



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS  
DE LA SALUD**

**TESIS DOCTORAL  
APLICACIÓN DE BACTERIOCINAS PARA LA  
BIOPROTECCIÓN DE ALIMENTOS**

**PRESENTADA POR:  
MARÍA DEL CARMEN LÓPEZ AGUAYO**

**DIRIGIDA POR:  
DR. D. ANTONIO GÁLVEZ DEL POSTIGO  
DRA. DÑA. MARÍA JOSÉ GRANDE BURGOS  
DRA. DÑA. ROSARIO LUCAS LÓPEZ**

**JAÉN, 30 DE MAYO DE 2017**

**ISBN 978-84-9159-302-7**

# **APLICACIÓN DE BACTERIOCINAS PARA LA BIOPROTECCIÓN DE ALIMENTOS**

Memoria para optar al grado de Doctor  
Jaén, Abril de 2017

Fdo.: María del Carmen López Aguayo  
Aspirante al Grado de Doctor

*Los Directores del trabajo:*

*Fdo.: Rosario Lucas López      Fdo: María José Grande Burgos*

*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<sup>a</sup>. Rosario Lucas López, D<sup>a</sup>. 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: **“Aplicación de bacteriocinas para la bioprotección de alimentos”** presentado por **D<sup>a</sup>. María del Carmen López Aguayo** ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al Grado de Doctor.

Jaén, Abril de 2017

Fdo.: Rosario Lucas López

Fdo.: María José Grande Burgos

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

*Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto AGL2012-38708 (MINECO), el Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (grupo AGR230, y el Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3). María del Carmen López Aguayo ha sido beneficiaria de una beca FPU (MEC).*



**INDICE**

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>I.- MICROORGANISMOS DE RIESGO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA</b> .....	8
I.1.- <i>Listeria</i> .....	9
I.2.- <i>Staphylococcus</i> .....	14
I.3.- <i>Salmonella</i> .....	17
<b>II.- CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS</b> .....	20
<b>III.- SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS DE ORIGEN BIOLÓGICO</b> .....	22
III.1.- Antimicrobianos de origen vegetal.....	23
III.1.1.- Efecto de la adición de antimicrobianos naturales .....	25
III.1.2.- Tipos de antimicrobianos naturales .....	26
III.2.- Antimicrobianos de origen bacteriano.....	28
III.2.1.- Bacteriocinas .....	28
III.2.1.1.-Clasificación de las bacteriocinas .....	30
III.2.1.2.-Aplicación de las bacteriocinas en alimentos: Ventajas e inconvenientes .....	34
III.2.1.3.-La Enterocina AS-48.....	36
III.2.2.- Péptidos antimicrobianos de síntesis no ribosómica .....	43
<b>IV.- RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES</b> .....	44
IV.1.-Tipos de recubrimientos.....	47
IV.2.-Aplicaciones en alimentos.....	49
IV.3.-Películas comestibles cargadas con antimicrobianos .....	52
<b>V.- TRATAMIENTOS ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA (APH)</b> .....	53
V.1.- Aplicaciones de las altas presiones hidrostáticas en alimentos.....	55

VI.- SUSTANCIAS EMPLEADAS EN PROCESOS DE DESINFECCIÓN.....	56
VI.1.-Tipos de biocidas.....	60
<b>OBJETIVOS</b> .....	64
<b>TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS</b> .....	67
- ARTÍCULO 1: Effect of different activated coatings containing enterocin AS-48 against <i>Listeria monocytogenes</i> on apple cubes.....	69
- ARTÍCULO 2: Analysis of the microbiota of refrigerated chopped parsley after treatments with a coating containing enterocin AS-48 or by High-Hydrostatic Pressure .....	77
- ARTÍCULO 3: Inactivation of <i>Staphylococcus aureus</i> in oat and soya drinks by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. ....	102
- ARTÍCULO 4: Inhibition of planktonic and sessile <i>Salmonella enterica</i> cells by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides.....	108
<b>DISCUSIÓN</b> .....	116
<b>CONCLUSIONES</b> .....	130
<b>REFERENCIAS</b> .....	133

**RESUMEN**

Una de las técnicas actuales para la conservación de alimentos es la utilización de productos naturales como las bacteriocinas. La enterocina AS-48 es un péptido antimicrobiano de amplio espectro producida por *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. Su actividad antimicrobiana ha sido muy estudiada tanto en cultivos líquidos como en alimentos. Estudios previos indican que la eficacia de esta bacteriocina puede variar significativamente sobre el tipo de alimento, las condiciones del tratamiento y las bacterias diana, por lo que esta tesis se ha centrado en el estudio de la aplicación de la enterocina AS-48 en combinación con otras técnicas como recubrimientos, alta presión hidrostática o antimicrobianos, frente a bacterias patógenas como *Listeria*, *Staphylococcus* o *Salmonella* en diferentes alimentos.

Una de las posibles estrategias para aplicar las bacteriocinas es mediante incorporación en recubrimientos comestibles. El objetivo del primer estudio fue evaluar el efecto de la enterocina AS-48 incorporada en diferentes soluciones de recubrimiento frente a un cóctel de cinco cepas de *Listeria monocytogenes* previamente inoculadas sobre trozos de manzana. Se prepararon soluciones de recubrimiento con quitosano, caseinato, alginato, carragenato potásico, goma de xantana, pectina, almidón, carboximetil celulosa o metilcelulosa. Los recubrimientos se aplicaron individualmente o combinados con la enterocina AS-48 a concentraciones de 20 o 40 µg/ml. Las muestras se almacenaron a 4°C durante 7 días. La aplicación de los recubrimientos solos no tuvo casi efecto (como es el caso del alginato y metilcelulosa) o mostró un efecto bajo sobre la viabilidad de las listerias (con descensos en los recuentos inferiores a 2.0 unidades logarítmicas), con la excepción del recubrimiento de quitosano que mostró una fuerte actividad frente a *Listeria* (con la reducción de 3,7 unidades logarítmicas en el séptimo día de almacenamiento). Los recubrimientos combinados con la enterocina AS-48 a una concentración de 20 µg/ml redujeron gradualmente los recuentos de *Listeria* durante el almacenamiento en la mayoría de los casos, logrando reducciones significativas ( $p < 0,05$ ) de 1,0 a 1,9 logaritmos después de 7 días con el carragenato, la goma xantana, la pectina, la carboximetil celulosa y la metilcelulosa. Adicionando una concentración de 40 µg/ml de enterocina AS-48 se observó una reducción significativa de los recuentos viables ( $p < 0,05$ ) con la mayoría de los revestimientos (entre 1,4 y 3,3 unidades, dependiendo del recubrimiento) en comparación con los recubrimientos sin

bacteriocina (excepto para el quitosano). Posteriormente se ensayaron los recubrimientos de quitosano, pectina, carboximetil celulosa y goma xantana, combinados o no con 40 µg/ml de AS-48, y con soluciones de EDTA 20 mM o con lactato sódico al 2,0%. Con la adición de lactato sódico se observaron los mejores resultados al séptimo día, donde se redujeron significativamente los recuentos viables ( $p < 0,05$ ) de 1,1 a 2,2 unidades logarítmicas en comparación con los recubrimientos solos (excepto para el quitosano), mientras que la combinación de lactato sódico y AS-48 redujeron los recuentos viables por debajo de los niveles de detección también en el día 7 para todos los recubrimientos. La combinación de EDTA y AS-48 fue la más eficaz, reduciendo los recuentos de *Listeria* por debajo de los niveles de detección desde el día 1 para la mayoría de los recubrimientos ensayados. La combinación de EDTA y AS-48 fue también la más efectiva a tiempo 0, ya que inmediatamente después del tratamiento se observaron reducciones en los recuentos de células viables entre 2,0 y 2,7 log, dependiendo del tipo de recubrimiento. Estos resultados demuestran la efectividad de los recubrimientos comestibles con enterocina AS-48 y EDTA para la inactivación de *L. monocytogenes* en superficie de manzana cortada. Dado que los recubrimientos comestibles son muy utilizados en las superficies de las frutas, los recubrimientos activados con enterocina AS-48 y EDTA se podrían aplicar en trozos de manzana recién cortados para evitar la contaminación con *L. monocytogenes*.

El perejil es una planta herbácea que se encuentra fácilmente en muchos huertos y jardines, e incluso en los márgenes de muros y caminos, y que destaca por ser el ingrediente principal en muchas partes del mundo por sus cualidades aromáticas, de ahí que sea muy usado como condimento, o picado como ingrediente o guarnición para muchos platos. Sin embargo, el perejil puede estar implicado en la transmisión de bacterias patógenas a través de los alimentos. El objetivo este trabajo fue determinar el efecto de dos tratamientos diferentes (un recubrimiento con una solución de pectina-EDTA que contenía la enterocina AS-48 y un tratamiento con alta presión hidrostática (APH) a 600 MPa durante 8 min) sobre el perejil picado y almacenado en bandejas a 5°C durante 10 días. Ambos tratamientos redujeron los recuentos de células viables en 3,7 unidades logarítmicas y retrasaron el crecimiento de estas durante el almacenamiento. En este estudio aplicamos tecnología de secuenciación masiva de ADN para determinar la biodiversidad bacteriana del perejil sometido o no a diferentes tratamientos y almacenado en refrigeración. Al estudiar la biodiversidad bacteriana del

perejil picado se observó que estaba representada principalmente por *Proteobacteria* (96,87%) pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (69,12%), *Rheinheimera* (8,56%) y *Pantoea* (6,91%) entre otros. Durante el almacenamiento, la presencia relativa de *Bacteroidetes* (representada principalmente por *Flavobacterium* y *Sphingobacterium*) aumentó al 26,66%. La aplicación del recubrimiento con pectina, bacteriocina y EDTA redujo la abundancia relativa de *Proteobacteria* al 63,75% y aumentó la de *Firmicutes* al 34,70%. Sin embargo, el porcentaje de ciertos grupos como *Salmonella*, *Shigella* y *Acinetobacter* aumentó en los primeros días de almacenaje. El almacenamiento a largo plazo se caracterizó por un aumento de *Proteobacteria*, principalmente *Pseudomonas*. El tratamiento con APH redujo la abundancia relativa de *Proteobacteria* (85,88%) y aumentó la de *Actinobacteria* (8,01%), pero también indujo cambios complejos en la microbiota superviviente dependiendo del tiempo de almacenamiento, produciéndose un aumento de *Firmicutes*. Con respecto a la abundancia relativa de las secuencias correspondientes a bacterias potencialmente patógenas como *Shigella*, sólo aumentaron al final del período de almacenamiento en las muestras tratadas con APH. Los resultados del presente estudio muestran cómo dos tratamientos diferentes con los que se obtienen reducciones en los recuentos de células viables tienen un impacto diferente sobre la biodiversidad bacteriana del perejil picado.

La presencia de *Staphylococcus aureus* toxicogénico en los alimentos y la diseminación de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) en la cadena alimentaria son otro motivo de preocupación actual. En este trabajo se ensayó la actividad de la enterocina AS-48, sola o combinada con compuestos fenólicos (carvacrol, eugenol, geraniol y citral) o con 2-nitro-1-propanol (2NPOH), en el control de un cóctel compuesto por una cepa sensible a la meticilina y una cepa resistente (SARM) inoculadas en bebida de avena comercial y en una bebida de soja. La enterocina AS-48 sola mostró una baja actividad bactericida frente a los estafilococos en las bebidas ensayadas. Las combinaciones de concentraciones subinhibitorias de enterocina AS-48 (25 µg/ml) y compuestos fenólicos o 2NPOH provocaron la inactivación completa de los estafilococos en las bebidas a las 24 h de incubación a 22°C. Cuando se ensayó en bebidas de avena y soja almacenadas durante 7 días a 10°C, la enterocina AS-48 (25 µg/ml) combinada con 2NPOH (5,5 mM) provocó una reducción rápida de los recuentos viables en el caso de la bebida de avena y una reducción más lenta en la bebida de soja (3,8 log después de 3 días). Al ensayar el mismo tratamiento combinado

aplicado a las bebidas almacenadas a 22°C, se observó una rápida inactivación de los estafilococos entre las 12 y 24 h en ambas bebidas, y no se detectaron estafilococos viables en los 7 días de almacenamiento. Los resultados del estudio destacan el potencial de la enterocina AS-48 combinada con 2NPOH para la inactivación de estafilococos.

La polimixina B es un péptido antimicrobiano que ha despertado recientemente el interés de la comunidad científica en el control de microorganismos patógenos en diferentes contextos. En este estudio pretendimos estudiar la acción conjunta de la polimixina B y la enterocina AS-48 frente a *Salmonella enterica* en estado planctónico o en estado sésil, y determinar si esta combinación podría potenciar la acción de los biocidas de cara a su posible aplicación en procesos de desinfección. La enterocina AS-48 fue ensayada frente a células planctónicas de *S. enterica* UJ3197 combinada con polimixina B y/o diferentes biocidas. Al combinar la enterocina AS-48 a 50 mg/l o 100 mg/l con 2 mg/l de polimixina B, se observó la inhibición casi completa del crecimiento de *S. enterica* UJ3197 a las 24 h de incubación. Al combinar 2 mg/l de polimixina B con los biocidas no aumentó significativamente el efecto inhibitorio frente a UJ3197, excepto en el caso de la adición de cetrimida a 25 mg/l. La combinación de polimixina B (2 mg/l) y enterocina AS-48 (25 mg/l) sí inhibió significativamente el crecimiento de la cepa UJ3197 al combinarlo con 2,5 ó 25 mg/l de cetrimida, 25 mg/l de cloruro de hexadecilpiridinio, 500 mg/l clorhexidina, y también con hidrocloreto de poli hexametileno guanidinio a 0,16 ó 1,6 mg/l. Por otro lado, los biofilms formados por cuatro cepas de *Salmonella* (S62, S64, UJ3197, UJ3198) sobre placas de microtitulación de poliestireno se trataron con los biocidas solos o combinados con la polimixina B (2 mg/l), enterocina AS-48 (25 ó 50 mg/l) o ambos. Las células séviles de *Salmonella* mostraron una mayor tolerancia a todos los biocidas ensayados en comparación con las células planctónicas. A la concentración ensayada, la polimixina B no aumentó la actividad bactericida de ninguno de los biocidas en las células séviles de *Salmonella*. La enterocina AS-48 mejoró la actividad de la mayoría de los biocidas, pero sólo para algunas de las cepas y sólo a la concentración mayor de bacteriocina ensayada. La mezcla de enterocina AS-48 y polimixina B inactivó las células séviles de *Salmonellas* al combinarla con los biocidas, aunque el grado de inactivación era altamente dependiente de la cepa y del biocida. Las combinaciones de polimixina B (2 mg/l) y enterocina AS-48 (50 mg/l) con los biocidas cloruro de benzalconio, cetrimida,

triclosán, hexaclorofeno, clorhexidina, hidrocloreuro de poli hexameten guanidinio y P3 oxonia, mejoraron significativamente ( $p < 0,05$ ) la inactivación de todas las cepas de *Salmonella* en estado sésil.

## **INTRODUCCIÓN**

## I.- MICROORGANISMOS DE RIESGO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Los alimentos, los microorganismos y los seres humanos tienen interesantes y duraderas asociaciones que se desarrollaron mucho antes del inicio de la historia escrita. Los alimentos no sólo poseen un valor nutricional para quienes lo consumen, sino que a menudo constituyen un medio de cultivo ideal para la multiplicación de los microorganismos. La globalización del mercado de los alimentos y la distribución y procesamiento a gran escala de materias primas y productos alimenticios, crean nuevos nichos a los que se adaptan microorganismos de diferentes regiones del mundo, planteando nuevos problemas para la industria alimentaria.

Los alimentos pueden actuar como vehículo de transmisión de enfermedades, por lo que la detección y el control de los patógenos y microorganismos responsables de la descomposición de los alimentos constituyen partes importantes de la microbiología alimentaria. El papel de los microorganismos en los alimentos puede conducir a la conservación o a su descomposición, dependiendo de los microorganismos implicados. La contaminación de los alimentos por microorganismos causantes de enfermedades puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimentaria, desde que se recoge la materia prima hasta que el producto finaliza en la mesa. Una de las principales causas del deterioro de los alimentos es el ataque de estos por diferentes tipos de microorganismos como pueden ser bacterias, levaduras y mohos. Este deterioro puede tener consecuencias económicas evidentes, tanto para los fabricantes (pérdidas de materias primas y productos elaborados, daño a la imagen de la empresa, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro del producto después de su adquisición y antes de su consumo). Se calcula que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos.

Aparte de los microorganismos en sí, los alimentos contaminados pueden resultar muy perjudiciales para la salud del consumidor debido a la producción en ellos de toxinas como por ejemplo, la toxina botulínica producida por *Clostridium botulinum* en las conservas mal esterilizadas, embutidos y en otros productos, o las enterotoxinas producidas por *Bacillus cereus* por ejemplo en el arroz (Guinebretière et al., 2002), o por *Staphylococcus aureus* en diferentes alimentos. También existe un riesgo mayor de transmisión de microorganismos patógenos capaces de provocar diversos tipos de

infecciones, como las provocadas por *Escherichia coli* (Hilborn et al., 1999), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Horby et al., 2003), *Listeria monocytogenes* y, en menor grado, otras bacterias (Nguyen-the y Carlin, 2000). También hay que considerar de riesgo la producción de micotoxinas por el crecimiento de ciertos mohos, como las aflatoxinas, muchas de las cuales son potentes agentes cancerígenos.

Los microorganismos patógenos presentes en los alimentos pueden ser de origen endógeno (ya están presentes en el interior de las estructuras del alimento) o exógeno (se incorporan al alimento durante su manipulación y procesado). Dentro de estos podemos destacar: *Aeromonas*, *B. cereus*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *S. aureus*, *Vibrio* spp. y *Yersinia enterocolitica* (Nguyen-the y Carlin, 2000). Los alimentos vegetales que se consumen crudos representan un riesgo considerable para la transmisión de diferentes microorganismos patógenos (Callejón et al., 2015; Wadamori et al., 2017).

El perejil (*Petroselinum crispum* Mill.) es un popular vegetal culinario nativo de los países de la región mediterránea y es ampliamente utilizado como aditivo alimentario como aromatizante (Simon y Quinn, 1988; Díaz-Maroto et al., 2006). Se utiliza en la medicina popular para el tratamiento de diferentes enfermedades, ya que sus componentes bioactivos poseen una amplia gama de propiedades farmacológicas, incluyendo antioxidante, hepatoprotector, protector del cerebro, antidiabético, analgésico, espasmolítico, inmunosupresor, antiplaquetario, gastroprotector, citoprotector, laxante, estrogénico, diurético, hipotensivo, antibacteriano y antifúngico (Farzaei et al., 2006). El consumo de alimentos que contienen perejil también ha sido estudiado en las enfermedades transmitidas por los alimentos. En 1995, Tschape et al. describieron un brote de gastroenteritis severa en verano seguida de síndrome hemolítico urémico y trombocitopenia trombótica en niños después del consumo de sándwiches que contenían perejil contaminado con cepas de *Citrobacter freundii* verotoxinogénico. El perejil también fue sospechoso de causar un brote de *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC) producido en restaurantes de Minnesota (Naimi et al., 2003). En cada uno de los restaurantes asociados con el brote, el perejil se picó, se mantuvo a temperatura ambiente y se utilizó como ingrediente o guarnición para platos múltiples. El mismo y otros estudios indican la implicación del perejil como vehículo para *Shigella* (*Shigella sonney*, *Shigella boydi*) causante de shigelosis alimentaria

(Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 1999, Naimi et al., 2003, Chan y Blaschek, 2005). El estiércol y el riego con aguas contaminadas son las principales fuentes de patógenos entéricos en los productos frescos. Un estudio mostró que el riego por aspersión con agua que contenía *S. enterica* serotipo Typhimurium (8,5 log CFU/ml) dio como resultado la persistencia de las bacterias en la filosfera y la rizosfera durante al menos 4 semanas (Kisluk y Yaron, 2012). Otro estudio demostró que *E. coli* O157:H7 permaneció de 154 a 217 días en suelos abonados con compost contaminado y se detectó en la lechuga y el perejil en 77 y 177 días, respectivamente, después de plantarlas (Islam et al., 2004). Otro estudio sobre la calidad microbiológica de los productos frescos reveló que los coliformes totales aumentaron durante el proceso de envasado en el cilantro y el perejil (Johnston et al., 2005).

### **I.1.- *Listeria***

El género *Listeria* pertenece a la clase *Bacilli*, orden *Bacillales* y familia *Listeriaceae*. Está formado por diecisiete especies distintas ([www.bacterio.net/listeria.html](http://www.bacterio.net/listeria.html); Orsi y Wiedmann, 2016) de las que *Listeria monocytogenes* destaca por ser el único patógeno en humanos (rara vez *L. ivanovii*). La presencia de *L. monocytogenes* en diferentes alimentos destinados al consumo humano en los últimos años ha tenido un interés creciente, incluyéndola entre los patógenos más importantes transmitidos a través de los alimentos.

Este género bacteriano fue descrito por primera vez en 1926 como *Bacterium monocytogenes*, como agente causante de monocitosis en conejos infectados artificialmente con un pequeño bacilo Gram-positivo, aislado durante una epidemia que se produjo espontáneamente en animales de laboratorio. Desde entonces *L. monocytogenes* (llamada *Listerella hepatolytica* por Pirie en 1927 y reclasificado por el mismo autor como *L. monocytogenes* en 1940), se aisló de la sangre y el líquido cerebroespinal de pacientes humanos, y en el tracto gastrointestinal de humanos y animales.

La primera evidencia de la listeriosis transmitida por los alimentos que afectó a humanos se produjo en 1953, cuando *L. monocytogenes* se aisló de vacas con mastitis, y en los gemelos nacidos muertos de una mujer que había consumido leche cruda del

mismo animal. La detección de varias epidemias causadas por la ingestión de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* ha causado gran preocupación en materia de salud pública por el aumento de listeriosis transmitida por los alimentos. Hasta 1961, *L. monocytogenes* fue la única especie reconocida del género *Listeria*. Solo tres especies del género *Listeria* producen  $\beta$ -hemólisis entre estas *L. monocytogenes* patógena para los seres humanos.

*L. monocytogenes* es un bacilo corto regular con tamaño de 0,4-0,5 y 0,5-2 micrómetros, suele formar cadenas cortas en forma de V o Y. Es Gram-positiva, no forma capsulas y no produce esporas. Es móvil mediante flagelos peritricos que garantizan una movilidad de tipo rotativo. El número y el desarrollo de flagelos y la movilidad resultante son más importantes a temperaturas entre 20 y 25°C, reduciéndose drásticamente a 37°C. Crece a temperaturas entre los 3°C y los 45°C con una temperatura óptima entre 30°C y 37°C (Buchanan et al., 1990; Gandhi y Chikindas, 2007). Crece a pH comprendido entre 5 y 9 en presencia de 10 % NaCl. No hidroliza la urea ni la caseína. No reduce los nitratos y se puede inhibir por azida sódica al 0,02 % mientras puede crecer en presencia de bilis a 10 y 40 % y con nivel de sales de talio de 0,025 %. Es un microorganismo aeróbico y microaerófilo. Fermenta la glucosa, fructosa, manosa, galactosa, celobiosa, trehalosa y sacarosa; la fermentación de la lactosa, maltosa, sacarosa, glicerol y sorbitol sin embargo es más lenta. Contiene 13 serotipos, de los cuales solo tres, principalmente el 4b y, ocasionalmente, la 1/2 a y 1/2 B son responsables de la mayoría de los casos de listeriosis en humanos (Rocourt y Cossart, 1997; Khelef et al., 2006; Liu et al., 2000). *L. monocytogenes* es una bacteria que se adapta muy bien a los medios, y la encontramos ampliamente distribuida en el medio ambiente, también se considera como un saprófito en estrecha asociación con el suelo.

Es una bacteria patógena que se transmite por los alimentos y que causa una enfermedad denominada listeriosis (Ghandi y Chikindas, 2007). Se considera como una enfermedad que ataca principalmente los animales, aunque la transmisión directa a los seres humanos se ha demostrado solo en raras ocasiones. *L. monocytogenes* está asociada con el tracto intestinal y con infecciones latentes de una amplia variedad de animales salvajes y domésticos como: vacas, cabras, ovejas, cerdos, caballos, perros,

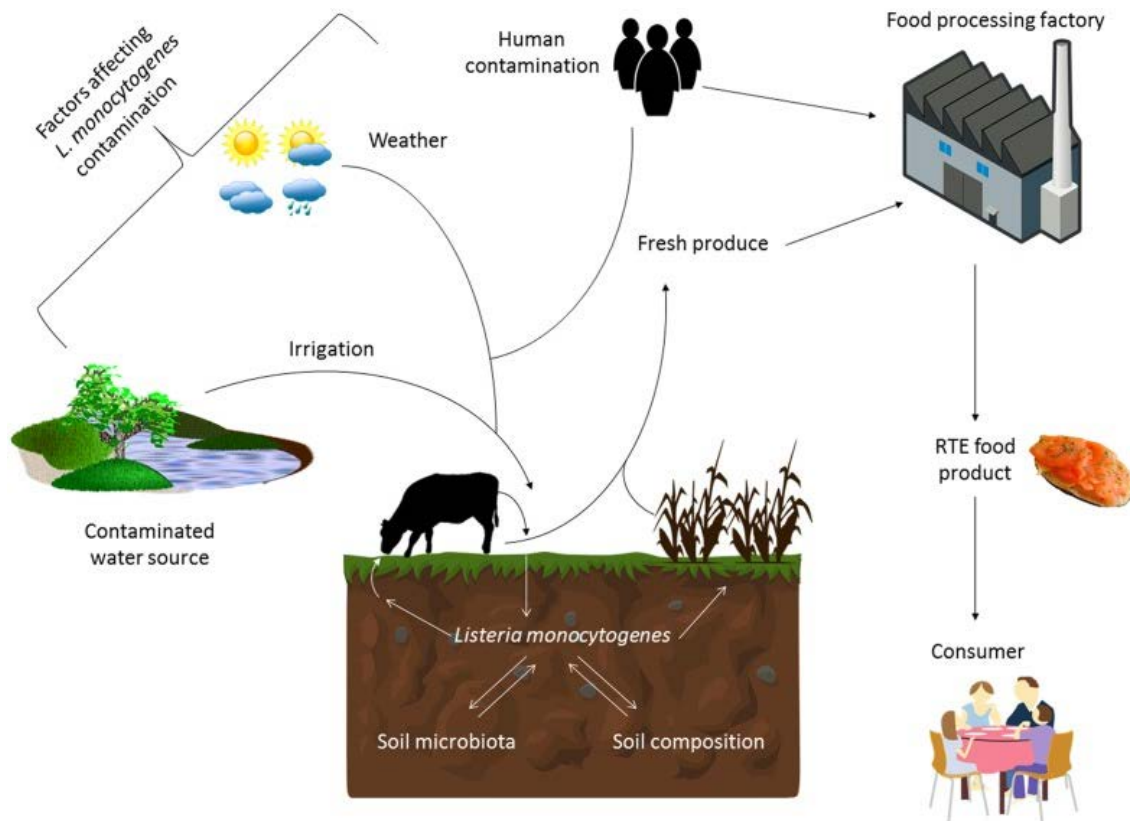
gatos, conejos; por otra parte, la bacteria se aisló de numerosas especies de aves, que son considerados como posibles portadores, y también de la hierba de los ensilados.

A diferencia de otros microorganismos transmitidos a través de los alimentos, *L. monocytogenes* además del tracto digestivo afecta a diferentes órganos, tales como el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular, el sistema respiratorio, los ojos, los huesos y la piel (Jurado et al., 1993; Lorber, 1997). La población de mayor riesgo son las personas con un sistema inmunitario más débil, especialmente aquellas que presentan una inmunidad mediada por células T reducida, como las personas mayores de 60 años, los bebés y los niños en los primeros años de vida, aquellas mujeres embarazadas, o las personas sometidas a tratamientos con inmunosupresores (Lecuit et al., 2007).

Las manifestaciones clínicas de la listeriosis humana difieren entre los grupos más susceptibles; se ha demostrado ampliamente que las manifestaciones clínicas más conocidas y también las más severas son la meningitis y meningoencefalitis, afectando especialmente a los niños y los ancianos. La tasa de mortalidad es muy alta, puede alcanzar hasta el 70 %, aumenta con la edad y con la presencia de uno o más factores de riesgo. Los síntomas suelen ser fiebre alta, daños al sistema nervioso central, respiración dificultosa hasta llegar al coma y la muerte. A pesar de las epidemias recientes de listeriosis humana, es una enfermedad esporádica. La incidencia media en Europa se estima en 4-8 casos por año por cada millón de habitantes. Por el contrario, las tasas de mortalidad son muy altas, alcanzando hasta valores de un 70% con promedios estimados en torno al 20-22 % (EFSA y ECDC, 2015).

El aislamiento cada vez más frecuente de *L. monocytogenes* a partir de una amplia variedad de alimentos para el consumo humano está parcialmente justificado por las características del patógeno que ayudan a explicar su capacidad para adaptarse y multiplicarse en diferentes condiciones tecnológicas que caracterizan los procesos de producción, transformación, conservación y distribución de alimentos (Figura 1). La resistencia al estrés juega un papel importante en este proceso de adaptación (NicAogáin y O'Byrne, 2016). *L. monocytogenes*, de hecho, tiene una cierta, aunque discutida, tolerancia a los tratamientos térmicos, es capaz de multiplicarse a

temperaturas de refrigeración, en presencia de cloruro de sodio y nitrato, a valores bajos de pH y actividad de agua (Farber y Peterkin, 1991).



