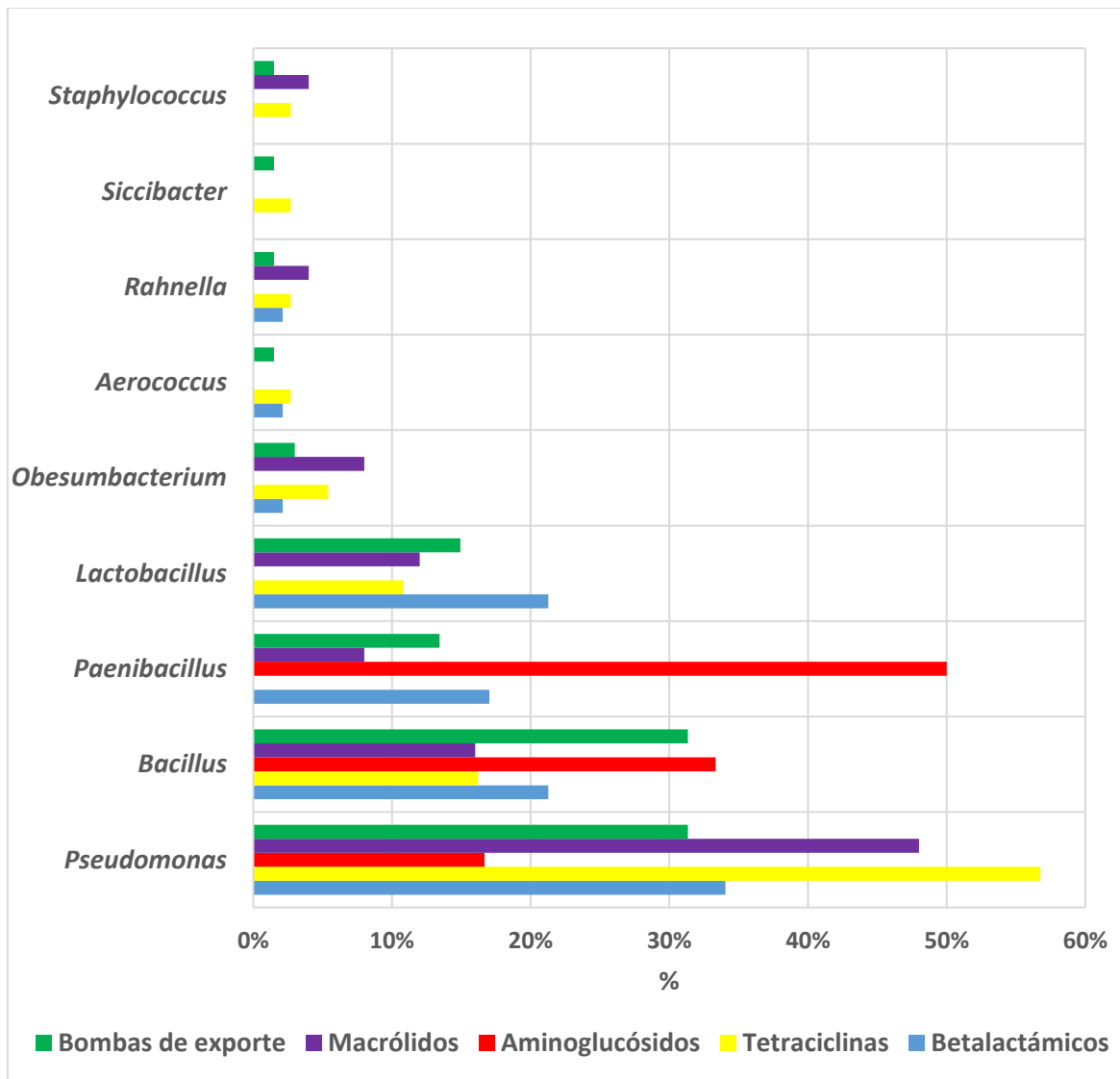


Figura 25. Porcentaje de grupos bacterianos aislados del aliño que presentan los diferentes tipos de genes de resistencia.

5.2.4. Estimación de la biodiversidad bacteriana de las muestras.

El número de lecturas asignadas a las unidades taxonómicas operativas (OTU) varió de 35.034 a 62.467 (Tabla 21). Los índices de diversidad de Shannon y Simpson más bajos se observaron en las muestras control durante el almacenamiento. La mayoría de las muestras tratadas también mostraron valores bajos de diversidad después del tratamiento, pero no durante el almacenamiento.

Tabla 21. Número de lecturas e índices de diversidad alfa a nivel de género de las muestras de aliño tratadas o no por alta presión hidrostática (APH).

Muestras	Número de lecturas	Chao1	Shannon	Simpson
C0	56912	101	2.59	0.82
C2	57200	64	1.63	0.65
C5	51266	52	1.69	0.74
C10	56475	64	1.71	0.72
C20	50928	25	0.99	0.45
A0	38169	97	3.16	0.93
A2	50607	119	3.02	0.91
A5	62467	128	3.29	0.93
A10	36648	123	3.27	0.93
A20	43370	117	3.27	0.93
B0	46673	108	3.05	0.92
B2	47933	106	3.03	0.91
B5	45995	113	3.11	0.92
B10	41491	124	3.20	0.93
B20	41592	125	3.33	0.94
C0	47285	84	2.76	0.88
C2	48422	106	2.94	0.88
C5	35034	101	3.08	0.91
C10	46524	129	3.30	0.93
C20	47399	125	3.32	0.92
D0	41706	98	2.67	0.87
D2	49617	121	3.20	0.93
D5	51462	112	2.98	0.90
D10	41697	116	2.99	0.89
D20	48628	122	3.24	0.91

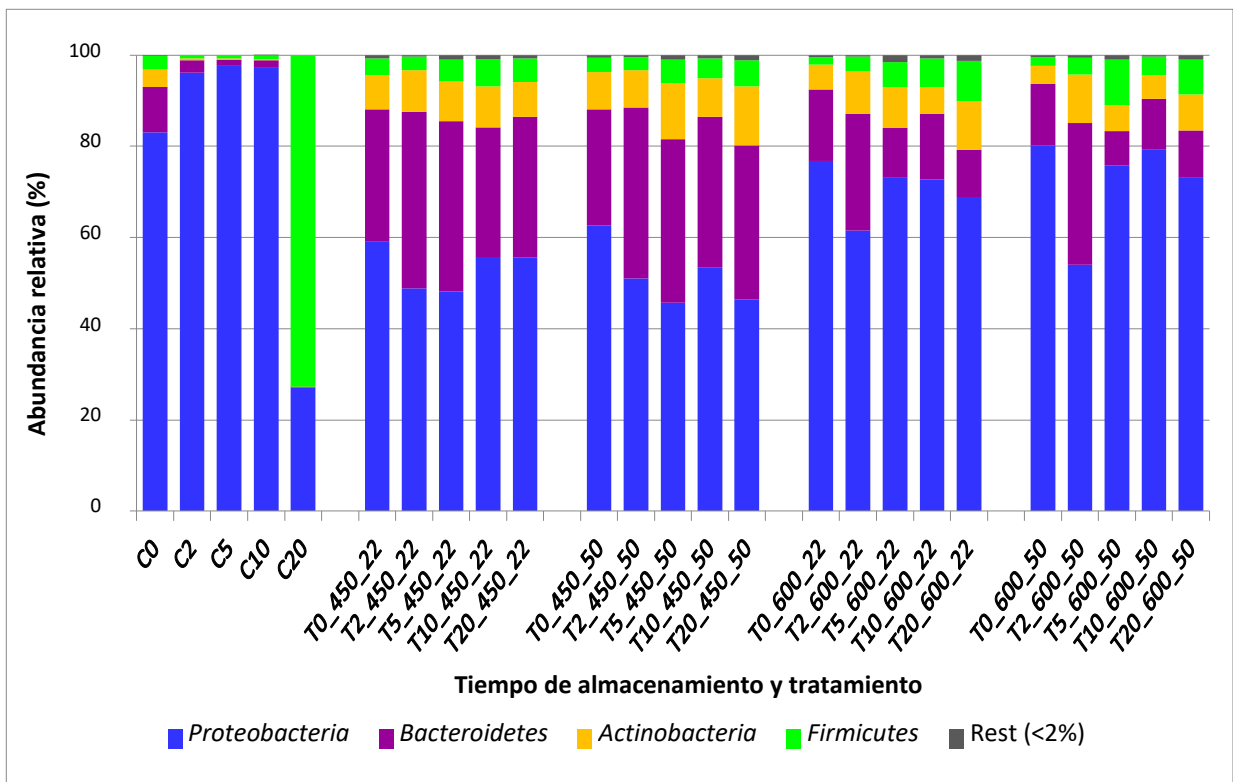
Las muestras C se corresponden con los controles (no tratados). Los diferentes tratamientos con APH son: A, 450 MPa a 22 °C; B, 450 MPa a 50 °C; C, 600 MPa a 22 °C; y D, 600 MPa a 50 °C. Los números indican el tiempo de almacenamiento (días). Chao 1 es un estimador de la riqueza de especies basado en la abundancia. Los índices de Shannon y Simpson son estimadores tanto de la riqueza como de la uniformidad de las especies, con más énfasis en la riqueza (Shannon) o en la uniformidad (Simpson).

El principal filo detectado en las muestras control, al comienzo del ensayo (T0), fue *Proteobacteria* (83,10%), seguido de *Bacteroidetes* (9,95%), *Actinobacteria* (3,85%) y *Firmicutes* (2,88%), tal y como podemos observar en la Figura 26A. Durante los primeros 10 días de almacenamiento refrigerado, la abundancia relativa de *Proteobacteria* aumentó hasta el 97,61%, mientras que los demás grupos disminuyeron. Al final del almacenamiento (día 20), *Proteobacteria* disminuyó hasta el 27,20%, mientras que *Firmicutes* se convirtió en el filo con mayor abundancia relativa (72,71%).

Las proteobacterias en la muestra control estaban representadas principalmente por *Gammaproteobacteria* (familia *Pseudomonadaceae*, seguida de *Enterobacteriaceae* y *Moraxellaceae*). El grupo más abundante entre los días 2 y 10 fue *Enterobacteriaceae* (Figura 26B). El género *Pseudomonas* fue el principal representante en las muestras control en los tiempos 0 y 2, disminuyendo posteriormente en abundancia relativa (Figura 26C). El principal representante de la familia *Enterobacteriaceae* en los tiempos 0 y 2 fue el género *Pantoea*, aunque posteriormente (especialmente en los tiempos 5 y 10) *Serratia* y otros géneros no asignados fueron las OTUs más abundantes en este grupo. Al final del período de almacenamiento (día 20), la microbiota cambió, con dominancia para el filo *Firmicutes* (familia *Lactobacillaceae*) y con el género *Lactobacillus* como OTU más abundante. No obstante, también se detectaron *Serratia* y otras *Enterobacteriaceae*, aunque con abundancias relativas bajas.

Los tratamientos con alta presión indujeron cambios importantes en la microbiota y las abundancias relativas de los principales grupos se mantuvieron bastante estables durante el almacenamiento. A nivel de filo, se observaron diferencias entre las muestras tratadas a 450 MPa y las

tratadas a 600 MPa, pero no entre los tratamientos a 22°C y los tratamientos a 50°C. Como regla general, las proteobacterias siguieron siendo el principal grupo bacteriano en todas las muestras tratadas, seguidas de *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*. En los tratamientos a menor presión (450 MPa), *Proteobacteria* mostró abundancias relativas en los rangos de 45,74 a 62,59% y *Bacteroidetes* fue el segundo grupo más abundante con abundancias relativas entre 25,48 y 37,44%. En las muestras tratadas a 600 MPa, las abundancias relativas de *Proteobacteria* fueron ligeramente superiores (54,01 a 80,23%).



(A)

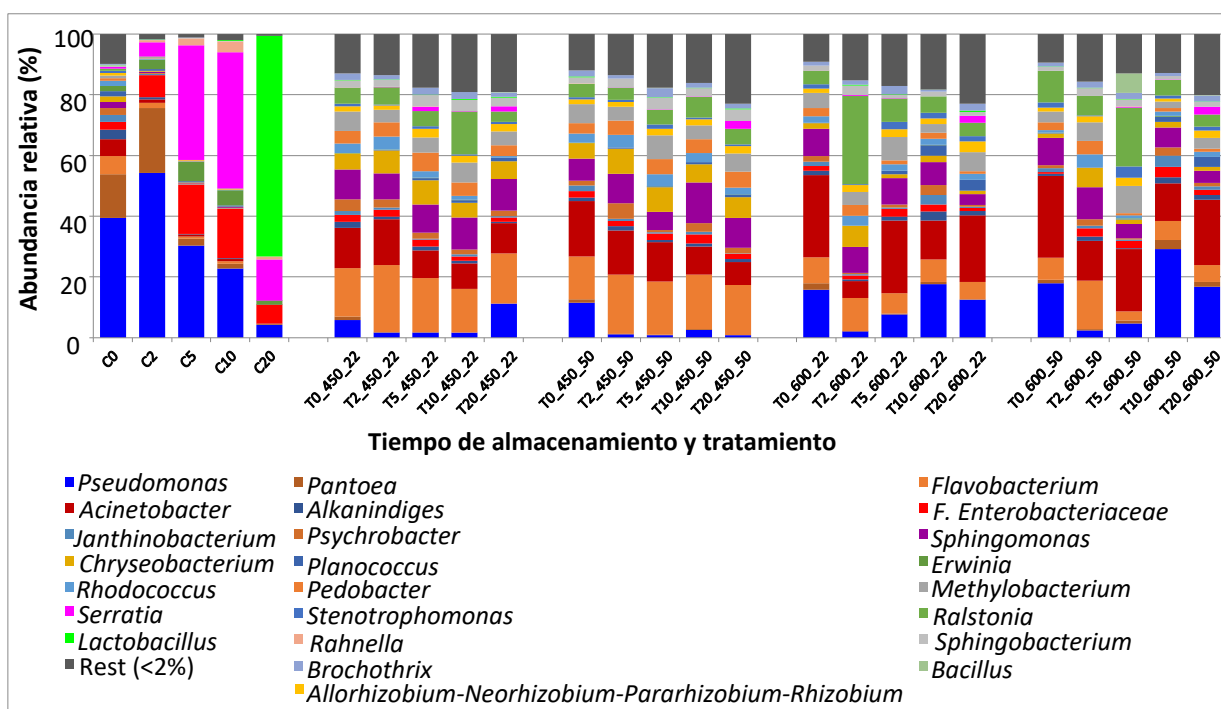
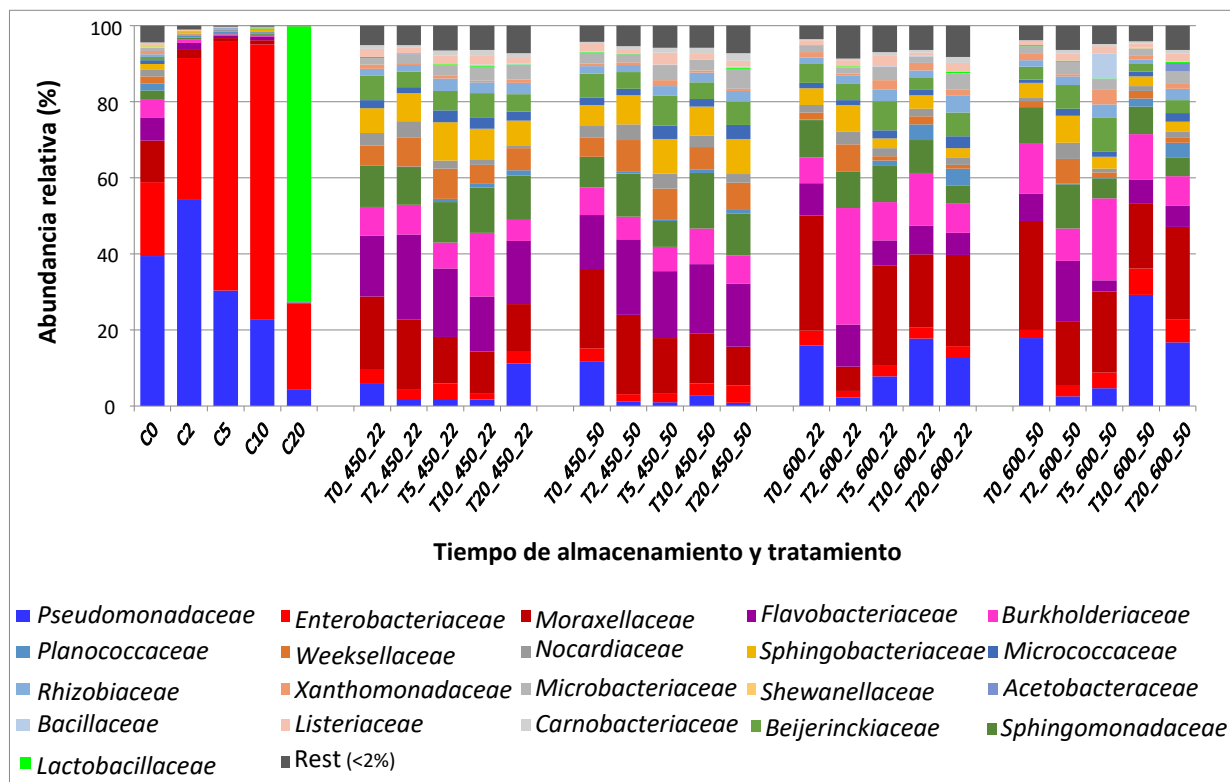


Figura 26. Diversidad bacteriana de las muestras de aliño a nivel de filo (A), familia (B) y género (C). Las muestras C se corresponden con los controles (no tratados). Las muestras sometidas a los diferentes tratamientos con APH (450 MPa a 22 °C; 450 MPa a 50 °C; 600 MPa a 22 °C; 600 MPa a 50 °C) en los diferentes tiempos de almacenamiento en días se corresponden con T.

El análisis estadístico de las abundancias relativas de *Proteobacteria* en las muestras tratadas indicó una abundancia significativamente mayor ($p < 0,05$) en las muestras tratadas a 600 MPa en comparación con las muestras tratadas a 450 MPa. Sin embargo, para el mismo tratamiento de presión, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) para *Proteobacteria* entre muestras tratadas a 22°C y muestras tratadas a 50°C. El grupo de *Bacteroidetes* tuvo abundancias relativas significativamente más bajas ($p < 0,05$) en las muestras tratadas a 600 MPa en comparación con las tratadas a 450 MPa.

Las abundancias relativas de los grupos de proteobacterias encontradas en las muestras tratadas difieren mucho de las muestras de control. En las muestras tratadas a 450 MPa, las familias *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae* tuvieron abundancias relativas muy bajas, mientras que otras familias de *Proteobacteria* se hicieron más notorias (principalmente *Moraxellaceae*, *Sphingomonadaceae* o *Burkholderiaceae*). *Bacteroidetes* estuvo representado principalmente por *Flavobacteriaceae*, *Weeksellaceae* y *Sphingobacteriaceae*. *Flavobacterium*, *Acinetobacter* y *Sphingomonas* fueron los géneros con mayor abundancia relativa en las muestras tratadas a 450 MPa.

La mayor proporción de *Proteobacteria* detectada en las muestras tratadas a 600 MPa incluía principalmente *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Sphingomonadaceae* y *Burkholderiaceae*. La baja abundancia relativa de *Bacteroidetes* involucró principalmente a las familias *Flavobacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae* y *Weeksellaceae*. Estas tres familias tenían abundancias relativas significativamente más bajas ($p < 0,05$) en las muestras tratadas a 600 MPa en comparación con 450 MPa, al igual que sus géneros representativos *Flavobacterium* y *Chryseobacterium*.

Las abundancias relativas medias calculadas para el género *Acinetobacter* en el grupo de muestras tratadas a 450 MPa (11,17% para las muestras tratadas a 22°C y 12,49% para las tratadas a 50°C) fueron inferiores en comparación con las muestras tratadas a 600 MPa (18,27% y 18,91%), pero las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). La misma observación podría hacerse para el género *Pseudomonas* (con valores promedio de 4,42 y 3,40% en las muestras tratadas a 450 MPa, y 11,18 o 14,14% para los tratamientos a 600 MPa).

En cuanto al análisis de coordenadas principales (PCoA) reveló que las muestras control se mapearon por separado de las muestras tratadas y entre sí (Figura 27). También se pudo observar que las muestras tratadas se mapearon de forma general en 2 subgrupos según el tratamiento al que fueron sometidas, atendiendo exclusivamente a las diferentes presiones de 450 y 600 MPa que se utilizaron, sin influencia de la temperatura de los tratamientos ni el tiempo de almacenamiento de las muestras.

Principal Coordinates Analysis (axes F1 and F2)

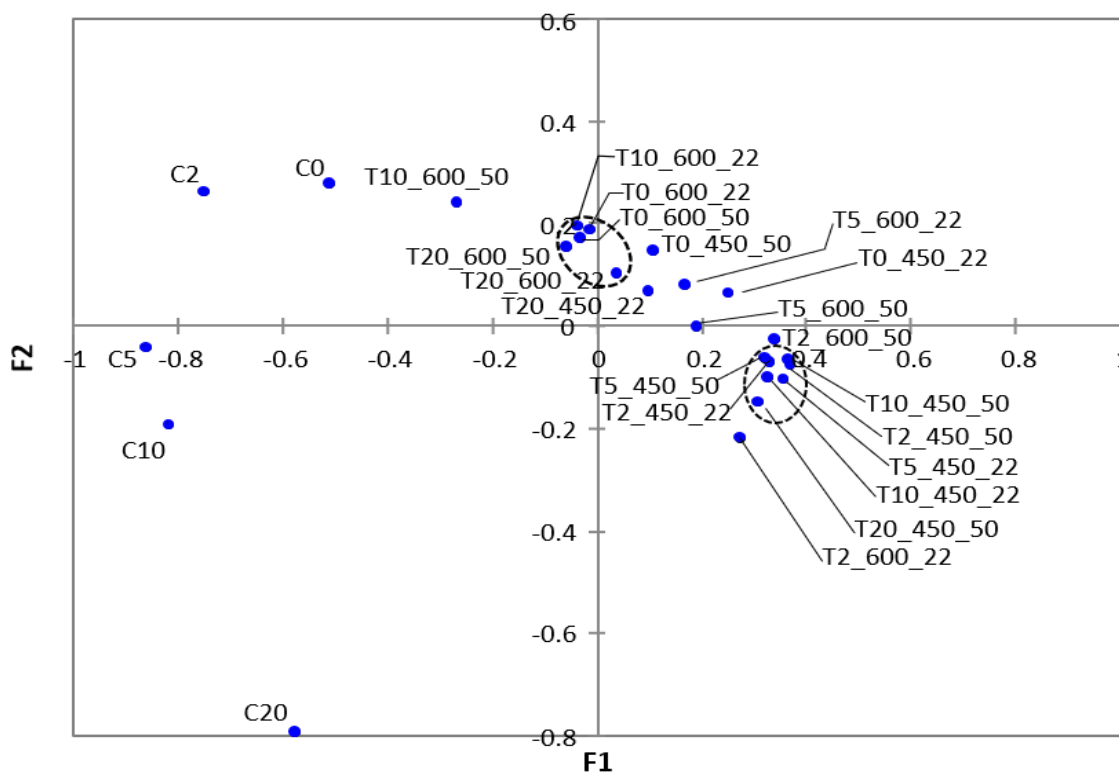


Figura 27. Análisis de coordenadas principales de las muestras de alíño tratadas o no por APH. Las muestras C se corresponden con los controles (no tratados). Las muestras sometidas a los diferentes tratamientos con APH (450 MPa a 22 °C; 450 MPa a 50 °C; 600 MPa a 22 °C; 600 MPa a 50 °C) en los diferentes tiempos de almacenamiento en días se corresponden con T.

5.3. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON BACTERIOCINA AS-48 SOBRE LA CARGA MICROBIANA Y DIVERSIDAD BACTERIANA EN ARÁNDANOS.

5.3.1. Estudio de la carga microbiana total.

En general, todos los tratamientos con bacteriocina AS-48 redujeron significativamente los recuentos de células viables en comparación con las muestras control, no tratadas.

En cuanto a los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales, llevados a cabo en el medio de cultivo TSA, encontramos que las muestras tratadas con bacteriocina mostraron recuentos de células viables comprendidos entre 1,4 y 1,88 log UFC/g, significativamente más bajos ($p < 0,05$) en comparación con las muestras control, cuyo rango de valores de los recuentos estaba comprendido entre 2,7 y 4,09 log UFC/g. Además, independientemente del tratamiento empleado, dos de las muestras (A1-A1B y A4-A4B) presentaron unos recuentos por debajo del límite de detección de 1,0 log UFC/g (Tabla 22).

Los recuentos de presuntas enterobacterias, obtenidas en agar McConkey (MC), fueron similares para dos de las muestras de control, con valores de 3 y 3,23 log UFC/g para las muestras A3 y A2 respectivamente. Para el resto de muestras control y la totalidad de las muestras tratadas se obtuvieron unos recuentos inferiores al límite de detección en este medio de cultivo (Tabla 22).

En el caso de los recuentos de presuntas *Salmonella*, llevados a cabo en el medio de cultivo Agar Verde Brillante (VB), solamente se obtuvieron recuentos significativos en dos muestras control, A2 y A3. La muestra A2

presentó un valor de 3,81 log UFC/g, significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación con la muestra A3, cuyo valor fue de 2,84 log UFC/g. Resultados similares se obtuvieron en los recuentos realizados en el medio de cultivo Eosina-Azul de Metileno Agar (EMB), para detección de bacterias coliformes, siendo en este caso los valores de células viables de 3,61 y 3,04 log UFC/g para las muestras control A2 y A3, respectivamente, encontrando también diferencias significativas ($p < 0,05$). Para el resto de muestras control y la totalidad de las muestras tratadas se obtuvieron unos recuentos inferiores al límite de detección en ambos medios de cultivo (Tabla 22).

Tabla 22. Recuento de células viables en muestras de arándanos tratadas o no con bacteriocina AS-48.

Muestras	TSA	MC	VB	EMB
A1	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
A2	4.09± 0.21 ^{a,b}	3.23± 0.07	3.81± 0.01 ^c	3.61± 0.02 ^d
A3	3.65± 0.25 ^{a,b}	3.00± 0.03	2.84± 0.3	3.04± 0.008
A4	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
A5	2.70± 0.03 ^a	< 1.00	< 1.00	< 1.00
A1B	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
A2B	1.40± 0.12	< 1.00	< 1.00	< 1.00
A3B	1.48± 0.21	< 1.00	< 1.00	< 1.00
A4B	< 1.00	< 1.00	< 1.00	< 1.00
A5B	1.88± 0.21	< 1.00	< 1.00	< 1.00

Las muestras tratadas con Bacteriocina AS-48 vienen indicadas con “B”. El resto de muestras (sin “B”) se corresponden con las muestras control, no tratadas. Cada número se corresponde con los 5 diferentes lotes de arándanos utilizados en el ensayo. Significación estadística ($p < 0.05$): a, significativamente mayor que las muestras tratadas; b, significativamente mayor que la muestra control A5 (en el medio TSA); c, significativamente mayor que la muestra control A3 (en el medio VB); d, significativamente mayor que la muestra control A3 (en el medio EMB).

5.3.2. Estimación de la biodiversidad bacteriana de las muestras.

El número de lecturas asignadas osciló entre 18.587 y 54.911 (Tabla 23), sin embargo, la mayoría de ellas correspondían a cloroplastos. Al objeto de eliminar las secuencias procedentes de ADN de origen vegetal, se eliminaron todas las lecturas correspondientes a cloroplastos y a mitocondrias, lo cual redujo muy considerablemente el número de lecturas asignadas a las unidades taxonómicas operativas (OTU) hasta valores comprendidos entre 668 y 11.820. Los datos así depurados se utilizaron para calcular los índices de biodiversidad y los valores de abundancia relativa de los diferentes taxones. Los índices de biodiversidad Chao-1, Shannon y Simpson obtenidos a nivel de género (incluyendo así mismo las secuencias de niveles superiores que no pudieron ser asignadas a este nivel) se muestran en la Tabla 23. Los datos del índice de biodiversidad Chao-1 fueron inferiores en las muestras tratadas con respecto a los controles para las muestras A1B, A3B y A4B. Así mismo, los índices de biodiversidad de Shannon y Simpson fueron inferiores en las siguientes muestras tratadas con respecto a los controles: A1B, A3B, A4B y A5B.

Tabla 23. Número de lecturas e índices de diversidad alfa a nivel de género de las muestras de arándanos, tratadas o no con bacteriocina AS-48.

Muestras	Lecturas totales asignadas	Lecturas asignadas a procariotas	Chao-1	Shannon	Simpson
A1	18.587	4.761	80	3,319	0,9079
A1B	46.576	7.266	67	2,505	0,8
A2	49.922	8.332	43	0,5841	0,1815
A2B	54.867	11.336	44	0,6706	0,2194
A3	43.194	5.206	51	2	0,6615
A3B	48.197	11.820	46	0,7479	0,2587
A4	51.473	3.601	84	3,364	0,9204
A4B	49.697	2.132	45	2,96	0,8851
A5	23.922	668	32	3,187	0,9496
A5B	54.911	2.632	39	2,027	0,6481

Las muestras tratadas con Bacteriocina AS-48 vienen indicadas con “B”. El resto de muestras (sin “B”) se corresponden con las muestras control, no tratadas. Cada número se corresponde con los 5 diferentes lotes de arándanos utilizados en el ensayo. Los índices de Shannon y Simpson son estimadores tanto de la riqueza como de la uniformidad de las especies, con más énfasis en la riqueza (Shannon) o en la uniformidad (Simpson).

Los valores de abundancia relativa de las diferentes unidades taxonómicas operativas (OTU) encontradas en las muestras de arándanos se muestran en la Figura 28. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de 16 filos en el conjunto de las muestras, todos ellos pertenecientes al dominio Bacteria (Figura 28A). Cabe destacar que se encontraron

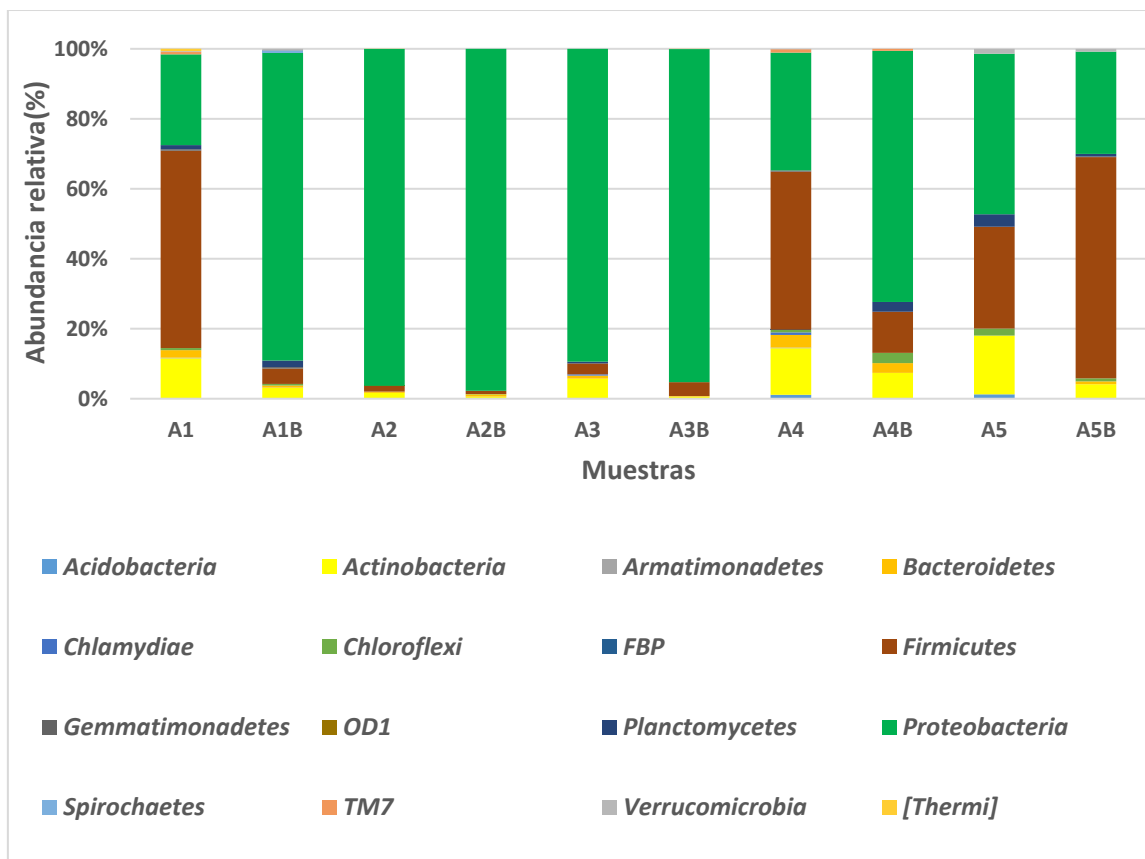
diferencias importantes en las abundancias relativas de los diferentes grupos entre los distintos lotes de muestras.

En las muestras control *Firmicutes* fue el filo más abundante en las muestras A1, con una abundancia relativa del 56,39%, y A4, con un 45,13%. *Proteobacteria* fue el filo con mayor abundancia relativa en las muestras control A2 (96,30%), A3 (89,41%) y A5 (45,88%). El tercer filo en importancia fue *Actinobacteriota*, mostrando las abundancias relativas más elevadas en las muestras A1 (11,55%), A4 (13,30%) y A5 (16,80%). Según se muestra en la Figura 28B, el grupo de *Firmicutes* estaba representado principalmente por miembros de la familia *Enterococcaceae* (principalmente en las muestras A1 y A4, siendo el género *Enterococcus* el más abundante), seguido de la familia *Bacillaceae* (muestra A1, género *Bacillus*) y *Staphylococcaceae* (muestra A5, género *Staphylococcus*). En el grupo de *Proteobacteria*, la familia *Enterobacteriaceae* fue la más destacada, con abundancias relativas de 90,57% (A2) y 71,63% (A3). En la muestra A3 destacó la elevada abundancia relativa del género *Erwinia*, con un 55,70% (Figura 28C). El resto de grupos de *Proteobacteria* mostraron abundancias relativas inferiores en general para las muestras control. La muestra A5 mostró una composición algo diferente, con una mayor abundancia relativa del filo *Actinobacteria*, representado por la familia *Micrococcaceae* y el género *Micrococcus*, además de *Carnobacterium* (3,44%), *Enterococcaceae*, *Staphylococcus* y una variedad de *Proteobacteria*.

Respecto a las muestras tratadas con bacteriocina mostraron en su mayoría abundancias relativas más elevadas para *Proteobacteria*, a excepción de la muestra A5B (Figura 28A). En la muestra A1B, las familias más importantes detectadas fueron *Enterobacteriaceae* (40,84%), *Phyllobacteriaceae* (14,01%, representada principalmente por el género

Parvibaculum), *Hyphomicrobiaceae* (12,88%) y *Xanthomonadaceae* (7,56%), mientras que las familias *Enterococaceae* y *Bacillaceae* descendieron por debajo del 2,6% en abundancia relativa con respecto a la muestra control correspondiente A1 (Figura 28B). También se detectó un ligero descenso de *Sphingomonadaceae*. En la muestra A2B, el único cambio destacado respecto al control A2 fue un ligero aumento de la *Oxalobacteraceae* (2,58%) y un descenso de *Pseudomonadaceae*. En la muestra A3B, el incremento de *Proteobacteria* detectado respecto al control (del 89,41 al 95,18%) se debió principalmente a un incremento de *Enterobacteriaceae*, alcanzando el 89,69%, y en mucho menor grado de *Legionellaceae* (2,45%, representada por el género *Legionella*). Por el contrario, el porcentaje de lecturas asignadas al género *Erwinia* descendió con respecto al control (del 55,70% al 3,76%). Para la muestra A4B, el incremento en la abundancia relativa de *Proteobacteria* con respecto al control A4 fue mucho mayor (del 33,65% al 71,63%). Sin embargo, en este caso además de la familia *Enterobacteriaceae*, la cual alcanzó un 30,72%, también incrementó la abundancia relativa de otras familias como *Hyphomicrobiaceae* (6,70%), *Phyllobacteriaceae* (6,19%), *Legionellaceae* (3,51%, representada por el género *Legionella*), *Pseudomonadaceae* (3,38%; género *Pseudomonas*), *Xanthomonadaceae* (5,30%), y el Orden ASSO-13 (3,05%). La muestra A5B fue la única en la que se detectó un incremento en la abundancia relativa de *Firmicutes* tras el tratamiento con bacteriocina. Este grupo alcanzó el 63,22% y estuvo representado principalmente por la familia *Enterococcaceae* con un 58,62%. Por el contrario, los representantes de *Actinobacteria* y *Proteobacteria* descendieron en abundancias relativas (hasta el 4,14 y el 29,26%, respectivamente). En *Proteobacteria*, los grupos que más descendieron en

abundancia relativa fueron las familias *Hyphomicrobiaceae* (género *Parvibaculum*), *Sphingomonadaceae* (género *Sphingomonas*), *Haliangiaceae*, *Enterobacteriaceae* y el orden *Burkholderiales*. Por el contrario, las abundancias relativas de *Pseudomonadaceae* y *Xanthomonadaceae* aumentaron respecto a la muestra control A5.