**Figura 1.** Supervivencia de *L. monocytogenes* en el ambiente y en la cadena alimentaria (NicAogáin y O'Byrne, 2016).

En 2013, se confirmaron por la EFSA 1763 casos de listeriosis en humanos, lo que representó un aumento del 8,6% en comparación con el año 2012 (EFSA y ECDC, 2015). En los Estados Unidos, *L. monocytogenes* es la responsable de aproximadamente 1600 casos de listeriosis transmitida por alimentos que se producen anualmente, teniendo como consecuencia unas 1500 hospitalizaciones y 260 muertes (Scallan et al., 2011). Es capaz de crecer en diferentes verduras a temperatura ambiente y en refrigeración (Cobo-Molinos et al., 2005; Harris et al., 2003, Penteadó y Leitao, 2004) y en frutas no ácidas (Cobo-Molinos et al., 2008; Ukuku y Fett, 2002). También se ha

demostrado su capacidad para crecer en frutas y verduras con pHs más bajos tales como tomates (Beuchat y Brackett, 1991), gajos de naranjas (Pao et al., 1998), frambuesas en rodajas, peras o kiwi (Cobo-Molinos et al., 2008), y manzana “Golden Delicious” troceada (Alegre et al., 2010; Conway et al., 2000). Por otro lado, *L. monocytogenes* también se ha aislado de fresas (Johannessen et al., 2002) y de frutos secos (Mena et al., 2004). Además se han descrito brotes de listeriosis relacionados con alimentos como apio o melón (Garner y Kathariou, 2016; McCollum et al., 2013). En 2014 en los EE. UU. se produjo un brote de listeriosis provocado por manzanas de caramelo (Garner y Kathariou, 2016) la inserción de un palo en la manzana acelera la transferencia de jugo desde el interior de la manzana a la superficie, creando un microambiente entre la manzana y el caramelo donde *L. monocytogenes* puede crecer rápidamente a los niveles necesarios para causar la enfermedad cuando estas se almacenan a temperatura ambiente (Glass et al., 2015).

## **I.2.- *Staphylococcus***

Los cocos Gram-positivos son un grupo heterogéneo de bacterias que incluye a diferentes géneros con especies capaces de colonizar a los humanos. Las características que tienen en común son su forma esférica, su morfología en la tinción de Gram y la ausencia de endosporas. La presencia o ausencia de actividad catalasa es un test sencillo que se utiliza para subdividirlos en géneros.

El nombre *Staphylococcus* deriva del griego *staphylé*, que significa “en racimo de uvas”. Este nombre se refiere al hecho de que las células de estos cocos Gram-positivos que provienen de crecimiento en agar presentan un patrón que recuerda a un racimo de uvas; sin embargo, los microorganismos en tinciones directamente de las muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o en cadenas cortas. La mayor parte de los estafilococos tienen un diámetro de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  y son inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, catalasa-positivos, y crecen en un medio que contiene cloruro sódico al 10% a una temperatura que va desde 18-40°C. Están presentes en la piel y en las mucosas de los humanos, otros mamíferos y aves. Es un patógeno importante en humanos, produciendo un amplio espectro de enfermedades sistemáticas que pueden poner en riesgo la vida. El género *Staphylococcus* contiene 47 especies y 24 subespecies diferentes (Becker et al., 2014). Las especies asociadas con

mayor frecuencia a enfermedad en el ser humano son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus* (Murray et al., 2005).

*Staphylococcus aureus* es una de las especies que se asocian con más frecuencia a las enfermedades en humanos, es el miembro más virulento y mejor conocido del género. Se asocia a diferentes tipos de enfermedad, incluyendo infecciones de la piel, sepsis, osteomielitis y neumonía (Kallen et al., 2007; Kechrid et al., 2011; Talan et al., 2011). Provoca enfermedad mediante la producción de toxina o a través de la invasión directa y de la destrucción del tejido. Es anaerobio facultativo, no esporulado, coagulasa y desoxirribonucleasa positivos. Crece a 7-48°C (óptimo 37°C), pH 4-9,3 (óptimo 7-7,5). Está presente en las secreciones nasales, la piel, las heridas, los ojos, y el tracto intestinal del hombre, además de estar presente en el suelo, el aire y la leche. Puede crecer con una actividad del agua de 0,83, si bien la producción de toxina no se produce por debajo de 0,86. Se lo considera el patógeno bacteriano más resistente a una actividad de agua reducida.

La intoxicación por estafilococos es una de las causas más frecuentes de las enfermedades transmitidas por los alimentos (Tirado y Schmidt 2001; Le Loir et al., 2003; EFSA, 2014). En Europa, 346 casos de los producidos en 2012 (que representan el 6,4% del total de los brotes) fueron causados por toxinas producidas por estafilococos según el informe de la UE remitido por la EFSA sobre zoonosis, agentes zoonóticos y brotes de origen alimentario en 2012 (EFSA, 2014). La intoxicación estafilocócica se produce por la ingestión de alimentos que contienen la toxina, producida por algunas especies y cepas de estafilococos. La mayoría de las cepas de *S. aureus* son capaces de producir una o más enterotoxinas termoestables (Balaban y Rasooly 2001; Ortega et al., 2010), que son la causa de los síntomas gastrointestinales observados durante las intoxicaciones (Tamarapu et al., 2001). Las toxinas son sintetizadas durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano en los alimentos almacenados. Se han identificado diferentes tipos serológicos. La enterotoxina más frecuente es la del tipo A, detectada en el 75% de los brotes. Entre el 15 al 20% de *S. aureus* aislados de humanos son enterotoxigénicos, dato del que se deriva la importancia de los manipuladores en la transmisión de la intoxicación estafilocócica, que suele ser por alimentos elaborados manualmente, con insuficiente refrigeración posterior, y también los cocinados pero

consumidos fríos, como carnes, huevos, cremas o productos lácteos. Esto se debe a que la toxina se produce más fácilmente en ausencia de microbiota competitiva. El problema principal asociado con el control de esa intoxicación alimentaria es la alta tasa de portadores humanos, que aumenta el riesgo de contaminación a partir de manipuladores de alimentos.

Después de ingerir el alimento contaminado, los síntomas aparecen rápidamente, entre 1-6 horas, con una media de unas 3 h. El síntoma más dominante y grave es el vómito que va precedido de una sensación de náusea. Otros síntomas comunes son dolores, cólicos y diarrea. Los síntomas duran normalmente de 1 a 2 días y la mortalidad es extraordinariamente baja, si bien se han señalado casos fatales. Se sabe que se necesita la presencia de muchas células de *S. aureus* en los alimentos para que exista riesgo de intoxicación, pero se desconoce el mínimo exacto de células necesario para producir enterotoxina suficiente para originar los síntomas; se han sugerido cifras mayores de 1 millón por gramo, número que corresponde aproximadamente a un nivel de enterotoxina en el alimento consumido de 1 µg. Esta cantidad es suficiente para originar la enfermedad en un adulto pero en los niños bastaría con 0,2 µg.

*S. aureus* ha sido aislado de varios alimentos incluyendo carne y productos cárnicos, pollo, leche y productos lácteos, alimentos fermentados, ensaladas, verduras, productos de pescado etc. (Genigeorgis, 1989; Wieneke et al., 1993; Jablonski y Bohach, 2001; Tamarapu et al., 2001; Jorgensen et al., 2005). *S. aureus* se encuentra en las fosas nasales, así como en la piel y cabello de animales de sangre caliente, y del 30% al 50% de la población humana es portadora (Le Loir et al., 2003). Se transmite también en las infecciones nosocomiales, y supone una amenaza debido a su resistencia adquirida a los antimicrobianos. Las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) son de especial importancia (Ippolito et al., 2010; Doyle et al., 2012). La presencia de cepas de *S. aureus* resistentes a los antibióticos productoras de enterotoxinas en los alimentos es un riesgo adicional para la diseminación de cepas resistentes a los antibióticos a través de la cadena alimentaria y también para individuos inmunocomprometidos sensibles a cepas más virulentas. La inactivación de *S. aureus* en los alimentos mediante el uso de tecnología de barreras es un enfoque interesante en comparación con métodos clásicos como el calentamiento, permitiendo una mejor

conservación de las propiedades organolépticas de los alimentos y manteniendo su valor nutricional (Gálvez et al., 2008, 2014).

### **I.3.- *Salmonella***

*Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* la cual está formada por bacilos Gram-negativos, aerobios y anaerobios facultativos, que crecen en medios usuales. No forman endosporas. La mayoría son móviles, exceptuando algunas variantes inmóviles como *S. gallinarum* y *S. pullorum* (Porrero et al., 2006). *Salmonella*, como todas las enterobacterias, crecen bien en medios usuales, pero además presentan la mayor resistencia de esta familia a las sales biliares y otros componentes químicos (Prats y Coll, 1998). El género incluye dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (McQuiston et al., 2008). *S. enterica* es la de mayor preocupación en salud pública, y a su vez está compuesta por seis subespecies: *S. enterica* subsp. Enterica (I), *S. enterica* subsp. Salamae (II), *S. enterica* subsp. Arizonae (IIIa), *S. enterica* subsp. Diarizonae (IIIb), *S. enterica* subsp. Houtenae (IV) y *S. enterica* subsp. Indica (VI). Se dividen en serotipos, basado en el primer esquema de tipificación publicado en 1934 por Kaufmann-White, el cual diferencia cepas de *Salmonella* por sus antígenos de superficie (Brenner et al., 2000). Cuando Kaufmann propuso por primera vez el programa, se habían descrito 44 serotipos. A partir de 2007, el número de serotipos descubiertos fueron 2,579 (Grimont y Weill, 2007; Lampel et al., 2012).

El género *Salmonella* incluye un amplio grupo de cepas patógenas, la mayoría de las cuales tiene su reservorio natural en el tubo digestivo de muy diversos animales, como aves, mamíferos y reptiles y causan enteritis en humanos; se pueden encontrar en otros ambientes como el agua, tierras húmedas y colonizando la superficie de los vegetales; otras tienen un reservorio exclusivamente en humanos, como las causantes de la fiebre tifoidea y paratifoidea. Se transmite a los humanos por medio del consumo de alimentos contaminados con heces de animales. *Salmonella* está presente en los alimentos crudos de origen animal, como las carnes, las aves, el huevo, la leche y los productos lácteos, el pescado, así también como algunas frutas y vegetales pueden contener este germen (Ackers et al., 2000; D'Aoust, 2000).

La dosis infectiva mínima se situal alrededor de  $10^5$ -  $10^6$  bacterias (Lampel et al., 2012), aunque en las personas con aclorhidria o que han tomado recientemente otros antibioticos la infección puede producirse con  $10^3$  bacterias, las cuales penetran en las células del epitelio intestinal donde se multiplican in situ, pudiendo alcanzar los ganglios linfáticos intestinales y causar sepsis. Este proceso de infección generalizada solo se produce en algunas personas y es muy breve y autolimitado por lo que generalmente pasa desapercibido (Prats y Coll, 1998).

La “salmonelosis” es la infección causada por *Salmonella*. De acuerdo con el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2012), la salmonelosis causa aproximadamente 1,4 millones de casos de infecciones transmitidas por alimentos y más de 400 muertes anualmente en los Estados Unidos (Scallan et al., 2011). En la Unión Europea (UE) de los casos producidos, un 9,2% de los casos de salmonelosis suelen estar relacionados con los viajeros, y el 3,6% de los casos fueron identificados como brotes de los cuales se desconoce su fuente (Pires et al., 2011).

A pesar de que algunas personas no muestran síntomas, la mayoría de las personas enfermas experimentan diarrea, dolor abdominal y fiebre entre 8 a 72 horas después de comer el alimento contaminado. Se pueden presentar síntomas adicionales como escalofríos, dolor de cabeza, náusea y vómito. Los síntomas generalmente desaparecen dentro de un plazo de 4 a 7 días. Muchas personas se recuperan sin tratamiento y quizás nunca visiten al médico. Sin embargo, las infecciones con *Salmonella* pueden ser graves especialmente para los recién nacidos y los niños pequeños, las mujeres embarazadas, las personas de edad avanzada, y las que tienen un sistema inmunológico débil (como aquellos que sufren de VIH/SIDA, cáncer, diabetes, enfermedades de los riñones o pacientes de trasplantes) (Centers for Disease Control and Prevention, 2012).

Dentro de los alimentos que la pueden transmitir se encuentran la carne, aves de corral, leche y los huevo crudo (Jorgensen et al., 2002; Mead et al., 1999) principalmente aunque también pueden aparecer en zumos no pasteurizados (Buxton et al., 1999; Parish et al., 1997), el pescado (Da Silva et al., 1998; Heintz et al., 2000) cacao, frutas, verduras y mantequilla de cacahuets (Grasso et al., 2010; Park et al., 2008; Lampel et al., 2012). Dado que *Salmonella* es sensible al calor, es más frecuente

en los alimentos crudos que no se cocinan a una alta temperatura o a una temperatura mínima. En 2008, la salmonelosis fue la segunda causa de zoonosis en humanos en la UE, lo que representa 131.468 casos confirmados, de los cuales 3.833 ocurrieron en España (EFSA, 2010). *Salmonella* fue la causa más frecuente de brotes alimentarios (35,4% de todos los brotes). Dado que el hábitat de *Salmonella* es el tracto intestinal de una amplia gama de animales, los alimentos de origen animal y los vegetales que han sufrido contaminación fecal pueden ser fuentes de infección. La transmisión suele ocurrir cuando aparece la bacteria en las zonas de preparación de alimentos y posteriormente se multiplica en estos, p.ej. debido a una temperatura inadecuada de almacenamiento, o de cocinado, o a la contaminación cruzada con alimentos listos para el consumo.

La formación de biofilms o biopelículas juega un papel importante en la adhesión y colonización de *S. enterica* sobre materiales bióticos y abióticos (Collignon y Korsten, 2010; Iturriaga et al., 2007; Joseph et al., 2001; Lapidot et al., 2006; Vestby et al., 2009). Esta bacteria tiene la capacidad de generar una matriz extracelular formada por celulosa y fimbrias tipo curli que le permiten unirse fuertemente entre si y a las superficies. La formación de biofilms es un importante mecanismo mediante el cual las bacterias pueden sobrevivir a procesos de desinfección y a los tratamientos con antibióticos (Corcoran et al., 2014). Supone un problema serio para la industria medio ambiental, de salud pública y médica (Gilbert et al., 2003; Hall-Stoodley et al., 2004). Si se forma el biofilm durante el procesado de los alimentos puede causar una contaminación posterior a la elaboración del producto, lo que conlleva a reducir la vida útil de estos y a la transmisión de enfermedades (Jessen y Lammert, 2003). Los microorganismos sésiles que entran en contacto con las superficies son más difícil de eliminar y son más resistentes a los desinfectantes en comparación con las células planctónicas (Gilbert et al., 2001; Morton et al., 1998). En un estudio reciente se ha demostrado que la mayoría de los aislados de *Salmonella* de muestras de huevos, tenían una capacidad media o alta para formar biofilms en placas de microtitulación de poliestireno, incluyendo entre ellas a cepas multirresistentes. (Fernández Márquez et al., 2016). Estudios anteriores han demostrado que *Salmonella* puede formar biofilms en superficies en contacto con alimentos tanto en ambientes industriales como domésticos (Manijeh et al., 2008; Moretro et al., 2012; Rodrigues et al., 2011). Por lo tanto, existe

un gran interés en el desarrollo de tratamientos que inactiven la formación de biofilm en diferentes bacterias, incluyendo *S. enterica*.

## **II.- CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS**

La conservación de los alimentos tiene como objetivo principal mantener un alimento en perfectas condiciones higiénicas y sanitarias, así como preservar sus características organolépticas. Para ello se debe de impedir o minimizar el crecimiento de los microorganismos, proporcionar niveles aceptables de seguridad higiénica, y alargar y mejorar la vida útil de los alimentos. A lo largo de la historia se han desarrollado diferentes métodos para conservar los alimentos. Muchos de ellos se han utilizado desde hace siglos por nuestros antepasados griegos, romanos, fenicios, egipcios y chinos, los cuales utilizaban diferentes técnicas de conservación basadas en el secado, ahumado, la adición de sal a las carnes y pescados, o la refrigeración. Estas técnicas se han seguido manteniendo a lo largo de la historia de forma tradicional junto a otros métodos como son el escabechado, el adobo, el marinado, el confitado, o las fermentaciones espontáneas. El desarrollo de los métodos térmicos de procesado de alimentos junto con los conservantes químicos permitieron mantener una producción y distribución de alimentos a gran escala. Los conservantes químicos jugaron un papel esencial en la estrategia de desarrollar una cadena alimentaria que pudiese distribuir alimentos a bajo coste en diferentes regiones geográficas.

Los cambios en los hábitos de la sociedad, el abandono de las zonas rurales, y el trabajo intensivo han ido cambiando nuestros hábitos alimenticios. Los consumidores demandan de forma creciente alimentos de fácil preparación que sean de calidad, seguros, naturales, y que estén poco procesados pero a la vez tengan una mayor vida útil (Tabla 1). Las tecnologías de conservación de alimentos tienen como reto, obtener productos más duraderos sin alterar sus características nutricionales y sensoriales iniciales (Del Valle, 2003).

**Tabla 1.** Tendencia de los consumidores (Welti, 1997).

<b>Tendencias actuales</b>	<b>Características</b>
Convenientes y de alta calidad	Fáciles de almacenar con vida útil satisfactoria
De procesos menos severos	Calentamiento menos intenso y daño mínimo por congelación
Con menos aditivos artificiales	Uso de antimicrobianos naturales, timol, carvacrol, eugenol
Más frescos	Uso de congelación
Más saludables	Con menos grasas saturadas y menos cantidad de azúcares

Los métodos de conservación tradicionales como la congelación, la pasterización, la deshidratación, o la esterilización se basan en la variación de uno o dos factores de conservación. Las condiciones de uso de los conservantes están reglamentadas en todos los países del mundo, existiendo un límite máximo autorizado en función del conservante y el uso a que va destinado. Hoy en día, se estudia combinar dos o más factores que actúen sinérgicamente controlando a la población microbiana, con lo que se evita la aplicación de un solo factor de conservación de forma masiva, y se mejora la calidad sensorial y nutrimental del alimento. Esto nos va a permitir obtener productos semejantes al producto fresco, más sanos, con menos aditivos y listos para consumir (Alzamora, 1997). A esta combinación de factores se le ha denominado tecnología de barreras o factores combinados (Leistner y Rodell, 1976).

El concepto de la tecnología de barreras comenzó a aplicarse en el sector alimentario de una manera racional después de observar que el crecimiento de los microorganismos en los alimentos descendía tras el tratamiento combinado con diferentes factores antimicrobianos (Leistner, 1978, 2000; Leistner y Goris, 1995). Después de la exposición de una población bacteriana a un solo factor antimicrobiano se observa a menudo una respuesta heterogénea, dependiendo de la intensidad del tratamiento así como de otros muchos factores. El uso exclusivo de tratamientos físicos o químicos generalmente no permite alargar lo deseado la vida de los productos mínimamente procesados, por ello la combinación de estos tratamientos con frecuencia

suele ser imprescindible para mantener la calidad alimentos como pueden ser las frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Artés et al., 1998).

La tecnología de barreras se basa en la utilización de diferentes técnicas de conservación, dentro de las que sobresalen el uso de desinfectantes, tratamientos térmicos, aditivos químicos, bioconservantes, envasado en atmósferas modificadas, almacenamiento a bajas temperaturas, tratamientos por altas presiones, entre otros. La supervivencia de los microorganismos a los diferentes tratamientos depende del microorganismo y de la matriz del alimento que se esté tratando, siendo necesario realizar estudios que permitan identificar cual es la secuencia de tratamientos necesaria para obtener un efecto sinérgico y de esta forma producir un efecto de barrera que permita prolongar la vida útil de los alimentos entre ellos frutas y hortalizas mínimamente procesadas (Leistner y Gould, 2002; Artés y Allende, 2005; Hun y Cennadios, 2005; Bico et al., 2009; Denoya y Ardanaz, 2012).

Entre los diferentes métodos para la conservación de alimentos, los métodos no térmicos basados en el uso combinado de antimicrobianos naturales, los recubrimientos activados con sustancias antimicrobianas o los tratamientos de alta presión hidrostática (HHP) están ganando interés en la conservación de los productos frescos, ya que tienen un impacto bajo o nulo en los alimentos.

### **III. SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS DE ORIGEN BIOLÓGICO**

El uso de antimicrobianos es una práctica común en la industria alimentaria. Durante años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente (que en algunos casos han causado daño en la salud de los consumidores, si se utilizan a grandes dosis como en el caso de los sulfitos), ocasionando un rechazo por los consumidores de productos procesados, lo que ha llevado a la necesidad de buscar otras opciones. En esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los utilizados tradicionalmente (Nychas, 1995).

Los sistemas antimicrobianos naturales pueden clasificarse atendiendo a su origen animal, vegetal o microbiano. El primero de estos grupos incluye proteínas,

enzimas como la lisozima, lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosano. El segundo grupo incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, así como ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas, y otros compuestos orgánicos de naturaleza química diversa; el tercer grupo incluye diversos compuestos y sustancias de naturaleza peptídica producidos por microorganismos (Beuchat, 2001).

### **III.1. Antimicrobianos de origen vegetal**

Diversos productos de origen natural provenientes de plantas pueden ser usados como conservantes de alimentos. Se estima que del 1% al 10% de entre las aproximadamente 500 000 especies de plantas que existen en el mundo tienen uso como alimento. La mayor parte de los antimicrobianos naturales son bacteriostáticos (impiden el crecimiento) en lugar de ser bactericidas (destruyen gérmenes) por lo cual su efectividad en alimentos es limitada. En ocasiones, es preferible usar una combinación de ellos para ampliar el espectro de acción en la conservación de frutas o alimentos en general (Blanchard, 2000). Muchas veces, solo son útiles con materias primas que tienen una baja carga microbiológica inicial (Alvarez-Parrilla, 2005).

Muchas especias y hierbas así como algunas plantas tienen actividad antimicrobiana. Entre las usadas en alimentos se encuentran: hierbabuena, apio, albahaca, cilantro, laurel, almendra, café, puerro, rábano picante, tomillo, etc. Las especias son raíces, cortezas, semillas, brotes, hojas o frutos de plantas aromáticas que se añaden a los alimentos como agentes saborizantes. Sin embargo, se sabe desde tiempos antiguos que las especias y sus aceites esenciales tienen diferentes grados de actividad antimicrobiana. El uso de las especias como conservantes se remonta a unos 1.550 años a.c., cuando los antiguos egipcios las empleaban para conservar alimentos y embalsamar a los muertos (Davidson, 2001).

Ciertas especias inhiben el crecimiento de microorganismos. Son más efectivas frente a bacterias Gram-positivas que frente a Gram-negativas:

- Canela, clavo y mostaza: gran poder conservante.
- Pimienta negra/roja, jengibre: inhibidores débiles frente a una gran variedad de microorganismos.
- Pimienta, laurel, cilantro, comino, orégano, romero, salvia y tomillo: actividad intermedia.
- Otros: anís, menta, hinojo, apio, eneldo, cúrcuma.

El poder conservante de las plantas, hierbas y especias se debe a que contienen una variedad de sustancias que inhiben varias actividades metabólicas de bacterias, levaduras y mohos (Tabla 2). Los compuestos antimicrobianos en las plantas están comúnmente contenidos en la fracción del aceite esencial de las hojas (romero, salvia), flores y brotes de flores (clavo), bulbos (cebolla, ajo), rizomas (asafétida), frutas (pimiento, cardamomo) u otras partes de la planta. Los compuestos presentes en especias y hierbas que tienen actividad antimicrobiana son derivados simples y complejos del fenol, los cuales son volátiles a temperatura ambiente. También presentan actividad antimicrobiana las oleorresinas de estas especias (Petrone, 2002).

Algunos de estos sistemas antimicrobianos naturales se aplican ya para la conservación de alimentos, y muchos otros están siendo investigados para que se apruebe su uso en alimentos (Tabla 3). Dentro de los que actualmente están aprobados se encuentran los compuestos fenólicos, que se han estado utilizando como agentes antimicrobianos desde 1867 cuando se empezó a utilizar el fenol como higienizante. Atendiendo a su interés en la conservación de alimentos, los compuestos fenólicos pueden clasificarse como aquellos actualmente aprobados (parabenos), aquellos aprobados para otros usos (antioxidantes) y aquellos que se encuentran en la naturaleza (polifenólicos y fenol).

**Tabla 2.** Compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas, hierbas y especias (López-Malo et al., 2000).

Planta, hierba o especia	Compuestos principales	Otros compuestos
Ajo ( <i>Allium sativum</i> )	Dialildisulfuro, diali trisulfuro	Dietil sulfuro, alicina
Albahaca ( <i>Ocimum basilicum</i> )	D-linalol, metilcavicol	Eugenol, cineol, geraniol
Canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> )	Aldehído cinámico	l-linalol, p-cimeno, eugenol
Cebolla ( <i>Allium cepa</i> )	d-n-propildisulfuro	
Cilantro ( <i>Coriandum sativum</i> )	d-linalol	d- $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno
Clavo de olor ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	Eugenol	Cariofileno
Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> )	Cuminaldehido	p-cimeno
Estragón ( <i>Artemisa dracunlus</i> )	Metilcavicol	Anetol
Limonaria ( <i>Cymbopgon citratus</i> )	Citral	Geraniol
Mejorana ( <i>Origanum marjorana</i> )	Linalo, cineol, eugenol	Metilcavicol
Mostaza ( <i>Brassica hirta</i> )	Alilisotiocianato	
Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	Timol, Carvacrol	$\alpha$ -pineno, p-pineno
Perejil ( <i>Petrosellnum crispum</i> )	$\alpha$ -pineno, fenol-eter-epiol	
Pimienta negra ( <i>Pipper nigrum</i> )	Monoterpenos, sesquiterpenos	Compuestos oxigenados
Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	Borneol, cinenol	Canfor, $\alpha$ -pineno
Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> )	Timol	Carvacrol, l-linalol, geraniol
Vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> )	Vainilina	Ácidos p-hidroxibenzóicos

### III.1.1.- Efecto de la adición de antimicrobianos naturales

Los antimicrobianos o conservantes pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el microorganismo:

- Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
- Daño a la integridad de las membranas.
- Interferencia con procesos metabólicos esenciales.

Algunos antimicrobianos naturales pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitor más reducido. Del mismo modo algunos antimicrobianos pueden tener un efecto bactericida, mientras que otros actúan como bacteriostático.

Los componentes activos de los aceites esenciales pueden variar en su composición, ya que ésta puede verse afectada por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas. Se ha observado que las grasas, proteínas, la concentración de sal, pH y temperatura afectan a la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Nychas, 1995).

### **III.1.2.- Tipos de antimicrobianos naturales**

#### **Ácidos orgánicos y ésteres**

Uno de los factores que predomina en el crecimiento de los microorganismos en los alimentos es el pH. En general las bacterias crecen a pH cercanos a la neutralidad (pH 6,5 a 7,5) pero sin embargo son capaces de tolerar un rango de pH entre 4 y 9. A diferencia de éstas, los mohos y las levaduras toleran un rango más amplio de pH para su crecimiento, ya que pueden crecer a pH por debajo de 3,5. Las levaduras y mohos proliferan más en frutas y vegetales debido a sus características inherentes como su bajo pH y baja capacidad tamponante. El modo de acción de los ácidos orgánicos en la inhibición del crecimiento microbiano está relacionado con el mantenimiento del equilibrio ácido-base. Los sistemas biológicos y químicos dependen de la interacción entre los sistemas ácido-base. La célula microbiana normalmente refleja este equilibrio atendiendo al mantenimiento de un pH interno cercano a la neutralidad. Las proteínas, los ácidos nucleicos y fosfolípidos pueden ser alterados estructuralmente por los cambios de pH.

**Tabla 3.** Antimicrobianos utilizados en sistemas modelos a base de frutas (Raibaudi et. al., 2006).

Antimicrobiano	Sustrato	Efecto
Vainillina	Sistemas modelo de agar a base de frutas	Inhibición del la tasa de crecimiento de colonias de especies de <i>Aspergillus</i>
Eugenol, timol, mentol y eucaliptol	Cerezas	Inhibición del crecimiento de bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras
Carvacrol y ácido cinnámico	Melón fresco cortado y kiwi	Reducción de los recuentos de microorganismos viables en kiwi y extensión de la fase lag de la flora microbiana natural en melón
Aceite de mandarina, sidra, limón y lima	Ensalada de frutas	Aumento de la vida de anaquel y reducción del crecimiento microbiano
Metil jasmonato y etanol	Fresa fresca	Retraso del deterioro fúngico y aumento de la capacidad antioxidante
Hexanal	Manzanas frescas cortadas	Inhibición del crecimiento de bacterias aerobias mesófilas, psicrófilas, mohos y levaduras
Hexanal y trans-2 hexenal	Manzanas frescas cortadas	Extensión de la vida útil de la fruta por inhibición del crecimiento de la flora nativa y prolongación de la fase lag de levaduras inoculadas

### Compuestos fenólicos

Muchos compuestos fenólicos como los ácidos cafeico, clorogénico, p-coumárico o ferúlico están presentes en partes de plantas que son usadas como especias. La actividad antimicrobiana de esos y otros ácidos como hidroxicinámico y cinámico pueden retardar la invasión microbiana así como también la putrefacción de frutas y vegetales. Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, mohos y levaduras comúnmente encontradas como organismos contaminantes son sensibles a los derivados del ácido hidroxicinnámico. Los ácidos cafeico, ferúlico y p-cumárico, por ejemplo, inhiben *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus*. Otros compuestos fenólicos que han demostrado tener actividad antimicrobiana son los taninos y el ácido tánico. Este último por ejemplo

muestra actividad antibacteriana frente a *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. aureus*, *Aeromonas hydrophila* y *Enterococcus faecalis* (Beuchat, 2001; Burt, 2004).