(A)

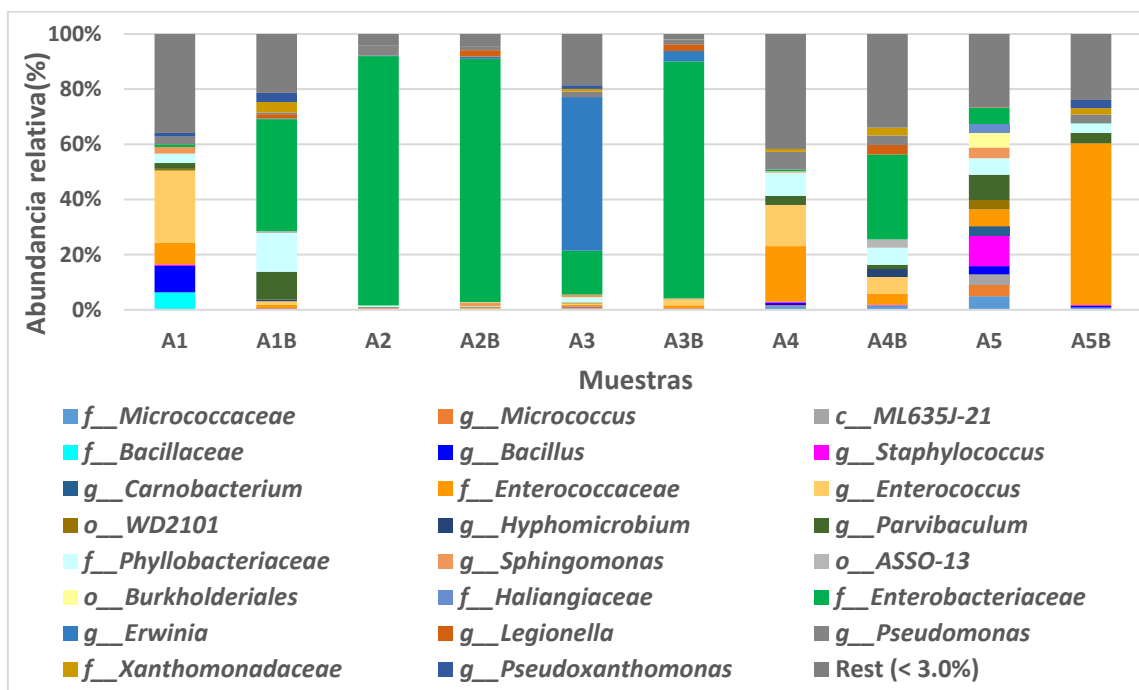
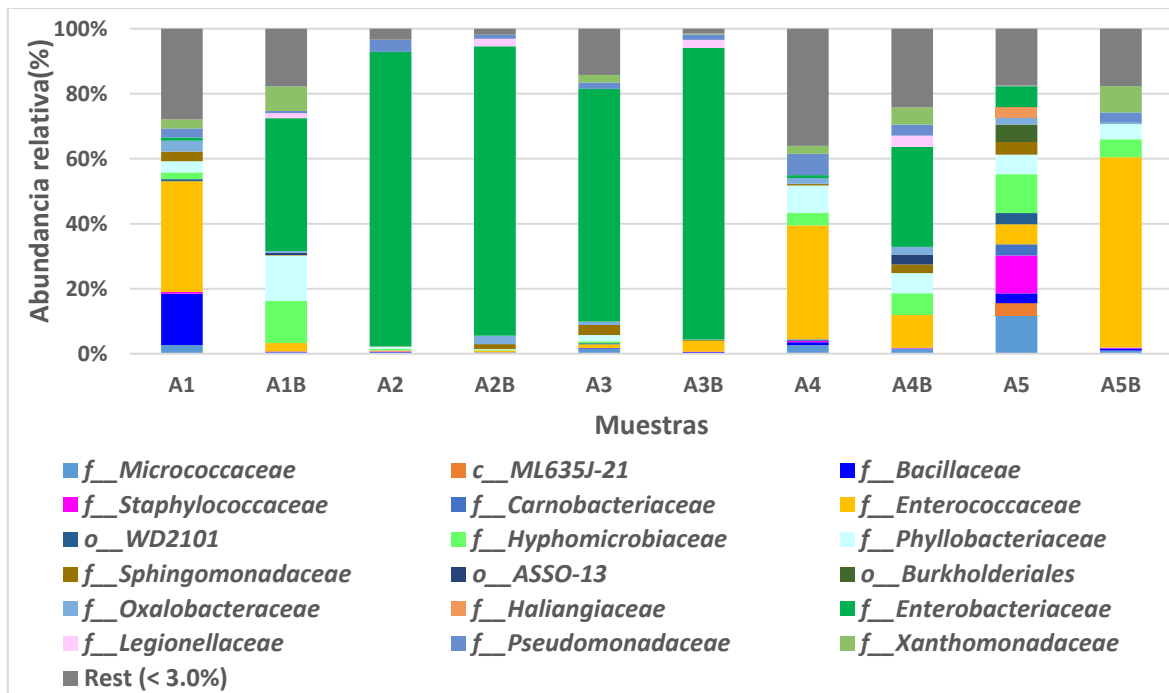


Figura 28. Diversidad bacteriana de las muestras de arándanos a nivel de filo (A), familia (B) y género (C). Las muestras tratadas con Bacteriocina AS-48 vienen indicadas con “B”. El resto de muestras (sin “B”) se corresponden con las muestras control, no tratadas. Cada número se corresponde con los 5 diferentes lotes de arándanos utilizados en el ensayo.

El análisis de coordenadas principales (Figura 29) indicó una mayor proximidad para las muestras tratadas con bacteriocina correspondientes a los lotes 1-4, que formaban un grupo separado de las muestras control (excepto la muestra A2). Por otra parte, las muestras control mostraban una distribución más dispersa (exceptuando las muestras A1 y A4, que además estaban muy próximas a la muestra tratada A5B), y las muestras A3 y A5 que mostraban posiciones más alejadas de todas las demás.

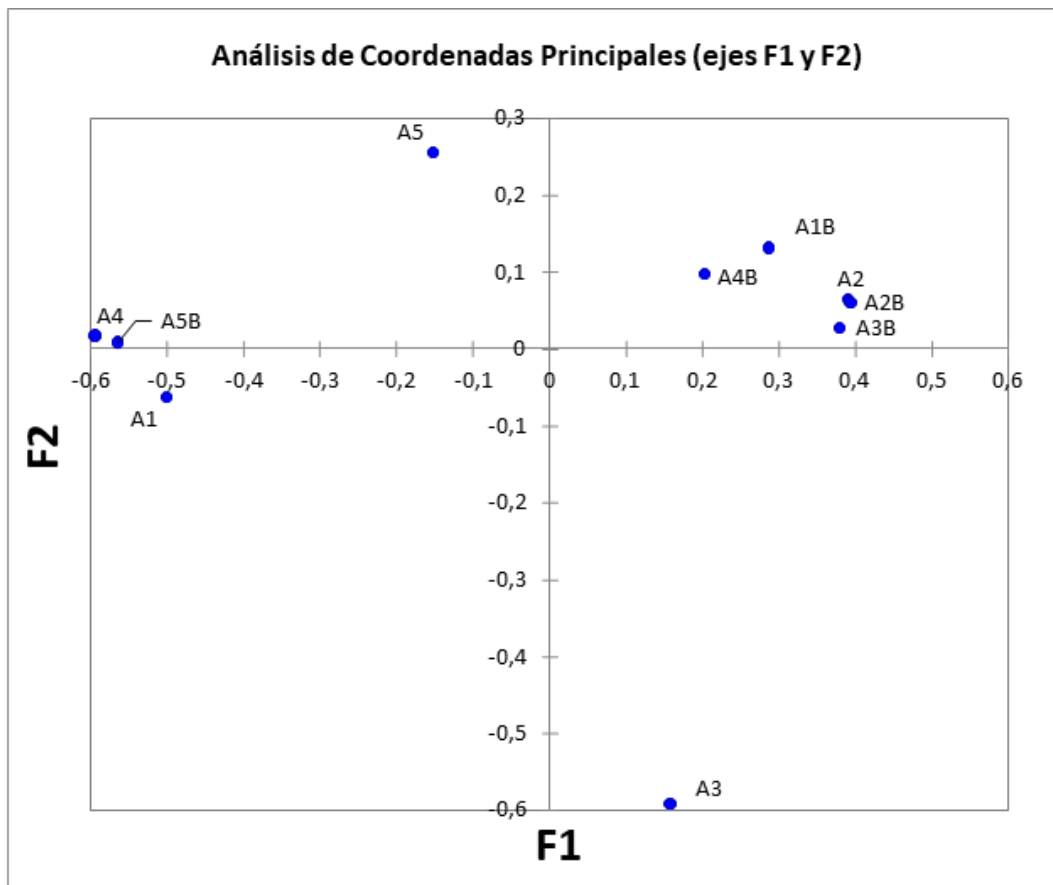


Figura 29. Análisis de coordenadas principales de las muestras de arándanos tratadas o no con Bacteriocina AS-48. Las muestras tratadas con bacteriocina vienen indicadas con "B". El resto de muestras (sin "B") se corresponden con las muestras control, no tratadas. Cada número se corresponde con los 5 diferentes lotes de arándanos utilizados en el ensayo.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que los tratamientos de alta presión hidrostática (APH) no lograron inactivar completamente las poblaciones microbianas en el guacamole. Estudios anteriores también informaron de la presencia de una fracción residual de células viables en alimentos y bebidas vegetales tras los tratamientos de alta presión (Waite J. et al., 2009; Toledo Del Árbol J. et al., 2016a). Un estudio (Jacobo-Velázquez D.A. y Hernández-Brenes C., 2010) informó de una fracción superviviente de aproximadamente 2 unidades logarítmicas por gramo (total de mesófilos aeróbicos y bacterias lácticas) en la pasta de aguacate tratada a 600 MPa (3 min) y almacenada en refrigeración durante 45 días.

La presencia de una fracción residual superviviente se ha atribuido a los efectos de cola observados cuando las células vegetativas son tratadas por APH (Smelt J., 1998). Se ha informado de que los residuos tienden a desaparecer cuando se combina la APH con el calor (Kalchayanand N. et al., 1998). Los resultados del presente estudio indicaron que los tratamientos aplicados a 50 °C lograron reducciones significativamente mayores de los recuentos viables (mesófilos aeróbicos totales) en guacamole en comparación con los tratamientos aplicados a 22 °C, y redujeron los recuentos viables de levaduras y hongos por debajo de los niveles de detección en todos los tiempos de almacenamiento. Estos resultados podrían explicarse por la mayor inactivación del tratamiento combinado sobre las células vegetativas más que sobre las formas de esporas. Según estudios anteriores, la APH a 50 °C puede no ser suficiente para inactivar las

endosporas bacterianas (Evelyn y Silva F.V., 2019). Sin embargo, al ser un alimento muy ácido ($\text{pH} < 4,6$), parece poco probable que la germinación de endosporas y el crecimiento bacteriano extensivo se produzca en el guacamole tratado bajo refrigeración. También se ha informado de que las esporas de hongos resistentes al calor pueden requerir la combinación de alta presión y procesamiento térmico para su inactivación en alimentos de alta acidez, mientras que las esporas de hongos menos resistentes pueden ser inactivadas por APH a temperatura ambiente (Evelyn y Silva F.V., 2019). Además, se ha informado de que las ascosporas de levadura tienen menor resistencia que las esporas bacterianas y esporas de hongo y eran mucho más fáciles de inactivar por APH (Evelyn y Silva F.V., 2019). La mayoría de estos resultados se basan en estudios realizados con zumos de fruta y concentrados de zumo, en los que el contenido de azúcar puede tener un efecto en la inactivación de las esporas. Los resultados del presente estudio sugieren que los tratamientos combinados de APH a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ mejoraron la inactivación de levaduras y hongos, ya que no se obtuvieron recuentos viables en ninguna de las muestras tratadas en comparación con las muestras presurizadas a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una segunda cuestión abordada en el presente estudio fue el impacto de los tratamientos de APH en la carga de resistencia antimicrobiana en el guacamole. En primer lugar, elegimos el cloruro de benzalconio (CB) como biocida representante de los compuestos de amonio cuaternario (QACs) porque los QACs son ampliamente utilizados para la limpieza y desinfección en la industria alimentaria y también porque la tolerancia a los biocidas podría estar implicada en la coselección de la resistencia a los antibióticos (Kim M. et al., 2018; Tezel U. y Pavlostathis S.G., 2015). Sin embargo, sólo detectamos el crecimiento bacteriano de las

muestras control en el tiempo 0, pero no durante el almacenamiento ni después de la aplicación de los tratamientos de APH. En segundo lugar, nos centramos en la tolerancia al carbapenem porque existe una creciente preocupación por la diseminación de bacterias productoras de carbapenemasas a través de la cadena alimentaria (Morrison B. J. y Rubin J. E., 2015; Bonardi S. y Pitino R., 2019; Iseppi R. et al., 2018; Zurfluh K. et al., 2015b). Los resultados obtenidos indicaron niveles bajos de presuntas enterobacterias tolerantes al carbapenem (cefotaxima e imipenem) en el guacamole, pero también indicaron que las bacterias tolerantes podían persistir en la salsa durante el almacenamiento refrigerado hasta 30-40 días. Lo más preocupante es que los recuentos viables obtenidos en agar KPC incubado en condiciones aeróbicas aumentaron drásticamente durante el almacenamiento refrigerado de las muestras control. Aunque el agar KPC se diseñó para la detección de *Enterobacteriaceae* tolerantes a carbapenem a partir de muestras clínicas, las cepas productoras de carbapenemasas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, así como otras bacterias intrínsecamente tolerantes también podrían crecer en este medio (que carece de la selectividad del agar MacConkey). Esto explicaría los recuentos mucho más bajos obtenidos cuando el agar KPC se incubó bajo anaerobiosis. Para obtener más información sobre los antecedentes genéticos de la tolerancia al penem se ha obtenido una colección de cepas bacterianas aisladas de los medios selectivos para ser investigadas.

Existe el riesgo de que la ingestión de alimentos que contengan bacterias tolerantes al penem pueda dar lugar a la transferencia de los determinantes genéticos de la resistencia a la microbiota intestinal. Sin embargo, cabe destacar que no se detectó crecimiento bacteriano en

medios suplementados con antibióticos en ninguna de las muestras de guacamole presurizado. Así pues, un tratamiento de baja intensidad de 450 MPa a 22 °C durante 5 minutos mejoraría la seguridad del guacamole al reducir la carga de bacterias tolerantes a penem por debajo de niveles detectables.

El análisis de la dinámica de las poblaciones bacterianas durante el almacenamiento refrigerado de muestras de guacamole no tratadas indicó un cambio en la microbiota de miembros de *Enterobacteriaceae* y otras Proteobacterias hacia una fermentación láctica. Este cambio fue seguido por una disminución del pH durante el almacenamiento y una sucesión de bacterias lácticas. La población de *Leuconostoc* aumentó en abundancia relativa de los días 5 a 20 y *Lactobacillus* fue la OTU predominante en las muestras hacia el final del almacenamiento. Esta sucesión es típica de algunas fermentaciones vegetales como el chucrut (Zabat M. et al., 2018). Los *Leuconostoc* son menos tolerantes a los pH bajos que los lactobacilos. Al mismo tiempo, los lactobacilos tienen una mayor capacidad de acidificación y utilización de los azúcares residuales y se espera que tomen el relevo en las últimas etapas de la fermentación y creen un entorno selectivo que provoque el desplazamiento de otras poblaciones bacterianas.

La aplicación de los tratamientos APH no sólo tuvo un impacto en la carga microbiana de las muestras de guacamole, sino que también afectó a su diversidad bacteriana, reduciendo la abundancia relativa de *Enterobacteriaceae* y aumentando la de *Ralstonia*. Las muestras tratadas también mostraron algunos cambios en la diversidad bacteriana durante el almacenamiento, pero estos cambios difieren notablemente de las muestras de control. En primer lugar, las bacterias lácticas (BAL) tuvieron

una abundancia relativa muy baja en las muestras tratadas durante el almacenamiento. *Lactobacillus* se encontraba por debajo del 1,5% y *Leuconostoc* por debajo del 0,3%. *Weissella* fue la única BAL detectada en las muestras tratadas, especialmente durante los periodos de almacenamiento temprano y medio. Es tentador sugerir que *Weissella* desplazó a *Leuconostoc* en las muestras tratadas con APH, posiblemente debido a una mayor tolerancia a los tratamientos con APH o a una mayor capacidad para desarrollarse en las muestras presurizadas. *Weissella* spp. ha sido aislada de una amplia variedad de hábitats, por ejemplo, plantas, verduras y alimentos fermentados como la masa madre para elaboración de pan y los alimentos fermentados tradicionales de Asia y África (Fusco V. et al., 2015). La capacidad de crecimiento de *Weissella* en el guacamole refrigerado podría estar limitada por la baja temperatura. Sin embargo, en algunas especies de *Weissella* (por ejemplo, *W. diestrammenae*, *W. soli* y *W. viridescens*) se ha descrito que pueden crecer en un rango de temperatura de 4 a 37 °C (Fusco V. et al., 2015).

Hoy en día, es importante para la industria alimentaria no sólo evaluar las relaciones entre tratamientos de procesamiento de alimentos y la vida útil del producto, sino también comprender el impacto de los tratamientos en la seguridad de los alimentos. Los resultados del presente estudio indican que todos los tratamientos de APH probados reducen los niveles de *Enterobacteriaceae* y de bacterias resistentes al carbapenem y proporcionan estabilidad al producto contra la acidificación por bacterias lácticas. La aplicación de los tratamientos de APH a 50 °C logró reducciones adicionales de los recuentos de células viables y redujo las concentraciones de supervivientes durante el almacenamiento. Por lo tanto, los tratamientos APH a 50 °C podrían recomendarse en casos de riesgo de

mayor contaminación, por ejemplo, cuando se utilizan materias primas con alta carga microbiana.