Otros compuestos fenólicos como los flavonoles, típicamente presentes en frutas y en el té verde, también tienen actividad antibacteriana. Así, Puupponen et al. (2001) demostraron que la mircetina pura, inhibía el crecimiento de bacterias ácido lácticas procedentes de la microbiota del tracto gastrointestinal de humanos, pero no afectaba al crecimiento de *Salmonella*, mientras que extractos preparados directamente a partir de fresas, frambuesas y otras mostraban un fuerte efecto inhibidor frente a *Salmonella* y *E. coli* (Raibaudi et. al., 2006).

### **III.2.- Antimicrobianos de origen bacteriano**

El uso de los microorganismos y/o de sus productos naturales de forma empírica para la conservación de los alimentos (bioconservación) ha sido una práctica común en la historia de la humanidad (Ross et al., 2002). Los microorganismos producen una amplia variedad de sustancias antimicrobianas, bien sean de naturaleza peptídica o no. El grupo mejor estudiado en relación con la bioconservación de los alimentos han sido las bacterias del ácido láctico (BAL). Las BAL producen diversas sustancias antimicrobianas (tales como ácidos orgánicos, diacetilo, acetoina, peróxido de hidrógeno, reuterina, reuteriicina, péptidos antifúngicos, y bacteriocinas (Holzapfel et al., 1995; El-Ziney et al., 2000; Holtzel et al., 2000; Mgnusson y Schnürer, 2001).

#### **III.2.1.- Bacteriocinas**

Las bacteriocinas pueden definirse como proteínas o péptidos antimicrobianos sintetizados a nivel ribosómico (Jack et al., 1995). Las bacterias del ácido láctico (BAL) son capaces de producir diferentes bacteriocinas, la mayoría se pueden agrupar en una de las clases propuestas por Klaenhammer (1993).

La estructura, biosíntesis, y aspectos genéticos de las bacteriocinas producidas por las BAL han sido muy estudiadas (Cotter et al., 2005; Fimland et al., 2005; Drider et al., 2006; Franz et al., 2007; Beshkova y Frengova, 2012; Zhang et al., 2013a,

2013b). Las bacteriocinas producidas por las BAL ofrecen una serie de ventajas que las hacen interesantes para la conservación de alimentos:

- se consideran sustancias seguras
- carecen de toxicidad frente a las células eucariotas
- son generalmente tolerantes al pH y al calor moderado
- se inactivan por las proteasas digestivas
- tienen un espectro antimicrobiano relativamente amplio, frente bacterias patógenas y alterantes de alimentos
- actúan generalmente sobre la membrana citoplasmática bacteriana, por lo que no presentan resistencia cruzada con los antibióticos de uso común, y
- sus determinantes genéticos están generalmente localizados en plásmidos lo que facilita su manipulación genética.

Los numerosos estudios realizados indican que el uso de las bacteriocinas en la conservación de alimentos puede ofrecer varias ventajas (Thomas et al., 2000) tales como:

- prolongar la vida útil de los alimentos
- proporcionar una protección adicional en condiciones de abuso de temperatura
- disminuir el riesgo de transmisión de patógenos a través de la cadena alimentaria
- disminuir las pérdidas económicas debidas a las alteraciones del alimento
- reducir el uso de conservantes químicos
- aplicar tratamientos térmicos menos severos sin comprometer la seguridad del alimento, garantizando la conservación de sus nutrientes y vitaminas, así como las características organolépticas
- desarrollar nuevos tipos de alimentos (menos ácidos, con un contenido más bajo en sal, y con un mayor contenido en agua)
- satisfacer las nuevas demandas de la industria y de los consumidores.

Las bacteriocinas presentan una amplia diversidad en cuanto a su estructura, modos de acción, mecanismos de biosíntesis, autoinmunidad y regulación génica. Son consideradas como compuestos muy atractivos tanto para la industria alimentaria para

prevenir el deterioro y el crecimiento de bacterias patógenas en los alimentos, como para la industria farmacéutica en el control de patógenos.

### **III.2.1.1.-Clasificación de las bacteriocinas**

Inicialmente las bacteriocinas producidas por las BAL fueron clasificadas en cuatro clases principales de acuerdo a su estructura, propiedades fisicoquímicas y propiedades moleculares (Chen y Hoover, 2003). No obstante, la cuarta clase no está lo suficientemente fundamentada, por lo que en la actualidad se reconocen tres clases principales (Savadogo et al., 2006; De Vuyst y Leroy, 2007; Beshkova y Frengova, 2012).

#### **Clase I. Lantibióticos**

Los lantibióticos son péptidos pequeños que están formados por 19-38 aminoácidos (Savadogo et al., 2006; Montalbán-López et al., 2011), policíclicos, con un peso molecular menor a 5 kDa, con poca estabilidad al calor y son modificados postraduccionalmente por la deshidratación de la serina y la treonina formando aminoácidos como dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb). Estos residuos pueden unirse a través de un grupo tioéter a cadenas laterales de cisteína dando lugar a aminoácidos inusuales como lantionina (Lan) y  $\alpha$ -metil-lantionina (MeLan) (Riley y Wertz, 2002). Los lantibióticos son los únicos que se producen en el ribosoma como un prepeptido, que experimenta una modificación postraduccional para formar un péptido activo (McAuliffe et al., 2001).

Los lantibióticos se dividen a su vez en dos grupos, según sus características estructurales y su modo de acción frente a los microorganismos (Guder et al., 2000):

Clase Ia. Son péptidos elongados en forma de tornillos con moléculas anfipáticas, presentan un peso molecular menor a 4 kDa, flexibles, con carga neta positiva, cuya actividad antimicrobiana se debe a la destrucción de la célula por la despolarización de la membrana citoplasmática (Chen y Hoover, 2003; Stoyanova et al., 2012). La bacteriocina más representativa de este grupo es la nisina (Cintas et al., 2001).

Clase Ib. Son péptidos globulares e hidrófobos, con un peso molecular entre 1.8 y 2.1 kDa. Presentan una carga neta negativa o sin carga. Su actividad antimicrobiana está relacionada principalmente con la inhibición enzimática (Riley y Wertz, 2002). A este grupo pertenecen la duramicina A, B, C y la cinamisina (Naidu et al., 2006).

## **Clase II. No lantibióticos**

Los no lantibióticos están conformados por bacteriocinas constituidas por 30 a 60 aminoácidos (Montalbán-López et al., 2011), con un peso molecular menor a 10 kDa, no contienen aminoácidos modificados y son estables al calor y al pH (Beshkova y Frengova, 2012). Es el mayor subgrupo de bacteriocinas producidas por las BAL, no sólo por su gran número, sino también por su actividad antimicrobiana y sus aplicaciones.

Los no-lantibióticos son subdivididos a su vez en tres grupos:

Clase IIa. Se caracterizan por tener una secuencia amino terminal - Tirosina - Glicina - Asparagina - Glicina - Valina - Xaa - Cisteína (-Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-; donde Xaa indica cualquier residuo de aminoácido) y contienen uno o dos puentes disulfuro (Chen y Hoover, 2003). Tienen una alta actividad antimicrobiana frente a *Listeria* (Zouhir et al., 2010). Como ejemplos de bacteriocinas pertenecientes a este grupo podemos citar la pediocina PA-1, la enterocina A, o la divercina V41 (Chen y Hoover, 2003).

Clase IIb. Grupo está formado por bacteriocinas con dos péptidos. Su actividad antimicrobiana requiere de la presencia de ambos péptidos en proporciones similares (Oppegård et al., 2007), formando poros en la membrana celular. Una bacteriocina representativa de este grupo es la sakacina (Cintas et al., 2001).

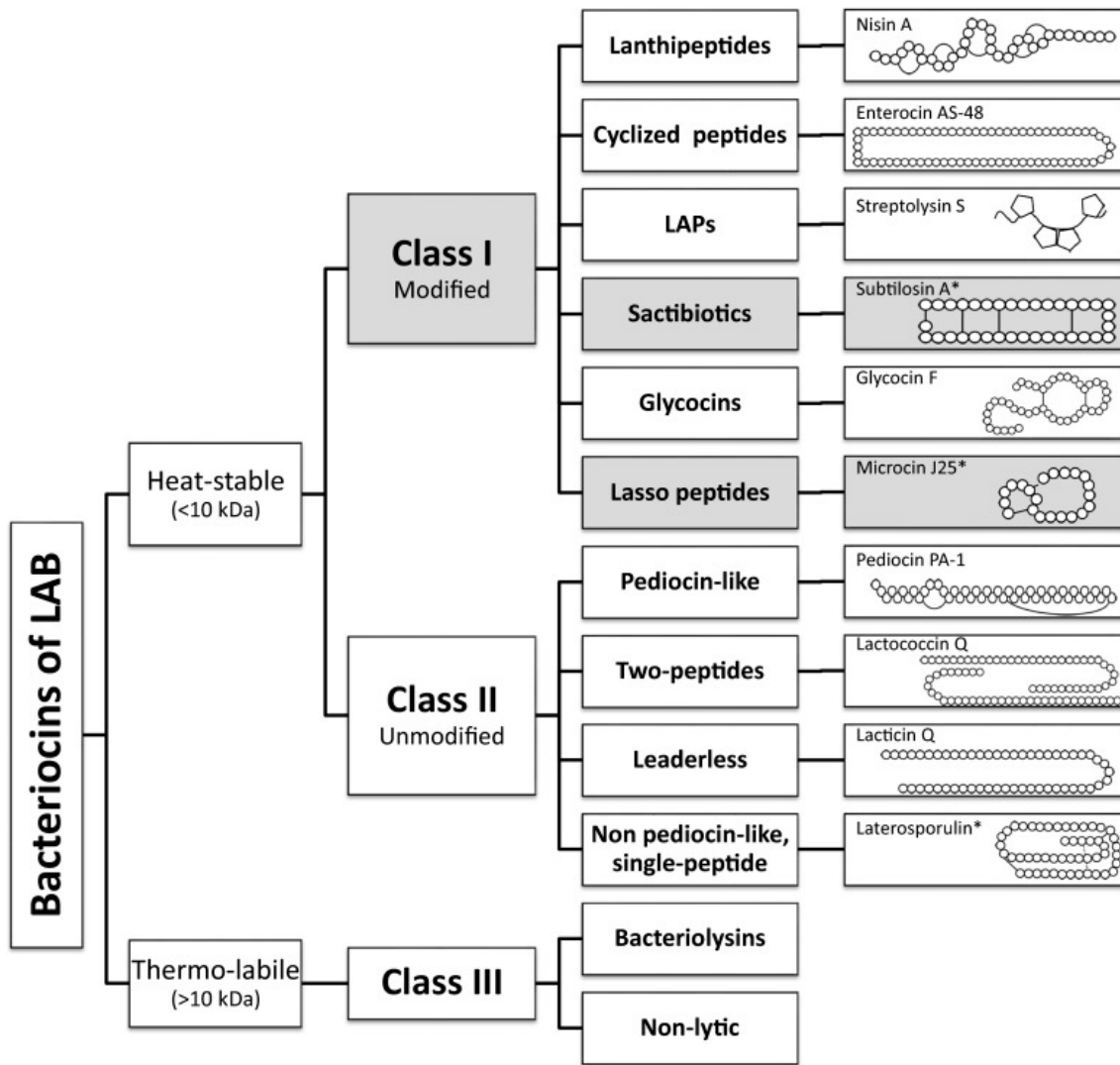
Clase IIc. Tienen estructura cíclica como consecuencia de la unión covalente de sus extremos carboxilo y amino terminal, son termoestables y no modificados después de la traducción (Šušková et al., 2010). Carecen de la secuencia amino terminal Tirosina - Glicina - Asparagina - Glicina - Valina - Xaa - Cisteína - que contienen la clase IIa y

Ib. La enterocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis* es la bacteriocina más representativa de este grupo (Dimov et al., 2005).

### **Clase III. Proteínas termolábiles**

Este grupo es denominado “bacteriolisinas”, incluye péptidos con un peso molecular mayor de 30 kDa y son lábiles al calor (Abriouel et al., 2011). Su mecanismo de acción se realiza a través de la hidrólisis de la pared celular de las células sensibles. Las bacteriolisinas más representativas son la helveticina J producida por *Lactobacillus helveticus* y la enterocina producida por *Enterococcus faecium* (Naidu et al., 2006).

Dentro de las diferentes clases de bacteriocinas (especialmente las de las clases I y II) se han propuesto diferentes subclases, atendiendo a las peculiaridades bioquímicas de cada una de ellas. Cabe destacar que esta clasificación va cambiando de forma continuada, a medida que se caracterizan nuevos péptidos con actividad antimicrobiana o se deduce su secuencia a partir del análisis *in silico* de los genomas bacterianos. A modo ilustrativo, en la Figura 2 se muestra una de las propuestas más recientes, que recoge la amplia variabilidad de bacteriocinas caracterizadas (Alvarez-Sieiro et al., 2016).



**Figura 2.** Esquema de clasificación de las bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas (BAL) propuesto por Alvarez-Sieiro et al. (2016). Las subclases identificadas mediante estudios *in silico* están sombreadas en gris. El asterisco indica bacteriocinas producidas por bacterias fuera del grupo láctico.

### **III.2.1.2.- Aplicación de las bacteriocinas en alimentos: Ventajas e inconvenientes**

La eficacia de las bacteriocinas en los alimentos va a depender de un gran número de factores, muchos de ellos implican la interacción con los componentes del alimento, la precipitación, la inactivación, o la distribución desigual de las moléculas de bacteriocina en la matriz del alimento. Los alimentos son ecosistemas complejos que pueden llegar a contener una gran variedad de microorganismos, dependiendo de estos los podemos dividir desde el punto de vista comercial en alimentos estériles, crudos o fermentados. En los alimentos estériles, los microorganismos contaminantes pueden proliferar fácilmente debido a la carencia de competidores, en estos la eficacia de las bacteriocinas dependerá directamente de la carga microbiana del contaminante, y se necesitará una concentración mayor de bacteriocina para inactivar un mayor número de células diana. En alimentos crudos, la microbiota autóctona puede interactuar con el desarrollo de patógenos y puede disminuir la eficacia de las bacteriocinas debido a la presencia de bacterias resistentes (tales como Gram-negativas) y/o la producción de enzimas (como las proteasas). Además, la bacteriocina puede no actuar siempre frente al grupo bacteriano deseado, pudiendo inactivar por ejemplo bacterias responsables de la fermentación del alimento perjudicando a este. En alimentos procesados, los microorganismos se pueden encontrar también en una gran variedad de estados fisiológicos, que pueden influir claramente en la sensibilidad a las bacteriocinas. Las endosporas presentes en los alimentos pueden ser resistentes a las bacteriocinas, aunque los tratamientos de procesado pueden activar la germinación, aumentando su sensibilidad. La eficacia de las bacteriocinas en los alimentos va a depender sobre todo de la composición microbiana del alimento y del estado fisiológico de su microbiota. También hay que considerar que los microorganismos no se distribuyen uniformemente en el alimento, sino que tienden a formar microcolonias en los alimentos sólidos, o a formar biopelículas en la superficie del alimento y sobre las paredes de los envases. Estas biopelículas pueden afectar a la eficacia de las bacteriocinas y de las sustancias antimicrobianas usadas en la industria alimentaria (Kumar y Anand, 1998).

Las bacteriocinas se pueden utilizar conjuntamente con otros tratamientos para aumentar su efecto antimicrobiano. La elección de tratamientos a aplicar va a depender sobre todo del tipo de alimento y de su composición microbiana. Este punto debe ser considerado cuidadosamente, puesto que en general cada tratamiento puede ejercer

diversos efectos sobre los miembros de la comunidad microbiana. Por ejemplo la eliminación de algunos miembros de la población microbiana puede proporcionar un ambiente más favorable para otros, debido a la falta de competencia. La interacción entre factores antimicrobianos puede modificar también el espectro de acción. Por ejemplo, las bacterias Gram-negativas pueden ser sensibles a las bacteriocinas en combinación con otros agentes que desestabilicen la membrana externa.

Como hemos podido ver, las bacteriocinas son excelentes candidatas para el control de microorganismos patógenos presentes en la industria alimentaria; ya sea como bioconservantes, cuyo principal ejemplo es la nisina, o como desinfectantes. Se puede decir que las bacteriocinas cíclicas presentan importantes ventajas frente a las bacteriocinas lineales debido a su mayor estabilidad, que les permite estar protegidas de la degradación por exopeptidasas. Otra característica que les proporciona una gran ventaja es su resistencia natural a un amplio rango de pH y temperatura. Por lo que el principal objetivo de la ingeniería de proteínas es generar moléculas con nuevas o mejoradas características, para posibles aplicaciones químicas, farmacéuticas o alimentarias.

Actualmente existe un gran interés en la industria alimentaria por encontrar nuevas sustancias y métodos de conservación de alimentos que permitan responder a las necesidades de mercado, comercializando nuevos productos conservados de una forma más natural. Del mismo modo la aparición de cepas resistentes a múltiples antibióticos y biocidas usados de forma común como desinfectantes, provoca una gran necesidad de nuevos mecanismos de desinfección que nos permitan reducir las dosis de dichos compuestos, utilizando productos naturales como las bacteriocinas, para evitar la aparición de dichas resistencias.

Por otro lado, existen algunas desventajas para la aplicación de las bacteriocinas, como son el desarrollo de resistencias a las bacteriocinas, o la formación de biofilms (Gravesen et al., 2002). Otra desventaja es la producción de metabolitos (Nilsson et al., 1999; Yamazaki et al., 2005) que pueden afectar al sabor y la textura del alimento, cuando se utilizan a altas dosis. Sin embargo, actualmente el principal inconveniente es el alto coste de producción, que sigue siendo un obstáculo para el uso de bacteriocinas

como conservante alimentario o desinfectante, por ello la combinación de las bacteriocinas con otros tratamientos minimizaría en parte la cantidad necesaria de esta.

Por tanto, las bacteriocinas son buenas candidatas para afrontar estos nuevos retos, en la industria alimentaria. Es importante estudiar en profundidad los mecanismos de acción y producción de dichas bacteriocinas en ambos niveles de conservación para poder así optimizar nuevos métodos seguros que nos permitan disminuir los riesgos de contaminación en la industria y los riesgos en la salud de los consumidores. Así pues, debemos investigar las imitaciones de dichas sustancias a la hora de ser utilizadas en la industria.

### **III.2.1.3.-La Enterocina AS-48**

La enterocina AS-48 es un péptido antimicrobiano extensamente caracterizado en cuanto a su composición, estructura, mecanismos de acción, determinantes genéticos, y aplicaciones en alimentos (Abriouel et al., 2010; Grande-Burgos et al., 2014; Maqueda et al., 2004). Se trata de una bacteriocina producida por *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48 (Gálvez, 1984; Gálvez et al., 1986). Es una bacteriocina circular producida por cepas procedentes de muestras clínicas (Gálvez et al., 1986; Tomita et al., 1997) y de alimentos, como la leche y quesos tradicionales (Folli et al., 2003; Joosten et al., 1996; Maisnier-Patin et al., 1996; Maqueda et al., 1998; Huang et al., 2013). La enterocina AS-48 ha sido publicada bajo diferentes nombres como enterocina EFS2 (Maisnier-Patin et al., 1996), enterocina 4 (Joosten et al., 1996), bacteriocina 21 (Tomita et al., 1997) producidas por cepas de *E. faecalis*, o la bacteriocina 7C5 producida por *E. faecium* 7C5 (Folli et al., 2003). En los últimos años se han descrito variantes naturales de la enterocina AS-48 producidas por diferentes especies bacterianas, con pequeñas diferencias en cuanto a la composición aminoacídica, niveles de producción, y localización de los genes codificadores. Una de las variantes de la enterocina AS-48, la enterocina AS-48RJ, difiere en un aminoácido y proviene de una cepa de *Enterococcus faecium* aislada de queso de cabra casero (Abriouel et al., 2005).

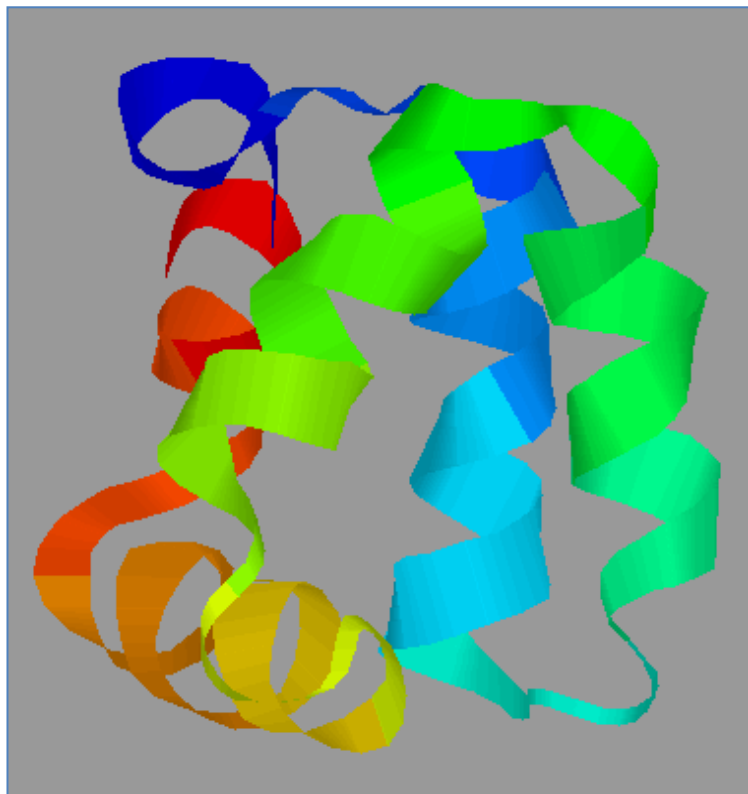
La enterocina AS-48 se libera al medio en cultivos líquidos, tanto en fase exponencial como estacionaria, lo que indica que se produce durante el metabolismo

celular primario (Gálvez et al., 1986). Para su producción se ha diseñado un medio de cultivo con el que se consigue la producción óptima de la bacteriocina, los mayores títulos de AS-48 se obtienen cuando la cepa productora se cultiva en medios suplementados con infusión de cerebro-corazón, glucosa y trazas de sulfato magnésico, a 37°C (Gálvez et al., 1986; Abriouel et al., 2003). Posteriormente se realiza una purificación rápida en dos etapas, una cromatografía de intercambio catiónico seguido de una cromatografía de alto rendimiento de fase inversa (Gálvez et al., 1989, Abriouel et al., 2003). La enterocina AS-48 también puede obtenerse sobre subproductos de la industria alimentaria económicos como por ejemplo el suero de leche, lo que abre el camino para una producción a escala industrial de preparados de bacteriocinas que puedan ser utilizados como aditivos alimentarios (Ananou et al., 2008). Los parámetros críticos para la producción óptima de enterocina AS-48 en este medio son la estabilización del pH a 6,55 y la concentración de glucosa al 1% (Kawai et al., 2001).

La actividad de la bacteriocina se expresa en unidades arbitrarias (UA) frente a la cepa indicadora *E. faecalis* S-47 (UAS-47). Bajo condiciones óptimas de fermentación, se pueden producir hasta 360 UAS-47/ml (lo que equivale a 104 µg de bacteriocina por ml) después de 18 h de cultivo. Los niveles de bacteriocina producida se mantienen estables hasta las 20 h, lo cual es una ventaja adicional ya que proporciona un margen amplio para la incubación en caldos de cultivo y la recuperación posterior de la bacteriocina. También se puede obtener en polvo mediante secado lo que facilita su aplicación en alimentos (Ananou et al., 2010).

El análisis de la composición aminoacídica muestra una alta proporción de aminoácidos básicos, lo que justifica su carácter fuertemente catiónico (pI = 10.5). Además, contiene una gran cantidad de residuos hidrofóbicos (Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu y Phe) y de aminoácidos hidrofílicos sin carga neta (Ser, Gly, Thr, y Tyr) (Gálvez et al., 1989a). La enterocina AS-48 tiene 70 residuos de aminoácidos en total (Samyn et al., 1994). La concentración de unos y de otros en sendas zonas de la molécula le confiere un carácter anfipático, lo que está de acuerdo con su mecanismo de acción. Tiene una masa molecular de 7,14 kDa y un pI de 10,09. El análisis de los determinantes genéticos para la producción de bacteriocina indicó que el gen estructural de la enterocina AS-48 codifica para un prepeptido de 105 aminoácidos, que se procesa por la eliminación de un péptido señal de 35 aminoácidos (Martínez-Bueno et al.,

1994). Una característica peculiar de la enterocina AS-48 es que sus extremos N- y C-terminales están unidos por un enlace peptídico formado entre la metionina N-terminal (Met1) y el triptófano C-terminal (Trp70), dando una estructura circular (Samyn et al., 1994) (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura de la enterocina AS-48 obtenida mediante el programa RasMol a partir del fichero de coordenadas generado mediante RMN.

En el momento de su caracterización molecular, fue la primera bacteriocina descrita con estructura circular. La carnociclina A de *Carnobacterium maltaromaticum* y la uberolisina A de *Streptococcus uberis* tienen una estructura similar a la enterocina AS 48, aunque tienen una baja identidad de secuencia (Gabrielsen et al., 2014). La molécula se encuentra plegada en cinco hélices alfa conectadas por cortas regiones de giro que encierran un núcleo compacto hidrofóbico (Langdon et al., 1998; González et al., 2000). La unión de cabeza a cola se encuentra en el centro de la hélice 5, y tiene un efecto pronunciado sobre la estabilidad de la estructura tridimensional de la molécula. Su secuencia de aminoácidos revela una distribución altamente asimétrica de cargas

positivas, ya que los 10 residuos de aminoácidos básicos encontrados en la molécula están contenidos en un segmento de 26 residuos de un total de 70. Por lo tanto, esta región tiene el potencial electrostático más alto. La circularidad y el plegado compacto confieren a las moléculas de enterocina AS-48 una notable estabilidad a situaciones extremas de pH, calor y agentes desnaturalizantes. Este es el primer ejemplo de modificación postraducciona de un péptido, que da lugar a una molécula con estructura cíclica, surgida de la unión de los residuos situados en ambos extremos, tras la separación del péptido señal (Samyn et al., 1994). Esta organización da lugar a una fuerte acumulación de cargas positivas en una zona superficial de la proteína, lo que se considera determinante de su actividad formadora de poros en las membranas bacterianas (González et al., 2000). La estructura global de AS-48 aparece muy compacta, con las cadenas laterales hidrofóbicas de las hélices formando el corazón de la proteína.

La estabilidad que le confiere la forma circular y el plegamiento de la molécula es una ventaja para la aplicación de la enterocina AS-48 en los sistemas alimentarios. Además, la enterocina AS-48 puede degradarse por las proteasas del tracto intestinal (tripsina, pepsina), disminuyendo teóricamente su posible impacto en la microbiota intestinal por las moléculas de bacteriocina ingeridas junto con los alimentos. Por el contrario, es resistente a carboxipeptidasas y aminopeptidasas (Montalbán et al., 2008).

Las primeras investigaciones sobre los aspectos genéticos de AS-48 pusieron de manifiesto la localización de sus determinantes genéticos en un plásmido conjugativo de 68 kb, que responde a feromonas, denominado pMB2 (Martínez-Bueno et al., 1990), el cual es responsable tanto de la producción del péptido como de la resistencia frente al mismo. El posterior estudio de este plásmido ha permitido localizar y secuenciar el gen estructural, *as-48A* (Martínez-Bueno et al., 1994; Fernández et al., 2007) y una serie de 9 genes situados corriente debajo de éste, *as-48B*, *as-48C*, *as-48C1*, *as-48D*, *as-48D1*, *as-48E*, *as-48F*, *as-48G* y *as-48H* relacionados con la producción y/o la resistencia frente a AS-48 (Martínez-Bueno et al., 1998; Díaz-Torres, 1999; Díaz et al., 2003; Maqueda et al., 2009). El clúster de genes para la producción de enterocina AS-48 se ha clonado en varias cepas de bacterias lácticas (BAL) de los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Fernández et al., 2007). Tanto la producción de bacteriocina como la inmunidad se expresaron satisfactoriamente en hospedadores de

*Enterococcus*. Sin embargo, no se detectó producción de bacteriocina en lactococos o lactobacilos, aunque siempre se detectó la expresión de un nivel parcial de resistencia contra AS-48. Las proteínas de fusión de formas lineales o permutadas de la enterocina AS-48 se pueden expresar en *E. coli*, pero muestran una fuerte tendencia a agregarse. Se ha demostrado que los fragmentos híbridos de proteínas de fusión recuperados después de la escisión no específica con enteroquinasa y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), tenían actividad anti-*Listeria* (Montalbán-López et al., 2011).

### **Espectro inhibitor de la enterocina AS-48**

Se ha demostrado que la enterocina AS-48 tiene actividad antibacteriana pero no frente a levaduras y mohos u otras células eucariotas. La adición de bacteriocina no causó ningún efecto sobre células intactas de *Sacharomyces cerevisiae* o las amebas *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba*. La concentración de bacteriocina necesaria para inducir cambios morfológicos parciales (visibles bajo un microscopio) en una línea celular Vero (100 µg/ml) fue excesivamente mayor que la concentración inhibitoria para la mayoría de las bacterias (entre 1,5 y 10 µg / ml). Sin embargo, un estudio publicado recientemente ha descrito que esta bacteriocina tiene actividad leishmanicida, actuando tanto a nivel de la membrana plasmática como a nivel intracelular, afectando a las mitocondrias (Abengózar e al., 2017).

La enterocina AS-48 tiene efecto bactericida sobre la gran mayoría de las bacterias Gram-positivas ensayadas, siendo especialmente sensibles ciertas cepas de *Enterococcus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Planococcus* (Gálvez, 1987; Gálvez et al., 1985, 1989b). Así mismo, es interesante resaltar la actividad de AS-48 frente a bacterias patógenas y/o alterantes transmitidas por alimentos, como *L. monocytogenes* (Mendoza et al., 1999; Cobo Molinos et al., 2005), *B. cereus* (Abriouel et al., 2002; Muñoz et al., 2004; Grande Burgos et al., 2009; Martínez Viedma et al., 2009; Cobo Molinos et al., 2008) y *S. aureus* (Grande Burgos et al., 2007; Martínez Viedma et al., 2009). La adición de concentraciones bajas de enterocina AS-48 a cultivos exponenciales de todas estas cepas disminuyó el crecimiento y la presencia de células viables. Además, la ausencia de turbidez en muchos casos, tras la adición de la enterocina AS-48, indican su acción bacteriolítica. Las bacterias con ácidos micólicos en sus paredes celulares (*Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia*) son altamente

sensibles a la enterocina AS-48. Las especies del género *Listeria* también son sensibles a la enterocina AS-48. *L. monocytogenes* se inhibe en medio líquido con una concentración de bacteriocina de tan solo 0,1 µg/ml. *Brochothrix thermosphacta* y las bacterias lácticas (pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*) también son sensibles a la bacteriocina. Las bacterias formadoras de endosporas aerobias o anaerobias facultativas (*B. cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus* spp., *Bacillus licheniformis*, *Bacillus macroides*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Alicyclobacillus acidocaldarius* y *Geobacillus stearothermophilus*), así como las anaerobias formadoras de endosporas (*Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes* y *Clostridium tetani*) también son sensibles a la bacteriocina. Cuando se ensayó la efectividad de la enterocina frente a las endosporas de *B. cereus*, no se vió afectada la viabilidad de estas al incubarlas con una concentración de 50 µg/ml de bacteriocina durante 3 h, lo que indica que las endosporas son resistentes a la bacteriocina (Abriouel et al., 2002).

Aunque AS-48 afecta también a diversas especies de bacterias Gram-negativas, éstas son mucho menos sensibles debido al efecto protector de la membrana externa (Gálvez et al., 1989b; Abriouel et al., 1998). Las especies más sensibles son *Myxococcus*, *E. coli* y *Rhizobium*. Las cepas de *Myxococcus* son las únicas bacterias Gram-negativas que se lisan después de la adición de bacteriocina a concentraciones similares a las utilizadas para inhibir las bacterias Gram-positivas. Otras bacterias Gram-negativas como *Agrobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* y *Klebsiella*, fueron menos sensibles, necesitándose concentraciones altas de bacteriocina para su inhibición (por encima de 100 µg/ml), y ninguna de ellas fue lisada. El empleo de tratamientos combinados de enterocina AS-48 con calor subletal, quelatos (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o tripolifosfato), campos eléctricos pulsados de alta intensidad (HIPEF), o alta presión hidrostática, pueden aumentar la actividad frente a bacterias Gram-negativas como *S. enterica* (Abriouel et al., 1998; Martínez Viedma et al., 2008; Cobo Molinos et al., 2008; Ananou et al., 2010) y *E. coli* O157:H7 (Ananou et al., 2005b; Cobo Molinos et al., 2008).

Dado el potencial tecnológico de esta bacteriocina como bioconservante, su eficacia ha sido comprobada en diversos sistemas alimentarios tales como productos cárnicos (para controlar *L. monocytogenes* y *S. aureus*; Ananou et al., 2005a,c), leche y

queso (frente a *B. cereus* y *S. aureus*; Muñoz et al., 2005, 2007), y en alimentos de origen vegetal para controlar *L. monocytogenes* (Cobo Molinos et al., 2005) así como en zumo de manzana en combinación con otras barreras para controlar *E. coli* (Ananou et al., 2005c). La actividad frente a *S. aureus* se vio incrementada *in vitro* en combinación con diversos conservantes químicos, en especial los ácidos orgánicos y el tripolifosfato sódico (Ananou et al., 2007; Martínez Viedma et al., 2009). En el caso de las endosporas de *B. cereus* en arroz, la actividad de la bacteriocina se vio potenciada al combinarla con tratamientos de calor (Grande et al., 2006). Este efecto combinado de la enterocina AS-48 y los tratamientos térmicos fue corroborado en *Bacillus licheniformis*. Cuando las endosporas de *B. licheniformis* inoculadas en una sidra comercial de manzana fueron sometidas a tratamiento térmico en presencia de enterocina AS-48, los recuentos de células viables disminuyeron en proporción al tratamiento térmico (85 a 95 °C durante 1 a 6 min) y la bacteriocina, no detectándose supervivientes después de los tratamientos a 95°C durante 4 min y 6 µg/ml de bacteriocina o 1 min y 12 µg/ml de enterocina AS-48 (Grande et al., 2006). La combinación de tratamientos con la enterocina AS48 y alta presión hidrostática es efectiva frente a bacterias Gram-positivas como *S. aureus* en arroz (Pérez Pulido et al., 2012) o *Leuconostoc* en la chirimoya (Toledo del Árbol et al., 2016).

Aunque se han estudiado muchas bacteriocinas para la inactivación de patógenos transmitidos por los alimentos en estado planctónico, sólo unos pocos estudios han explorado la posibilidad de utilizar bacteriocinas o sus subproductos frente a bacterias sésiles (Ammor et al., 2006; Bower, et al., 1995; Kumar et al., 2009; Leriche et al., 1999; Minei et al., 2008; Winkelströter et al., 2011; Zhao et al., 2004). La Nisina y Sakacia 1 redujeron la adherencia de *L. monocytogenes* a sílice y a superficies de acero inoxidable, respectivamente (Bower et al., 1995; Winkelströter et al., 2011). La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas puede mejorarse al combinarlas con otras sustancias antimicrobianas, pero hay pocos estudios que hayan demostrado sinergia entre bacteriocinas y desinfectantes o biocidas. La bacteriocina PsVP-10 de *Pseudomonas* es capaz de actuar sinérgicamente con la clorexidina y triclosán frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en estado planctónico, así como en biofilms (Lobos et al., 2009). Otra bacteriocina, la enterocina AS-48 potencia su actividad frente a *L. monocytogenes* al combinarla con una variedad de biocidas (Caballero Gómez et al., 2012).

La combinación de compuestos antimicrobianos y bacteriocinas pueden mejorar considerablemente la inactivación de bacterias patógenas o toxicogénicas en los sistemas alimentarios, incluyendo *S. aureus*. En estudios anteriores, se demostró que la adición de compuestos fenólicos junto con la enterocina AS-48 mejora significativamente la inactivación de *S. aureus* CECT 976 en salsas (Grande et al., 2007). Entre ellos, el ácido hidrocínámico y el carvacrol fueron los que mostraron los mejores resultados al combinarlos con la enterocina AS-48 (Grande et al., 2007). Otro estudio demostró que la enterocina AS-48 actuó sinérgicamente con el compuesto antimicrobiano 2-nitro-1-Propanol (2NPOH) en bebidas y en salsas (Grande et al., 2007). Sin embargo, también se observó que la eficacia de la bacteriocina y los tratamientos frente a *S. aureus* CECT 976 dependían en gran medida tipo de alimento. Por esta razón, la eficacia de los tratamientos combinados deberá ser evaluada para cada sustrato o alimento específico.

Como hemos comentado, la enterocin AS-48 es un péptido antimicrobiano cíclico de gran interés para su aplicación en la conservación de los alimentos (Abriouel et al., 2010; Grande-Burgos et al., 2014; Maqueda et al., 2004) frente a patógenos de origen alimentario, tanto en cultivos líquidos como en alimentos (Abriouel et al., 2010) sin embargo, la actividad frente a algunas bacterias es limitada, con lo que se puede pensar en combinarla con otros tratamientos para mejorar su actividad y así poder minimizar por ejemplo los efectos secundarios de otros tipos de tratamientos químicos.

### **III.2.2.- Péptidos antimicrobianos de síntesis no ribosómica**

A diferencia de las bacteriocinas, que se producen mediante síntesis ribosómica, en la naturaleza existe un amplio grupo de péptidos antimicrobianos de síntesis no ribosómica (también conocidos como antibióticos polipeptídicos). La mayoría son producidos por especies del grupo de *Bacillus*, y suelen contener una parte lipídica (lipopéptidos). La polimixina B es un antibiótico polipeptídico producido por *Paenibacillus polymyxa*. Su espectro de acción se limita a las bacterias Gram-negativas. El mecanismo de acción de la polimixina B se basa en la permeabilización de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas mediante unión al lípido A (Horton y Pankey, 1982; Velkov et al., 2010). Esta unión destruye las membranas bacterianas mediante un efecto detergente, aumentando la permeabilidad de la membrana lo que se

traduce en muerte celular. La polimixina B es bactericida frente a la mayor parte de bacterias Gram-negativas, aunque algunos *Proteus* y *Serratia* pueden ser resistentes. Los microorganismos generalmente susceptibles a polimixina B son *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*. Hoy día la polimixina B se utiliza en raras ocasiones debido a su potencial nefrotóxico; sólo se utiliza por vía oftálmica, ótica o tópica o en combinación con otros antibióticos. Los efectos nefrotóxicos contrarrestan su potencial uso como antimicrobiano alternativo en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias multirresistentes.

Ya que las polimixinas son péptidos catiónicos cíclicos activos frente a bacterias Gram-negativas gracias a su actividad detergente sobre la membrana externa y la membrana citoplasmática (Horton y Pankey, 1982), cabría pensar que las polimixinas puedan mejorar la actividad de las bacteriocinas frente a bacterias Gram-negativas. En un estudio reciente, se demostró que la actividad de la polimixina E frente a *E. coli* aumentó al combinarla con bacteriocinas como la nisina o la pediocina PA-1 (Naghmouchi et al., 2011). Si bien no existen estudios previos sobre la combinación de polimixina B con enterocina AS-48, cabría esperar también un incremento de la actividad de ambas frente a bacterias Gram-negativas. Gracias al efecto permeabilizante de la polimixina B, se podría aumentar también la actividad de otros antimicrobianos, como por ejemplo los biocidas.

#### **IV.-RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES**

En la actualidad existen diversas técnicas para prolongar la vida útil de los alimentos frescos, mínimamente procesados y procesados. Entre estas tecnologías destaca el desarrollo y uso de recubrimientos comestibles que contienen sustancias antimicrobianas que evitan la presencia de patógenos que pueden transmitirse por los alimentos.

La utilización de recubrimientos comestibles se empezó a aplicar a principios del siglo XII, recubriendo de ceras las frutas con el fin de mantenerlas más tiempo (Krochta y Mulder-Johnston, 1997). Posteriormente en China también se aplicó para

mantener estables limones y naranjas. En 1930 se utilizaron en otras frutas como manzanas y peras. Lowings y Cutts en 1982, describieron el primer material comestible, no tóxico, insípido, inodoro y eficaz para aumentar la vida útil de frutas y verduras.

Los recubrimientos comestibles se definen como matrices continuas o capas delgadas de materiales comestibles (tales como proteínas, polisacáridos y lípidos) aplicadas a la superficie del producto alimentario formando una película (Cagri et al., 2004; Dhall, 2013), con el fin de controlar la transferencia de agua, gases como oxígeno y dióxido de carbono, controlar la tasa de crecimiento microbiano y conservar las características organolépticas de los productos (Smith et al., 1987; Nisperos-Carriedo et al., 1992a; Guilbert et al., 1996; Lerdthanangkul y Krochta, 1996; Avena - Bustillos et al., 1997; McHugh y Senesi, 2000). Se aplican directamente en la superficie del alimento por inmersión, rociado, aspersión o cepillado, para crear una atmósfera modificada (Guilbert et al., 1996, Krochta y Mulder - Johnston, 1997; McHugh y Senesi, 2000). Ya que el alimento se va a consumir, el material que se utilice para el recubrimiento debe considerarse como seguro para su consumo (GRAS), debe proporcionar un valor añadido al producto, (Park et al., 1994, Krochta y Mulder-Johnston, 1997; Baldwin et al., 2012), y estar autorizado para uso en alimentos en las condiciones especificadas en las normativas para productos alimentarios (Guilbert et al., 1996).

El recubrimiento ideal se define como aquel que es capaz de prolongar la vida de almacenamiento del alimento sin causar modificaciones en este ni afectar a su calidad. Inicialmente, se utilizaban para evitar la pérdida de agua por parte del alimento, pero actualmente debido a la existencia de diferentes fórmulas de recubrimientos y a la capacidad de estos se ha ampliado el potencial de aplicación en los alimentos (Avena-Bustillos et al., 1994; Park et al., 1994). Por ejemplo los recubrimientos en determinadas frutas pueden mejorar las características nutritivas del producto, con lo que aumenta el valor de estas en el mercado (McHugh y Senesi, 2000). El efecto de los recubrimientos en las frutas y hortalizas depende de la temperatura, alcalinidad, espesor y tipo de revestimiento, así como de la variedad y condición de las frutas y hortalizas (Park et al., 1994). Además, los recubrimientos van a disminuir los daños mecánicos,

físicos y químicos que genera el medio ambiente al producto. Su uso en los diferentes alimentos (Tabla 4) viene condicionados por:

**Tabla 4.** Parámetros del uso de recubrimientos en alimentos (Rojas-Grau, 2009).

PARÁMETRO
Coste
Disponibilidad
Funcionalidad
Propiedades mecánicas (flexibilidad y tensión)
Propiedades ópticas (brillo y opacidad)
Barrera contra flujo de gases
Aceptabilidad sensorial
Resistencia estructural contra el agua
Resistencia estructural contra los microorganismos

Las características del material utilizado van a depender de las condiciones en las que se elaboran los recubrimientos, y el tipo y concentración de aditivos. Estos aditivos son agregados en el proceso de elaboración de los recubrimientos y pueden ser agentes antioxidantes, antimicrobianos, aromatizantes, pigmentos o nutrientes (Pascall y Lin, 2013).

Los recubrimientos usados en la industria de alimentos deben cumplir con una serie de características ideales (Tabla 5). Es difícil encontrar uno que cumpla con todas las características mencionadas en la tabla, pero, la diversidad de componentes y alimentos hacen posible diferentes combinaciones entre ellos y que cada día aparezcan nuevos recubrimientos combinando diferentes técnicas de conservación alimentaria.

**Tabla 5.** Características ideales de los recubrimientos empleados en la industria alimentaria (Arvanitoyannis y Gorris, 1999; Baldwin et al., 2012).

CARACTERÍSTICAS IDEALES DE LOS RECUBRIMIENTOS
Secar rápidamente
No producir espuma
Ser resistente al agua
No agrietarse, decolorarse o caerse durante la manipulación
No reaccionar de manera adversa con los alimentos
No modificar la calidad del producto
Permitir el paso de gases como oxígeno o dióxido de carbono
Durante el almacenamiento no fermentar, coagular, separarse o desarrollar sabores desagradables en el alimento
Debe derretirse por encima de 40°C sin descomposición.
Debe tener baja viscosidad y ser económico

#### **IV.1.-Tipos de recubrimientos**

Los recubrimientos comestibles pueden estar compuestos por diferentes sustratos producidos en la industria alimentaria. Pueden estar compuestos de polisacáridos tales como almidón, alginato, goma xantana, celulosa, quitosano, y carragenanos, o por proteínas tales como proteína de suero, proteína de soja, o de maíz entre otros (Cagri et al., 2004; Cha y Chinnan, 2004; De Azevedo, 2012; Dhall, 2013; Kuorwel et al., 2011; Lin y Zhao, 2007) (Tabla 6). Los polisacáridos, las proteínas y los lípidos son los tres principales ingredientes poliméricos usados en los alimentos. En muchos casos se mezclan dos o más materiales con el fin de obtener un producto de mejor calidad. Los polisacáridos son hidrofílicos y debido a sus propiedades químicas constituyen una barrera muy eficiente frente al oxígeno, pero deficiente frente a la humedad. Los lípidos proporcionan una buena barrera frente a la humedad debido a su naturaleza hidrofóbica, pero tienen propiedades mecánicas deficientes. Los recubrimientos de proteínas son también hidrofílicos, y tienen una buena resistencia mecánica (Pascall y Lin, 2013).

El quitosano tiene excelentes capacidades para formar películas con propiedades antimicrobianas y se ha utilizado con gran éxito para controlar la calidad comercial de

frutas y vegetales (Lin y Zhao, 2007), incluyendo las rodajas de manzana (Qi et al., 2011). La pectina es una sustancia soluble que se encuentra en muchos tejidos vegetales. Los recubrimientos comestibles obtenidos a partir de pectina y sus derivados tienen gran interés en aplicaciones relacionadas con la alimentación por sus propiedades mecánicas, ya que generan un efecto barrera frente al transporte de gases. También se pueden obtener recubrimientos con diversas propiedades funcionales adicionando sustancias encapsuladas o como parte de la matriz. Se utilizan actualmente en frutas y verduras frescas o mínimamente procesadas (Ciolacu et al., 2014; Valdés et al., 2015).

La goma xantana es un polisacárido de origen microbiano que se ha utilizado eficazmente para la conservación de los melocotones mínimamente procesados (Pizato et al., 2013) y también como conservante aplicado en manzanas frescas (Rodrigues-Freitas et al., 2013). La carboximetilcelulosa es otro polímero con efectos beneficiosos, utilizado para retrasar la maduración de diferentes frutas (Meheriuk y Lau, 1988; Sayanjali et al., 2011). El alginato sódico posee propiedades físicas y biológicas, tales como la retención de humedad, tiene capacidad de gelificación y buena biocompatibilidad (Pei et al., 2008). El caseinato, un material a base de proteínas de la leche, se ha ensayado en diferentes frutas y hortalizas incluyendo manzanas y patatas (Letien et al., 2001) para controlar la respiración poscosecha.

**Tabla 6.** Principales materias primas utilizadas en películas comestibles (Cagri et al., 2004).

MATERIAS PRIMAS		
Caseína	Gluten de trigo	Celulosa
Colágeno	Proteína de suero de leche	Almidón
Zeína de maíz	Proteína de soja	Quitosano
Gelatina	Alginatos	

## **IV.2.-Aplicaciones en alimentos**

Como ya hemos comentado anteriormente los recubrimientos comestibles no son un invento nuevo, se han aplicado desde hace años, pero cada vez son más los alimentos sobre los que se aplican, así como los fines para su utilización. Actualmente existen muchos estudios de nuevos componentes, nuevas mezclas y aplicaciones, con lo que hace que la utilización de los recubrimientos como técnica de conservación en alimentos esté de actualidad. (Kokoszka y Lenart, 2007; Ramos et al., 2012; Marquez et al., 2017).

Los alimentos de origen animal proporcionan un ambiente adecuado para el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes, el uso de recubrimientos comestibles es una opción prometedora para conservar productos cárnicos tanto crudos como procesados (Sánchez Ortega et al., 2014). Se han estudiado recubrimientos con quitosano como conservantes en salami, o hamburguesas de cerdo, para controlar la microbiota (Moreira et al., 2011). A modo de ejemplo, en otro ensayo se evaluó la actividad del recubrimiento de quitosano con aceite de girasol, observándose un descenso en el recuento de microorganismo comparado con las hamburguesas de cerdo sin recubrimiento y las hamburguesas solo con quitosano (Vargas et al., 2011).

En productos de panadería como son galletas, cereales o bocadillos, también se han ensayado recubrimientos de polisacáridos para controlar la humedad y mantener la textura crujiente (Baldwin et al., 2012). La metilcelulosa y la hidroxipropilmetil celulosa se han utilizado también como recubrimientos para reducir la absorción de aceite en discos de masa de trigo para hornear, siendo más eficaz la metilcelulosa (García et al., 2002).

En frutas los recubrimientos comestible se aplican por ejemplo sobre manzanas cortadas para producir una atmósfera modificada, que reduce la descomposición y retrasa la maduración y los cambios de color (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2005). Diversos emulsionantes y gelificantes, que retienen agua y mejoran la textura y contribuyen al rendimiento del alimento, se han aplicado en diferentes frutas y hortalizas incluyendo manzanas y patatas (Letien et al., 2001), para controlar la respiración en la vida de postcosecha del producto. Se ha comprobado que los recubrimientos de almidón al 4% aumentan en 10 días la vida útil de la fruta

manteniendo su textura y calidad (Achipiz et al., 2013). La aplicación de recubrimientos de quitosano retrasa la maduración de las frutas, como plátano o uvas (Romanazzi et al., 2002) y otras. En 2007 se ensayaron los primeros recubrimientos con probióticos, compuestos de alginato o proteínas con bifidobacterias viables y se aplicaron a frutas frescas cortadas como la manzana o papaya. Los resultados indicaron que los recubrimientos elaborados con proteínas eran más efectivos que los de alginato en las frutas troceadas (Tapia et al., 2007).

En cuanto a las hortalizas y otros productos, el quitosano ha sido también uno de los más empleados, por ejemplo en champiñones cortados, o tomates (García et al., 2014). En el caso de las zanahorias se han utilizado recubrimientos comestibles elaborados con biopolímeros adicionados de calcio y vitamina E, con lo que se aumentó el valor nutricional de las zanahorias sin afectar al aroma, frescura y la cantidad de beta-carotenos de estas (Mei et al., 2002).

El uso de recubrimientos comestibles y su aplicación se rigen por la legislación vigente en el país donde se aplican, o en el país donde se exportarán las frutas y hortalizas. En la Tabla 7 se muestran alguno de los recubrimientos aplicados a frutas y vegetales. Cabe destacar que la celulosa y sus derivados están incorporados en la mayoría de los productos comerciales tales como Semperfresh (AgriCoat Industries Ltd., Berkshire, Reino Unido), Pro-long (Grupo Courtaulds, Londres), Nature-Seal (Ecoscience Product System Divison, Orlando, FL), y Natural Shine 9000 (Pace International, Seattle, EE.UU.) entre otros.

**Tabla 7.** Aplicaciones de diferentes recubrimientos en frutas y vegetales (Dhall, 2013).

MATERIAL DE RECUBRIMIENTO	COMPOSICIÓN	FRUTA/ VEGETAL	EFEECTO DEL RECUBRIMIENTO
Semperfresh™	Esteres de sacarosa con una elevada proporción de éster ácido graso saturado de cadena corta, sal de sodio, mono y diglicéridos mixtos	Calabacín	Reduce las pérdidas de agua y CO <sub>2</sub> interno
		Manzana	Reduce cambio de color, retiene la acidez incrementa la vida útil y mantiene sus cualidades
		Tomate	Reduce cambio de color, retiene la acidez incrementa la vida útil y mantiene sus cualidades
		Banana	Decrece la producción de etileno y retrasa la pérdida de clorofila
Prolong	Mezcla de ésteres de ácidos grasos y sacarosa, CMC sódica y mono y diglicéridos	Mango	Retarda la maduración y la pérdida de carotenos. Es una barrera para impedir la difusión de O <sub>2</sub>
		Pera	Retiene la firmeza, al color verde de la piel, y mantiene la acidez deseable
Tal Prolong	Mezcla de ésteres de ácidos grasos y sacarosa, CMC sódica y mono y diglicéridos	Mango	Retrasa la maduración
Nature-seal™	Bases de celulosa de recubrimientos comestibles	Mango y tomate Pomelo	Retrasa la maduración
		Zanahoria	Retrasa la maduración y pérdida de carotenos, es una barrera para la difusión del O <sub>2</sub>
Chitosan	Quitosano y Tween 80	Fresas, pepino, pimiento marrón	Antimicrobiano
		Manzana, pera, ciruela y melocotón	Actúa como barrera de gas
		Litche	Reduce la pérdida de humedad y el pardeamiento Mejora la conservación
		Zanahoria	Mejora la apariencia
		Tomate	Reducción de la frecuencia respiratoria, producción de etileno y aumento de acidez deseable
		Pera	Producción reducida de etileno y retraso en la maduración
Zein	Proteína de maíz (zeína)	Tomate	Retraso en el color, pérdida de firmeza y peso y prolongar la vida útil
Nutri-save	N,O carboximetil quitosano	Manzana, pera y granada	Mayor vida útil
Brilloshine	Éster de sacarosa y cera	Manzana, aguacate, melones y cítricos	Proteger, aumenta el brillo y extiende la vida útil
Nu-coatFlo, Ban-seel	Ésteres de sacarosa de ácidos grasos y sal sódica de CMC	Manzana, plátano, pepino, guayaba, melón, pera y ciruela	Proteger, aumenta el brillo y extiende la vida útil
Citrashine	Éster de sacarosa y cera	Mandarina	Proteger, aumenta el brillo y extiende la vida útil
Casein	Caseinato de calcio	Pimiento morrón	Barrera de gases efectiva a O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> interna, inhibe el cambio de color y reduce el deterioro
	Caseinato de sodio y ácido esteárico		Reduce la pérdida de humedad
Celulosa	MC y glicerol	Zanahoria	Extiende la vida útil, resultando más caroteno que el control
Freshseal™	Alcohol polivinílico, almidón y tensoactivo	Frutas	Extiende la vida útil

### **IV.3.-Películas comestibles cargadas con antimicrobianos**

Las películas y recubrimientos con antimicrobianos han innovado el concepto de envases activos y se han desarrollado para reducir, inhibir o detener el crecimiento de microorganismos sobre la superficie de los alimentos (Appendini y Hotchkiss, 2002). Aunque muchos de los componentes básicos como el quitosano o la metilcelulosa poseen actividades antimicrobianas, los recubrimientos tiene la posibilidad de incorporar en ellos antimicrobianos como enzimas, agentes quelantes, bacteriocinas, benzoatos, propionatos, sorbatos y agentes antimicrobianos de origen natural como los aceites esenciales.

Estos compuestos permiten alargar la vida útil del producto y disminuir el riesgo del crecimiento de microorganismos patógenos en la superficie del alimento (Roney, 2002; Cagri et al., 2004; Lin y Zhao, 2007). Los antimicrobianos se eligen en función del alimento, y se pueden combinar con otras sustancias como antioxidantes, colorantes, saborizantes... La difusión del antimicrobiano viene condicionada por el pH, la actividad de agua, la temperatura, y las condiciones de almacenamiento (Lin y Zhao, 2007; Ozdemir y Floros, 2008). Se han incorporado ácidos orgánicos débiles y sus sales derivadas con actividad frente a hongos y bacterias para recubrimientos aplicados en alimentos como frutas, verduras, pescados, carnes, derivados lácteos... reduciendo la carga microbiana e inhibiendo a los patógenos de la superficie (Cagri et al., 2004).

Un de las estrategias para mejorar el papel protector de los recubrimientos comestibles es incorporar aditivos químicos tales como EDTA, lactato de sodio, diacetato potasio y otros, individualmente o combinados con antimicrobianos naturales, tales como aceites esenciales, lisozima o bacteriocinas (Galvez et al., 2014; Realini y Marcos, 2014; Valencia-Chamorro et al., 2011). Las sales de EDTA tienen múltiples aplicaciones en la industria alimentaria; por ejemplo el Na<sub>2</sub>EDTA está aprobado para uso en una variedad de alimentos en concentraciones que oscilan entre 35 y 800 ppm (21 CFR 72) (Código de Regulaciones Federales, 1998; Heimbach et al., 2000) o incluso hasta 1000 ppm dependiendo del alimento de acuerdo con el Codex Alimentarius (FAO-OMS, 2015). El lactato de sodio (E-325) se puede añadir a diferentes alimentos como antioxidante, emulsionante y regulador de acidez así como por sus propiedades antimicrobianas (FAO-OMS, 2015).

Debido al rechazo de los consumidores a los productos con aditivos químicos, se han investigado en los últimos años recubrimientos con antimicrobianos naturales como extractos de orégano, aceites de plantas esenciales, bacteriocinas, etc... (Avila-Sosa et al., 2008; Ozdemir y Floro, 2008). A modo de ejemplo, para inhibir el crecimiento bacterias como *L. monocytogenes*, se ha utilizado recubrimientos con nisina en salchichas (Cooksey, 2005). Otro ejemplo es el estudio de Min et al., en 2008, demostrando la efectividad de recubrimientos con lisozima en salmón ahumado para reducir el crecimiento de *Pseudomonas* en la superficie del ahumado. En cuanto a los aceites esenciales, se han utilizado recubrimientos con extractos de orégano, albahaca, anís, té, limón, o canela para evitar la presencia en alimentos de bacterias como *E. coli* o *L. monocytogenes* (Zivanovik et al., 2005; Rojas-Grau et al., 2007).

La incorporación de sustancias antimicrobianas en los recubrimientos comestibles ofrece amplias posibilidades para desarrollar nuevas técnicas de conservación de alimentos, manteniendo siempre la calidad de estos y minimizando el riesgo de contaminación alimentaria para el consumidor.

## **V.- TRATAMIENTOS POR ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA (APH)**

El tratamiento por Alta Presión Hidrostática (APH), consiste en someter a un alimento a elevados niveles de presión hidrostática de 100-1000 MPa, de forma continua durante un tiempo controlado (Herrero y Romero de Ávila, 2006), con el fin de reducir la carga microbiana del alimento, aumentando así su vida útil y manteniendo las características organolépticas del producto. La APH inactiva las células microbianas sin alterar la calidad sensorial ni los nutrientes de los alimentos (Barba et al., 2015; Cheftel, 1995). Está considerada como técnica de conservación ya que permite mantener la calidad (sabor, aroma, color y vitaminas) de determinados alimentos frescos e inactivar microorganismos, esporas y enzimas, incrementando su vida útil (en combinación con la refrigeración) y facilitando su comercialización. Se ha demostrado su aplicación frente a patógenos alimentarios como *Salmonella* Typhimurium, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* (Velázquez et al., 2005).

Es una de las tecnologías denominadas emergentes, con un gran éxito a nivel industrial, ya que se ha conseguido llegar a los mercados y aplicarla a una gran variedad de productos alimenticios. Su uso se conoce también como 'Pasteurización Fría' ya que inactivan los microorganismos patógenos o alterantes de los alimentos mediante el uso de presión en lugar de calor, con lo que se consigue una reducción en el recuento de microorganismos similar a lo conseguido con las técnicas de pasteurización térmica de uso tradicional. El efecto de los tratamientos por altas presiones en los alimentos es conocido desde el siglo XIX, pero no fue hasta los años 90 cuando se desarrollaron los primeros productos. La primera aplicación de las altas presiones en un alimento fue investigada por Hite en 1899 cuando intentó esterilizar la leche mediante presurización. Más tarde en 1914 Hite y colaboradores, intentaron aplicar las altas presiones a frutas y hortalizas. A partir del año 2000, el desarrollo de equipos con una mayor capacidad de procesado ha permitido implementar esta tecnología de forma exitosa en todo tipo de industrias alimentarias alrededor del mundo.