Es de sobra conocido que el uso indiscriminado de antimicrobianos contribuye frecuentemente al desarrollo de resistencias antimicrobianas (Hawkey P.M., 2008). Para evaluar la incidencia de la resistencia antimicrobiana en el guacamole debemos tener en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de resistencia a biocidas y antibióticos y la determinación de la presencia de los diferentes genes de resistencia utilizados en las cepas aisladas e identificadas. En nuestro caso, la población aislada e identificada a partir del guacamole difiere totalmente de los resultados obtenidos en un reciente estudio realizado en la India sobre el análisis microbiológico de zumos de fruta (Omar B. et al., 2020), cuya especie predominante fue *Klebsiella* sp. con un 59,05% de abundancia relativa respecto a la población total. En nuestra población objeto de estudio cabe destacar el notable predominio del género *Bacillus*, en un 62,9%. Esta asimétrica distribución poblacional hay que tenerla en cuenta a la hora de exponer los resultados obtenidos en los diferentes ensayos de determinación de resistencias y multirresistencias. El hecho de que la mayor parte de cepas aisladas e identificadas se correspondan con bacilos, a su vez, se va a ver reflejado en un mayor grado de tolerancia a los antimicrobianos ensayados, tanto biocidas como antibióticos, por parte de las cepas de dicho grupo, al igual que la mayor parte de genes de resistencia van a ser detectados dentro del grupo de los *Bacillus*. Para evitar caer en este error trataremos de realizar un enfoque global, de la población en conjunto, y específico, de los principales grupos bacterianos que conforman dicha población, para poder comparar e interpretar de forma óptima los resultados.

En cuanto las resistencias a los antibióticos la totalidad de las cepas identificadas presentaron alguna resistencia frente al menos uno de los 12 antibióticos ensayados. El segundo antibiótico al que mayor número de cepas han resistido es la cefotaxima (CTX) con un 71,4% de las mismas. Según Sharma N. et al. en 2020, se informó de una alta resistencia a este antibiótico por parte de las cepas ensayadas, aunque, por el contrario, nuestros hallazgos diferían respecto al antibiótico cloranfenicol (C), en el cual encontramos resistencias por parte del 24% de nuestras cepas mientras que en dicho estudio no se detectó ninguna resistencia. Estos resultados obtenidos para cefotaxima son clínicamente importantes, ya que este antibiótico se encuentra en la lista de medicamentos esenciales de la OMS (World Health Organization, 2019). Además, la cefotaxima es una cefalosporina de espectro extendido que tiene una amplia gama de terapia antibiótica y produce mínimos efectos secundarios adversos (Arumugham V.B. et al., 2022).

De forma específica, cabe destacar las dos siguientes cepas bacterianas, pertenecientes al género *Enterobacter*, por el perfil de multiresistencias a antibióticos que presentan. Estas cepas (que mostraron el mayor porcentaje de homología con las secuencias ribosómicas depositadas en bases de datos para *Enterobacter soli* ATCC BAA-2102 strain LF7 y *Escherichia* sp. PP001), mostraron resistencias a 11 de los 12 antibióticos ensayados. Nyenje M. E. et al. en 2012 ya reportaron un perfil multirresistente de varias enterobacterias aisladas de alimentos listos para consumir. En otro estudio (Haryani Y. et al., 2008) observaron que todas las cepas correspondientes a *Enterobacter cloacae* estudiadas fueron resistentes a seis o más antibióticos de los 12 que se ensayaron, aunque

todas ellas mostraron sensibilidad al cloranfenicol (C) y la gentamicina (CN), al contrario que las nuestras.

El grado de sensibilidad a los biocidas ensayados por parte de la población bacteriana aislada del guacamole fue elevado en general, ya que con todos los biocidas se observó una concentración mínima inhibitoria (MIC) relativamente baja para la totalidad de dichas cepas bacterianas. Independientemente de esto es crucial tener en cuenta que el uso generalizado de biocidas y su difusión resultante en el medio ambiente puede contribuir a las adaptaciones de las bacterias que conducen al desarrollo de un bajo nivel de susceptibilidad a los agentes antibacterianos. Algunos de los mecanismos de resistencia de las bacterias son similares para los antimicrobianos, incluidos los biocidas, por lo que la exposición a los biocidas puede dar lugar a una resistencia cruzada frente a los diferentes agentes antibacterianos (Davin-Regli A. y Pagès J., 2012).

Atendiendo a los 6 diferentes biocidas ensayados, en 3 de ellos [cetrimida (C), hexadecilpiridinio (HP) y triclosán (T)] la mayor parte de la población bacteriana (entre un 79 y 99%) mostraron la menor MIC ensayada (2 µg/mL). Estos resultados coinciden con los reportados por Romero J.L. et al. en 2017, donde informan de una baja tolerancia a los biocidas C y HP en la mayor parte de cepas ensayadas en su estudio. Por el contrario, para el biocida T se obtuvieron mayores porcentajes de aislados que mostraban una menor sensibilidad. Con el biocida cloruro de benzalconio (CB) no hubo una MIC claramente predominante, observando la inhibición del crecimiento de las diferentes cepas a concentraciones medias-bajas del biocida (entre 2-32 µg/mL). Por el contrario, según Arioli S. et al. en 2013, los valores de MIC obtenidos para CB, frente a las bacterias del ácido láctico que ensayaron, oscilaron entre 0,06 y 4 µg/mL,

presentando unas MICs mucho más bajas que en nuestro estudio. En contraste con los resultados descritos por Fernández-Fuentes M.A. et al. en 2012, en nuestro estudio el biocida que mayor MIC mostró fue el hexaclorofeno (HC), llevando a cabo la inhibición del crecimiento del 60% de la población con la concentración más alta ensayada (128 µg/mL). Los biocidas se utilizan para muchos propósitos diferentes, incluidos los procesos de desinfección en la industria alimentaria de tal forma que el contacto previo con biocidas podría explicar la tolerancia a los biocidas observadas en el presente estudio. Sin embargo, en este mismo estudio (Fernández-Fuentes M.A. et al., 2012) encontramos ciertas coincidencias con nuestros resultados sobre el biocida clorhexidina digluconato (CD) ya que la MIC mostrada por la totalidad de los aislados ensayados, en ambos estudios, se encontraba entre 10 y 100 µg/mL.

Atendiendo a los determinantes de resistencia detectados en el presente estudio, los genes de resistencia a betalactámicos fueron los que mayor presencia mostraron dentro de nuestra población bacteriana (83%), siendo a su vez el gen *bla_{SHV}* el determinante genético detectado con mayor frecuencia, mientras que el gen *bla_{TPSE}* no fue detectado. En contraposición a los resultados obtenidos en el presente estudio, Zhu Y. et al. informaron en 2017 de la ausencia del gen *bla_{SHV}* en la totalidad de sus aislados (*Salmonellas* aisladas de pollos en China), mientras que el gen *bla_{TEM}* fue detectado en la mayor parte de la población objeto de estudio. Esta disparidad encontrada entre ambos estudios puede explicarse debido a las diferentes cepas estudiadas, aisladas a su vez de diferentes muestras además de las diferencias geográficas existentes, sin embargo, ambos entornos podrían llegar a complementarse entre sí por los diferentes mecanismos de dispersión de genes de resistencia existentes. Los genes de

resistencia a tetraciclinas fueron el segundo grupo de genes de resistencia con mayor porcentaje de detección (80%), con el predominio de la presencia del gen *tet(A)*. Además, cada uno de los 10 genes ensayados en este grupo fue observado en al menos 2 aislados. En el estudio mencionado anteriormente (Zhu Y. et al., 2017) también se informó del alto porcentaje de detección de genes de resistencia a tetraciclinas en la población de *Salmonella* estudiada, incluyendo la presencia, entre otros determinantes genéticos ensayados en nuestro estudio, del gen *tet(A)*. Para el resto de grupos de genes de resistencia ensayados, aunque presentaron en general una baja frecuencia de detección, cabe destacar el gen *dfra12* dentro de los inhibidores de dihidrofolato reductasa, el gen *mepA* que codifica para las bombas de exporte y el gen *ereA* como representante de resistencia frente a macrólidos, los cuales presentaron un porcentaje de detección respecto a la población total entre un 24-31%. No se han encontrado estudios previos al presente donde se informe de la presencia de alguno de los genes de resistencia a bombas de exporte e inhibidores de dihidrofolato reductasa en cepas aisladas de alimentos de origen vegetal. En los siguientes estudios se reporta la detección de los principales genes de resistencia a inhibidores de dihidrofolato reductasa, bombas de exporte y macrólidos señalados en nuestro estudio. En un estudio (Sunde M. et al., 2015), el cual formaba parte de los programas noruegos de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, se detectó la presencia del gen *dfra12* en cepas de *E. coli* de origen humano (muestras clínicas) y alimentario (productos cárnicos). Sri Prabakusuma A. et al. en 2021, detectaron en una cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de un queso tradicional chino la presencia del gen *mepA*. En otro estudio (Wang J. et al., 2018), detectaron la presencia del gen *ereA*, de resistencia a macrólidos, en las cepas

Staphylococcus carnosus y *Lactobacillus plantarum*, aisladas de carne curada china fermentada naturalmente.

De forma más específica, cabe destacar la cepa K48 (*Lysinibacillus* sp.) en la cual se detectó la presencia de 4 de los 7 genes de resistencia a betalactámicos ensayados (***bla*_{SHV}**, ***bla*_{TEM}**, ***bla*_{KPC}** y ***bla*_{ctxM}**) además de mostrar determinantes de resistencia en los 3 grupos de tetraciclinas (*tet(C)*, grupo I; *tet(A)*, grupo II; y *tet(S)*, grupo III). En futuros estudios trataremos de investigar la posible correlación existente entre el perfil de resistencias, tanto a antibióticos como a biocidas, de esta y todas las cepas de interés que encontremos, y la presencia de los diferentes determinantes genéticos de resistencia presentes en su genoma. Los avances en los análisis de secuenciación del genoma completo asociados con una mejor comprensión de la correlación entre los datos de resistencia fenotípica y genotípica pueden mejorar la predicción de la resistencia a los antimicrobianos, lo cual es imprescindible para afrontar este grave problema al que nos enfrentamos.

Es de sobra conocido que la contaminación microbiana de los alimentos puede producirse a través de diferentes fuentes. Los aderezos y condimentos se preparan a menudo en casa o en los servicios de restauración sin aplicar ningún tratamiento para inactivar los microorganismos. Esto puede dar lugar a un riesgo de deterioro o de proliferación de bacterias patógenas o toxigénicas para el ser humano durante el almacenamiento. Las hierbas empleadas en la preparación de aliños, salsas y otros ingredientes son a menudo una fuente importante de contaminación. El cilantro y el perejil frescos se consumen a menudo sin

ningún tipo de tratamiento que inactive los microorganismos. Además, se cultivan cerca del suelo, lo que las hace más susceptibles de contaminación por el agua de riego. En algunos casos se ha descrito el riego de campos de cultivo con aguas no tratadas, o la presencia de toallitas o papel higiénico usados en los campos de cultivo, o instalaciones agrícolas o de envasado sin aseos ni agua corriente, lo que también facilita la contaminación. En 1995 se registró un brote de gastroenteritis severa que derivó en síndrome hemolítico urémico y púrpura trombocitopénica en niños que habían consumido bocadillos que contenían perejil contaminado con *Cyrobacter freundii* verotoxigénico (Tschape H. et al., 1995). El perejil también se asoció a brotes provocados por alimentos contaminados con *Escherichia coli* (EPEC) en restaurantes de Minnesota (Naimi T.S. et al., 2003). Otros estudios también han establecido una relación causa-efecto entre casos de shigelosis y el consumo de perejil contaminado con *Shigella sonney* o *Shigella boydi* (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1999; Chan Y.C. y Blaschek H.P., 2005; Naimi T.S, et al., 2003). Así mismo, entre 1996 y 2015, la FDA registró nueve brotes asociados al consumo de estas hierbas, con un total de 2.699 afectados y 84 hospitalizaciones. Cuatro de los brotes estaban ligados a albahaca, tres a cilantro y dos a perejil. Siete de los brotes se atribuyeron al parásito *Cyclospora cayetanensis*, uno a *E. coli* O157:H7, y uno a *Shigella sonnei*. En 2021 se registró en USA un brote infeccioso por *Salmonella* Oranienburg que afectó al menos a 279 personas en 29 estados de acuerdo con el Centers For Disease and Prevention. Tras largas investigaciones, la cepa de *Salmonella* en cuestión se aisló de un recipiente que había contenido un condimento a base de cilantro y lima (Beach C., 2021). Ante esto la FDA estableció en 2017 un plan de muestreo

de hierbas frescas (cilantro, perejil y albahaca) para la detección de los patógenos intestinales más importantes (FDA, 2022).

En el presente estudio, se preparó un aliño con cilantro y perejil como ingredientes principales. La mezcla resultante presentaba una carga microbiana elevada para aerobios mesófilos totales y enterobacterias, así como para mohos y levaduras, lo que sugiere una baja calidad de las materias primas. Durante el almacenamiento, los recuentos alcanzaron niveles de 6,25-6,5 log UFC/g, lo que si bien no supone un factor importante para el deterioro del producto sí podría constituir un riesgo para la salud, teniendo en cuenta la carga de enterobacterias. En un estudio previo realizado por nuestro grupo con perejil troceado almacenado en bandejas, las concentraciones de aerobios mesófilos totales llegaron a incrementar desde 6,3 a tiempo 0 hasta 9,4 log UFC/g tras diez días de almacenamiento (Grande Burgos M.J. et al., 2017), valores que son muy superiores a los alcanzados en el presente estudio para las muestras de aliño envasadas en bolsas termoselladas. Esto podría indicar que las condiciones de envasado durante el almacenamiento son importantes para la conservación del producto. Otros estudios han descrito valores de carga microbiana iniciales comprendidos entre 3 y 5 log UFC/g para el perejil (Garbowska M. et al., 2015). Para el cilantro, se han descrito valores entre 6,7 (Wang H. et al., 2004) y 7 log UFC/g (Allende A. et al., 2009; Gao H. et al., 2017). En otro estudio sobre 132 muestras de cilantro, se encontró que aproximadamente el 90% de las muestras presentaban recuentos de aerobios totales entre 6,00 y 8,99 log UFC/g (Su Y. et al., 2021). Muchas de las muestras también presentaban concentraciones de coliformes totales en torno a 3 log UFC/g o superior, y en una de ellas se detectó *E. coli* (Su Y. et al., 2021). Cabe destacar que en el presente estudio los recuentos para bacterias entéricas

obtenidos a partir de las muestras de aliño hacen sospechar que podrían entrañar un riesgo para la salud.

Aunque existen numerosos estudios sobre la aplicación de diferentes tratamientos para la desinfección de alimentos de origen vegetal, incluyendo las altas presiones (APH), este último método rara vez se aplica en productos como aliños y condimentos, por lo que no existen muchos estudios a este respecto. En un trabajo realizado en nuestro grupo sobre perejil troceado, la aplicación de tratamientos por APH (600 MPa, 8 min, a 22 °C) redujo la carga microbiana inicial en 3,7 ciclos logarítmicos y retrasó el crecimiento de la fracción superviviente durante los 10 días que se mantuvo el producto tratado bajo refrigeración, si bien llegaron a alcanzarse recuentos próximos a 5 log UFC/g al día 10 (Grande Burgos M.J. et al., 2017). La presencia de una fracción residual de microorganismos que sobreviven a los tratamientos por altas presiones puede suponer un problema si llegan a proliferar y alcanzan concentraciones elevadas. Por ese motivo, en esta tesis se han ensayado tratamientos combinados con calor moderado y presión. A diferencia del guacamole, la fracción superviviente a los tratamientos por APH en aliño fue más baja y apenas se detectó proliferación durante el almacenamiento. Así mismo, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos combinados con calor con respecto a los aplicados a 22°C, en los primeros no se detectaron células viables al final del periodo de almacenamiento. Y, lo más importante, para ninguna de las muestras tratadas por APH se detectaron células viables en ninguno de los medios selectivos empleados para enterobacterias ni en los medios adicionados de antibióticos o biocidas. Esto indica que los tratamientos por altas presiones

son eficaces para combatir la transmisión de bacterias resistentes a antimicrobianos a través de los alimentos.

Los resultados obtenidos en el estudio de biodiversidad microbiana indican que los grupos mayoritarios encontrados en el aliño (*Proteobacteria*, seguido de *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*) son similares a los descritos en otros alimentos vegetales, como es el caso del guacamole (esta tesis) o del perejil (Grande Burgos M.J. et al., 2017). Sin embargo, dicha composición cambia cuando se desglosa a niveles taxonómicos inferiores –como familia o género. También se encuentran diferencias importantes en los cambios que se producen durante el almacenamiento de las muestras. Este es un aspecto muy importante para la industria alimentaria, ya que de acuerdo con dichos cambios es posible realizar predicciones sobre los riesgos que puede presentar el alimento cuando está próximo a su fecha de caducidad, por la posible presencia de bacterias alterantes, patógenas o productoras de toxinas. Así, a modo de ejemplo, mientras que en las muestras de perejil la dinámica de las poblaciones microbianas en las muestras control estuvo marcada por una disminución en la abundancia relativa de *Proteobacteria* y un incremento en la proporción de *Bacteroidetes*, tanto en el caso de guacamole como de aliño las etapas finales del periodo de almacenamiento estaban claramente caracterizadas por una disminución más acusada de *Proteobacteria* acompañada de un incremento considerable de *Firmicutes*. Es interesante señalar también que estos últimos estuvieron representados en ambos casos por bacterias ácido-lácticas (principalmente *Leuconostocaceae* y *Lactobacillaceae* en guacamole y *Lactobacillaceae* en aliño), lo que indica que la vida útil de ambos tipos de alimentos estaría limitada por el inicio de una fermentación láctica. Este tipo de cambio en la microbiota (si bien

tendría efectos indeseados en el producto) es el que se produce de forma natural en la fermentación de los vegetales, y ha sido descrito también en otros estudios sobre almacenamiento de alimentos vegetales como pulpa de chirimoya (Pérez Pulido R. et al., 2015). Sin embargo, en el caso del aliño, en los días previos al inicio de la fermentación láctica se detectó un incremento importante en la abundancia relativa de *Serratia*. Este grupo de bacterias es importante por su poder como patógeno y también como transmisor de resistencia a antimicrobianos.