El efecto de las APH sobre los alimentos es casi instantáneo y uniforme, va a ser independiente de la forma del producto. La alta presión tiene la capacidad de inactivar ciertas enzimas y microorganismos, incluyendo patógenos de alto riesgo para la industria alimentaria, constituyendo una garantía de seguridad para los consumidores. El tratamiento se puede aplicar tanto a alimentos sólidos como líquidos. Normalmente se aplica una vez que el alimento está envasado, para así preservar la esterilidad posterior y evitar el riesgo de contaminación.

El proceso tiene una serie de ventajas:

- El alimento se mantiene intacto, no deformándose (Cheftel, 1995; Pothakamury et al., 1995).
- No se modifican las características nutricionales, se mantienen por ejemplo la vitamina C, antioxidantes, fenoles, etc... (Kimura et al., 1994; Eshtiaghi y Knorr, 1993).
- No se modifican las características organolépticas, el color o el sabor (Hayashi, 1989b; Tamaoka et al., 1991; Gross y Jaenické, 1994).
- Se reduce la carga microbiana, por lo que es interesante a la hora de eliminar patógenos (Benito et al., 1999; Bari et al., 2008).

- No produce residuos puesto que el agua de presurización se recicla.
- No hay que añadir aditivos al alimento para conservación posterior.
- Tiene un bajo gasto energético.

En cuanto a las desventajas:

- El coste del equipo es elevado.
- Los tratamientos hay que realizarlos en lotes.
- Una vez realizado el tratamiento al estar envasado el alimento no se puede modificar ni manipular.
- En algunos alimentos, principalmente frutas o verduras se puede modificar un poco la textura.

### **V.1.- Aplicaciones de las altas presiones hidrostáticas en alimentos**

La mayor demanda de tratamientos por altas presiones a los alimentos proviene de empresas dedicadas a la manufacturación de productos vegetales (29%) y empresas del sector cárnico (26%). También existe una demanda creciente de otros sectores dedicados a productos de la pesca (pescado y mariscos) (13%), a zumos y bebidas (14%) y otros productos ya elaborados, lácteos, etc. (18%).

Cabe destacar que, aunque el coste de inversión inicial es relativamente alto, la tecnología de las altas presiones hidrostáticas consume menos energía que otras tecnologías convencionales que aplican calor, por lo que, a corto plazo, los alimentos tratados con esta técnica resultan más competitivos a nivel comercial. Dentro de las frutas y verduras, tratados mediante altas presiones que se encuentran en el mercado, destacan purés, salsas, productos listos para consumo como guacamole, hummus, o ensaladillas. Dentro de los productos cárnicos se ha aplicado también a embutidos, pollo troceado, jamón loncheado, e incluso a piezas completas de jamón (Ananth et al., 1998). En alimentos cárnicos, se aplica para evitar la presencia de patógenos como *L. monocytogenes* o *Salmonella* Typhimurium (Escriu et al., 2009). En el caso de zumos y otras bebidas a base de fruta y/o hortalizas, el procesado mediante altas presiones mantiene las propiedades originales del producto sin necesidad de conservantes (Asaka et al., 1991; Arroyo et al., 1997). En los zumos por ejemplo el tratamiento se orienta a

mantener el aroma y sabor de un ‘zumo fresco recién exprimido’ y en este sentido, los componentes aromáticos naturales presentes en el zumo mejoran la apetencia del zumo así elaborado. La aplicación en vegetales permite reducir la carga de microorganismos patógenos.

La aplicación de las altas presiones también abre nuevas vías de mejora en el sector lácteo (Bozoglu et al., 2004), en campos de seguridad alimentaria (para eliminar bacterias patógenas o competitivas), en la innovación y abre también la posibilidad de exportación de nuevos productos. Por ejemplo el procesado de queso fresco por alta presión puede acelerar o frenar la maduración con lo cual se mejora la vida útil del producto de una forma importante. Cuando se trata de productos probióticos, la alta presión es capaz de mantener intactos los componentes funcionales y bioactivos (inmunoglobulinas, lactoferrinas, vitaminas). También las empresas que se dedican a procesar pescados y mariscos han descubierto en esta técnica un importante aliado para comercializar y alargar la vida de los productos del mar ya que con las altas presiones se logran aplicaciones que no son posibles con otras tecnologías. Una de las principales aplicaciones en este campo es la apertura de moluscos. Cuando se les aplican altas presiones la carne se separa del caparazón sin necesidad de realizar una cocción previa. De este modo aparece en el mercado un nuevo producto de mayor valor añadido (carne sin caparazón que el consumidor puede cocinar por primera vez).

## **VI.- SUSTANCIAS EMPLEADAS EN PROCESOS DE DESINFECCIÓN**

El control de los microorganismos patógenos a lo largo de toda la cadena alimentaria exige la aplicación de diferentes estrategias que van a depender del punto de la cadena, la materia prima y las condiciones de procesado entre otros factores. El control de la calidad de las materias primas y de la contaminación durante el procesado de los alimentos exigen el mantenimiento de unas condiciones de higiene óptimas. En este contexto, los procesos de limpieza y desinfección son esenciales para reducir la carga microbiana, y evitar la formación de focos de contaminación microbiana en las instalaciones de procesado de los alimentos. En este punto, la correcta aplicación de

sustancias química generalmente conocidas como desinfectantes o biocidas es esencial para mantener la higiene y la calidad microbiológica.

Según la Directiva sobre Biocidas (98/8/EC) se denominan biocidas las sustancias activas y preparados que contienen una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos. El uso de biocidas para controlar a los microorganismos está aceptado en hospitales, en el hogar y se aplican en Salud Pública, en sanitarios, piscinas, higiene personal y de los animales, horticultura, y cadena de procesado de alimentos.

Los biocidas pueden inactivar a los microorganismos sobre los alimentos, en los equipos, en calderas, en tuberías y recipientes u otros equipos de procesos de preparación y envasado. Es importante tomar las medidas de precaución necesarias para evitar que sus residuos puedan llegar a ser ingeridos. Es indispensable mantener un control cualitativo y cuantitativo, tanto del biocida y de sus residuos en los alimentos, como del tipo de microorganismo para el que se aplique. Por ello es de interés revisar la naturaleza, tipos, efectos y potencia biológica de los biocidas para evaluar el riesgo para la salud humana y del ecosistema. En la industria alimentaria se aplican además de biocidas, compuestos de limpieza y desinfección, algunos de los cuales tienen capacidad bactericida. La industria alimentaria debe aplicar estándares higiénicos que se correspondan con el funcionamiento de la empresa, su estructura, construcción y aparataje; pero también con el equipo de personal, su función, formación, especialización y tareas.

La presencia de biocidas o de sus residuos en los alimentos representa un “peligro” que convierte el alimento en no apto para el consumo humano. La presentación de estos compuestos está regulada por la Directiva 98/8/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de febrero, relativa a la comercialización de biocidas, la cual armoniza en el ámbito europeo la legislación sobre estos productos. Se establecen principios comunes de evaluación y autorización de biocidas evitando de esta forma barreras económicas y administrativas. Esta Directiva, ha sido transpuesta a nuestro ordenamiento jurídico mediante el Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre,

por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas. Con este Real Decreto, se controlan 23 tipos de productos. Entre ellos se incluyen también los desinfectantes utilizados en los ámbitos de la vida privada y de la salud pública, los insecticidas, acaricidas, rodenticidas, repelentes, conservantes, etc.

Están clasificados como biocidas los productos cuyas propiedades y usos están descritos en el Anexo V del Real Decreto 1054/2002 (Real Decreto 1054/2002) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Clasificación de los biocidas según el Real Decreto 1054/2002.

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

Dentro de los biocidas dirigidos a las bacterias se encuentran: a) los desinfectantes, utilizados en objetos inanimados o la superficie de la piel para reducir el número de microorganismos; b) los antisépticos, utilizados para tratar la infecciones en heridas superficiales, a excepción de los antibióticos; c) los conservantes añadidos a productos como los cosméticos, los alimentos, el pienso para animales o los productos de limpieza, con el principal objetivo de inhibir el crecimiento de microorganismos.

El mecanismo de acción de los biocidas se basa en una interacción múltiple con diferentes dianas celulares, ya que afectan a diferentes tipos de moléculas como proteínas, carbohidratos, lípidos (fosfolípidos), ácidos nucleicos y otras pequeñas moléculas. Actúan sobre la membrana celular, alterando su permeabilidad, y provocando entrecruzamientos que hacen rígida a la membrana y alteran la presión intracelular. Los biocidas oxidantes tienden a oxidar todo tipo de materia orgánica y se consumen rápido en sistemas muy contaminados. Los biocidas no oxidantes, por otro lado, tienen un efecto más dañino, pueden penetrar en la célula y alterar el DNA, el RNA o los sistemas de defensa celulares, por lo cual son los más recomendados. Cada biocida tiene una concentración mínima inhibitoria frente a un microorganismo específico que define la capacidad para inhibir el crecimiento microbiano, no obstante en la mayoría de las aplicaciones los biocidas se aplican no contra un microorganismo, sino frente a poblaciones bacterianas o comunidades de bacterias y algas, bacterias y hongos o bacterias, hongos y algas. Para aumentar el intervalo de inhibición, los biocidas se pueden utilizar como mezclas de dos o tres compuestos activos compatibles que juntos tienen como blanco bacterias, algas, hongos, levaduras e incluso esporas bacterianas.

Existen varios términos para definir la respuesta de un microorganismo a un biocida. Según Russell (Russell, 2003, 2004) la resistencia se puede definir como la supervivencia de una cepa bacteriana a una concentración de biocida que matará el resto de las poblaciones bacterianas. En condiciones de laboratorio, el término resistencia se utiliza generalmente para definir una cepa bacteriana que sobrevive a concentraciones de un biocida que inhibe al resto de la población. Chapman (2003) definió tolerancia como la inhibición de un microorganismo sin causarle la muerte. El término no susceptible se utiliza para definir a un microorganismo que es resistente a un biocida.

En la práctica, la resistencia se podría definir como la supervivencia bacteriana frente a un biocida usando las concentraciones normalmente recomendadas por el fabricante (Maillard, 2007). El aumento de las infecciones causadas por microorganismos resistentes a diferentes antibióticos y biocidas ha motivado el estudio de la resistencia a estos compuestos (Chapman, 2003; Inoue, 1989) con el fin de controlar su uso.

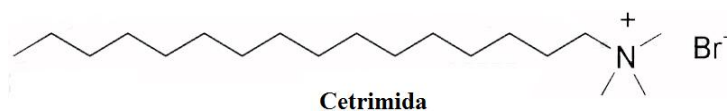
### VI.1. Tipos de biocidas

Los agentes “no oxidantes” ejercen su acción biocida actuando sobre diferentes dianas celulares de una forma inespecífica. Su acción es generalmente un envenenamiento lento de las células, alterando su metabolismo de alguna forma. Algunos ejemplos son sulfato de cobre, fenoles clorados, óxido de tributil estaño, compuestos de amonio cuaternarios, organosulfuros como el metilenditiocarbamato, la propianamida de dibromo nitrilo y otros.

Las sales de amonio cuaternario son productos químicos tensoactivos que consisten generalmente en un átomo de nitrógeno, rodeados por los grupos sustitutivos que contienen de ocho a veinticinco átomos de carbono en cuatro perspectivas del átomo de nitrógeno. Estos compuestos son generalmente los más eficaces contra bacterias en gamas alcalinas de pH. A través de sus cargas positivas, se unen a los sitios negativamente cargados en la pared bacteriana. Estos enlaces electrostáticos provocan tensiones en la pared celular. También provocan daños en la permeabilidad celular.

Dentro de los biocidas más utilizados en la industria alimentaria destacan:

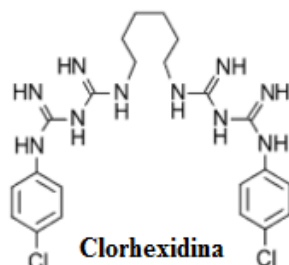
**Cetrimida** (bromuro de hexadeciltrimetilamonio,  $C_{19}H_{42}BrN$ )



Es un detergente catiónico derivado de amonio cuaternario. Se trata de un antiséptico de amplio espectro, que actúa de forma mayoritaria frente a bacterias Gram-positivas que

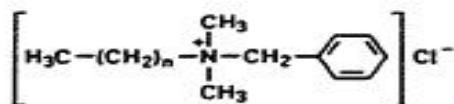
frente a Gram-negativas. Su uso está indicado para el tratamiento de quemaduras, heridas, desinfección de la piel y desinfección y limpieza de utensilios.

### Clorhexidina



La clorhexidina posee un amplio espectro de acción. Se ha utilizado desde hace años como desinfectante en productos farmacéuticos y cosméticos (Hugo et al., 1989). Es activa frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, modifica la permeabilidad de la membrana plasmática originando la precipitación de las proteínas y ácidos nucleicos (Harold et al., 1969; Chawner et al., 1989b).

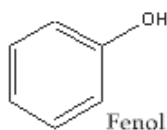
### Cloruro de benzalconio



**Cloruro de benzalconio**

Los derivados del amonio cuaternario son agentes activos catiónicos potentes en cuanto su actividad desinfectante, siendo activos frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas aunque estas últimas en menor grado (Farrell et al., 1998). El cloruro de benzalconio es activo también frente a hongos y virus. Se emplea como antiséptico y desinfectante de la piel, material de industrias alimentarias y en algunos compuestos cosméticos.

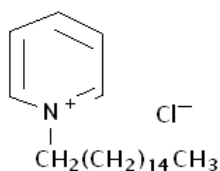
**Hexachlorofeno:** (2,2'-dihidroxi-3,5,6,3',5',6')



**Hexachlorofeno**

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

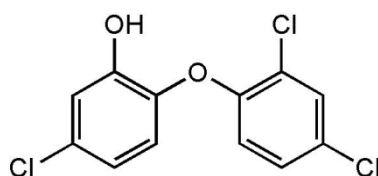
**Hexadecyl-Pyrimidinium, chloride.** Cloruro de hexadecil-piridinio. (HDPC)



**HDPC**

Agente antibacteriano con aplicaciones como conservante y desinfectante. Un estudio previo (Cobo Molinos et al., 2008) puso de manifiesto el efecto bactericida de este compuesto frente a las especies *B. cereus* y *B. weihenstephanensis* en verduras crudas, especialmente en condiciones de abuso de temperatura durante el almacenamiento.

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

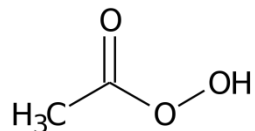


**Triclosan**

El triclosan es un biocida de amplio espectro que se ha utilizado tanto en cuidados médicos como en gran cantidad productos comerciales (Kopecka-Leitmanova et al., 1987; Schweizer, 2001). Ataca la membrana plasmática bloqueando la síntesis de

lípidos (McMurry et al., 1998). Actúa también sobre la síntesis de ARN, ácidos nucleicos y proteínas

### **P3-oxonia active**



Es un preparado comercial que contiene peróxido de hidrógeno (25-35%). Debe controlarse bien su uso, almacenaje y manejo, ya que a altos niveles de concentración puede quemar la piel, y existe la posibilidad de explosiones si entra en contacto con ciertos compuestos orgánicos o si se descompone generando calor y suficiente oxígeno. Oxida componentes esenciales de los microorganismos.

## **OBJETIVOS**

En la actualidad existe una demanda creciente por parte de los consumidores por los alimentos naturales o que estén mínimamente procesados y sin conservantes sintéticos. Como resultado de estas demandas, existe un gran interés en utilizar agentes antimicrobianos naturales, los cuales deben ser inocuos, que cumplan con los parámetros de calidad y seguridad alimentaria para agentes antimicrobianos y que además presenten un amplio espectro de acción frente a los microorganismos.

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados por algunas bacterias ácido lácticas y presentan un amplio potencial como conservadores para inhibir el crecimiento de otros microorganismos. El empleo de bacteriocinas como antimicrobianos naturales es un tema de gran interés en la industria alimentaria, principalmente por su actividad frente a patógenos, especialmente cuando se usan en combinación con otras barreras. Las bacteriocinas se pueden aplicar a una amplia variedad de alimentos lo que diversifica su uso, con alto potencial para sustituir a los conservantes sintéticos por naturales, abriendo paso a nuevas tecnologías en la bioconservación de alimentos.

Actualmente, las bacteriocinas son utilizadas en alimentos cárnicos, lácteos, conservas, productos del mar, vegetales, zumos de frutas, y bebidas como cerveza y vino. Sus características de compatibilidad en dichos productos así como su mecanismo de acción hacen atractivo su uso en los alimentos. La mayoría de las bacteriocinas son efectivas frente a microorganismos patógenos importantes involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos, tales como: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* o *Salmonella enterica*.

La enterocina AS-48 es activa frente a diferentes patógenos transmitidos por los alimentos y bacterias de alterantes. La combinación de la enterocina AS-48 con técnicas de recubrimiento, altas presiones hidrostáticas o diferentes compuestos antimicrobianos podría mejorar considerablemente la inactivación de bacterias patógenas o toxicogénicas en los sistemas alimentarios.

En base a lo expuesto anteriormente, para el desarrollo de esta tesis doctoral se han planteado los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar la eficacia de diferentes recubrimientos que contienen la enterocina AS-48 sobre la inactivación de *Listeria monocytogenes*, utilizando manzana troceada como sistema de modelo.
- 2.- Determinar si la actividad antimicrobiana de los recubrimientos se podría mejorar añadiendo aditivos químicos ampliamente utilizados en la industria alimentaria como el EDTA y lactato de sodio.
- 3.- Determinar el efecto de dos métodos de conservación, la aplicación de la enterocina AS 48 incorporada en un recubrimiento de pectina, y la aplicación de un tratamiento por alta presión hidrostática, en perejil picado almacenado bajo refrigeración.
- 4.- Estudiar la biodiversidad bacteriana del perejil picado antes y después de la aplicación de los tratamientos de conservación.
- 5.- Determinar la eficacia de la enterocina AS-48 (sola o en combinación con otros antimicrobianos) en bebidas derivadas de cereales, como avena y soja para la inactivación de *Staphylococcus aureus*.
- 6.- Investigar si la polimixina B podría potenciar el efecto de la Enterocina AS-48 frente a *Salmonella enterica* y si la combinación de Polimixina B y enterocina AS-48 podría ser útil para mejorar la actividad antimicrobiana de los biocidas frente a las células planctónicas y sésiles de *Salmonella*.

## **TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS**

## **ARTÍCULO 1**

**María del Carmen López Aguayo, María José Grande Burgos, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez del Postigo Ruiz, Rosario Lucas López.**  
**Effect of different activated coatings containing enterocin AS-48 against**  
***Listeria monocytogenes* on apple cubes.**  
***Innovative Food Science & Emerging Technologies* 35, pp. 177-183.**



## Effect of different activated coatings containing enterocin AS-48 against *Listeria monocytogenes* on apple cubes



Maria del Carmen López Aguayo, María José Grande Burgos, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez\*, Rosario Lucas López

Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 April 2016

Received in revised form 11 May 2016

Accepted 13 May 2016

Available online 16 May 2016

#### Keywords:

Bacteriocin

Edible coatings

*Listeria*

Apple

### ABSTRACT

Enterocin AS-48 is a circular bacteriocin with strong anti-*Listeria* activity. The purpose of the present study was to evaluate the effect of the bacteriocin incorporated into different coating solutions on a cocktail of five *L. monocytogenes* strains previously inoculated on apple cubes. Coating solutions were made with chitosan, caseinate, alginate, k-carrageenane, xanthan gum, pectin, starch, carboxymethyl cellulose or methyl cellulose. Coatings were applied singly or combined with enterocin AS-48 at 20 or 40 µg/ml. Samples were stored at 4 °C for 7 days. The single application of coatings had almost no effect (as in alginate and methyl cellulose) or had a low effect on *Listeria* viability (<2.0 log cycles), with the exception of chitosan coating which showed a strong anti-*Listeria* activity (up to 3.7 log cycles at day 7). Coatings dosed with 20-µg/ml enterocin AS-48 reduced viable *Listeria* counts gradually during storage in most cases, achieving significant reductions ( $p < 0.05$ ) of 1.0 to 1.9 log cycles after 7 days for k-carrageenane, xanthan gum, pectin, starch, carboxymethyl cellulose and methyl cellulose compared to the single coating. At 40 µg/ml, enterocin AS-48 significantly reduced viable counts ( $p < 0.05$ ) for most coatings (by 1.4 to 3.3 log cycles, depending on the coating) compared with coatings without bacteriocin (except for chitosan). Chitosan, pectin, xanthan gum and carboxymethyl cellulose coatings, supplemented or not with 40 µg/ml AS-48 were further investigated in combination with 20 mM EDTA or with 2.0% sodium lactate. The single addition of sodium lactate showed the greatest effects at day 7, where it reduced viable counts significantly ( $p < 0.05$ ) by 1.1 to 2.2 log cycles compared to the single coatings (except for chitosan), whereas the combination of sodium lactate and AS-48 reduced viable counts below detection levels also at day 7 for all coatings. The combination of EDTA and AS-48 was much more effective, reducing *Listeria* counts below detection levels from day 1 for most of the coatings tested. The combination of EDTA and AS-48 was also the most effective at time 0, achieving reductions of viable counts between 2.0 and 2.7 log cycles depending on the coating immediately after treatment compared with single coatings.

**Industrial relevance:** Results from the present study suggest the potential of edible coatings containing enterocin AS-48 and EDTA for inactivation of *L. monocytogenes* on apple surfaces. Since edible coatings are widely used on fruit surfaces, coatings activated with enterocin AS-48 and EDTA could find application as a hurdle against *L. monocytogenes* in fresh-cut apple pieces.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen causing listeriosis (Ghandi & Chikindas, 2007). In 2013, the EFSA reported 1763 confirmed human cases of listeriosis, which represented an 8.6% increase compared with 2012 (EFSA & ECDC, 2015). In the United States, *L. monocytogenes* is responsible for approximately 1600 cases of foodborne listeriosis annually, resulting in an estimated 1500 hospitalizations and 260 deaths

(Scallan et al., 2011). Growth of *L. monocytogenes* has been demonstrated in a number of vegetables under refrigerated and ambient conditions (Cobo-Molinos et al., 2005; Harris et al., 2003; Penteado & Leitao, 2004) and in non-acidic fruits (Cobo-Molinos et al., 2008; Ukuku & Fett, 2002). Growth has also been demonstrated on acidic fruits such as tomatoes (Beuchat & Brackett, 1991), peeled Hamlin oranges (Pao, Brown, & Schneider, 1998), sliced raspberries, pear or kiwi (Cobo-Molinos et al., 2008), and in 'Golden Delicious' apple slices (Alegre, Abadías, Anguera, Oliveira, & Viñas, 2010; Conway, Leverentz, Saftner, Janisiewicz, & Leblanc, 2000). *L. monocytogenes* has been isolated from strawberries (Johannessen, Loncarevic, & Kruse, 2002) and from dried fruits (Mena et al., 2004). In addition to previously reported fresh produce outbreaks involving sprouts, celery or cantaloupe (Garner &

\* Corresponding author at: Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Edif. B3, Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain.

E-mail address: [agalvez@ujaen.es](mailto:agalvez@ujaen.es) (A. Gálvez).

Kathariou, 2016; McCollum et al., 2013), a listeriosis outbreak occurring in 2014 in the USA was linked to commercially-produced, prepackaged whole caramel apples (Garner & Kathariou, 2016; <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html>). It was reported that insertion of a stick into the apple accelerates the transfer of juice from the interior of the apple to its surface, creating a microenvironment at the apple–caramel interface where *L. monocytogenes* can rapidly grow to levels sufficient to cause disease when stored at room temperature (Glass, Golden, Wanless, Bedale, & Czuprynski, 2015). A recall of green apples contaminated with *L. monocytogenes* was reported in 2015 (<http://www.foodsafetynews.com/2015/10/granny-smith-apples-recalled-for-possible-listeria-contamination/>).

One of the approaches to preserve foods that are eaten raw or without further cooking free of foodborne pathogens, is the application of edible films or coatings containing antimicrobial substances. Edible films or coatings are defined as continuous matrices or thin layers of edible materials (such as proteins, polysaccharides, and lipids) that can be applied and formed directly on the surface of the product (Cagri, Ustunol, & Ryser, 2004; Dhall, 2013). They are used to inhibit migration of moisture, oxygen, carbon dioxide, aromas and lipids, and introduce additives, such as antioxidants and antimicrobials, thereby improving the intrinsic characteristics, mechanical integrity and handling of food products (Krochta & Mulder-Johnston, 1997). Edible coatings are applied on cut apples to produce a modified atmosphere, which reduces decay and delays ripening and color changes (Olivas & Barbosa-Cánovas, 2005).

Edible coatings can be based on different substrates, usually by products from the food industry. Coatings can be based on polysaccharide materials such as starch, alginate, xanthan gum, cellulose, chitosan, and carrageenan, or proteins such as whey protein, soya protein, or corn zein among others (Cha & Chinnan, 2004; de Azevedo, 2012; Dhall, 2013; Kuorwel, Cran, Sonneveld, Miltz, & Bigger, 2011; Lin & Zhao, 2007). Chitosan has excellent film-forming and antimicrobial functions and has been successfully used to control quality loss of fruits and vegetables (Lin & Zhao, 2007), including apple slices (Qi, Hu, Jiang, Tian, & Li, 2011). Pectin is a soluble component of plant fiber derived from cell walls of plants. Edible coatings obtained from pectin and derivatives have been recently proposed in food-related applications by their excellent barrier to oxygen, aroma preservation, barrier to oil and good mechanical properties, and in fact they are currently used in fresh and minimally processed fruits and vegetables (Ciolacu, Nicolau, & Hoorfar, 2014; Valdés, Burgos, Jiménez, & Garrigós, 2015). The microbial polysaccharide xanthan gum has been effective in the preservation of minimally processed peaches (Pizato, Cortez-Vega, de Souza, Prentice-Hernández, & Borges, 2013) and also as carrier of preservatives applied on fresh-cut apples (Rodrigues-Freitas, Cortez-Vega, Pizato, Prentice-Hernández, & Borges, 2013). Cellulose can be modified into functional polymers such as carboxymethyl cellulose or methyl cellulose. Carboxymethyl cellulose has shown beneficial effects in delaying ripening of different fruits (Meheriuk & Lau, 1988; Sayanjali, Ghanbarzadeh, & Ghiassifar, 2011). Sodium alginate has many attractive physical and biological properties, such as moisture retention, gel-forming capability, and good biocompatibility (Pei, Chen, Li, & Zhou, 2008). Caseinate, a milk protein-based material, has excellent oxygen barrier properties and has been studied in different fruits and vegetables including apples and potatoes (Letien, Vachion, Mateescu, & Lacroix, 2001), for controlling postharvest respiration.

A common strategy to improve the protective role of edible coatings is to incorporate chemical additives (such as EDTA, sodium lactate, potassium diacetate and others) either singly or in combination with natural antimicrobials, such as essential oils, lysozyme, or bacteriocins (Galvez, Lucas, Pérez-Pulido, & Grande-Burgos, 2014; Realini & Marcos, 2014; Valencia-Chamorro, Palou, del Río, & Pérez-Gago, 2011). Several EDTA salts have a history of food use; Na<sub>2</sub>EDTA is approved for use in a variety of foods at concentrations ranging from 35 to 800 ppm ((21 CFR 72) (Code of Federal Regulations, 1998; Heimbach et al.,

2000) or even up to 1000 ppm depending on the food according to the Codex Alimentarius (FAO-WHO, 2015). Sodium lactate (E-325) can be added to different foods following good manufacturing practices as an antioxidant, emulsifier and acidity regulator also having antimicrobial activities (FAO-WHO, 2015).

Enterocin AS-48 is a circular bacteriocin with strong antilisterial activity. Its molecular structure, genetic determinants and mode of action have been elucidated (Maqueda et al., 2004). This bacteriocin has been tested against foodborne pathogens and spoilage bacteria in different food systems, including meats, dairy foods, seafood, and vegetable foods (Abriouel, Lucas, Ben-Omar, Valdivia, & Gálvez, 2010; Grande-Burgos, Pérez-Pulido, López-Aguayo, Gálvez, & Lucas, 2014), and it now stands as a solid candidate to be developed into a food biopreservative. The purpose of the present study was to determine the efficacy of different coatings containing enterocin AS-48 on inactivation of *L. monocytogenes*, using apple cubes as a food model system, and to determine if antimicrobial activity could be improved by adding two widely used chemical additives, EDTA and sodium lactate.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and cultivation conditions

*L. monocytogenes* strains CECT 911, CECT934, CECT 936, CECT4032 and CECT 5672 were provided by the Spanish Type Culture Collection (CECT, Burjasot, Valencia). Strains were cultivated overnight on brain–heart infusion broth (BHI, Scharlab, Spain). Cells from 1 ml overnight culture were collected by centrifugation (13,000 ×g for 10 min), washed with sterile saline solution, and resuspended in 1 ml sterile saline solution. The resulting suspensions of individual strains were mixed in equal proportions to prepare a cocktail of strains. The cocktail was then diluted tenfold in sterile saline solution and used for inoculation of apple slices.

### 2.2. Preparation of bacteriocin enterocin AS-48

Enterocin AS-48 was obtained from cultured broths of the producer strain *Enterococcus faecalis* A-48-32 by using the standard cation exchange chromatography procedure described elsewhere (Abriouel, Valdivia, Martínez-Bueno, Maqueda, & Gálvez, 2003). Bacteriocin concentrates were first dialyzed for 24 h (10 ml against 500 ml distilled water) by using 2000 molecular weight cut-off benzoylated dialysis tubing (Sigma-Aldrich, Madrid) and filtered through 0.22 μm pore size low protein binding filters (Millex GV; Millipore Corp., Belford, MA, USA) under sterile conditions.

### 2.3. Preparation of activated coatings

Activated coatings were prepared as described elsewhere (Jiang, Neetoo, & Chen, 2011; Maftoonazad & Ramaswamy, 2005; Neetoo, Ye, & Chen, 2010) with slight modifications. Alginate (1%), low molecular weight chitosan (2%; ≥75% deacetylation), pectin from apples (1%), potato starch (15%), κ-carrageenan (1%), xanthan gum (1%), casein from bovine milk, sodium salt (1%) and carboxymethyl cellulose (1%) were dissolved at the concentrations given in parentheses (by weight) in 0.5% acetic acid adjusted to pH 5.0 with 5 N NaOH. Methyl cellulose was dissolved at 10% (by weight) in an ethanol:water mixture (1:3, by volume) and then mixed with a concentrated acetic acid solution (1.0%, pH 5.0) to give the desired final concentration of 1% methyl cellulose in 0.5% acetic acid solution. All coating reagents were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

### 2.4. Treatment of apple slices with activated coatings

Golden delicious apples were bought at local supermarkets. The surface of apples was washed with 70% ethanol in sterile distilled water.

Apples were peeled with a sterile knife under aseptic conditions, and cut into  $1.0 \times 1.0 \times 0.5$  cm cubes. Each cube was inoculated on its upper side with  $10 \mu\text{l}$  (approx.  $5.92 \log_{10}$  CFU) of the tenfold diluted cocktail of the five *L. monocytogenes* strains prepared as described above. Cubes were deposited on sterile filter paper and allowed to dry inside a biosafety cabinet (Telstar Bio IIA, Telstar, Madrid) for 30 min (keeping the side inoculated with listeriae in upward position). Cubes inoculated with the cocktail of *Listeria* strains received the following treatments: a) no coating; b) treatment with coating described in Section 2.2; c) treatment with coating with solutions described in Section 2.2 supplemented with enterocin AS-48 at concentrations of 20 or  $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ . In this case, bacteriocin was added to coating solutions just before application of coating treatments. Coating treatments were applied by immersing apple cubes for 1 min in the coating solutions. Cubes were allowed to dry for 30 min as described above, and then placed inside empty Petri dishes and incubated at  $4^\circ\text{C}$  for up to 7 days. Cubes not inoculated with listeriae were also prepared as negative controls. At desired intervals of incubation (0, 1, 3, and 7 days), four cubes from each sample were placed together inside a stomacher bag and homogenized with 5 ml sterile sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) supplemented with 100 mg/l trypsin (Type IX-S from porcine pancreas, Sigma) in order to inactivate residual bacteriocin. The resulting homogenate was serially diluted in sterile saline solution and plated in triplicate on PALCAM agar with added supplement (Panreac, Barcelona, Spain). Plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 48 h, and colonies with

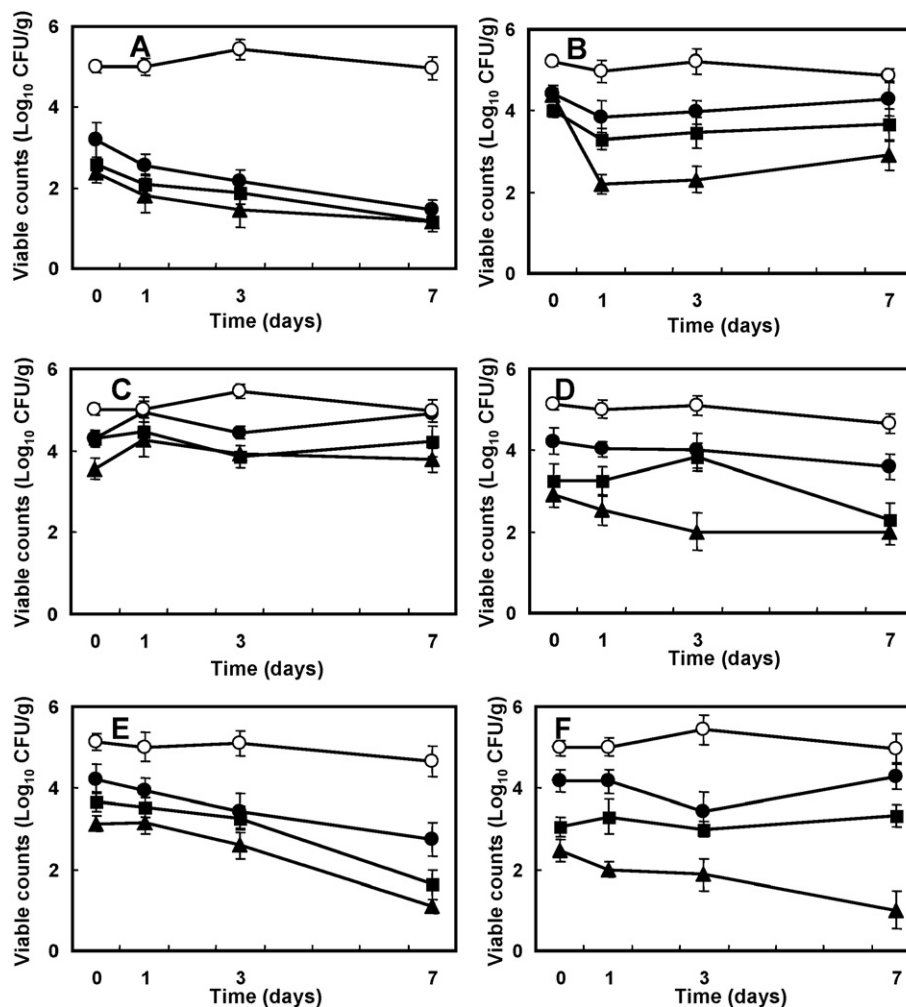
appearance typical of *L. monocytogenes* were counted in order to calculate the viable cell concentration, expressed in  $\log_{10}$  colony forming units (CFU) per ml.

## 2.5. Application of coatings activated with EDTA, sodium lactate, and bacteriocin

Coating solutions consisting of 1% chitosan, 1% pectin, 1% xanthan gum, and 1% carboxymethyl cellulose (all of them in 0.5% acetic acid, pH 5.0) were supplemented with 20 mM EDTA (Sigma) or 2.0% sodium lactate (Sigma), singly or in combination with enterocin AS-48 at  $40 \mu\text{g}/\text{ml}$  final concentration. Coating solutions were freshly prepared right before use. Coating treatments were applied as described in Section 2.2, and the numbers of viable listeriae were determined during incubation of apple cubes at  $4^\circ\text{C}$  for 7 days as described in previous section.

## 2.6. Statistical analyses

All experiments were carried out in duplicate, and the average data  $\pm$  standard deviations were determined with Excel program (Microsoft Corp., USA). A paired *t*-test was performed at the 95% confidence interval with Statgraphics Plus version 5.1 (Statistical Graphics Corp, USA), in order to determine the statistical significance of data.

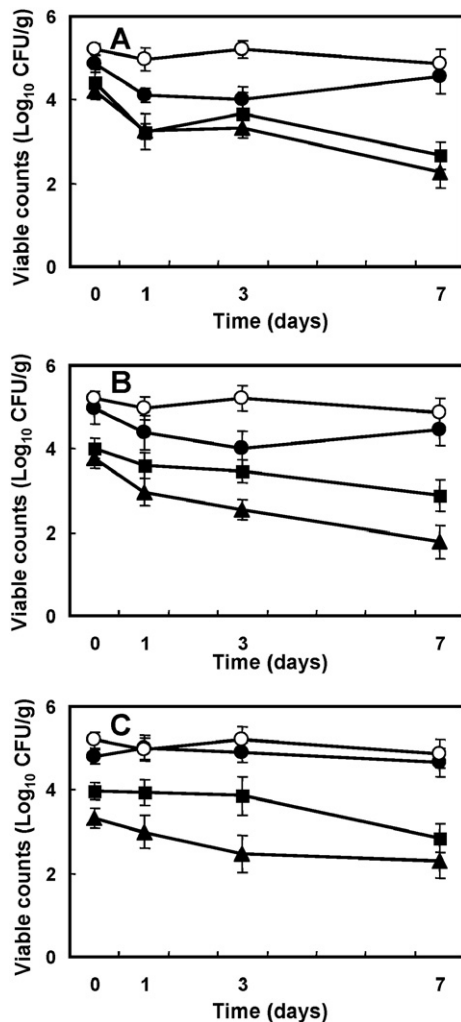


**Fig. 1.** Effect of different coatings on the viability of a cocktail of *L. monocytogenes* strains inoculated on apple cubes. Chitosan (A), sodium caseinate (B), alginate (C), k-carragenate (D), xanthan gum (E) and pectin (F) were applied as coatings either singly (●) or in combination with enterocin AS-48 at 20 (■) or  $40 \mu\text{g}/\text{ml}$  (▲). Inoculated control cubes without coating (○). Samples were stored under refrigeration for 7 days. The viable cell counts (expressed as the average  $\log_{10}$  CFU/g  $\pm$  standard deviation) are shown.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of different coating substrates supplemented or not with enterocin AS-48 on inactivation of *L. monocytogenes* on apple cubes

Apple cubes inoculated with the cocktail of *L. monocytogenes* strains were coated or not with different coating solutions, which either contained no bacteriocin or were supplemented with enterocin AS-48 at final concentrations of 20 or 40 µg/ml. *L. monocytogenes* was able to survive well on the cut apple surfaces during storage for 7 days under refrigeration, with non-significant ( $p > 0.05$ ) changes in viable counts (Figs. 1 and 2). Chitosan coating was very effective in reducing the *Listeria* population, even when it was applied without bacteriocin (Fig. 1A). Viable counts in samples coated with chitosan were significantly lower ( $p < 0.05$ ) compared to the untreated controls from the beginning to the end of storage period, with reductions ranging from 1.8 to 3.5 log cycles. Addition of enterocin AS-48 did not enhance antilisterial activity of chitosan coatings significantly ( $p > 0.05$ ). At day 7, viable counts from the coated apple cubes were up to 3.8 log cycles lower than the uncoated control. *Listeria* inactivation was much lower for the coating based on casein from bovine milk compared with chitosan. However, bacteriocin addition at 40 µg/ml achieved significant



**Fig. 2.** Effect of different coatings on the viability of a cocktail of *L. monocytogenes* strains inoculated on apple cubes. Starch (A), carboxymethyl cellulose (B) and methyl cellulose (C), were applied as coatings either singly (●) or in combination with enterocin AS-48 at 20 (■) or 40 µg/ml (▲). Inoculated control cubes without coating (○). Samples were stored under refrigeration for 7 days. The viable cell counts (expressed as the average  $\text{Log}_{10}$  CFU/g  $\pm$  standard deviation) are shown.

reductions in *Listeria* counts of 1.6 to 1.4 log cycles from days 1 to 7 compared to the coating without bacteriocin (Fig. 1B). After 7 days, viable counts in the samples coated with casein plus 40 µg/ml AS-48 were 2 cycles lower compared to samples without coating.

When alginate was used as a coating, the reductions of viable *Listeria* counts obtained for samples supplemented with enterocin AS-48 were not significantly different ( $p > 0.05$ ) compared to alginate coatings without bacteriocin (Fig. 1C). Even so, viable counts from samples coated with alginate supplemented with 40 µg/ml enterocin AS-48 were significantly lower ( $p < 0.05$ ) at all storage times (by approximately 1.0 to 1.5 log cycles) compared to the samples without any coating. For apple cubes coated with k-carrageenate without bacteriocin, viable *Listeria* counts were about 1 log cycle lower compared to the untreated controls at all sampling points (Fig. 1D). The k-carrageenate coating provided best results when it was supplemented with 40 µg/ml AS-48, since viable *Listeria* counts during storage were significantly lower ( $p < 0.05$ ) by 1.3 to 2.0 log cycles compared to the coating without bacteriocin. Counts at day 7 were 2.6 log cycles lower than the uncoated controls.

In samples coated with xanthan gum alone, viable *Listeria* counts were significantly lower ( $p < 0.05$ ) by 1.0 to 1.9 log cycles compared to the uncoated controls (Fig. 1E). *Listeria* counts from samples coated with xanthan gum plus 40 µg/ml bacteriocin were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than the single coating at most sampling points, achieving additional reductions between 1.1 log cycles (time 0) and 1.6 log cycles (time 7). Furthermore, at day 7 of storage, viable cell counts in bacteriocin-coated samples (40 µg/ml) were 3.6 log cycles lower than the uncoated controls. Application of pectin coatings resulted in variable reductions of *Listeria* counts through storage period (Fig. 1F). The pectin coating containing 40 µg/ml AS-48 was the most effective, reducing viable counts significantly ( $p < 0.05$ ) at all sampling points compared to the untreated control and the single pectin coating. For 40 µg/ml bacteriocin, reductions in *Listeria* counts ranged from 1.7 log cycles at time 0 up to 3.3 log cycles at day 7 compared to the pectin coating without bacteriocin, or up to 4.0 log cycles lower than control without coating.

For the potato starch coating, both bacteriocin concentrations significantly reduced viable *Listeria* counts ( $p < 0.05$ ) at days 1 and 7 compared to the starch coating without bacteriocin (Fig. 2A). At day 7, viable counts in bacteriocin-treated samples were between 1.9 (for 20 µg/ml AS-48) and 2.3 log cycles (for 40 µg/ml AS-48) lower ( $p < 0.05$ ) compared to the starch coating alone and between 2.2 and 2.6 log cycles lower compared to the uncoated control. The carboxymethyl cellulose coating provided best results when it was supplemented with enterocin AS-48 at 40 µg/ml. The bacteriocin-dosed coating significantly ( $p < 0.05$ ) reduced *Listeria* counts on apple cubes at all sampling points (by 1.2 to 2.7 log cycles) compared to the coating without bacteriocin (Fig. 2B). Compared to the uncoated control, viable counts in samples coated with carboxymethyl cellulose plus 40 µg/ml AS-48 were 3.1 log cycles lower at day 7. The methyl cellulose coating supplemented with enterocin AS-48 also reduced viable *Listeria* counts significantly ( $p < 0.05$ ) compared to coatings without bacteriocin (Fig. 2C). At the end of storage period, viable counts in samples coated with methyl cellulose plus 40 µg/ml AS-48 were 2.4 log cycles lower than the single coating or 2.5 log cycles lower compared to the uncoated controls.

#### 3.2. Effect of EDTA and sodium lactate incorporation in activated coatings on inactivation of *L. monocytogenes*

The coatings that yielded higher reductions of viable *Listeria* counts (xanthan gum, pectin, carboxymethyl cellulose and chitosan) were selected for further study in which EDTA or sodium lactate were incorporated in the coatings, singly or in combination with enterocin AS-48 (40 µg/ml). The results are shown in Table 1.

Addition of 20 mM EDTA significantly ( $p < 0.05$ ) enhanced inactivation of *Listeria* for the chitosan, pectin and carboxymethyl cellulose coatings, especially during the late storage of samples. Viable *Listeria*

**Table 1**  
Effect of EDTA and sodium lactate applied singly or in combination with enterocin AS-48 (40 µg/ml) on inactivation of *L. monocytogenes* by different coatings on apple cubes.

Coating	Viable cell counts (Log <sub>10</sub> CFU/g) during storage (days)‡			
	0	1	3	7
Chitosan	3.47 ± 0.25	2.48 ± 0.24	2.30 ± 0.35	1.24 ± 0.53
Chitosan + AS-48	2.27 ± 0.39*	1.47 ± 0.42	1.27 ± 0.36*	1.00 ± 0.24
Chitosan + EDTA	1.94 ± 0.33*	1.0 ± 0.24*	<1.0	<1.0
Chitosan + EDTA + AS-48	1.02 ± 0.21*	<1.0	<1.0	<1.0
Chitosan + lactate	3.27 ± 0.21	2.47 ± 0.24	1.87 ± 0.14	1.33 ± 0.32
Chitosan + lactate + AS-48	2.60 ± 0.18	2.0 ± 0.32	1.0 ± 0.18*	<1.0
Pectin	4.39 ± 0.24	4.23 ± 0.36	3.67 ± 0.32	3.85 ± 0.36
Pectin + AS-48	2.76 ± 0.15*	2.74 ± 0.21*	2.05 ± 0.36*	1.08 ± 0.39*
Pectin + EDTA	3.32 ± 0.18	2.82 ± 0.24*	2.39 ± 0.18*	1.69 ± 0.28*
Pectin + EDTA + AS-48	1.69 ± 0.41*†	<1.00	<1.00	<1.00
Pectin + lactate	3.43 ± 0.32	2.90 ± 0.28*	2.54 ± 0.19	1.60 ± 0.18*
Pectin + lactate + AS-48	2.40 ± 0.32*	1.87 ± 0.33*	1.44 ± 0.34*	<1.00
Xanthan gum	4.27 ± 0.15	3.72 ± 0.21	3.77 ± 0.25	2.92 ± 0.21
Xanthan + AS-48	2.97 ± 0.24*	2.77 ± 0.32	2.57 ± 0.29*	1.32 ± 0.35*
Xanthan + EDTA	3.14 ± 0.48	2.97 ± 0.38	2.77 ± 0.38*	1.27 ± 0.42*
Xanthan + EDTA + AS-48	1.67 ± 0.33*	<1.00	<1.00	<1.00
Xanthan + lactate	3.67 ± 0.28	3.17 ± 0.28	3.10 ± 0.28	1.80 ± 0.25*
Xanthan + lactate + AS-48	2.49 ± 0.27	2.47 ± 0.28*	1.20 ± 0.21*	<1.00
CMC	4.70 ± 0.32	3.79 ± 0.41	3.71 ± 0.29	3.88 ± 0.44
CMC + AS-48	3.57 ± 0.42	2.77 ± 0.21	2.32 ± 0.24*	1.23 ± 0.32*
CMC + EDTA	3.76 ± 0.22	3.20 ± 0.14	2.77 ± 0.28*	2.10 ± 0.25*
CMC + EDTA + AS-48	2.64 ± 0.31*	1.57 ± 0.24*†	<1.00	<1.00
CMC + lactate	4.24 ± 0.19	3.41 ± 0.44	3.12 ± 0.35	2.11 ± 0.25*
CMC + lactate + AS-48	3.25 ± 0.21*	2.30 ± 0.32*	1.31 ± 0.30*†	<1.00

‡Average data ± standard deviation.

CMC, carboxymethyl cellulose.

\*Statistically significant differences (p < 0.05) compared with the single coating.

†Statistically significant differences (p < 0.05) compared with the single chemical preservative.

counts were reduced below detectable levels for the chitosan coating at days 3 and 7 and for the xanthan gum coating at day 7. The combination of EDTA and enterocin AS-48 was quite more effective, since no viable *Listeria* were detected for any of the coatings containing this antimicrobial combination from days 1 to 7.

Incorporation of sodium lactate in the coatings was much less effective compared with EDTA (Table 1). Viable *Listeria* counts in the coatings supplemented with 2.0% sodium lactate were not significantly lower compared to coatings without lactate except for at day 7, and only for pectin, xanthan gum and carboxymethyl cellulose coatings (Table 1). The combination of sodium lactate and enterocin AS-48 reduced viable counts significantly compared to lactate alone in chitosan and pectin coatings at time 0. This combination had a more pronounced effect during late storage, reducing viable cell counts below detectable levels at days 3 and 7 for most of the coatings (or only at day 7 in the case of chitosan) while coatings activated only with lactate did not.

#### 4. Discussion

Results from the present study indicate that application of coatings without bacteriocin reduced viable *Listeria* counts on apple cubes to a variable degree. This effect could be attributed to the low pH of the coatings and the presence of acetic acid. However, in the case of chitosan coating there was a strong reduction in viable counts that could be attributed to the antimicrobial activity of chitosan itself. Depending on the degree of deacetylation, chitosan can have an extensive collection of C2 amino groups, having pKa values of ~6.5, which can become protonated in weakly acidic conditions (Wang & Heuzey, 2016). The antimicrobial properties of chitosan rely on its polycationic character, which favors interaction with negatively-charged microbial cell walls and cytoplasmic membranes. These interactions result in decreased osmotic stability, membrane disruption, and eventual leakage of intracellular elements (Banerjee, Mallick, Paul, Chattopadhyay, & Ghosh, 2010; Ma, Zhou, & Zhao, 2008; Sanpui, Murugadoss, Prasad, Ghosh, & Chattopadhyay, 2008). In addition, chitosan may enter the nuclei of bacteria and fungi and inhibit mRNA and protein synthesis by binding to

microbial DNA (Blecher, Nasir, & Friedman, 2011; Ma et al., 2008; Qi, Xu, Jiang, Hu, & Zou, 2005).

The main purpose of the present study was to determine if the antimicrobial activity of edible coatings could be improved by addition of enterocin AS-48. Presumably, the application of edible coatings would allow a higher retention of bacteriocin activity on the food surface and a slow and gradual release of bacteriocin molecules. This approach would also add the benefit of the coatings themselves, possibly preventing cross contamination of the cut surfaces and other effects such as prevention of browning and weight loss.

Previous studies showed that application of washing treatments with aqueous solutions containing enterocin AS-48 had variable results on bacterial inactivation depending on the food substrate (Cobo-Molinos et al., 2005, 2008). Application of washing treatments with enterocin AS-48 (25 µg/ml) reduced viable counts of *L. monocytogenes* CECT 4032 in alfalfa sprouts by approximately 2.3 log cycles, and by approximately 1.8 to 2.0 log cycles in soybean sprouts. However, washing treatments had a much more limited effect on green asparagus (Cobo-Molinos et al., 2005). Furthermore, application of similar washing treatments reduced viable counts of *L. monocytogenes* CECT 4032 by 1 to 1.3 log cycles in raspberries, 3.4 log cycles in sliced pear or 2.9 log cycles in sliced kiwi, but only 0.6 to 1 log cycles in sliced melon and in watermelon (Cobo-Molinos et al., 2008). Results from the present study indicated that a bacteriocin concentration of 40 µg/ml should be preferred for use in coatings solutions, since it ensured a more homogeneous decrease in viable counts during storage compared to the lower concentration tested (20 µg/ml). This recommended concentration is higher compared to results from previous studies using immersion solutions indicated above. Such differences could be explained considering that only one strain of *L. monocytogenes* was used in previous studies versus the cocktail of strains used in the present work. Furthermore, in the present study we also introduced a trypsin treatment at the point of sample processing to avoid possible effects of adsorbed bacteriocin in plate counting.

Comparing reductions of viable counts for the different coatings supplemented with enterocin AS-48 at 40 µg/ml at time 0 and after 7 days of storage clearly indicated that xanthan gum, pectin and

chitosan coatings performed best, both at early reduction of viable counts (by 2.0 to 3.6 log cycles) and on final count reduction (3.6 to 4.0 log cycles) compared to controls without coatings. In the case of chitosan coating, bacteriocin addition did not seem to enhance antilisterial activity of the chitosan itself significantly. Since enterocin AS-48 has a net positive charge, we could speculate that the deacetylated polymer (also positively charged) and the bacteriocin could compete for binding sites on the bacterium, and that saturation of negative charges by chitosan could hamper binding of enterocin. Carboxymethyl cellulose coatings containing enterocin AS-48 also achieved high reductions (3.1 log cycles) at the end of storage, although the early reduction was low. Since carboxymethyl cellulose has a negative charge and enterocin AS-48 is positively charged, we would expect a slow release of bacteriocin molecules from this substrate. Nevertheless, these interactions are expected to be weaker under the acidic conditions (pH 5.0) of the coating solutions used considering that the polymer has a pKa value of 4.3. Other supports such as potato starch, k-carrageenane and methyl cellulose also achieved high final reductions of viable counts between 2.5 and 2.6 log cycles. In contrast, alginate and casein coatings showed the lowest antimicrobial activities.

Addition of sodium lactate potentiated the antimicrobial activity of coatings very weakly. In combination with enterocin AS-48, sodium lactate slowly improved inactivation of *Listeria*, with greatest effects being detected only after 7 days of incubation. In previous studies, however, addition of sodium lactate improved the inactivation of *L. monocytogenes* on fruit surfaces (other than apples) when applied in combination with enterocin AS-48 as a washing treatment (Cobo-Molinos et al., 2008). Sodium lactate also improved the activity of enterocin AS-48 against *Bacillus cereus* (Grande et al., 2006) and *Staphylococcus aureus* (Ananou, Maqueda, Martínez-Bueno, Gálvez, & Valdivia, 2007). Other studies showed that sodium lactate improved inactivation of *L. monocytogenes* by nisin incorporated in zein coatings applied on turkey frankfurters (Lungu & Johnson, 2005) and by nisin incorporated into chitosan-coated plastic films applied on smoked salmon (Ye, Neetoo, & Chen, 2008) or when nisin and sodium lactate were injected in smoked fish (Nykanen, Weckman, & Lapvetelainen, 2000). Sodium lactate in combination with nisin or pediocin applied for decontamination of fresh produce also improved inactivation of *L. monocytogenes* (Bari et al., 2005; Ukuku, Bari, Kawamoto, & Isshiki, 2005). Sodium lactate also enhanced the antibacterial activity of lactacin 3147 (Scannell, Ross, Hill, & Arendt, 2000).

In contrast with sodium lactate, promising results were obtained for EDTA. Addition of 20 mM EDTA in combination with 40 µg/ml enterocin AS-48 remarkably improved inactivation of the cocktail of *L. monocytogenes* strains for chitosan, pectin and xanthan gum coatings and also to a less extent for the carboxymethyl cellulose coating, reducing viable counts below detection levels early during storage. EDTA acts as a chelating agent. Chelators can destabilize the cell membranes of bacteria by complexing the divalent cations, which act as salt bridges between membrane macromolecules such as lipopolysaccharides (Vaara, 1992; Shelef & Seiter, 1993). In Gram-positive bacteria, chelators may interfere with bacterial growth by competition for divalent cations that may be essential for bacterial metabolism and membrane stabilization (Reidmiller et al., 2006). EDTA has been reported to inhibit bacterial growth by depriving microorganisms from essential growth factors such as Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Fe<sup>2+</sup> and thus inhibiting many enzymes that need these cations as cofactors (Banin, Brady, & Greenberg, 2006). EDTA potentiates the activity of nisin, lysozyme, and monolaurin against Gram-negative bacteria (Razavi-Rohani & Griffiths, 1994; Sinigaglia, Bevilacqua, Corbo, Pati, & Del Nobile, 2008; Stevens, Sheldon, Klapes, & Klaenhammer, 1991). EDTA also enhances the activity of several antimicrobials, (including lysozyme, ovotransferrin, nisin and other bacteriocins) on *Listeria* and other Gram-positives (Ananou et al., 2007; Bari et al., 2005; Branen & Davidson, 2004; Buncic, Fitzgerald, Bell, & Hudson, 1995; Ferrocino et al., 2013; Gänzle, Weber, & Hammes, 1999; Gill & Holley, 2003; Ko, Mendonca, & Ahn, 2008;

Martínez-Viedma et al., 2010; Mastromatteo, Lucera, Sinigaglia, & Corbo, 2010; Parente, Giglio, Ricciardi, & Clementi, 1998; Zhang & Mustapha, 1999).

In conclusion, results from the present study indicate that the efficacy of coatings based on enterocin AS-48 and natural polymeric substances against *L. monocytogenes* on apple cut surfaces can be strongly potentiated by incorporation of EDTA. In particular, the coatings based on apple pectin dosed with enterocin AS-48 and EDTA seem very attractive not only because of their high antilisterial activity but also because pectin, being a natural polymer derived from the same fruit, would be expected to be preferred by consumers compared to polymers from other sources.

## Acknowledgments

We acknowledge the support from the University of Jaen and the Junta de Andalucía (research group AGR230). M.C. López Aguayo was a beneficiary of a fellowship from the Spanish Ministry of Education.

## References

- Abriouel, H., Lucas, R., Ben-Omar, N., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2010). Potential applications of the cyclic peptide enterocin AS-48 in the preservation of vegetable foods and beverages. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2, 77–89.
- Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Gálvez, A. (2003). A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 599–605.
- Alegre, I., Abadías, M., Anguera, M., Oliveira, M., & Viñas, I. (2010). Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiology*, 27(1), 70–76.
- Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., & Valdivia, E. (2007). Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and chemical preservatives against *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 45(1), 19–23.
- Banerjee, M., Mallick, S., Paul, A., Chattopadhyay, A., & Ghosh, S. (2010). Heightened reactive oxygen species generation in the antimicrobial activity of three component iodinated chitosan–silver nanoparticle composite. *Langmuir*, 26, 5901–5908.
- Banin, E., Brady, K. M., & Greenberg, E. P. (2006). Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2064–2069.
- Bari, M. L., Ukuku, D. O., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K., & Kawamoto, S. (2005). Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *Journal of Food Protection*, 68(7), 1381–1387.
- Beuchat, L. R., & Brackett, R. E. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1367–1371.
- Blecher, K., Nasir, A., & Friedman, A. (2011). The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*, 2, 395–401.
- Branen, J. K., & Davidson, P. M. (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), 63–74.
- Buncic, S., Fitzgerald, S., Bell, C. M., & Hudson, R. G. (1995). Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperatures. *Journal of Food Safety*, 15(3), 247–264.
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, 67, 833–848.
- Cha, D. S., & Chinnan, M. S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 223–237.
- Ciolacu, L., Nicolau, A. I., & Hoorfar, J. (2014). *Global safety of fresh produce. A handbook of best practice, innovative commercial solutions and case studies*. Sawston, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Cobo-Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2008). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. *Journal of Food Protection*, 71, 2460–2467.
- Cobo-Molinos, A., Abriouel, H., Ben-Omar, N., Valdivia, E., Lucas, R., Maqueda, M., et al. (2005). Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7781–7787.
- Conway, S. B., Leverentz, R. A., Saftner, W. J., Janisiewicz, C. E., & Leblanc, S. E. (2000). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. *Plant Disease*, 84, 177–181.
- de Azevedo, H. M. C. (2012). Edible coatings. In S. Rodrigues, & F. A. N. Fernandes (Eds.), *Advances in fruit processing technologies* (pp. 345–361). FL: CRC Press.
- Dhall, R. K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 435–450.
- EFSA (European Food Safety Authority), & ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13(1), 3991 (165 pp.).