Los resultados obtenidos sobre la biodiversidad de las muestras de aliño tratadas por altas presiones demuestran también que este tipo de tratamiento tiene un efecto muy importante sobre la microbiota, y es que estabiliza las poblaciones residuales haciendo que los cambios que se producen durante el almacenamiento sean mucho menores en comparación con las muestras control. Así, por ejemplo, todos los tratamientos por APH aplicados inhibieron el paso a una fermentación láctica al final del almacenamiento del producto (algo que también se observó en el estudio previo sobre pulpa de chirimoya de Pérez Pulido R. et al., 2015). También se observa en general una disminución de la abundancia relativa de *Proteobacteria* y un incremento de *Bacteroidetes*, especialmente en las muestras tratadas a 450 MPa, mientras que en los tratamientos a 600 MPa este cambio es menos acusado. Pero las diferencias más importantes se observan a nivel de los taxones inferiores (sobre todo de familia y género). Así, aquellos géneros que presentaban abundancias relativas más elevadas en las muestras control (como *Pseudomonas* o *Serratia*) pasan a ser minoritarios, mientras que otros géneros (como por ejemplo *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas* o *Ralstonia*) presentan abundancias relativas mayores. Estos resultados se

podrían interpretar teniendo en cuenta las diferencias en la sensibilidad a los tratamientos por altas presiones que presenta cada grupo microbiano, así como las diferencias en cuanto a su capacidad para reparar los daños subletales provocados por los tratamientos en las condiciones del alimento (pH, nutrientes, tiempo y temperatura) y la propia competencia entre las distintas poblaciones.

Desde el comienzo del uso de antimicrobianos, la carga de resistencia a los mismos entre las bacterias ha aumentado progresivamente y se ha acelerado en los últimos 10 años. Los genes de resistencia a los antibióticos estaban presentes en niveles muy bajos antes de la introducción de los antibióticos y es en gran medida la presión selectiva del uso de antibióticos, no solo en humanos sino también en animales de consumo y el medio ambiente, lo que ha causado el aumento (Hawkey P.M., 2008). Los alimentos listos para el consumo, que no necesitan procesamiento térmico antes de ser ingeridos, son un vehículo idóneo para la propagación de microorganismos resistentes a los antibióticos (Chajęcka-Wierzchowska W. et al., 2014). En cuanto al aislamiento e identificación a nivel de especie de la población bacteriana presente en nuestro alimento objeto de estudio cabe destacar como grupos mayoritarios a *Pseudomonas* y *Bacillus*, con un 38,75 y 26,25% de abundancia respectivamente. En otros estudios también se ha informado de la presencia, por un lado, de *Pseudomonas* en alimentos de origen vegetal, llegando a ser un contaminante importante de las verduras frescas (Allydice-Francis K. y Brown P.D., 2012) y, por otro lado, de *Bacillus* aislados de frutas y verduras frescas para la venta en tiendas minoristas en Dinamarca (Frederiksen K. et al., 2006).

Para evaluar la incidencia de la resistencia antimicrobiana en el aliño se han llevado a cabo una serie de ensayos de resistencia a biocidas y antibióticos y se realizó la determinación de la presencia de varios grupos de genes de resistencia. En cuanto a la resistencia a los antibióticos casi la totalidad de las cepas identificadas (90%) presentaron resistencia a la cefotaxima (CTX) lo cual, como se ha mencionado anteriormente es muy preocupante teniendo en cuenta la importancia clínica de dicho antibiótico (World Health Organization, 2019). Un estudio evaluó el alcance de la contaminación de vegetales frescos por *Pseudomonas aeruginosa* en Jamaica y examinó los perfiles de susceptibilidad a diferentes antibióticos obteniendo resultados tanto similares como diferentes a los de nuestro estudio. En el presente estudio ninguno de los aislados mostró resistencia al ciprofloxacino (CIP), gentamicina (CN) o tetraciclina (TE) y, en concordancia, Allydice-Francis K. y Brown P.D., en 2012 reportaron una sensibilidad del 97 y 93% de la población de *Pseudomonas* estudiada para los antibióticos CN y CIP. En el caso de TE el resultado defirió ya que encontraron un 71% de cepas resistentes. Además, el 84% de sus cepas fueron resistentes al cloranfenicol (C) frente al 23% obtenido en nuestro estudio. Cabe destacar uno de los aislados en el presente estudio, identificado como *Pseudomonas paralactis*, el cual mostró resistencia a 7 de los 12 antibióticos ensayados. *Pseudomonas* se caracteriza por su gran capacidad para colonizar diferentes nichos ecológicos, pero también por su resistencia antimicrobiana y patogenicidad, causando enfermedades en humanos, animales o plantas. En un estudio (Ruiz-Roldán L. et al., 2021) cuyo objetivo fue determinar la ocurrencia de *Pseudomonas* spp. entre vegetales crudos y el análisis de su resistencia antimicrobiana se reportaron

niveles bajos de resistencia a los antimicrobianos, aunque se encontró un aislado con perfil multirresistente.

El grado de sensibilidad a los biocidas ensayados fue muy variado en general, es decir, para un mismo biocida se observó una concentración mínima inhibitoria (MIC) diferente dependiendo de las cepas ensayadas. En el caso de los biocidas cloruro de benzalconio (CB), cetrimida (C) y clorhexidina digluconato (CD) presentaron en común una MIC que varió entre 2,5-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con predominio de la concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La MIC para el hexadecilpiridinio (HP) también varió entre 2,5-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aunque en este caso se observó un predominio de la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En un estudio en el que se evaluó la susceptibilidad a biocidas en *Pseudomonas* spp. aisladas de las superficies de los mataderos a lo largo de la cadena de producción de la carne (Lavilla Lerma L. et al., 2015), se informó que para los biocidas CB y C la MIC más elevada que se observó fue de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual difiere mucho de nuestros resultados, siendo el grado de sensibilidad a los biocidas mucho menor por parte de nuestra población bacteriana. De igual manera sucede con el biocida CD frente al cual nuestras cepas muestran una mayor resistencia o tolerancia. Para el hexaclorofeno (HC) se observó una MIC entre 2,5-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con predominio de la MIC más baja (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que para el triclosán (T), aunque también presentó una MIC mayoritaria de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se observó una amplia variación de las MICs con valores entre 2,5 y 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En este caso, estos resultados coinciden con los reportados por Lavilla Lerma L. et al., en 2015, donde informan que para el biocida T se obtuvieron MICs muy variadas, superiores a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e inferiores a 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (nuestra MIC menos concentrada), coincidiendo con nuestros resultados. Además, la MIC observada frente al HC se encontraba por debajo de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lo cual

también podría concordar con nuestros resultados en el caso de que hubiéramos ensayado unas concentraciones de biocida menores. Por último, con el biocida PHMG predominaron, casi con un 50% cada una, las MICs de 2,5 y 2.500 µg/mL, dependiendo de los diferentes grupos bacterianos principales. El grupo de *Pseudomonas* y *Lactobacillus* presentaron una MIC mayoritaria de 2.500 µg/mL mientras que en los *Bacillus* y *Paenibacillus* la MIC principal fue de 2,5 µg/mL. Atendiendo a los resultados obtenidos frente a este biocida por parte del grupo de *Pseudomonas* y, con el fin de realizar una comparación lo más cercana posible, encontramos grandes diferencias con los resultados reportados por Lavilla Lerma L. et al., en 2015, siendo las *Pseudomonas* aisladas en el presente estudio notablemente más resistentes.

En cuanto a la detección de los determinantes de resistencia en el presente estudio, los genes de resistencia codificantes para bombas de exporte fueron los que mayor presencia mostraron dentro de nuestra población bacteriana (84%), siendo a su vez el gen *mdeA* el determinante genético detectado con mayor frecuencia. En contraposición a los resultados obtenidos en el presente estudio, se informó en dos estudios que, por un lado (Fernández-Fuentes M. A. et al., 2014b) el gen *mdeA* solo se detectó en un aislado de *Enterococcus faecium*, pero no en el resto de bacterias grampositivas aisladas, entre las que se encontraban varias especies de *Bacillus* y, por otro lado, (Fernández-Fuentes M. A. et al., 2014a) dicho gen *mdeA* solo fue detectado en un aislado de *Enterobacter* sp., pero no en el resto de bacterias gramnegativas aisladas. Los genes de resistencia a betalactámicos fueron el segundo grupo de genes de resistencia con mayor porcentaje de detección (59%), destacando el predominio de la presencia del gen *bla_{SHV}*, al igual que en el caso del guacamole en el

presente estudio, y la ausencia del gen *bla_{ctxM}*. Los organismos portadores del gen *bla_{SHV}* también se han detectado en una gran variedad de muestras ambientales y de alimentos (Sanjit Singh A. et al., 2017). En un reciente estudio (Dougnon V. et al., 2021) donde se llevó a cabo la evaluación de la presencia de genes de resistencia detectados en el medio ambiente y productos alimenticios seleccionados en Benín, se informó que el gen *bla_{SHV}* se detectó en el 33,33% de los aislamientos totales y en el 100% de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado, a pesar de la alta resistencia a cefotaxima observada, no se detectó la presencia del gen *bla_{ctxM}* en ninguna de las cepas bacterianas, lo que sugiere que otros genes pueden estar involucrados en el mecanismo de resistencia. Respecto a los genes de resistencia a tetraciclinas fueron detectados en un 46% de la población bacteriana, siendo el gen *tet(M)* el que más veces se observó, mientras que los genes *tet(D)*, *tet(G)* y *tet(S)* no se detectaron en ninguna cepa. En contraposición a los resultados obtenidos en el presente estudio, Li L. et al., reportaron en 2016 una detección mínima del gen *tet(M)* en bacterias aeróbicas (siendo *Pseudomonas* sp. el grupo mayoritario) aisladas de una planta procesadora de carne. No se han encontrado estudios previos al presente donde se informe de la presencia del gen *tet(M)* en cepas aisladas de alimentos de origen vegetal, aunque si en muestras de estiércol porcino y productos vegetales (Xiong L. et al., 2019). Para el resto de grupos de genes de resistencia ensayados, aunque presentaron en general una baja frecuencia de detección, cabe destacar el gen *dfra12* dentro de los inhibidores de la dihidrofolato reductasa (también detectado en cepas aisladas de ensaladas preparadas listas para su consumo según informaron Campos J. et al., en 2013), y los genes *ereA* y *ereB* como representantes de resistencia frente a macrólidos. Llama poderosamente la atención dicha

baja frecuencia de detección de los genes *ereA* y *ereB* en las cepas bacterianas de la población a pesar de la alta resistencia a eritromicina observada, lo cual sugiere que otros genes pueden estar involucrados en el mecanismo de resistencia. En otros estudios también se han obtenido una baja frecuencia de detección de los genes de resistencia a macrólidos *ereA* y *ereB* (Fernández-Fuentes M. A. et al., 2014b).

Las frutas y verduras pueden actuar como vehículo para la transmisión de microorganismos patógenos o productores de toxinas. La contaminación puede ocurrir antes de la cosecha, durante la cosecha o durante la preparación final (Palumbo M. et al., 2013). Las bayas como los arándanos (tanto frescos como congelados) también se encuentran en esta categoría de riesgo (Oliveira M. et al., 2019). Si bien la mayoría de los brotes detectados se deben a la contaminación con virus y coccidios parásitos, también se han descrito brotes asociados a bacterias patógenas. En 2006, se detectaron cinco personas que habían enfermado por *E. coli* O26, siendo el vehículo sospechoso las fresas, arándanos o una mezcla de ambos (Luna R.E. y Mody R., 2010). En 2009 se detectó un brote por *Salmonella* Muenchen que afectó al menos a 14 personas, asociado al consumo de arándanos contaminados (CDC, 2013). Y en 2011, 15 personas enfermaron por *E. coli* O157:H7 en Oregon (USA). Las cepas aisladas de los pacientes afectados coincidían con las cepas ambientales obtenidas del lugar donde se habían cultivado las fresas implicadas en el brote (Laidler M.R. et al., 2013; Oregon Public Health, 2011; Terry L., 2012). En 1984 se describió un brote de listeriosis asociado al consumo de arándanos en Connecticut (Ryser E.T. y Marth E., 1999). Recientemente se ha descrito la retirada del mercado de un lote de arándanos congelados contaminados con *L. monocytogenes* (Fensterbush J., 2022).

Los resultados obtenidos en el presente estudio con cinco lotes de arándanos diferentes adquiridos de distintos supermercados mostraron que tres de ellos presentaban recuentos de aerobios mesófilos totales entre 2,7 y 4 log UFC/g, y que las dos muestras que mostraban recuentos más elevados también presentaban niveles considerables de coliformes y presuntas salmonelas de acuerdo con los recuentos obtenidos en medios selectivos. Estos resultados podrían considerarse alarmantes, teniendo en cuenta los riesgos de contaminación y de aparición de brotes infecciosos antes mencionados.

A fin de disminuir la carga microbiana y evitar el riesgo de propagación de patógenos se han ensayado diferentes métodos como el uso de bacteriófagos, la irradiación, o el lavado con soluciones que contienen diferentes tipos de desinfectantes o productos biocidas. Los métodos biológicos, como el empleo de bacteriófagos o de bacteriocinas, son mejor aceptados por los consumidores en comparación con los productos de síntesis química. La enterocina AS-48 es un péptido antimicrobiano que ya se han ensayado en estudios previos para la desinfección de frutas y verduras, obteniéndose buenos resultados en ensayos de desafío con cepas de laboratorio (Cobo Molinos A. et al., 2005, 2008a,b,c; Grande M.J. et al., 2005). Los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que el lavado con una solución de bacteriocina redujo de forma considerable los recuentos de aerobios mesófilos totales en las tres muestras que inicialmente mostraban valores elevados para este grupo y, lo más importante, redujeron los recuentos de bacterias entéricas por debajo del límite de detección en las dos muestras que habían arrojado resultados positivos en medios selectivos para este tipo de bacterias. Numerosos estudios previos han demostrado que AS-48 actúa sobre la

membrana citoplásmica y que las bacterias Gram-negativas presentan niveles de resistencia mucho más elevados debido a que la membrana externa que poseen actúa como barrera frente a la difusión de la bacteriocina hasta su diana principal. No obstante, se ha comprobado también que cualquier agente que altere la permeabilidad de la membrana externa incrementa la sensibilidad de las bacterias Gram-negativas a esta bacteriocina. Por tanto, los resultados obtenidos podrían explicarse teniendo en cuenta que los arándanos contienen diferentes tipos de compuestos fenólicos con marcada actividad antibacteriana. En concreto, se han descrito más de 15 tipos de antocianinas (que están presentes principalmente en la piel y son solubles en agua). El hecho de que además de su actividad bactericida frente a bacterias patógenas muestren también una capacidad destacada para inhibir la adherencia bacteriana y la formación de biopelículas, hace que en la actualidad sean consideradas como una fuente alternativa de antimicrobianos (Silva S. et al., 2016). Por tanto, cabría especular que la disminución observada en los recuentos se deba al efecto combinado de la bacteriocina y los compuestos antimicrobianos de los arándanos bien facilitando la inactivación bacteriana o disminuyendo su adherencia (facilitando así su eliminación por lavado) o ambos. Cabe destacar también que AS-48 es una molécula anfipática (esto es, presenta una región fuertemente cargada positivamente, así como regiones hidrófobas), por lo que también podría tener cierta acción como detergente. Otra posibilidad a tener en cuenta es un posible efecto subletal por la combinación de los antimicrobianos presentes en el fruto y AS-48, que impediría la recuperación de las células bacterianas dañadas en los medios selectivos (Wu V., 2008). Finalmente, un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio demostró que el lavado con bacteriocina

reducía significativamente o eliminaba a *L. monocytogenes* en una variedad de frutas como fresas, frambuesas y moras (Cobo Molinos A. et al., 2008c). La menor supervivencia de la bacteria en estos sustratos y el mayor efecto de la bacteriocina en comparación con otras frutas se atribuyeron al pH más ácido de las primeras.

Otro aspecto a destacar del presente estudio son las diferencias en cuanto a biodiversidad bacteriana de las muestras analizadas. Las muestras A2 y A3 se caracterizaron por un predominio de *Proteobacteria*, principalmente de la Fam. *Enterobacteriaceae*, mientras que en el resto de las muestras *Firmicutes* fue el grupo predominante o bien tuvo una abundancia relativa mucho mayor. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en medios selectivos para las muestras A2 y A3. Las diferencias encontradas entre muestras podrían deberse a varios factores: origen, prácticas de cultivo, procesado y tiempo de almacenamiento. Se ha descrito que las condiciones del entorno donde se realizan los cultivos, sobre todo la presencia de granjas de animales, influyen de forma considerable en la microbiota asociada a frutas y vegetales. Esta podría ser una explicación para la mayor abundancia de *Enterobacteriaceae* en dos de las muestras, si bien se desconoce el origen de las mismas. No obstante, entre los *Firmicutes* también se encontraron grupos bacterianos (como *Staphylococcus* o *Enterococcus*) cuyo origen podría estar ligado a las granjas, al agua contaminada, o a la propia manipulación (siendo en este caso de origen humano). En cuanto a *Enterococcus*, también se ha aislado a partir de suelo, existiendo especies típicamente epífitas, mientras que otras se pueden transmitir de unos ambientes a otros a través del aire o de vectores como los insectos. En cuanto al resto de grupos microbianos detectados, en la mayoría de los casos se trata de bacterias típicamente

asociadas con vegetales (como *Xanthomonadaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* o *Erwinia*). En su mayoría se trata de bacterias saprofitas que podrían jugar un papel importante en la alteración del fruto.

En las muestras sometidas a lavado con bacteriocina, los cambios más importantes se detectaron en aquellas en que inicialmente predominaba el grupo de *Firmicutes*. Ello podría deberse a que, de acuerdo con estudios previos, las bacterias Gram-positivas son mucho más sensibles a AS-48 en comparación con las Gram-negativas. Como ejemplo ilustrativo podríamos citar el descenso observado en la abundancia relativa de *Bacillaceae*, *Bacillus*, *Enterococcaceae* y *Enterococcus* en la muestra A1B con respecto a la muestra control A1, el descenso de *Enterococcaceae* y *Enterococcus* en la muestra A4B con respecto a la muestra A4, y el de *Micrococaceae*, *Micrococcus*, *Carnobacterium* y *Staphylococcus* en la muestra A5B con respecto a A5. Una excepción importante a estos ejemplos es el incremento tan destacado de *Enterococcaceae* en la muestra A5B con respecto a A5, cuando cabría esperar justo todo lo contrario. Ello podría deberse a la presencia de alguna cepa portadora de los genes de resistencia a la bacteriocina AS-48, y cuya presencia podría verse enriquecida con respecto al resto de grupos microbianos precisamente por el tratamiento con bacteriocina. Existen varios estudios que han demostrado la producción de bacteriocina AS-48 en enterococos de diferentes orígenes (Franz C.M.A.P. et al., 2007). Así mismo, existen otras bacteriocinas circulares (Perez R.H. et al., 2018), algunas de las cuales podrían tener una relación estructura-función equivalente a AS-48 y que podrían portar determinantes genéticos capaces de conferir inmunidad cruzada con AS-48.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Los tratamientos con alta presión hidrostática (APH) ensayados reducen todos ellos la carga microbiana de los alimentos estudiados, salsa de guacamole y aliño de cilantro y perejil, si bien son menos efectivos en el primero de los alimentos, dejando una población residual viable mayor.
2. Los tratamientos combinados de APH y calor producen una mayor reducción en la carga microbiana residual, especialmente en salsa de guacamole.
3. Los tratamientos por APH son altamente eficaces en la reducción de la carga de enterobacterias y de bacterias resistentes a antimicrobianos, con independencia de que se apliquen solos o combinados con calor.
4. Los estudios realizados sobre la sensibilidad a antimicrobianos en las colecciones de cepas bacterianas aisladas de guacamole y aliño indican patrones de resistencia a antibióticos variables, destacando algunas cepas multirresistentes a un elevado número de antibióticos.
5. Las cepas resistentes a antibióticos arrojan también resultados positivos en la amplificación para genes de resistencia, lo que indica que presuntamente son portadoras de dichos genes.