- FAO-WHO (2015). Codex alimentarius. General standard for food additives. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/gsf/en/>
- FDA Code of Federal Regulations (1998). Title 21, part 172: food additives permitted for direct addition to food for human consumption, subpart B: Food preservatives, sec. 172.120 calcium disodium EDTA.
- Ferrocino, I., La-Storia, A., Torrieri, E., Musso, S. S., Mauriello, G., Villani, et al. (2013). Antimicrobial packaging to retard the growth of spoilage bacteria and to reduce the release of volatile metabolites in meat stored under vacuum at 1 °C. *Journal of Food Protection*, 76(1), 52–58.
- Galvez, A., Lucas, R., Pérez-Pulido, R., & Grande-Burgos, M. J. (2014). In R. W. Hartel (Ed.), *Food biopreservation*. New York: Springer.
- Gänzle, M. G., Weber, S., & Hammes, W. P. (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 46(3), 207–217.
- Garner, D., & Kathariou, S. (2016). Fresh produce-associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, and insights. *Journal of Food Protection*, 79(2), 337–344.
- Ghandi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1–15.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 251–259.
- Glass, K. A., Golden, M. C., Wanless, B., Bedale, W., & Czuprynski, C. (2015). Growth of *Listeria monocytogenes* within a caramel-coated apple microenvironment. *mBio*, 6(5), e01232-15.
- Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N. B., Maqueda, M., et al. (2006). Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice based foods by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 185–194.
- Grande-Burgos, M. J., Pérez-Pulido, R., López-Aguiayo, M. C., 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, 22706–22727.
- Harris, L. J., Farber, J. N., Beuchat, L. R., Parish, M. E., Suslow, T. V., Garret, E. H., et al. (2003). Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 78–141.
- Heimbach, J., Rieth, S., Mohamedshah, F., Slesinski, R., Samuel-Fernando, P., & Sheenan, T. (2000). Safety assessment of iron EDTA [sodium iron (Fe3+) ethylene diamine tetraacetate]: Summary of toxicological, fortification and exposure data. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 99–111.
- Jiang, Z., Neetoo, H., & Chen, H. (2011). Efficacy of freezing, frozen storage and edible antimicrobial coatings used in combination for control of *Listeria monocytogenes* on roasted turkey stored at chiller temperatures. *Food Microbiology*, 28, 1394–1401.
- Johannessen, G. S., Loncarevic, S., & Kruse, H. (2002). Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 199–204.
- Ko, K. Y., Mendonca, A. F., & Ahn, D. U. (2008). Effect of ethylenediaminetetraacetate and lysozyme on the antimicrobial activity of ovotransferrin against *Listeria monocytogenes*. *Poultry Science*, 87(8), 1649–1658.
- Krochta, J. M., & Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51, 61–74.
- Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2011). Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. *Journal of Food Science*, 76(3), R90–R102.
- Letien, C., Vachion, C., Mateescu, M. A., & Lacroix, M. (2001). Milk protein coatings prevent oxidative browning of apples and potatoes. *Journal of Food Science*, 66, 512–516.
- Lin, D., & Zhao, Y. (2007). Innovation in development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6, 1–15.
- Lungu, B., & Johnson, M. G. (2005). Fate of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of model Turkey frankfurter pieces treated with zein coatings containing nisin, sodium diacetate, and sodium lactate at 4 °C. *Journal of Food Protection*, 68, 855–859.
- Ma, Y., Zhou, T., & Zhao, C. (2008). Preparation of chitosan-nylon-6 blended membranes containing silver ions as antibacterial materials. *Carbohydrate Research*, 343, 230–237.
- Maftoonazad, N., & Ramaswamy, H. S. (2005). Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 617–624.
- Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Sanchez-Barrena, M. J., González, C., Albert, A., et al. (2004). Peptide AS-48: Prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Current Protein and Peptide Science*, 5, 399–416.
- Martínez-Viedma, P., Ercolini, D., Ferrocino, I., Abriouel, H., Ben-Omar, N., Lucas-López, R., et al. (2010). Effect of polythene film activated with enterocin EJ97 in combination with EDTA against *Bacillus coagulans*. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 514–518.
- Mastromatteo, M., Lucera, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2010). Synergic antimicrobial activity of lysozyme, nisin, and EDTA against *Listeria monocytogenes* in ostrich meat patties. *Journal of Food Science*, 75(7), M422–M429.
- McCullum, J. T., Cronquist, A. B., Silk, B. J., Jackson, K. A., O'Connor, K. A., Cosgrove, S., et al. (2013). Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *New England Journal of Medicine*, 369(10), 944–953.
- Meheriuk, M., & Lau, D. L. (1988). Effect of two polymeric coatings on fruit quality of 'Bartlett' and 'Anjou' pears. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113, 222–226.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., & Gibbs, P. A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21, 213–216.
- Neetoo, H., Ye, M., & Chen, H. (2010). Bioactive alginate coatings to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon slices and fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 326–331.
- Nykanen, A., Weckman, K., & Lapveteläinen, A. (2000). Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 63–72.
- Olivas, G. I., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). Edible coatings for fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*, 45, 657–670.
- Pao, S., Brown, G. E., & Schneider, K. R. (1998). Challenge studies with selected pathogenic bacteria on freshly peeled Hamlin orange. *Journal of Food Science*, 63, 359–362.
- Parente, E., Giglio, M. A., Ricciardi, A., & Clementi, F. (1998). The combined effect of nisin, leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1–2), 65–75.
- Pei, H. N., Chen, X. G., Li, Y., & Zhou, H. Y. (2008). Characterization and ornidazole release in vitro of a novel composite film prepared with chitosan/poly(vinyl alcohol)/alginate. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85, 566–572.
- Penteado, A. L., & Leitao, M. F. F. (2004). Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 89–94.
- Pizato, S., Cortez-Vega, W. R., de Souza, J. T. A., Prentice-Hernández, C., & Borges, C. D. (2013). Effects of different edible coatings in physical, chemical and microbiological characteristics of minimally processed peaches (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Food Safety*, 33, 30–39.
- Qi, H., Hu, W., Jiang, A., Tian, M., & Li, Y. (2011). Extending shelf-life of fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12, 62–66.
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2005). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339, 2693–2700.
- Razavi-Rohani, S. M., & Griffiths, M. W. (1994). The effect of mono and polyglycerol laurate on spoilage and pathogenic bacteria associated with foods. *Journal of Food Safety*, 14, 131–151.
- Realini, C. E., & Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, 98, 404–419.
- Reidmiller, J. S., Smith, W. L., Sawyer, M. M., Osburn, B. I., Stott, J. L., & Cullor, J. S. (2006). Antimicrobial properties of the chelating agent EDTA on streptococcal bovine mastitis isolates. *Journal of Food Protection*, 69(6), 1460–1462.
- Rodrigues-Freitas, I., Cortez-Vega, W. R., Pizato, S., Prentice-Hernández, C., & Borges, C. D. (2013). Xanthan gum as a carrier of preservative agents and calcium chloride applied on fresh-cut apple. *Journal of Food Safety*, 33, 229–238.
- Sanpui, P., Murugadoss, A., Prasad, P. V., Ghosh, S. S., & Chattopadhyay, A. (2008). The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 142–146.
- Sayanjali, S., Ghanbarzadeh, B., & Ghassifar, S. (2011). Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. *Food Science and Technology Research*, 44, 1133–1138.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M., Roy, S. L., et al. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7–15.
- Scannell, A. G., Ross, R. P., Hill, C., & Arendt, E. K. (2000). An effective lacticin biopreservative in fresh pork sausage. *Journal of Food Protection*, 63, 370–375.
- Shelof, L., & Seiter, J. (1993). Indirect antimicrobials. In P. M. Davidson, & A. L. Braner (Eds.), *Antimicrobials in foods* (pp. 544–555). New York: Marcel Dekker.
- Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Pati, S., & Del Nobile, M. A. (2008). Use of active compounds for prolonging the shelf life of mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 18, 624–630.
- Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A., & Klaenhammer, T. R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3613–3615.
- Ukuku, D. O., & Fett, W. (2002). Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated on cantaloupe surfaces and efficacy of washing treatments to reduce transfer from rind to fresh-cut pieces. *Journal of Food Protection*, 65, 924–930.
- Ukuku, D. O., Bari, M. L., Kawamoto, S., & Isshiki, K. (2005). Use of hydrogen peroxide in combination with nisin, sodium lactate and citric acid for reducing transfer of bacterial pathogens from whole melon surfaces to fresh-cut pieces. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 225–233.
- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 56, 395–411.
- Valdés, A., Burgos, N., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2015). Natural pectin polysaccharides as edible coatings. *Coatings*, 5, 865–886.
- Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., del Río, M. A., & Pérez-Gago, M. B. (2011). Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 872–900.
- Wang, X. Y., & Heuzey, M. C. (2016). Chitosan-based conventional and pickering emulsions with long-term stability. *Langmuir*, 32(4), 929–936.
- Ye, M., Neetoo, H., & Chen, H. (2008). Effectiveness of chitosan-coated plastic films incorporating antimicrobials in inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 31(3), 235–240.
- Zhang, S., & Mustapha, A. (1999). Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. *Journal of Food Protection*, 62, 1123–1127.

## **ARTÍCULO 2**

**María José Grande Burgos, María del Carmen López Aguayo, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Rosario Lucas López.**

**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* (under review)**

**Analysis of the microbiota of refrigerated chopped parsley after treatments with a coating containing enterocin AS-48 or by High-Hydrostatic Pressure**

María Jose Grande Burgos, María del Carmen López Aguayo, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez\*, and Rosario Lucas

*Área de Microbiología. Departamento de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. 23071-Jaén, Spain.*

*\*Corresponding author. Present address: Área de Microbiología. Departamento de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Edif. B3. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas s/n. 23071-Jaén, Spain.*

Email address: [agalvez@ujaen.es](mailto:agalvez@ujaen.es)

## Abstract

Parsley can be implicated in foodborne illness, yet chopped parsley is used as an ingredient or garnish for multiple dishes. The aim of the present study was to determine the effect of two different treatments (coating with a pectin-EDTA solution containing the circular bacteriocin enterocin AS-48, and a high hydrostatic pressure-HHP-treatment at 600 MPa for 8 min) on parsley that was refrigerated stored in trays at 5 °C for 10 days. Both treatments reduced viable counts by 3.7 log cycles and retarded growth of survivors during storage. The bacterial biodiversity of the chopped parsley was studied by high throughput sequencing (Illumina Miseq). Bacterial biodiversity of controls samples was represented mainly by *Proteobacteria* (96.87%) belonging to genera *Pseudomonas* (69.12%), *Rheinheimera* (8.56%) and *Pantoea* (6.91%) among others. During storage, the relative abundance of *Bacteroidetes* (represented mainly by *Flavobacterium* and *Sphingobacterium*) increased to 26.66%. Application of the pectin-bacteriocin-EDTA coating reduced the relative abundance of *Proteobacteria* (63.75%) and increased that of *Firmicutes* (34.70%). However, the relative abundances of certain groups such as *Salmonella*, *Shigella* and *Acinetobacter* increased transiently at early storage times. Late storage was characterized by an increase in the relative abundance of *Proteobacteria*, mainly *Pseudomonas*. The HHP treatment reduced the relative abundance of *Proteobacteria* (85.88 %) and increased that of *Actinobacteria* (8.01%), but it also induced complex changes in the surviving microbiota depending on storage time, involving a transient increase in the relative abundance of *Firmicutes*. Potentially-pathogenic bacteria (*Shigella*) only increased in relative abundance by the end of the storage period in the HHP-treated samples. Results of the present study illustrate how two different treatments achieving similar reductions in viable cell counts have a different impact on the bacterial biodiversity of chopped parsley.

**Keywords:** Parsley; coating; bacteriocin; High-Hydrostatic Pressure; biodiversity

## 1. Introduction

Parsley (*Petroselinum crispum* Mill.) is a popular culinary vegetable native to the countries of the Mediterranean region and is widely used as a flavoring and aromatic food additive (Simon & Quinn, 1988; Díaz-Maroto, Pérez-Coello, & Cabezudo, 2002; Zhang, Chen, Wang, & Yao, 2006). Parsley is also used in folk medicine for the treatment of different diseases, and its bioactive constituents exhibit a wide range of pharmacological properties, including antioxidant, hepatoprotective, brain protective, anti-diabetic, analgesic, spasmolytic, immunosuppressant, anti-platelet, gastroprotective, cytoprotective, laxative, estrogenic, diuretic, hypotensive, antibacterial and antifungal activity (Farzaei, Abbasabadi, Reza, Ardekani, & Rahimi, 2013). Consumption of foods containing parsley has been implicated in food-borne illness. Back in 1995, Tschape et al. reported a summer outbreak of severe gastroenteritis followed by haemolytic uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura in children after consumption of sandwiches containing parsley contaminated with verotoxigenic *Cyrobacter freundii*. Parsley was also the implicated or suspected source of unrelated restaurant-associated enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) outbreaks in Minnesota (Naimi et al., 2003). In each of the outbreak-associated restaurants, parsley was chopped, held at room temperature, and used as an ingredient or garnish for multiple dishes. The same and other studies have reported on the implication of parsley as vehicle for *Shigella* species (*Shigella sonney*, *Shigella boydi*) implicated in foodborne shigellosis (Centers for Disease Control and Prevention, 1999; Naimi et al., 2003; Chan & Blaschek, 2005). Manure and irrigation with contaminated water are main sources for enteric pathogens in fresh produce. One study showed that spray irrigation with water containing *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (8.5 log CFU/ml) resulted in persistence of the bacteria in the phyllosphere and the rhizosphere for at least 4 weeks

(Kisluk & Yaron, 2012). Another study reported that *E. coli* O157:H7 persisted for 154 to 217 days in soils amended with contaminated composts and was detected on lettuce and parsley for up to 77 and 177 days, respectively, after seedlings were planted (Islam, Doyle, Phatak, Millner, & Jiang, 2004). Another study on the microbiological quality of fresh produce revealed that total coliforms increased during the packing process in the case of cilantro and parsley (Johnston et al., 2005).

Fresh chopped parsley may have a profitable market in different food sectors (such as hotels, restaurants and catering services) as a ready-to use ingredient for food preparation. However, cutting and manipulation may shorten the shelf life of parsley considerably and at the same time release nutrients that may enhance bacterial growth. Among the different methods tested in food preservation, non-thermal methods such as bacteriocins (Galvez, Lucas, Pérez-Pulido, & Grande-Burgos, 2014), activated coatings (Cagri, Ustunol, & Ryser, 2004; Dhall, 2013), or high hydrostatic pressure (HHP) treatments (Yaldagard, Mortazavi, & Tabatabaie, 2008; Balasubramaniam, Martínez-Montegudo, & Gupta, 2015) are gaining interest in the preservation of fresh produce, since they may be considered natural preservation methods or have only a low or no impact on the food properties and small, bioactive molecules present in the food (Balasubramaniam, Martínez-Montegudo, & Gupta, 2015). The aim of the present study was to determine the effect of two preservation methods on chopped parsley stored under refrigeration. One method was based on the application of the broad-spectrum circular bacteriocin enterocin AS-48 (Grande Burgos, Pérez-Pulido, López-Aguayo, Gálvez, & Lucas, 2014) incorporated in a pectin coating containing EDTA, and the other was based on application of a HHP treatment. Since there are no previous studies on the microbiota of chopped parsley or how it can be affected by application of food preservation practices, we chose to study the bacterial biodiversity of chopped

parsley before and after application of the preservation treatments, by high throughput DNA sequencing analysis.

## **2. Methods**

### *2.1. Sample preparation, treatments, and microbiological analysis*

Parsley (*Petroselinum crispum*, 1 kg) was bought at a local supermarket and cut into 2-3 cm long pieces with sterile scissors on a sterile beaker under aseptic conditions. The cut parsley was thoroughly mixed with a sterile spatula and divided into three batches (each one in duplicate). Batch A served as untreated control. Batch B was coated by immersion for 10 min in a pectin solution containing 1.0 % pectin from apples (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), 100 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 0.5% acetic acid (Sigma-Aldrich) adjusted to pH 5.0 and 40 µg/ml enterocin AS-48 prepared as described in a previous study (López Aguayo, Grande Burgos, Pérez Pulido, Gálvez, & Lucas, 2016). The pectin solution was prepared as described elsewhere (Jiang, Neetoo, & Chen, 2011; López Aguayo, Grande Burgos, Pérez Pulido, Gálvez, & Lucas, 2016). After the coating treatment, the samples were allowed to drain for one min. on sterile filter paper in a biosafety cabinet (Telstar, Madrid, Spain). Then the filter paper was replaced and the samples were allowed to dry for one hour in the cabinet. Batch C was placed inside polyethylene polyamide plastic bags containing an acidified saline calcium chloride solution (1% calcium chloride –PanReac, Barcelona, Spain; 0.5% acetic acid and 0.85% NaCl –Sigma-Aldrich). The bags were sealed and treated by high hydrostatic pressure for 8 min at 600 MPa and room temperature by using a Stansted Fluid Power LTD HHP equipment (SFP, Essex, UK) as described elsewhere (Toledo del Árbol et al., 2016a). After application of the HHP treatment, the bags were opened and the samples were drained and allowed to dry on sterile filter paper in a biosafety

cabinet as described above. Samples from the three duplicate batches were deposited in 11 x 8 x 5 cm (length, width, height; Bandesur, Jaen, Spain) plastic trays (5 g per tray), and the trays were stored at 5 °C for 10 days. At days 0, 3, 5 and 10, three trays were removed from each batch replicate (six trays in total per batch) for microbiological analysis. For each tray, the content of the tray was transferred to a sterile stomacher bag containing 20 ml of sterile buffered peptone water and pummeled for 3 min in a Stomacher 80 (Seward, Worthing, UK). One aliquot (1 ml) of the homogenate was transferred to a sterile test tube, serially diluted on sterile saline solution and plated in triplicate on trypticase soya agar (TSA, Scharlab, Barcelona, Spain). After incubation at 30 °C for 24 h, the average viable cell counts were calculated for each batch (expressed as log colony forming units -CFU- per gram of sample).

## 2.2. DNA extraction

Aliquots (5 ml) from the remaining homogenates obtained for the three samples corresponding to each batch replicate as described above were mixed in a sterile 50 ml test tube and centrifuged at 600 x g for 5 min in order to remove solids from the vegetable tissue. An aliquot (1.5 ml) of the resulting supernatant was then transferred to an Eppendorf test tube and centrifuged at 13.500 x g for 5 min to recover microbial cells. The pellet was resuspended in 0.5 ml sterile saline solution each. Then, Propidium Monoazide (PMA™, Biotium, UK) was added to block subsequent PCR amplification of the genetic material from dead cells (Nocker, Cheung, & Camper, 2006; Nocker, Sossa-Fernandez, Burr, & Camper, 2007) as described by Elizaquivel, Sánchez, & Aznar (2012). DNA from PMA-treated cells was extracted by using a GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich), following instructions provided by the manufacturer. The resulting DNA from the two batch replicates and same sampling

point was pooled into a single sample. DNA concentration and quality were measured with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, United Kingdom).

### *2.3. DNA sequencing and analysis*

The sequence of the V3-V4 region of 16S rRNA gene was used as the taxonomic basis to estimate bacterial populations present in the samples, according to Caporaso et al. (2011) using Illumina technology (Illumina Miseq, 2 x 300). Accurate concentration of DNA samples was determined using a fluorimetric method with Quant-IT PicoGreen reagent (Thermo Fischer) in a Quantifluor ST fluorometer (Promega). Afterwards, DNA samples were diluted to 1.5 ng/ $\mu$ l and 2  $\mu$ l of each sample were used to amplify the V3-V4 region of 16 S rRNA gene. Those specific primers were used as fusion primers respectively linked to CS1 and CS2 sequences (Fluidigm) useful for subsequent barcoding. Positive amplification was evaluated by gel electrophoresis of PCR products. Afterwards, a second PCR of low number of cycles was applied to add the individual barcode to each of the samples, as well as to incorporate Illumina-specific sequences in the amplicon libraries. Individual libraries were analyzed using a Bioanalyzer 2100 (Agilent) to estimate the concentration of the specific PCR products and a pool of samples was made in equimolar amounts. The pool was further cleaned, quantified and the exact concentration of the library was measured by real time PCR, using Illumina specific primers (Kapa Biosystems). Finally, samples were denatured and prepared at 8-12 pM to be seed into a Miseq flowcell (Illumina) and run under a 600 cycle pair end sequencing procedure (Parque Científico de Madrid). After demultiplexing, paired end reads were joined together with the fastq-join program (<https://expressionanalysis.github.io/ea-utils/>). Only reads that had quality value (QV) scores of  $\geq 20$  for more than 99% of the sequence were extracted for further analysis. All sequences with ambiguous base calls were discarded. Sequence reads were

assigned to operational taxonomic units (OTUs) based on sequence similarity for each read to 16S rRNA genes from the NCBI nt database by using BLASTN function (Era7 Bioinformatics, Granada, Spain). Each read was assigned to the taxon corresponding to the Best Blast Hit over a threshold of similarity ( $e < 1E-15$ ).

#### *2.4. Statistical analysis*

Data on viable cell counts for the different treatments and storage times were analysed with two-way ANOVA (Microsoft Excel). The Shannon Wiever ( $H'$ ) and Simpson ( $D$ ) biodiversity indexes were calculated with Excel programme. Data on OTUs with relative abundances  $\geq 1.5\%$  obtained for the different treatments and storage times were analyzed by principal component analysis (PCA) with Pearson correlation coefficient ( $r$ ) (XLSTAT 2014 evaluation version (2014.1.03, Addinsoft, France). Correlations were defined as very weak (0.00-0.19), weak (0.20-0.39), moderate (0.4-0.59), strong (0.60-0.79) or very strong (0.80-0.99), with a P significance of  $< 0.05$ .

### **3. Results**

#### *3.1. Effect of treatments on microbial load*

Viable cell counts in the control samples increased non-significantly ( $P > 0.05$ ) from 6.32 to 6.83 log CFU/g at day 3, but then increased significantly ( $P < 0.05$ ) during the remaining storage period, reaching 9.34 log CFU/g at day 10 (Table 1). Samples coated with the pectin-bacteriocin-EDTA solution showed viable cell counts at time 0 that were significantly lower ( $P < 0.05$ ) by 3.75 log cycles compared to the untreated controls. A significant increase ( $P < 0.05$ ) in viable counts was noticed in the coated samples during late storage, approaching 4 log CFU/g at day 10. Nevertheless, viable counts in the coated samples were always significantly lower ( $P < 0.05$ ) during storage

compared to untreated controls. The samples treated by HHP also showed a significant ( $P < 0.05$ ) reduction of 3.70 log cycles at time 0. Furthermore, viable counts did not increase significantly ( $P > 0.05$ ) during the first 7 days of storage, although they approached a concentration of 5 log CFU/g at day 10. Viable counts obtained for the HHP treatment were significantly lower ( $P < 0.05$ ) compared to untreated controls at all storage points, but they were only significantly different ( $P < 0.05$ ) than the coated samples at day 10 of storage.

### 3.2. Changes in bacterial diversity after treatments and during storage

The number of reads ranged from 24965 to 199585 (Table 2). Most OTUs recovered from control samples at time 0 (96.87%) belonged to *Proteobacteria* (Fig. 1A). These were followed in relative abundance by *Bacteroidetes* (1.89%), *Firmicutes* (0.77%) and *Actinobacteria* (0.45%). At genus level (Fig. 1B), *Proteobacteria* were represented mainly by OTUs belonging to genus *Pseudomonas* (69.12%), followed by *Rheinheimera* (8.56%), *Pantoea* (6.91%) and sequences belonging to an unidentified Gamma proteobacterium (5.96%). During storage of controls samples, the relative abundance of *Proteobacteria* decreased, while *Bacteroidetes* increased (reaching 26.66% at day 10). At genus level, there was a marked decrease in the relative abundance of *Pseudomonas* (down to 30.41% at day 10) and an increase in the relative abundances of other groups such as *Rheinheimera*, *Flavobacterium* and *Sphingobacterium*.

The HHP treatment reduced the relative abundance of *Proteobacteria* (85.88 %) and increased that of *Actinobacteria* (8.01%) (Fig. 1A). There was also a remarkable change at genus level (Fig. 1B). The relative abundance of *Pseudomonas* was reduced to 21.05% after treatment, while several other genera (*Enterobacter*, *Sphingomonas*,

and others) increased. *Proteobacteria* decreased further at day 3, while several groups of *Firmicutes* (*Paenibacillus*, *Enterococcus*, Uncultured low G+C Gram-positive bacterium, and others) increased. However, the relative abundance of *Proteobacteria* increased again during late storage. This involved mainly OTUs for *Pseudomonas*, Gamma proteobacterium and *Rheinheimera* at day 7. At day 10, however, there was a decrease in the relative abundance of *Pseudomonas* and an increase of the Enterobacteria *Shigella* (18.87%), *Enterobacter* (7.90%) and *Serratia* (2.80%).

Application of the pectin-bacteriocin-EDTA coating reduced the relative abundance of *Proteobacteria* at time 0 (63.75%) and increased that of *Firmicutes* (34.70%) (Fig. 1A). OTUs for genus *Pseudomonas* were reduced to 5.01%, while OTUs from other *Proteobacteria* (mainly *Salmonella* and *Shigella* and to a less extent *Pantoea*) and *Firmicutes* (Uncultured low G+C Gram-positive bacterium and *Enterococcus*) increased in their relative abundances (Fig. 1B). This was a transient change, since OTUs for the Enterobacteria decreased below 1% by day 3, a storage point where *Acinetobacter* became the main OTU (70.60%) among *Proteobacteria* followed by *Paenibacillus* 11.68%) among *Firmicutes*. During late storage, there was a remarkable increase in the relative abundances of OTUs belonging to *Pseudomonas* and Gamma proteobacterium (and to a less extent also for other genera such as *Stenotrophomonas*, *Erwinia*, *Duganella* and *Janthinobacterium*) and also a higher relative abundance of *Bacteroidetes* represented mainly by *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium* and *Flavobacterium*.

Calculation of biodiversity indexes indicated a decrease in both Shannon-Wiener and Simpson's indexes after application of the pectin-bacteriocin coating or the HHP treatment followed by an increase in both index values during prolonged storage in all cases (Table 2). Principal component analysis of the data at genus level indicated

the lack of positive correlations between the samples treated with the pectin-bacteriocin-EDTA coating at days 0 and 3 with the rest of the samples studied (Table 3, Fig. 2). The remaining samples treated with pectin-bacteriocin-EDTA coating showed significant ( $P < 0.05$ ) positive correlations with controls and also with the samples treated by HHP. Most of the observed positive correlations were strong or very strong. The HHP-treated samples from time 0 did not show any significant ( $P > 0.05$ ) positive correlations with control samples from days 7 and 10 or with HHP-treated samples from day 10.

#### 4. Discussion

According to results from the present study, chopped parsley had a high microbial load that was able to proliferate during refrigerated storage, reaching 9.34 log CFU/g and leading to food spoilage. The bacterial microbiota of parsley was composed mainly of *Proteobacteria* of genus *Pseudomonas*. This bacterial group has also been reported to be highly represented in the microbiota of other vegetable foods (Lee et al., 2013; Pérez Pulido, Toledo, Grande, Gálvez, & Lucas, 2015; Toledo del Árbol et al., 2016b). During refrigerated storage, the main change in the bacterial diversity detected consisted in a decrease in the relative abundance of *Pseudomonas* and an increase in the relative abundance of other plant-associated bacteria of the phylum *Bacteroidetes*, mainly *Flavobacterium* and *Sphingobacterium*.

Application of a pectin-bacteriocin-EDTA coating reduced viable counts by 3.75 log cycles and delayed bacterial growth till the end of storage. Enterocin AS-48 acts on the bacterial cytoplasmic membrane and is active mainly on Gram-positive bacteria (Grande Burgos, Pérez-Pulido, López-Aguayo, Gálvez, & Lucas, 2014). Its inhibitory spectrum can be extended to Gram-negative bacteria in combination with outer-membrane disturbing agents such as EDTA (Ananou, Gálvez, Martínez-Bueno,

Maqueda, & Valdivia, 2005). Furthermore, EDTA has been reported to inhibit bacterial growth by depriving microorganisms from essential growth factors such as  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , and  $Fe^{2+}$  and thus inhibiting many enzymes that need these cations as cofactors (Banin, Brady, & Greenberg, 2006). Therefore, it would be expected that the combined treatment would reduce a microbial load composed mainly of Gram-negatives. As a matter of fact, the results of bacterial diversity indicated that the coating treatment markedly reduced the relative abundance of *Pseudomonas*. However, other bacterial groups showed high relative abundances in the treated samples right after treatment or during early storage. In particular, *Acinetobacter* accounted for 70.60% of total OTUs at day 3 of storage. While the majority of *Acinetobacter* species are nonpathogenic, environmental organisms, those species adapted to clinical environments are now causing serious health problems (Wong et al., 2017). The fact that the Enterobacteria *Shigella* and *Salmonella* showed a high relative abundance in the treated samples at time 0 deserves special attention. Although these two bacterial groups were not detected during storage, there is a concern that they may cause foodborne illness, as previous *Shigella* outbreaks demonstrated. A previous study on *S. boydii* from an outbreak associated to consumption of contaminated parsley concluded that the *S. boydii* general stress response sigma factor *rpoS* gene plays a vital role in survival under acidic conditions. Enteric micro-organisms have developed several inducible mechanisms for surviving transient acid stress (Foster, 2000; Foster & Moreno, 1999). Since the coating used in the present study was acidified to pH 5.0 with acetic acid, we could suggest a higher tolerance of enteric bacteria to other stress conditions in the tested food after induction of acid stress.