6. Dentro de cada especie, la mayoría de las cepas aisladas presentan una concentración mínima inhibitoria común para los biocidas ensayados, encontrándose porcentajes bajos de cepas que muestran valores superiores y que por tanto podrían ser consideradas como tolerantes al biocida en cuestión.
7. Durante el almacenamiento del guacamole y del aliño se producen cambios en la microbiota que implican principalmente una reducción de *Proteobacteria* como poblaciones predominantes en las etapas iniciales y un aumento de *Firmicutes* en las etapas finales, entre los que predominan las bacterias lácticas.
8. Los tratamientos por altas presiones frenan el cambio hacia una microbiota láctica en los alimentos ensayados en comparación con los controles, quedando poblaciones residuales que cambian muy poco durante la etapa de almacenamiento.
9. La composición de la microbiota residual detectada durante el almacenamiento depende en gran medida de la presión aplicada, y no de la temperatura de tratamiento.
10. Los arándanos presentan variaciones acusadas entre lotes en cuanto a su carga microbiana como a su biodiversidad bacteriana.
11. El tratamiento de los arándanos con la bacteriocina AS-48 reduce la carga microbiana total e induce cambios en la microbiota residual que dependen de la composición microbiana de partida del lote en particular.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. All the high hydrostatic pressure (HP) treatments applied reduce the microbial load of the two foods studied, guacamole sauce and dressing, even though they are less effective in guacamole sauce since they leave a higher residual population of viable cells.
2. The HP treatments applied in combination with heat yield lower residual populations of viable cells, specially in guacamole sauce.
3. HP treatments are highly effective at reducing the microbial load of enterobacteria and also of antimicrobial resistant bacteria, regardless of whether they are applied singly or in combination with heat.
4. The study of antimicrobial resistance in the bacterial collections isolated from guacamole sauce and dressing indicate variable patterns of antimicrobial resistances, with outstanding isolates being mutiresistant to a high number of antibiotics.
5. Antimicrobial resistance strains also show positive results on PCR amplification of antimicrobial resistance genes, suggesting that they carry genetic determinants of resistance.
6. Most of the isolates belonging to the same species show a common minimum inhibitory concentration for each particular biocide, although there are also lower percentages of isolates requiring higher biocide concentrations for inhibition, which suggests that they may be biocide-tolerant.

7. The main changes in the microbiota of guacamole sauce and dressing during storage involve a reduction of the relative abundances of the predominant starting populations, the Proteobacteria, and an increase towards the end of storage of Firmicutes with lactic acid bacteria as predominant group.
8. HP treatments slow down the transition towards a lactic microbiota observed in controls, leaving residual populations that undergo only limited changes in their relative abundances during the storage period.
9. The composition of the residual microbial populations detected during storage depend to a great extent on the intensity of the HP treatment applied rather than on the temperature of treatment.
10. Blueberries show large batch-to-batch variations in microbial load and in bacterial diversity.
11. Treatment of blueberries with bacteriocin AS-48 reduces the microbial load and induces changes in the remaining microbiota that depend on the initial microbial composition of the batch being treated.

REFERENCIAS

8.REFERENCIAS

- Abriouel, H., Benomar, N., Gálvez, A., & Pérez Pulido, R. (2014). Preservation of Manzanilla Aloreña cracked green table olives by high hydrostatic pressure treatments singly or in combination with natural antimicrobials. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.012>
- Abriouel, H., Omar, N. B., Molinos, A. C., López, R. L., Grande, M. J., Martínez-Viedma, P., Ortega, E., Cañamero, M. M., & Gálvez, A. (2008). Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.067>
- Aganovic, K., Hertel, C., Vogel, R. F., Johne, R., Schlüter, O., Schwarzenbolz, U., Jäger, H., Holzhauser, T., Bergmair, J., Roth, A., Sevenich, R., Bandick, N., Kulling, S. E., Knorr, D., Engel, K., & Heinz, V. (2021). Aspects of high hydrostatic pressure food processing: Perspectives on technology and food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3225–3266. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12763>
- Aguado, V. (2004). Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 341–347. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00313-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00313-1)
- Alissa, E. M., & Ferns, G. A. (2015). Dietary fruits and vegetables and cardiovascular diseases risk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1040487>

- Al-Kharousi, Z. S., Guizani, N., Al-Sadi, A. M., Al-Bulushi, I. M., & Shaharoon, B. (2016). Hiding in fresh fruits and vegetables: Opportunistic pathogens may cross geographical barriers. *International Journal of Microbiology*, 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/4292417>
- Allende, A., McEvoy, J., Tao, Y., & Luo, Y. (2009). Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on *Escherichia coli* O157:H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro. *Food Control*, 20(3), 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.05.009>
- Allydice-Francis, K., & Brown, P. D. (2012). Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. *International Journal of Microbiology*, 2012, 426241. <https://doi.org/10.1155/2012/426241>
- Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Amachawadi, R. G., Shelton, N. W., Shi, X., Vinasco, J., Dritz, S. S., Tokach, M. D., Nelssen, J. L., Scott, H. M., & Nagaraja, T. G. (2011). Selection of fecal enterococci exhibiting tcrB -mediated copper resistance in pigs fed diets supplemented with copper. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16), 5597–5603. <https://doi.org/10.1128/aem.00364-11>

- Ananou, S., Garriga, M., Jofré, A., Aymerich, T., Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (2010). Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages. *Meat Science*, 84(4), 594–600. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.017>
- And, H. C., & Hoover, D. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), 82–100. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x>
- Araújo, R. G., Rodríguez-Jasso, R. M., Ruiz, H. A., Pintado, M. M. E., & Aguilar, C. N. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 80, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.027>
- Arioli, S., Elli, M., Ricci, G., & Mora, D. (2013). Assessment of the susceptibility of lactic acid bacteria to biocides. *International Journal of Food Microbiology*, 163(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.002>
- Arumugham, V. B., Gujarathi, R., & Cascella, M. (2022). Third Generation Cephalosporins. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic resistance: One health one world outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>

- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F., & Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, Volume 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/idr.s173867>
- Ayvaz, H., Balasubramaniam, V. M., & Koutchma, T. (2016). High pressure effects on packaging materials. *High Pressure Processing of Food*, 73–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3234-4_5
- Badau, E. (2021). A One Health perspective on the issue of the antibiotic resistance. *Parasite*, 28, 16. <https://doi.org/10.1051/parasite/2021006>
- Balasubramaniam, V. B., Martínez-Monteagudo, S. I., & Gupta, R. (2015). Principles and application of high pressure–based technologies in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 435–462. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015539>
- Barbosa-Cánovas, G. V., & Juliano, P. (2008). Food sterilization by combining high pressure and thermal energy. *Food Engineering: Integrated Approaches*, 9–46. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75430-7_2
- Beach, C., (2021). Cilantro identified as possible source behind mystery *Salmonella oranienburg* outbreak. *Food Safety News* Sept. 26, 2021. <https://www.foodsafetynews.com/2021/09/cilantro-identified-as-possible-source-behind-mystery-salmonella-oranienburg-outbreak/>
- ben Said, L., Klibi, N., Dziri, R., Borgo, F., Boudabous, A., ben Slama, K., & Torres, C. (2015). Prevalence, antimicrobial resistance and genetic lineages of *Enterococcus* spp. from vegetable food, soil and irrigation water in farm environments in Tunisia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(5), 1627–1633. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7264>

- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385–2397. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>
- Bertrand, S., Weill, F. X., Cloeckert, A., Vrints, M., Mairiaux, E., Praud, K., Dierick, K., Wildemaue, C., Godard, C., Butaye, P., Imberechts, H., Grimont, P. A. D., & Collard, J. M. (2006). Clonal emergence of extended-spectrum β -Lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2897–2903. <https://doi.org/10.1128/jcm.02549-05>
- Beuchat, L. R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 4(4), 413–423. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01555-1](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01555-1)
- Bhardwaj, R. L., & Pandey, S. (2011). Juice Blends—A way of utilization of under-utilized fruits, vegetables, and spices: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 563–570. <https://doi.org/10.1080/10408391003710654>
- Bhutani, N., Muraleedharan, C., Talreja, D., Rana, S. W., Walia, S., Kumar, A., & Walia, S. K. (2015). Occurrence of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase-producing bacteria on iceberg lettuce retailed for human consumption. *BioMed Research International*, 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/547547>

- Blaak, H., van Hoek, A. H., Veenman, C., Docters Van Leeuwen, A. E., Lynch, G., van Overbeek, W. M., & de Roda Husman, A. M. (2014). Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *International Journal of Food Microbiology*, 168-169, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.006>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Blekkenhorst, L., Sim, M., Bondonno, C., Bondonno, N., Ward, N., Prince, R., Devine, A., Lewis, J., & Hodgson, J. (2018). Cardiovascular health benefits of specific vegetable types: A Narrative Review. *Nutrients*, 10(5), 595. <https://doi.org/10.3390/nu10050595>
- Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., Leschik-Bonnet, E., Müller, M. J., Oberritter, H., Schulze, M., Stehle, P., & Watzl, B. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition*, 51(6), 637–663. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0380-y>
- Bokulich, N. A., & Mills, D. A. (2012). Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. *BMB Reports*, 45(7), 377–389. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2012.45.7.148>
- Bonardi, S., & Pitino, R. (2019). Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health. *Italian Journal of Food Safety*, 8(2). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2019.7956>

- Bottari, B., Levante, A., Bancalari, E., Sforza, S., Bottesini, C., Prandi, B., de Filippis, F., Ercolini, D., Nocetti, M., & Gatti, M. (2020). The Interrelationship between microbiota and peptides during ripening as a driver for parmigiano reggiano cheese quality. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581658>
- Braoudaki, M., & Hilton, A. C. (2004). Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* K-12 and *E. coli* O55 compared to *E. coli* O157. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 305–309. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09603.x>
- Burgos, M. J. G., Aguayo, M. C. L., Pulido, R. P., Gálvez, A., & López, R. L. (2013). Multilocus sequence typing and antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolates from fresh produce. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(2), 413–421. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0073-4>
- Burnett, S. L., & Beuchat, L. R. (2000). Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(6), 281–287. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000106>
- Burnett, S. L., & Beuchat, L. R. (2001). Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 104–110. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000199>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C., & Antunes, P. (2013). Microbiological quality of ready-to-eat salads: an underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.005>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Cardello, A. V., Schutz, H. G., & Leshner, L. L. (2007). Consumer perceptions of foods processed by innovative and emerging technologies: A conjoint analytic study. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.07.002>
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2013). Foodborne Outbreak Online Database [CDC FOOD]. <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/Default.aspx>.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention (1999). Outbreaks of *Shigella sonnei* infection associated with eating fresh parsley--United States and Canada, July-August 1998. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 48(14), 285–289.
- Chaikham, P., & Prangthip, P. (2015). Alteration of antioxidative properties of longan flower-honey after high pressure, ultra-sonic and thermal processing. *Food Bioscience*, 10, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.01.002>

- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Nalepa, B., Sierpińska, M., & Laniewska-Trokenheim, L. (2014). Retail ready-to-eat food as a potential vehicle for *Staphylococcus* spp. harboring antibiotic resistance genes. *Journal of food protection*, 77(6), 993–998. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-466>
- Chan, Y. C., & Blaschek, H. P. (2005). Comparative analysis of *Shigella boydii* 18 foodborne outbreak isolate and related enteric bacteria: role of rpoS and adiA in acid stress response. *Journal of Food Protection*, 68(3), 521–527. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.3.521>
- Chiu, C. H., Chen, H. L., Kao, L. S., Yang, C. Y., Chu, C., Doublet, B., Praud, K., & Cloeckert, A. (2006). Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene clusters in *Salmonella enterica* serovar Derby isolates from humans in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 325–326. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl475>
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00560-8)
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th informational supplement. CLSI Document M100-S25, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2008c). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. *Journal of Food Protection*, 71(12), 2460–2467. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.12.2460>

- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., ben Omar, N., Valdivia, E., Lucas López, R., Maqueda, M., Cañamero, M. M., & Gálvez, A. (2005). Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 7781–7787. <https://doi.org/10.1128/aem.71.12.7781-7787.2005>
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., López, R. L., Valdivia, E., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2008a). Combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 for inactivation of Gram-negative bacteria in soybean sprouts. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2912–2921. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.05.035>
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., Benomar, N., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2008b). Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing solutions containing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. *Food Microbiology*, 25(6), 762–770. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.05.001>
- Cocolin, L., & Ercolini, D. (2015). Zooming into food-associated microbial consortia: a ‘cultural’ evolution. *Current Opinion in Food Science*, 2, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.01.003>
- Collese, T. S., Nascimento-Ferreira, M. V., de Moraes, A. C. F., Rendo-Urteaga, T., Bel-Serrat, S., Moreno, L. A., & Carvalho, H. B. (2017). Role of fruits and vegetables in adolescent cardiovascular health: a systematic review. *Nutrition Reviews*, 75(5), 339–349. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux002>

- Considine, K. M., Kelly, A. L., Fitzgerald, G. F., Hill, C., & Sleator, R. D. (2008). High-pressure processing and effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters*, 281(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01084.x>
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Campaniello, D., D'Amato, D., Speranza, B., & Sinigaglia, M. (2009). Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches - a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(2), 223–241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01883.x>
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Critzer, F. J., & Doyle, M. P. (2010). Microbial ecology of foodborne pathogens associated with produce. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.006>
- da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & Oliveira, R. P. D. S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.041>
- Davin-regli, A., & Pages, J. (2012). Cross-resistance between biocides and antimicrobials: an emerging question. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 31(1), 89–104. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2099>

- de Angelis, M., Ferrocino, I., Calabrese, F. M., de Filippis, F., Cavallo, N., Siragusa, S., Rampelli, S., di Cagno, R., Rantsiou, K., Vannini, L., Pellegrini, N., Lazzi, C., Turrioni, S., Lorusso, N., Ventura, M., Chieppa, M., Neviani, E., Brigidi, P., O'Toole, P. W., . . . Cocolin, L. (2020). Diet influences the functions of the human intestinal microbiome. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61192-y>
- de Filippis, F., Valentino, V., Alvarez-Ordóñez, A., Cotter, P. D., & Ercolini, D. (2021). Environmental microbiome mapping as a strategy to improve quality and safety in the food industry. *Current Opinion in Food Science*, 38, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.11.012>
- de Toro, M., Sáenz, Y., Cercenado, E., Rojo-Bezares, B., García-Campello, M., Undabeitia, E., & Torres, C. (2011). Genetic characterization of the mechanisms of resistance to amoxicillin/clavulanate and third-generation cephalosporins in *Salmonella enterica* from three Spanish hospitals. *International Microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 14(3), 173–181. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.146>
- Dees, M. W., Lysøe, E., Nordskog, B., & Brurberg, M. B. (2015). Bacterial communities associated with surfaces of leafy greens: Shift in composition and decrease in richness over time. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), 1530–1539. <https://doi.org/10.1128/aem.03470-14>
- Dougnon, V., Houssou, V., Anago, E., Nanoukon, C., Mohammed, J., Agbankpe, J., Koudokpon, H., Bouraima, B., Deguenon, E., Fabiyi, K., Hidjo, M., Djegui, F., Baba-Moussa, L., & Aïna, M. P. (2021). Assessment of the presence of resistance genes detected from the environment and selected food products in benin. *Journal of Environmental and Public Health*, 2021, 8420590. <https://doi.org/10.1155/2021/8420590>

- Doyle, M. E. (2015). Multidrug-resistant pathogens in the food supply. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(4), 261–279. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1865>
- Duarte, P. F., Chaves, M. A., Borges, C. D., & Mendonça, C. R. B. (2016). Avocado: characteristics, health benefits and uses. *Ciencia Rural*, 46(4), 747–754. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141516>
- Ercolini, D. (2013). High-throughput sequencing and metagenomics: Moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(10), 3148–3155. <https://doi.org/10.1128/aem.00256-13>
- Evelyn, & Silva, F. V. (2019). Heat assisted HPP for the inactivation of bacteria, moulds and yeasts spores in foods: Log reductions and mathematical models. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.016>
- Falguera, V., Aliguer, N., & Falguera, M. (2012). An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products? *Food Control*, 26(2), 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.051>
- FDA, (2009). Guidance for industry: Guide to minimize microbial food safety hazards of leafy greens. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). U.S. Food and Drug Administration.
- FDA, (2022). Microbiological Surveillance Sampling: FY18-21 Fresh Herbs (Cilantro, Basil & Parsley) Assignment. <https://www.fda.gov/food/sampling-protect-food-supply/microbiological-surveillance-sampling-fy18-21-fresh-herbs-cilantro-basil-parsley-assignment>

- Fensterbush, J. (2022). Blueberries recalled over *Listeria* risk. Food Poison Journal. <https://www.foodpoisonjournal.com/food-recall/blueberries-recalled-over-listeria-risk/>
- Fernández-Fuentes, M. A., Abriouel, H., Ortega Morente, E., Pérez Pulido, R., & Gálvez, A. (2014b). Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods. International Journal of Food Microbiology, 172, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.032>
- Fernández-Fuentes, M. A., Ortega Morente, E., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., & Gálvez, A. (2014a). Antimicrobial resistance determinants in antibiotic and biocide-resistant gram-negative bacteria from organic foods. Food Control, 37, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.041>
- Fernández-Fuentes, M. A., Ortega Morente, E., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., & Gálvez, A. (2012). Isolation and identification of bacteria from organic foods: Sensitivity to biocides and antibiotics. Food Control, 26(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.017>
- Francis, G. A., Thomas, C., & O'beirne, D. (1999). The microbiological safety of minimally processed vegetables. International Journal of Food Science & Technology, 34(1), 1–22. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1999.00253.x>
- Franz, C. M. A. P., van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., & Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiology Reviews, 31(3), 293–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x>

- Frederiksen, K., Rosenquist, H., Jørgensen, K., & Wilcks, A. (2006). Occurrence of natural *Bacillus thuringiensis* contaminants and residues of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides on fresh fruits and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3435–3440. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3435-3440.2006>
- Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., & Franz, C. M. A. P. (2015). The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>
- Gänzle, M., & Liu, Y. (2015). Mechanisms of pressure-mediated cell death and injury in *Escherichia coli*: from fundamentals to food applications. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00599>
- Gao, H., Fang, X., Li, Y., Chen, H., Zhao, Q. F., & Jin, T. Z. (2017). Effect of alternatives to chlorine washing for sanitizing fresh coriander. *Journal of Food Science and Technology*, 54(1), 260–266. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2458-7>
- Garbowska, M., Berthold-Pluta, A., & Stasiak-Róžańska, L. (2015). Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food microbiology*, 49, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.004>
- Georget, E., Sevenich, R., Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V., Callanan, M., Rauh, C., & Knorr, D. (2015). Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure processing in complex matrices: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.10.015>

- Gleeson, E., & O'Beirne, D. (2005). Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control*, 16(8), 677–685. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.06.004>
- Goldfeder, R. L., Wall, D. P., Khoury, M. J., Ioannidis, J. P. A., & Ashley, E. A. (2017). Human genome sequencing at the population scale: A primer on high-throughput DNA sequencing and analysis. *American Journal of Epidemiology*, 186(8), 1000–1009. <https://doi.org/10.1093/aje/kww224>
- Gómez, P., Artés Hernández, F. D. A., Aguayo Giménez, E. P., Escalona Contreras, V. H., & Artés Calero, F. (2007). Problemática de los alimentos vegetales mínimamente procesados en fresco. *PHYTOMA*, 189, 124-130. <https://repositorio.upct.es/bitstream/handle/10317/297/2007-2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gómez-Sanz, E., Kadlec, K., Feßler, A. T., Zarazaga, M., Torres, C., & Schwarz, S. (2013). Novel erm (T)-carrying multiresistance plasmids from porcine and human isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 that also harbor cadmium and copper resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3275–3282. <https://doi.org/10.1128/aac.00171-13>
- González, E. G., & Carroza, E. G. (2019). Enfermedades de transmisión alimentaria. Parte I. *Badajoz Veterinaria*, 16, 26-33.
- González-Cebrino, F., Durán, R., Delgado-Adámez, J., Contador, R., & Bernabé, R. R. (2015). Impact of high pressure processing on color, bioactive compounds, polyphenol oxidase activity, and microbiological attributes of pumpkin purée. *Food Science and Technology International*, 22(3), 235–245. <https://doi.org/10.1177/1082013215592732>

- Grande Burgos, M. J., López Aguayo, M., Pérez Pulido, R., Galvez, A., & Lucas, R. (2017). Analysis of the microbiota of refrigerated chopped parsley after treatments with a coating containing enterocin AS-48 or by high-hydrostatic pressure. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 99(Pt 1), 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.011>
- Grande Burgos, M., Pulido, R., del Carmen López Aguayo, M., Gálvez, A., & Lucas, R. (2014). The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: Isolation, mode of action, and possible food applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22706–22727. <https://doi.org/10.3390/ijms151222706>
- Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Omar, N. B., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2005). Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 104(3), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.010>
- Gupta, C., & Prakash, D. (2014). Phytonutrients as therapeutic agents. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11(3). <https://doi.org/10.1515/jcim-2013-0021>
- Hadjilouka, A., & Tsaltas, D. (2020). *Cyclospora cayetanensis*—major outbreaks from ready to eat fresh fruits and vegetables. *Foods*, 9(11), 1703. <https://doi.org/10.3390/foods9111703>
- Harbarth, S., Balkhy, H. H., Goossens, H., Jarlier, V., Kluytmans, J., Laxminarayan, R., Saam, M., van Belkum, A., & Pittet, D. (2015). Antimicrobial resistance: one world, one fight!. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0091-2>

- Haryani, Y., Robin, T., Chai, L. C., Lee, H., Tang, S. Y., & Son, R. (2008). Characterization of *Enterobacter cloacae* isolated from street foods. *International Food Research Journal*, 15, 57-64.
- Hawkey, P. M. (2008). The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(Supplement 1), i1-i9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn241>
- Heaton, J., & Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 104(3), 613–626. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03587.x>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*, 4(9), 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Hoelzer, K., Pouillot, R., Egan, K., & Dennis, S. (2012). Produce consumption in the United States: An analysis of consumption frequencies, serving sizes, processing forms, and high-consuming population subgroups for microbial risk assessments. *Journal of Food Protection*, 75(2), 328–340. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-11-313>
- Hoelzer, K., Wong, N., Thomas, J., Talkington, K., Jungman, E., & Coukell, A. (2017). Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? *BMC Veterinary Research*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1131-3>

- Holah, J., Taylor, J., Dawson, D., & Hall, K. (2002). Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 111S-120S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.18.x>
- Howes, M. J. R., & Simmonds, M. S. (2014). The role of phytochemicals as micronutrients in health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 17(6), 558–566. <https://doi.org/10.1097/mco.000000000000115>
- Hsu, W. Y., Simonne, A., & Jitareerat, P. (2006). Fates of seeded *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on selected fresh culinary herbs during refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1997–2001. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.8.1997>
- Hu, H. W., Han, X. M., Shi, X. Z., Wang, J. T., Han, L. L., Chen, D., & He, J. Z. (2015). Temporal changes of antibiotic-resistance genes and bacterial communities in two contrasting soils treated with cattle manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(2), fiv169. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv169>
- Huang, H. W., Hsu, C. P., & Wang, C. Y. (2020). Healthy expectations of high hydrostatic pressure treatment in food processing industry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.10.002>
- Huang, H. W., Lung, H. M., Yang, B. B., & Wang, C. Y. (2014). Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*, 40, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.007>
- Huang, H. W., Wu, S. J., Lu, J. K., Shyu, Y. T., & Wang, C. Y. (2017). Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control*, 72, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.019>

- Iseppi, R., de Niederhäusern, S., Bondi, M., Messi, P., & Sabia, C. (2018). Extended-spectrum β -Lactamase, AmpC, and MBL-producing Gram-Negative bacteria on fresh vegetables and ready-to-eat salads sold in local markets. *Microbial Drug Resistance*, 24(8), 1156–1164. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0198>
- Jackson, C. R., Randolph, K. C., Osborn, S. L., & Tyler, H. L. (2013). Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. *BMC Microbiology*, 13(1), 274. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-274>
- Jacobo-Velázquez, D. A., & Hernández-Brenes, C. (2011). Sensory shelf-life limiting factor of high hydrostatic pressure processed avocado paste. *Journal of Food Science*, 76(6), S388-S395. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02259.x>
- Jacobo-Velázquez, D., & Hernández-Brenes, C. (2010). Biochemical changes during the storage of high hydrostatic pressure processed avocado paste. *Journal of Food Science*, 75(6), S264-S270. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01654.x>
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2016). Alternatives to conventional thermal treatments in fruit-juice processing. Part 2: Effect on composition, phytochemical content, and physicochemical, rheological, and organoleptic properties of fruit juices. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 637–652. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.914019>
- Jung, Y., Jang, H., & Matthews, K. R. (2014). Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial Biotechnology*, 7(6), 517–527. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12178>

- Kakoullis, L., Papachristodoulou, E., Chra, P., & Panos, G. (2021). Mechanisms of antibiotic resistance in important Gram-Positive and Gram-Negative pathogens and novel antibiotic solutions. *Antibiotics*, 10(4), 415. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040415>
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C. P., & Ray, B. (1998). Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*, 61(4), 425–431. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.4.425>
- Karatzas, K. A. G., Webber, M. A., Jorgensen, F., Woodward, M. J., Piddock, L. J. V., & Humphrey, T. J. (2007). Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5), 947–955. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm314>
- Karkman, A., Johnson, T. A., Lyra, C., Stedtfeld, R. D., Tamminen, M., Tiedje, J. M., & Virta, M. (2016). High-throughput quantification of antibiotic resistance genes from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(3), fiw014. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw014>
- Kchouk, M., Gibrat, J. F., & Elloumi, M. (2017). Generations of sequencing technologies: From first to next generation. *Biology and Medicine*, 09(03). <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000395>
- Keenan, D. F., Rößle, C., Gormley, R., Butler, F., & Brunton, N. P. (2012). Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.006>

- Kendall, M. E., Mody, R. K., Mahon, B. E., Doyle, M. P., Herman, K. M., & Tauxe, R. V. (2013). Emergence of salsa and guacamole as frequent vehicles of foodborne disease outbreaks in the United States, 1973–2008. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(4), 316–322. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1328>
- Khalil, R. K., & Frank, J. F. (2010). Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 on damaged leaves of spinach, lettuce, cilantro, and parsley stored at abusive temperatures. *Journal of Food Protection*, 73(2), 212–220. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.2.212>
- Kim, M., Weigand, M. R., Oh, S., Hatt, J. K., Krishnan, R., Tezel, U., Pavlostathis, S. G., & Konstantinidis, K. T. (2018). Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(17). <https://doi.org/10.1128/aem.01201-18>
- Klaenhammer, T. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1–3), 39–85. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90057-g](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90057-g)
- Klein, E. Y., van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H., & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15). <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

- Krebbbers, B., Matser, A. M., Hoogerwerf, S. W., Moezelaar, R., Tomassen, M. M., & van den Berg, R. W. (2003). Combined high-pressure and thermal treatments for processing of tomato puree: evaluation of microbial inactivation and quality parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(4), 377–385. [https://doi.org/10.1016/s1466-8564\(03\)00045-6](https://doi.org/10.1016/s1466-8564(03)00045-6)
- Kumar, K. R., Cowley, M. J., & Davis, R. L. (2019). Next-generation sequencing and emerging technologies. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 45(07), 661–673. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1688446>
- Laidler, M. R., Tourdjman, M., Buser, G. L., Hostetler, T., Repp, K. K., Leman, R., Samadpour, M., & Keene, W. E. (2013). *Escherichia coli* O157:H7 Infections associated with consumption of locally grown strawberries contaminated by deer. *Clinical Infectious Diseases*, 57(8), 1129–1134. <https://doi.org/10.1093/cid/cit468>
- Laiola, M., de Filippis, F., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2020). A mediterranean diet intervention reduces the levels of salivary periodontopathogenic bacteria in overweight and obese subjects. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(12). <https://doi.org/10.1128/aem.00777-20>
- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. *Public Health Reports*, 127(1), 4–22. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Casado Muñoz, M., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2015). Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Food microbiology*, 51, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.010>

- Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(1), 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>
- Leff, J. W., & Fierer, N. (2013). Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables. *PLoS ONE*, 8(3), e59310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059310>
- Li, L., Ye, L., Zhang, S., & Meng, H. (2016). Isolation and identification of aerobic bacteria carrying tetracycline and sulfonamide resistance genes obtained from a meat processing plant. *Journal of food science*, 81(6), M1480–M1484. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13318>
- LI, X., & WANG, H. H. (2010). Tetracycline resistance associated with commensal bacteria from representative ready-to-consume deli and restaurant foods. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1841–1848. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.10.1841>
- Liu, B. T., Zhang, X. Y., Wan, S. W., Hao, J. J., Jiang, R. D., & Song, F. J. (2018). Characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in ready-to-eat vegetables in China. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01147>
- Liu, R. H. (2013). Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in Nutrition*, 4(3), 384S-392S. <https://doi.org/10.3945/an.112.003517>
- Lopes, M. L. M., Valente Mesquita, V. L., Chiaradia, A. C. N., Fernandes, A. A. R., & Fernandes, P. M. B. (2010). High hydrostatic pressure processing of tropical fruits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1189(1), 6–15. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05177.x>

- López Aguayo, M. D. C., Grande Burgos, M. J., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas López, R. (2016). Effect of different activated coatings containing enterocin AS-48 against *Listeria monocytogenes* on apple cubes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.006>
- López-Malo, A., Palou, E., Barbosa-Cánovas, G., Welte-Chanes, J., & Swanson, B. (1998). Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree. *Food Research International*, 31(8), 549–556. [https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(99\)00028-9](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(99)00028-9)
- Lucas, R., Grande, M. J., Abriouel, H., Maqueda, M., ben Omar, N., Valdivia, E., Martínez-Cañamero, M., & Gálvez, A. (2006). Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food and Chemical Toxicology*, 44(10), 1774–1781. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.05.019>
- Luna, R. E., & Mody, R. (2010). Non-O157 shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) outbreaks, United States. Available at: https://blogs.cdc.gov/publichealthmatters/files/2010/05/nono157stec_obs_052110.pdf (Accessed September 20, 2019).
- Ma, L., Xia, Y., Li, B., Yang, Y., Li, L. G., Tiedje, J. M., & Zhang, T. (2015). Metagenomic assembly reveals hosts of antibiotic resistance genes and the shared resistome in pig, chicken, and human feces. *Environmental Science & Technology*, 50(1), 420–427. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03522>

- Mandelová, L., & Totušek, J. (2007). Broccoli juice treated by high pressure: chemoprotective effects of sulforaphane and indole-3-carbinol. *High Pressure Research*, 27(1), 151–156. <https://doi.org/10.1080/08957950601082540>
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9(1), 387–402. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164359>
- Markovska, R. D., Stoeva, T. J., Bojkova, K. D., & Mitov, I. G. (2014). Epidemiology and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* spp., *Pantoea agglomerans*, and *Serratia marcescens* isolates from a Bulgarian hospital. *Microbial Drug Resistance*, 20(2), 131–137. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0102>
- Martinez-Monteaquedo, S. I., & Saldaña, M. D. A. (2014). Chemical reactions in food systems at high hydrostatic pressure. *Food Engineering Reviews*, 6(4), 105–127. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9087-6>
- Mayo, B., Rachid, C., Alegria, A., Leite, A., Peixoto, R., & Delgado, S. (2014). Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Current Genomics*, 15(4), 293–309. <https://doi.org/10.2174/1389202915666140616233211>
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial resistance: a One Health perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>
- Middleton, J. H., & Salierno, J. D. (2013). Antibiotic resistance in triclosan tolerant fecal coliforms isolated from surface waters near wastewater treatment plant outflows (Morris County, NJ, USA). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.025>

- Milanović, V., Aquilanti, L., Tavoletti, S., Garofalo, C., Osimani, A., de Filippis, F., Ercolini, D., Ferrocino, I., Cagno, R. D., Turrioni, S., Lazzi, C., Pellegrini, N., & Clementi, F. (2020). Distribution of antibiotic resistance genes in the saliva of healthy omnivores, ovo-lacto-vegetarians, and vegans. *Genes*, 11(9), 1088. <https://doi.org/10.3390/genes11091088>
- Miller, K., Feucht, W., & Schmid, M. (2019). Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: a brief overview. *Nutrients*, 11(7), 1510. <https://doi.org/10.3390/nu11071510>
- Mills, S., Serrano, L., Griffin, C., O'Connor, P. M., Schaad, G., Bruining, C., Hill, C., Ross, R., & Meijer, W. C. (2011). Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. *Microbial Cell Factories*, 10(S1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-s1-s7>
- Moerman, F., Mertens, B., Demey, L., & Huyghebaert, A. (2001). Reduction of *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* and *Streptococcus faecalis* in meat batters by temperature-high hydrostatic pressure pasteurization. *Meat Science*, 59(2), 115–125. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(00\)00145-5](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(00)00145-5)
- Monier, J. M., Demanèche, S., Delmont, T. O., Mathieu, A., Vogel, T. M., & Simonet, P. (2011). Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.010>
- Moodley, A., & Guardabassi, L. (2009). Transmission of IncN Plasmids Carrying bla CTX-M-1 between Commensal *Escherichia coli* in Pigs and Farm Workers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1709–1711. <https://doi.org/10.1128/aac.01014-08>

- Morrison, B. J., & Rubin, J. E. (2015). Carbapenemase producing bacteria in the food supply escaping detection. *PLoS ONE*, 10(5), e0126717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126717>
- Morrissey, I., Oggioni, M. R., Knight, D., Curiao, T., Coque, T., Kalkanci, A., & Martinez, J. L. (2014). Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS ONE*, 9(1), e86669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086669>
- Muntean, M. V., Marian, O., Barbieru, V., Cătușescu, G. M., Ranta, O., Drocas, I., & Terhes, S. (2016). High pressure processing in food industry – characteristics and applications. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 10, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.09.077>
- Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal*, 17(7), 760–769. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.006>
- Murano, E. A., Murano, P. S., Brennan, R. E., Shenoy, K., & Moreira, R. G. (1999). Application of high hydrostatic pressure to eliminate *Listeria monocytogenes* from fresh pork sausage. *Journal of Food Protection*, 62(5), 480–483. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.5.480>

- Naimi, T. S., Wicklund, J. H., Olsen, S. J., Krause, G., Wells, J. G., Bartkus, J. M., Boxrud, D. J., Sullivan, M., Kassenborg, H., Besser, J. M., Mintz, E. D., Osterholm, M. T., & Hedberg, C. W. (2003). Concurrent outbreaks of *Shigella sonnei* and enterotoxigenic *Escherichia coli* infections associated with parsley: implications for surveillance and control of foodborne illness. *Journal of Food Protection*, 66(4), 535–541. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.4.535>
- Nanasombat, S., Thonglong, J., & Jitlakha, J. (2015). Formulation and characterization of novel functional beverages with antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities. *Functional Foods in Health and Disease*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v5i1.162>
- Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15(4), 209–215. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0363>
- Nikaido, H. (1998). Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology*, 1(5), 516–523. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(98\)80083-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(98)80083-0)
- Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M. D., & Camper, A. K. (2007). Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5111–5117. <https://doi.org/10.1128/aem.02987-06>
- Nyenje, M. E., Tanih, N. F., Green, E., & Ndip, R. N. (2012). Current status of antibiograms of *Listeria ivanovii* and *Enterobacter cloacae* isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(9), 3101–3114. <https://doi.org/10.3390/ijerph9093101>

- Oey, I., Lille, M., van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.04.001>
- Oliveira, M., Rodrigues, C. M., & Teixeira, P. (2019). Microbiological quality of raw berries and their products: A focus on foodborne pathogens. *Heliyon*, 5(12), e02992. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02992>
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., & Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 288(5469), 1251–1253. <https://doi.org/10.1126/science.288.5469.1251>
- Omar, B., Malik, Y., & Singh, A. (2020). Bacteriological analysis of street-vended fruit juices available in Rishikesh, Uttarakhand. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9(2), 938. https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_818_19
- Ortega Morente, E., Fernández-Fuentes, M. A., Grande Burgos, M. J., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., & Gálvez, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 162(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028>
- Ortiz-Viedma, J., Rodriguez, A., Vega, C., Osorio, F., Defillipi, B., Ferreira, R., & Saavedra, J. (2018). Textural, flow and viscoelastic properties of Hass avocado (*Persea americana* Mill.) during ripening under refrigeration conditions. *Journal of Food Engineering*, 219, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.09.014>

- Ottesen, A. R., Gorham, S., Pettengill, J. B., Rideout, S., Evans, P., & Brown, E. (2014). The impact of systemic and copper pesticide applications on the phyllosphere microflora of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 1116–1125. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7010>
- Palou, E., Hernández-Salgado, C., López-Malo, A., Barbosa-Cánovas, G., Swanson, B., & Welti-Chanes, J. (2000). High pressure-processed guacamole. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/s1466-8564\(99\)00002-8](https://doi.org/10.1016/s1466-8564(99)00002-8)
- Palumbo, M., Harris, L. J., & Danyluk, M. D. (2013). Outbreaks of foodborne illness associated with common berries, 1983 through May 2013. *EDIS*, 2013(11). <https://doi.org/10.32473/edis-fs232-2013>
- Park, S., Szonyi, B., Gautam, R., Nightingale, K., Anciso, J., & Ivanek, R. (2012). Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: A systematic review. *Journal of Food Protection*, 75(11), 2055–2081. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-12-160>
- Parzanese, M. (2012). Vegetales mínimamente procesados. *Alimentos Argentinos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca*. 55, 31-39.
- Pasolli, E., de Filippis, F., Mauriello, I. E., Cumbo, F., Walsh, A. M., Leech, J., Cotter, P. D., Segata, N., & Ercolini, D. (2020). Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16438-8>
- Patel, D., Kosmidis, C., Seo, S. M., & Kaatz, G. W. (2010). Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 5070–5073. <https://doi.org/10.1128/aac.01058-10>

- Patterson, M. F., & Kilpatrick, D. J. (1998). The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection*, 61(4), 432–436. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.4.432>
- Paula Santos, A., M. Rogero, M., & H.M. Bastos, D. (2010). Edible plants, their secondary metabolites and antiobesogenic potential. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2(3), 195–212. <https://doi.org/10.2174/2212798411002030195>
- Pérez Pulido, R., Toledo Del Árbol, J., Grande Burgos, M. J., & Gálvez, A. (2012). Bactericidal effects of high hydrostatic pressure treatment singly or in combination with natural antimicrobials on *Staphylococcus aureus* in rice pudding. *Food Control*, 28(1), 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.045>
- Pérez Pulido, R., Toledo, J., Grande, M. J., Gálvez, A., & Lucas, R. (2015). Analysis of the effect of high hydrostatic pressure treatment and enterocin AS-48 addition on the bacterial communities of cherimoya pulp. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.033>
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2018). Circular and leaderless bacteriocins: biosynthesis, mode of action, applications, and prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02085>
- Pinela, J., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Nonthermal physical technologies to decontaminate and extend the shelf-life of fruits and vegetables: Trends aiming at quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(10), 2095–2111. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1046547>

- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), 309–318. <https://doi.org/10.1179/2047773215y.0000000030>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Quijada, N. M., Hernández, M., & Rodríguez-Lázaro, D. (2020). High-throughput sequencing and food microbiology. *Advances in Food and Nutrition Research*, 275–300. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.10.003>
- Quiñones Pérez, D. (2017). Antimicrobial resistance: evolution and current perspectives in the context of the "One health" approach. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3), 1-17.
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Coldham, N. G., Penuela, E. G., Mott, A. C., Woodward, M. J., Piddock, L. J. V., & Webber, M. A. (2007). Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(6), 1273–1280. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm359>
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Piddock, L. J. V., & Woodward, M. J. (2004). Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(3), 621–627. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh376>

- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69–112. <https://doi.org/10.1080/10408390600626420>
- Reinthaler, F. F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., Melkes, A., Posch, J., Winter, I., & Zarfel, G. (2010). ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Research*, 44(6), 1981–1985. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.052>
- Rendueles, E., Omer, M., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., & Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5), 1251–1260. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.001>
- Robinson, T. P., Bu, D. P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S. I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Thi Ngoc, P., van Boeckel, T. P., & Woolhouse, M. E. J. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(7), 377–380. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw048>
- Rodríguez López, J., Grande, M. J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R. (2020). Impact of high-hydrostatic pressure treatments applied singly or in combination with moderate heat on the microbial load, antimicrobial resistance, and bacterial diversity of guacamole. *Microorganisms*, 8(6), 909. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060909>
- Rodriguez-Casado, A. (2014). The health potential of fruits and vegetables phytochemicals: notable examples. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(7), 1097–1107. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.755149>

- Romero, J. L., Grande Burgos, M. J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R. (2017). Resistance to antibiotics, biocides, preservatives and metals in bacteria isolated from seafoods: co-selection of strains resistant or tolerant to different classes of compounds. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01650>
- Ruiz-Roldán, L., Rojo-Bezares, B., Lozano, C., López, M., Chichón, G., Torres, C., & Sáenz, Y. (2021). Occurrence of *Pseudomonas* spp. in raw vegetables: molecular and phenotypical analysis of their antimicrobial resistance and virulence-related traits. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12626. <https://doi.org/10.3390/ijms222312626>
- Ryser, E. T, & Marth, E. (1999). *Listeria*, listeriosis, and food safety. 2nd ed., rev. and expanded New York: Marcel Dekker. <https://lib.ugent.be/catalog/rug01:000268941>
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., & Torres, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3996–4001. <https://doi.org/10.1128/aac.48.10.3996-4001.2004>
- Sanjit Singh, A., Lekshmi, M., Prakasan, S., Nayak, B. B., & Kumar, S. (2017). Multiple antibiotic-resistant, extended spectrum- β -lactamase (ESBL)-producing enterobacteria in fresh seafood. *Microorganisms*, 5(3), 53. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030053>
- Sant'Anna, P. B., Melo Franco, B. D., & Maffei, D. F. (2020). Microbiological safety of ready-to-eat minimally processed vegetables in Brazil: an overview. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(13), 4664–4670. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10438>

- Santamaría, J., & Toranzos, G. A. (2003). Enteric pathogens and soil: a short review. *International Microbiology*, 6(1), 5–9. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0096-1>
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(6), 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Schwaiger, K., Helmke, K., Hölzel, C. S., & Bauer, J. (2011). Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.001>
- Seo, S., & Matthews, K. R. (2014). Exposure of *Escherichia coli* O157:H7 to soil, manure, or water influences its survival on plants and initiation of plant defense response. *Food Microbiology*, 38, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.015>
- Shankar, P. (2016). Book review: Tackling drug-resistant infections globally. *Archives of Pharmacy Practice*, 7(3), 110. <https://doi.org/10.4103/2045-080x.186181>
- Sharma, N., Singh, K., Toor, D., Pai, S. S., Chakraborty, R., & Khan, K. M. (2020). Antibiotic resistance in microbes from street fruit drinks and hygiene behavior of the vendors in Delhi, India. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(13), 4829. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134829>
- Shi, P., Jia, S., Zhang, X. X., Zhang, T., Cheng, S., & Li, A. (2013). Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water Research*, 47(1), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.046>

- Shin, J. Y., Kim, J. Y., Kang, H. T., Han, K. H., & Shim, J. Y. (2015). Effect of fruits and vegetables on metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(4), 416–425. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1025716>
- Siddiq, M., Ahmed, J., Lobo, M. G., & Ozadali, F. (2012). Tropical and subtrop fruit Proc/: Postharvest Physiology, Processing and Packaging: Vol. 23(437–454). John Wiley & Sons.
- Silva, S., Costa, E. M., Veiga, M., Morais, R. M., Calhau, C., & Pintado, M. (2018). Health promoting properties of blueberries: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(2), 181–200. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1518895>
- Silva, S., Costa, E., Mendes, M., Morais, R., Calhau, C., & Pintado, M. (2016). Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm activity of an ethanolic, anthocyanin-rich blueberry extract purified by solid phase extraction. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 693–703. <https://doi.org/10.1111/jam.13215>
- Slater, G. G., Shankman, S., Shepherd, J. S., & Alfin-Slater, R. B. (1975). Seasonal variation in the composition of California avocados. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(3), 468–474. <https://doi.org/10.1021/jf60199a048>
- Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in Nutrition*, 3(4), 506–516. <https://doi.org/10.3945/an.112.002154>
- Smelt, J. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 152–158. [https://doi.org/10.1016/s0924-2244\(98\)00030-2](https://doi.org/10.1016/s0924-2244(98)00030-2)

- Smith, K., Gemmell, C. G., & Hunter, I. S. (2007). The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(1), 78–84. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm395>
- Song, E. J., Lee, E. S., & Nam, Y. D. (2018). Progress of analytical tools and techniques for human gut microbiome research. *Journal of Microbiology*, 56(10), 693–705. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8238-5>
- Soto Varela, Z., Pérez Lavalle, L., & Estrada Alvarado, D. (2016). Bacteria causing of foodborne diseases: an overview at Colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105–122. <https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8598>
- Sri Prabakusuma, A., Zhu, J., Shi, Y., Ma, Q., Zhao, Q., Yang, Z., Xu, Y., & Huang, A. (2021). Prevalence and antimicrobial resistance profiling of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional cheese in Yunnan, China. *3 Biotech*, 12(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03072-4>
- Su, Y., Hsu, W. Y., Huang, T. S., & Simonne, A. (2021). Evaluation of the microbiological quality of fresh cilantro, green onions, and hot peppers from different types of markets in three U.S. States. *Horticulturae*, 7(6), 122. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7060122>
- Suárez Moya A. (2017). Microbioma y secuenciación masiva [Microbiome and next generation sequencing]. *Revista Española de Quimioterapia: Publicación Oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 30(5), 305–311.

- Sunde, M., Simonsen, G. S., Slette-meås, J. S., Böckerman, I., & Norström, M. (2015). Integron, plasmid and host strain characteristics of *Escherichia coli* from humans and food included in the Norwegian antimicrobial resistance monitoring programs. *PLoS ONE*, 10(6), e0128797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128797>
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., & Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11), 2562–2566. <https://doi.org/10.1128/aac.40.11.2562>
- Tabeshpour, J., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2017). Effects of avocado (*Persea americana*) on metabolic syndrome: A comprehensive systematic review. *Phytotherapy Research*, 31(6), 819–837. <https://doi.org/10.1002/ptr.5805>
- Taormina, P. J., & Beuchat, L. R. (2001). Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2555–2563. <https://doi.org/10.1128/aem.67.6.2555-2563.2001>
- Taylor-Robinson, D., & Bébéar, C. (1997). Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(5), 622–630. <https://doi.org/10.1093/jac/40.5.622>
- Teplitski, M., Warriner, K., Bartz, J., & Schneider, K. R. (2011). Untangling metabolic and communication networks: interactions of enterics with phytobacteria and their implications in produce safety. *Trends in Microbiology*, 19(3), 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.11.007>

- Terry, L. (2012). More people stricken with *E. coli* through raw milk from Wilsonville-area farm. The Oregonian/OregonLive. https://www.oregonlive.com/health/2012/04/more_people_stricken_with_the_co.html
- Tezel, U., & Pavlostathis, S. G. (2015). Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.018>
- Therdatha, P., Tandumrongpong, C., Pilasombut, K., Matsusaki, H., Keawsompong, S., & Nitisinprasert, S. (2016). Characterization of antimicrobial substance from *Lactobacillus salivarius* KL-D4 and its application as biopreservative for creamy filling. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2693-4>
- Toledo Del Árbol, J., Pérez Pulido, R., La Storia, A., Grande Burgos, M. J., Lucas, R., Ercolini, D., & Gálvez, A. (2016b). Changes in microbial diversity of brined green asparagus upon treatment with high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 216, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.001>
- Toledo Del Árbol, J., Pérez Pulido, R., La Storia, A., Grande Burgos, M. J., Lucas, R., Ercolini, D., & Gálvez, A. (2016a). Microbial diversity in pitted sweet cherries (*Prunus avium* L.) as affected by High-Hydrostatic Pressure treatment. *Food Research International*, 89, 790–796. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.014>

- Toledo, J., Pérez Pulido, R., Abriouel, H., Grande, M. J., & Gálvez, A. (2012). Inactivation of *Salmonella enterica* cells in Spanish potato omelette by high hydrostatic pressure treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.12.002>
- Tschape, H., Prager, R., Streckel, W., Fruth, A., Tietze, E., & Böhme, G. (1995). Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiology and Infection*, 114(3), 441–450. <https://doi.org/10.1017/s0950268800052158>
- USDA, U.S. Department of Agriculture. (2011). avocado, almond, pistachio and walnut composition. Nutrient Data Laboratory, USDA National Nutrient Database for Standard Reference.
- Valenzuela, A. S., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M. M., López, R. L., & Gálvez, A. (2013). Biocide and copper tolerance in enterococci from different sources. *Journal of Food Protection*, 76(10), 1806–1809. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-13-124>
- van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- van Schaik, W. (2015). The human gut resistome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670), 20140087. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0087>

- Vega-Gálvez, A., López, J., Torres-Ossandón, M. J., Galotto, M. J., Puente-Díaz, L., Quispe-Fuentes, I., & di Scala, K. (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, color, phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 58(2), 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.010>
- Vidaver, A. (2002). Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Diseases*, 34(s3), S107-S110. <https://doi.org/10.1086/340247>
- Waite, J., Jones, J., Turek, E., Dunne, C., Wright, A., Yang, T., Beckwitt, R., & Yousef, A. (2009). Production of shelf-stable ranch dressing using high-pressure processing. *Journal of Food Science*, 74(2), M83-M93. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01064.x>
- Wang, H., Feng, H., & Luo, Y. (2004). Microbial reduction and storage quality of fresh-cut cilantro washed with acidic electrolyzed water and aqueous ozone. *Food Research International*, 37(10), 949–956. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.06.004>
- Wang, J., Li, M., Wang, J., Liu, M., Yang, K., Zhang, J., Fan, M., & Wei, X. (2018). Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci and lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Chinese cured beef. *Journal of Food Protection*, 81(12), 2054–2063. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-18-195>
- Wang, X., Ouyang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhao, G., Bao, W., & Hu, F. B. (2014). Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ*, 349(jul29 3), g4490. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4490>

- Wang, Y., Li, F., Wang, Z., Qiu, T., Shen, Y., & Wang, M. (2015). Fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer: A dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. *Lung Cancer*, 88(2), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.02.015>
- Willett, W. C. (2002). Balancing Life-Style and Genomics Research for Disease Prevention. *Science*, 296(5568), 695–698. <https://doi.org/10.1126/science.1071055>
- Wood, E., Hein, S., Heiss, C., Williams, C., & Rodriguez-Mateos, A. (2019). Blueberries and cardiovascular disease prevention. *Food & Function*, 10(12), 7621–7633. <https://doi.org/10.1039/c9fo02291k>
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance (Illustrated ed.). WHO.
- World Health Organization. (2019). World Health Organization model list of essential medicines for children: 7th list 2019. WHO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325772>
- Wu, C. W., Yin, L. J., & Jiang, S. T. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1146–1151. <https://doi.org/10.1021/jf035100d>
- WU, V. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*, 25(6), 735–744. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.011>
- Wu, Y., Zhang, D., Jiang, X., & Jiang, W. (2015). Fruit and vegetable consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: A dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 25(2), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2014.10.004>

- Xiong, L., Sun, Y., Shi, L., & Yan, H. (2019). Characterization of antimicrobial resistance genes and class 1 integrase gene in raw meat and aquatic product, fresh vegetable and fruit, and swine manure in southern China. *Food Control*, 104, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.004>
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2001). Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/aac.45.4.1151-1161.2001>
- Younus, M., Sabuj, A., Haque, Z., Sayem, S., Majumder, S., Parvin, M., Islam, M., & Saha, S. (2020). Microbial risk assessment of ready-to-eat mixed vegetable salads from different restaurants of Bangladesh Agricultural University campus. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 7(1), 34. <https://doi.org/10.5455/javar.2020.g390>
- Yu, K., Wang, H., Cao, Z., Gai, Y., Liu, M., Li, G., Lu, L., & Luan, X. (2022). Antimicrobial resistance analysis and whole-genome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Indiana isolate from ducks. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 28, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.12.013>
- Yu, T., Han, G., Luan, Z., Zhu, C., Zhao, J., & Sheng, Y. (2022). Functional analysis of genes GlaDFR1 and GlaDFR2 encoding dihydroflavonol 4-reductase (DFR) in *Gentiana lutea* L. Var. *Aurantiaca* (M. Laínz) M. Laínz. *BioMed Research International*, 2022, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2022/1382604>

- Zabat, M., Sano, W., Wurster, J., Cabral, D., & Belenky, P. (2018). Microbial community analysis of sauerkraut fermentation reveals a stable and rapidly established community. *Foods*, 7(5), 77. <https://doi.org/10.3390/foods7050077>
- Zhan, J., Liu, Y. J., Cai, L. B., Xu, F. R., Xie, T., & He, Q. Q. (2015). Fruit and vegetable consumption and risk of cardiovascular disease: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1650–1663. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1008980>
- Zhang, T., Zhang, X. X., & Ye, L. (2011). Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. *PLoS ONE*, 6(10), e26041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026041>
- Zhao, L., Wang, Y., Wang, S., Li, H., Huang, W., & Liao, X. (2014). Inactivation of naturally occurring microbiota in cucumber juice by pressure treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.023>
- Zhou, C. L., Liu, W., Zhao, J., Yuan, C., Song, Y., Chen, D., Ni, Y. Y., & Li, Q. H. (2014). The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and physical–chemical characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.) during refrigerated storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 21, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.11.002>

- Zhu, Y., Lai, H., Zou, L., Yin, S., Wang, C., Han, X., Xia, X., Hu, K., He, L., Zhou, K., Chen, S., Ao, X., & Liu, S. (2017). Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. *International Journal of Food Microbiology*, 259, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.023>
- Zurfluh, K., Nüesch-Inderbinnen, M., Morach, M., Zihler Berner, A., Hächler, H., & Stephan, R. (2015a). Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), 3115–3120. <https://doi.org/10.1128/aem.00258-15>
- Zurfluh, K., Poirel, L., Nordmann, P., Klumpp, J., & Stephan, R. (2015b). First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0080-5>