Application of HHP treatment on parsley achieved a similar reduction in viable cell counts as the activated coating, and also delayed microbial growth during

refrigerated storage. The HHP treatment was applied under the same acidic conditions (0.5% acetic acid) as the activated coating. However, main Enterobacteria detected in the treated samples was *Enterobacter*. The presumptive pathogenic *Salmonella* and *Shigella* were not detected or they had very low relative abundances in the HHP-treated samples, except for *Shigella* at day 10 of storage. While the relative abundance of *Pseudomonas* was also reduced, other bacterial groups typically associated with plants or soil (such as *Sphingomonas*, *Rahnella* or *Dyella*) seemed to prevail. There are no previous studies on application of HHP treatments for preservation of parsley. From the microbiological point of view, the results from the present study suggest that HHP could be applied to reduce the microbial load of chopped parsley. There is a growing interest in using HHP treatments for decontamination of fresh produce, as exemplified by a study on application of this technology for decontamination of green onions from *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 (Neetoo, Nekoozadeh, Jiang, & Chen, 2011). Nevertheless, further work based on challenge tests with specific pathogenic strains is needed to assess the efficacy of using HHP for inactivation of foodborne pathogens in parsley.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by research grant AGL2016-77374-R (MINECO) and the University of Jaen's Plan de Apoyo a la Investigación (AGR230) MCLA was beneficiary of a fellowship from MECD (Ref. AP2012-1024).

## References

- Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2005). Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of applied microbiology*, 99, 1364-1372.
- Balasubramaniam, V. M., Martínez-Monteagudo, S. I., & Rockendra, G. (2015). Principles and Application of High Pressure–Based Technologies in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 435-462.
- Banin, E., Brady, K. M., & Greenberg, E. P. (2006). Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2064-2069.
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, 67, 833-848.
- 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*, 108(1), 4516–4522.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1999). Outbreaks of *Shigella sonnei* infection associated with eating fresh parsley--United States and Canada, July-August 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 48(14), 285-289.
- 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.

- Dhall, R. K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 435-450.
- Díaz-Maroto, M., Pérez-Coello, M., & Cabezudo, M. (2002). Effect of different drying methods on the volatile components of parsley (*Petroselinum crispum* L.). *European Food Research and Technology*, 215(3), 227–230.
- Elizaquivel, P., Sánchez, G., & Aznar, R. (2012). Quantitative detection of viable foodborne *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control*, 25, 704–708.
- Farzaei, M. H., Abbasabadi, Z., Reza, M., Ardekani, S., & Rahimi, R. (2013). Parsley: A review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 33(6), 815–826.
- Foster, J. W., & Moreno, M. (1999). Inducible acid tolerance mechanisms in enteric bacteria. *Novartis Foundation Symposium*, 221, 55-69.
- Foster, J. W. (2000). Microbial responses to acid stress. In G. Storz & R. Hengge-Aronis (Eds.), *Bacterial Stress Responses* (pp. 99–115). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Galvez, A., Lucas, R., Pérez-Pulido, R., & Grande-Burgos, M. J. (2014). Food Biopreservation. New York: Springer.
- Grande-Burgos, M. J., Pérez-Pulido, R., López-Aguayo, M. C., 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, 22706-22727.

- Islam, M., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., & Jiang, X. (2004). Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection*, 67(7), 1365-1370.
- Jiang, Z., Neetoo, H., & Chen, H. (2011). Efficacy of freezing, frozen storage and edible antimicrobial coatings used in combination for control of *Listeria monocytogenes* on roasted turkey stored at chiller temperatures. *Food Microbiology*, 28, 1394-1401.
- Johnston, L. M., Jaykus, L. A., Moll, D., Martinez, M. C., Anciso, J., Mora, B., & Moe, C. L. (2005). A field study of the microbiological quality of fresh produce. *Journal of Food Protection*, 68(9), 1840-1847.
- Kisluk, G., & Yaron, S. (2012). Presence and persistence of *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* in the phyllosphere and rhizosphere of spray-irrigated parsley. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4030-4036.
- Lee, D. H., Kim, J. B., Kim, M., Roh, E., Jung, K., Choi, M., Oh, C., Choi, J., Yun, J., & Heu, S. (2013). Microbiota on spoiled vegetables and their characterization. *Journal of Food Protection*, 76(8), 1350-1358.
- López Aguayo, M. C., Grande Burgos, M. J., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R. (2016). Effect of different activated coatings containing enterocin AS-48 against *Listeria monocytogenes* on apple cubes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 35, 177-183.
- 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.

Neetoo, H., Nekoozadeh, S., Jiang, Z., & Chen, H. (2011). Application of high hydrostatic pressure to decontaminate green onions from *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 28, 1275e1283.

Nocker, A., Cheung, C. Y., & Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 310–320.

Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M., & Camper, A. K. (2007). Use propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5111–5117.

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.

Simon, J. E., & Quinn, J. (1988). Characterization of essential oil of parsley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 467–472.

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.

- Toledo del Árbol, J., Pérez Pulido, R., La Stora, 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.
- 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.
- Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., & Spellberg, B. (2017). Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), 409-447.
- Yaldagard, M., Mortazavi, S. Y., & Tabatabaie, F. (2008). The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: a review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, 7, 2739-2767.
- Zhang, H., Chen, F., Wang, X., & Yao, H. -Y. (2006). Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Research International*, 39(8), 833–839.

**Table 1.** Viable counts (total aerobic mesophiles) of control parsley samples and samples treated by high hydrostatic pressure (HHP) or coated with pectin plus bacteriocin (PB).

<b>Treatment</b>	<b>Viable counts (Log<sub>10</sub> CFU/g ± SD) at different storage times (days)</b>			
	0	3	7	10
Control	6.32 ± 0.05	6.84 ± 0.09	7.75 ± 0.09	9.35 ± 0.06
HHP	2.60 ± 0.29	2.08 ± 0.10	3.17 ± 0.04	4.92 ± 0.09
PB	2.57 ± 0.07	2.27 ± 0.42	3.41 ± 0.24	3.95 ± 0.52

SD, standard deviation

**Table 2.** Number of sequences (reads) and observed diversity for 16S rRNA amplicons analyzed in this study.

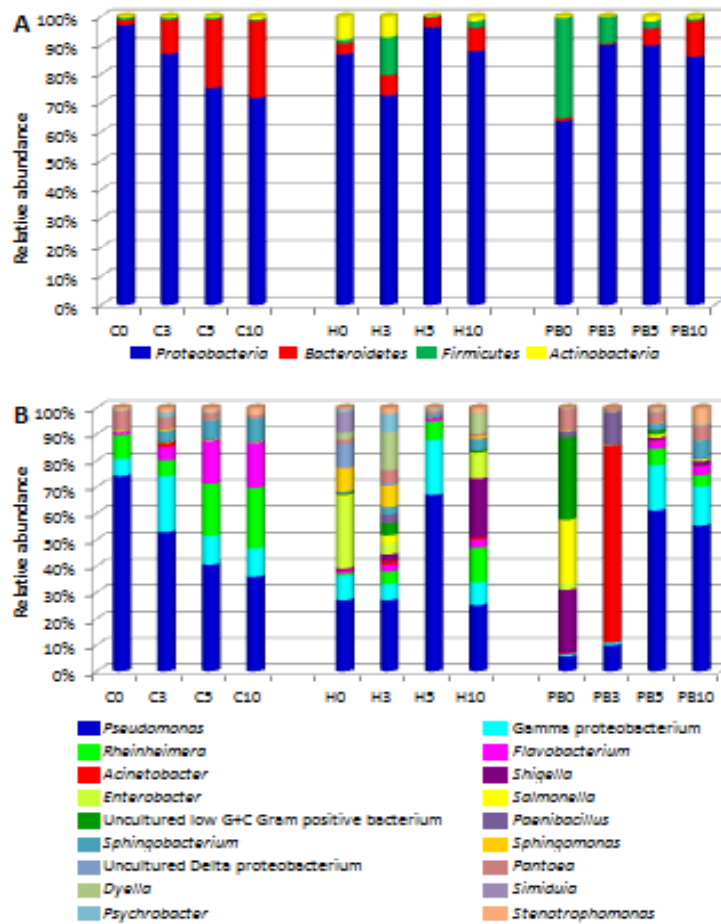
Sample	N° of reads	Shannon-Wiener index (H')	Simpson index (D)
C0	85124	3.28	0.91
C3	121350	3.46	0.92
C5	121959	3.87	0.96
C10	185489	3.94	0.96
H0	58520	3.95	0.95
H3	16478	1.92	0.49
H5	99269	3.17	0.91
H10	85054	3.51	0.99
PB0	47453	2.77	0.85
PB3	59028	1.94	0.68
PB5	90251	3.58	0.93
PB10	104288	3.68	0.95

**Table 3.** Correlations between controls and samples treated by HHP or coated with pectin bacteriocin (PB) at different storage times.

Variables	C0	C3	C5	C10	H0	H3	H5	H10	PB0	PB3	PB5	PB10
C0	1											
C3	0.9504	1										
C5	0.8725	0.8906	1									
C10	0.8058	0.8316	0.9906	1								
H0	0.6130	0.5966	0.4521	0.3884	1							
H3	0.8518	0.8051	0.6909	0.6207	0.5466	1						
H5	0.9711	0.9917	0.8773	0.8148	0.6282	0.8343	1					
H10	0.6592	0.6440	0.6509	0.6328	0.4655	0.5977	0.6695	1				
PB0	-0.0243	-0.0898	-0.1615	-0.1904	-0.1786	-0.0490	-0.0554	0.1543	1			
PB3	0.0360	0.0260	-0.0409	-0.0605	-0.1021	-0.0698	0.0283	-0.0966	-0.1464	1		
PB5	0.9794	0.9916	0.8845	0.8201	0.6185	0.8367	0.9977	0.6662	-0.0313	0.0211	1	
PB10	0.9727	0.9845	0.8786	0.8167	0.5992	0.8187	0.9852	0.6619	-0.0628	0.0042	0.9904	1

Significant correlations at  $P < 0.05$  are highlighted in bold.

## Figure legends



**Figure 1.** Relative abundance of OTUs based on paired-end 16S rRNA gene sequencing analysis of DNA from parsley. Controls (C), samples treated with a pectin-bacteriocin-EDTA (PB) coating containing enterocin AS-48 and samples treated by high-hydrostatic pressure (H) were stored at 5 °C. Sampling was performed at days 0, 3, 5 and 10. OTUs were sorted by *Phylum* (A) or *Genus* (B).



### **ARTÍCULO 3**

**María José Grande Burgos, María Del Carmen López Aguayo, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez Del Postigo Ruiz, Rosario Lucas López.**  
**Inactivation of *Staphylococcus aureus* in oat and soya drinks by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials.**  
***Journal of Food Science* 80-89, pp. 2030-2034.**

# Inactivation of *Staphylococcus aureus* in Oat and Soya Drinks by Enterocin AS-48 in Combination with Other Antimicrobials

María José Grande Burgos, M<sup>a</sup> Carmen López Aguayo, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, and Rosario Lucas López

**Abstract:** The presence of toxicogenic *Staphylococcus aureus* in foods and the dissemination of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in the food chain are matters of concern. In the present study, the circular bacteriocin enterocin AS-48, applied singly or in combination with phenolic compounds (carvacrol, eugenol, geraniol, and citral) or with 2-nitro-1-propanol (2NPOH), was investigated in the control of a cocktail made from 1 methicillin-sensitive and 1 MRSA strains inoculated on commercial oat and soya drinks. Enterocin AS-48 exhibited low bactericidal activity against staphylococci in the drinks investigated when applied singly. The combinations of sub-inhibitory concentrations of enterocin AS-48 (25 µg/mL) and phenolic compounds or 2NPOH caused complete inactivation of staphylococci in the drinks within 24 h of incubation at 22 °C. When tested in oat and soya drinks stored for 7 d at 10 °C, enterocin AS-48 (25 µg/mL) in combination with 2NPOH (5.5 mM) reduced viable counts rapidly in the case of oat drink (4.2 log cycles after 12 h) or slowly in soya drink (3.8 log cycles after 3 d). The same combined treatment applied on drinks stored at 22 °C achieved a fast inactivation of staphylococci within 12 to 24 h in both drinks, and no viable staphylococci were detected for up to 7 d of storage. Results from the study highlight the potential of enterocin AS-48 in combination with 2NPOH for inactivation of staphylococci.

**Keywords:** Staphylococcus, enterocin, cereal drinks

## Introduction

Staphylococcal food poisoning is among the most common causes of reported food-borne diseases (Tirado and Schmidt 2001; Le Loir and others 2003; EFSA 2014). In Europe, 346 outbreaks (representing 6.4% of total outbreaks) were caused by staphylococcal toxins in 2012 according to the EFSA EU Summary Report on zoonoses, zoonotic agents, and food-borne outbreaks in 2012 (EFSA, 2014). Most *Staphylococcus aureus* strains are capable of producing one or more heat stable enterotoxins (Balaban and Rasooly 2001; Ortega and others 2010), which are the cause of the gastrointestinal symptoms observed during intoxications (Tamarapu and others 2001). *S. aureus* has been isolated from several foods including meat and meat products, chicken, milk and dairy products, fermented food items, salads, vegetables, fish products, and so on (Genigeorgis 1989; Wieneke and others 1993; Jablonski and Bohach 2001; Tamarapu and others 2001; Jørgensen and others 2005). *S. aureus* is found in the nostrils as well as on the skin and hair of warm-blooded animals, and up to 30% to 50% of human population are carriers (Le Loir and others 2003). *S. aureus* is also widely disseminated in nosocomial infections, where it poses a threat because of its acquired resistance to most common antimicrobials. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains are of particular concern (Ippolito and others 2010; Doyle and others 2012). The presence of enterotoxin-producing antibiotic-resistant *S. aureus* strains in foods is an additional risk for dissemination of antibiotic resistance through the food chain and also for exposure of immunocompromised individuals to more virulent strains.

Inactivation of *S. aureus* in foods by using hurdle technology seems an interesting approach compared with classical methods such as heating, allowing a better preservation of the food organoleptic properties and nutritional value (Gálvez and others 2008, 2014). The combinations of antimicrobial compounds and bacteriocins can improve considerably the inactivation of pathogenic or toxicogenic bacteria in food systems, including *S. aureus*. One good example is enterocin AS-48, a cyclic antimicrobial peptide with a broad spectrum of inhibitory activity against Gram-positive bacteria (Maqueda and others 2004; Abriouel and others 2010; Grande Burgos and others 2014). In previous studies, it was shown that addition of phenolic compounds significantly improved microbial inactivation of *S. aureus* CECT 976 by enterocin AS-48 in sauces (Grande and others 2007). Among them, hydrocinnamic acid and carvacrol showed the best results in combination with enterocin AS-48 (Grande and others 2007). Another study demonstrated that enterocin AS-48 acted synergistically with the antimicrobial compound 2-nitro-1-propanol (2NPOH) in broth and in sauces (Grande and others 2007). However, it was also observed that the efficacy of bacteriocin treatments against *S. aureus* CECT 976 depended greatly on the food substrate. For that reason, the efficacy of combined treatments needs to be validated for specific food substrates or food categories. The purpose of the present study was to determine the efficacy of enterocin AS-48 in beverages derived from cereals, exemplified by oat and soya drinks (OD and SD). Both of them have pH values close to neutrality, and allow a rapid proliferation of *S. aureus*.

## Materials and Methods

### Bacterial strains and cultivation conditions

The toxicogenic strain *S. aureus* CECT 976 was from the Spanish Type Culture Collection (CECT, Burjasot, Valencia, Spain).

MS 20150431 Submitted 3/12/2015, Accepted 6/23/2015. Authors Burgos, Aguayo, Pulido, Gálvez, and López are with Área de Microbiología, Dept. de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Univ. de Jaén, Jaén 23071, Spain. Direct inquiries to author Gálvez (E-mail: agalvez@ujaen.es).

The methicillin-resistant toxicogenic *S. aureus* strain CCUG 31966 was obtained from the Culture Collection of the University of Göteborg, Sweden. Bacterial strains were grown on brain heart infusion broth (BHI; Scharlab, Barcelona, Spain) at 37 °C and maintained routinely on BHI agar slants at 4 °C.

### Bacteriocin preparation

Enterocin AS-48 was obtained from cultured broths of the producer strain *Enterococcus faecalis* A-48-32 after concentration by cation exchange chromatography as described elsewhere (Abriouel and others 2003). Bacteriocin concentrates were filtered through 0.22 µm pore size low protein binding filters (Millex GV; Millipore Corp., Belford, Mass., U.S.A.) under sterile conditions.

### Growth of staphylococci in OD and SD

OD and SD from different commercial brands were purchased at local supermarkets and coded as ODA (pH 7.49), ODB (pH 6.91), ODC (pH 6.94), and ODD (pH 7.50), and SDA (pH 6.93), SDB (pH 6.89) SDC (pH 6.71), and SDD (pH 6.65). All of them were standard drinks, except ODD and SDD, which were supplemented with calcium. The capacity of staphylococci to grow in OD and SD was investigated as follows. Drinks (5 mL, in duplicate) prewarmed at 22 °C were inoculated (0.2%, vol/vol) with a cocktail of the 2 staphylococcal strains. The cocktail was prepared by mixing 100-fold dilutions (in 0.85% NaCl sterile saline solution) from overnight cultures of strains grown in BHI broth at 37 °C. After incubation at 22 °C for 24 h, drink aliquots (1 mL) were serially diluted in sterile saline solution and plated in triplicate on Vogel-Jonson agar containing 0.01 g/L of potassium tellurite (VJ agar; Scharlab) for viable cell counting. After 48 h incubation at 37 °C, the average number of colonies on the plates was used to calculate the viable cell concentration of samples, expressed as colony forming units (CFU) per mL.

### Inactivation of *S. aureus* in drinks by enterocin AS-48 and antimicrobials

The inhibitory effects of antimicrobial compounds and enterocin AS-48 were investigated in oat drink A (ODA) and in soya drink A (SDA) as follows. Drinks (100 mL, in duplicate) inoculated with the cocktail of staphylococci as described above were used as controls without added antimicrobials, or supplemented with (a) enterocin AS-48 (at final concentration of 25 µg/mL); (b) the following antimicrobial compounds added at the final concentrations indicated in parentheses: carvacrol (1.25 mM), eugenol (1.28 mM), geraniol (1.13 mM), citral (1.10 mM), and 2NPOH (5.5 mM), or (c) combinations of enterocin AS-48 (25 µg/mL) and each of the above-mentioned antimicrobial compounds. Antimicrobial compounds were added directly from the corresponding commercial solutions (from Sigma group, Madrid, Spain). The combination of enterocin AS-48 (25 µg/mL) and 2NPOH (5.5 mM) was also tested in oat drinks ODB, ODC, and ODD and in soya drinks SDB, SDC, and SDD. Following addition of antimicrobials, the drinks were thoroughly mixed, distributed in sterile capped plastic test tubes, and incubated at 22 °C for 24 h. Viable cell counts were determined after plating on VJ agar as described above.

### Inactivation of *S. aureus* during storage of drinks supplemented with enterocin AS-48 and 2NPOH

Enterocin AS-48 was tested on ODA and SDA stored at 10 °C or 22 °C for 7 d, either singly at a final concentration of 50 µg/mL,

or at 25 µg/mL in combination with 5.5 mM 2NPOH. Drinks (50 mL, in duplicate) were pre-warmed at desired incubation temperatures before being inoculated with the cocktail of strains and addition of antimicrobials. At desired intervals of incubation, drink aliquots (1 mL) were serially diluted in sterile saline solution and plated in triplicate on VJ agar for viable cell counts as described above.

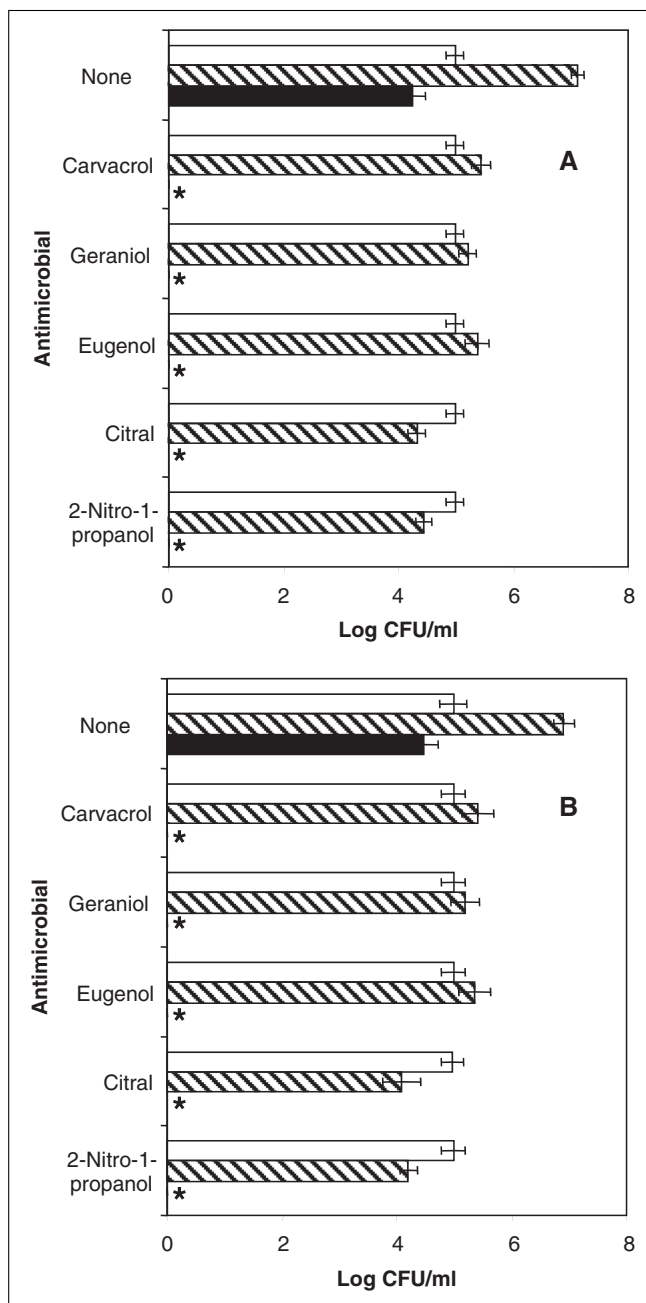


Figure 1—Effect of enterocin AS-48 in combination with selected antimicrobial compounds on the viability of a cocktail made from 2 *S. aureus* strains, inoculated in commercial oat drink ODA (A) and soya drink SDA (B) during storage at 22 °C. Viable counts were determined before addition of antimicrobials at time 0 (white bars), and after 24 h of incubation with antimicrobial compounds added singly (striped bars) or in combination with enterocin AS-48 at 25 µg/mL (solid bars). Asterisks denote statistically significant reductions of viable counts in the combined treatments compared with the single treatments.

**Table 1—Effect of enterocin AS-48 singly or in combination with 2-nitro-1-propanol (2NPOH) on the viability of a cocktail made from 2 *S. aureus* strains inoculated in oat (OD) and soya drinks (SD) from different brands (A to D). Viable cell counts were determined after 24 h incubation at 22 °C.**

Treatment	Viable cell counts (log <sub>10</sub> CFU/mL)							
	Oat drinks				Soya drinks			
	ODA	ODB	ODC	ODD	SDA	SDB	SDC	SDD
None	6.97	7.34	7.56	7.67	7.0	6.44	7.72	7.78
2NPOH (5.5 mM)	4.20	4.47	5.02	4.97	4.41	4.78	5.34	5.80
AS-48 25 µg/mL + 2NPOH (5.5 mM)	–	–	–	–	–	–	–	–

### Statistical analyses

All experiments were carried out in duplicate, and the average data ± standard deviations were determined with Excel programme (Microsoft Corp., Redmond, Washington, U.S.A.). A paired *t*-test was performed at the 95% confidence interval with Statgraphics Plus version 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, Maryland, U.S.A.), in order to determine the statistical significance of data.

## Results and Discussion

### Increased inactivation of *S. aureus* in drinks by enterocin AS-48 and antimicrobials

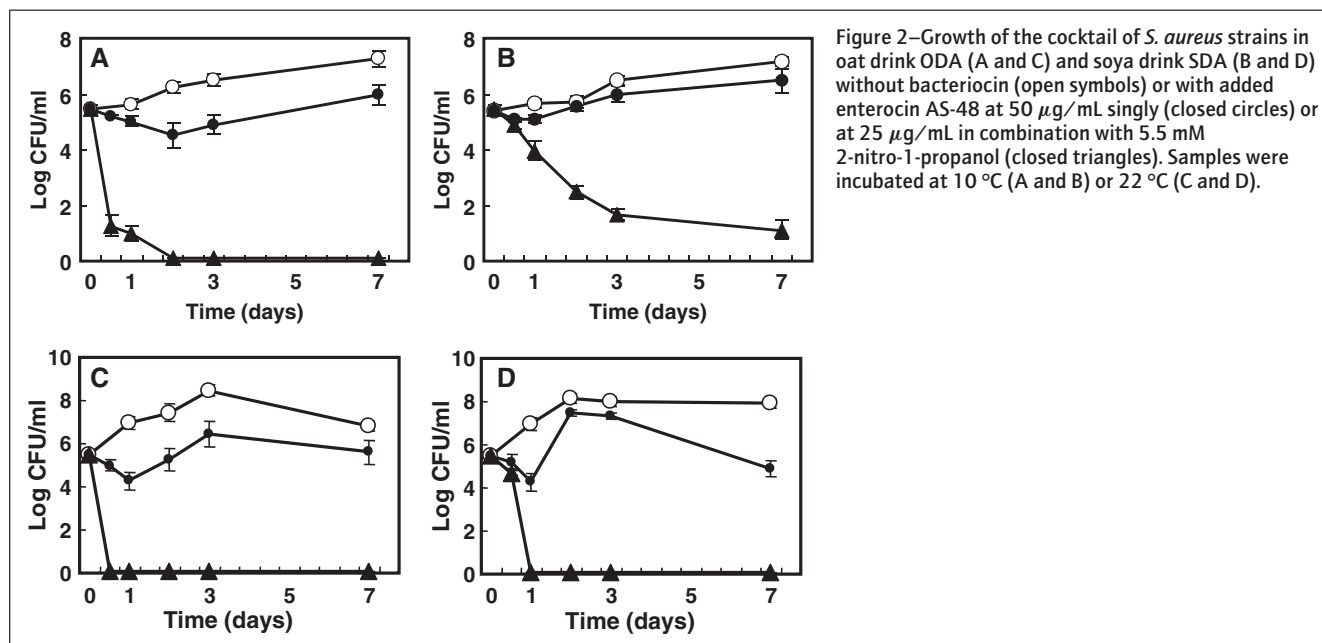
Enterotoxin-producing staphylococci may cause food poisoning and carry antibiotic resistance determinants. Results from the present study indicate that a cocktail made from methicillin-sensitive and methicillin-resistant, enterotoxin-producing staphylococci were able to multiply in OD and SD stored at 22 °C for 24 h, increasing the concentration of viable cells by 2.0 to 2.8 log cycles (Figure 1A and 1B and Table 1). Results obtained for addition of different antimicrobials in ODA and SDA drinks indicated that carvacrol, geraniol, eugenol, citral, or 2NPOH exhibited only a weak antimicrobial activity against the cocktail of strains (Figure 1). Carvacrol, geraniol, and eugenol caused growth inhibition that was statistically significant ( $P < 0.05$ ) compared with the untreated control. Citral and 2NPOH achieved a non-significant reduction ( $P > 0.05$ ) of viable cell counts in the drinks. Similar results were obtained for enterocin AS-48 applied

singly. In contrast, no viable staphylococci were detected in ODA or SDA treated with any of the combinations of enterocin AS-48 and the antimicrobial compounds.

The inhibitory effect of 2NPOH (5.5 mM) in combination with enterocin AS-48 (25 µg/mL) was corroborated in 4 different commercial at and SD inoculated with the cocktail of staphylococci at approx. 5.0 log<sub>10</sub> CFU/mL (Table 1). While 2NPOH alone only achieved growth inhibition or a slight decrease in the initial number of viable cells, no viable staphylococci were detected in any of the drinks after 24 h incubation with the combination of enterocin AS-48 and 2NPOH (Table 1).

Milk replacements such as the so-called cereal milks have become very popular in Western culture because of the changes in cultural habits and also as products with improved digestibility that avoid problems associated with glucose intolerance, or with claimed health benefits. They are not only being used as drinks, but also for culinary purposes in the preparation of dishes. Results from the present study indicate that *S. aureus* can multiply in soya as well as oat drinks under inadequate storage conditions. Therefore, if the drinks become cross-contaminated with staphylococci, there is a risk that the bacterium may multiply and cause food spoilage and possibly also food poisoning.

In a previous study, it was shown that the antibacterial activity of enterocin AS-48 against *S. aureus* CECT 976 in vegetable sauces (all of them having acidic pH values) was potentiated by several phenolic compounds, including carvacrol, geraniol, eugenol and citral, among others (Grande and others 2007). Similar results were obtained in the present study for the cocktail of 2 strains inoculated



**Figure 2—Growth of the cocktail of *S. aureus* strains in oat drink ODA (A and C) and soya drink SDA (B and D) without bacteriocin (open symbols) or with added enterocin AS-48 at 50 µg/mL singly (closed circles) or at 25 µg/mL in combination with 5.5 mM 2-nitro-1-propanol (closed triangles). Samples were incubated at 10 °C (A and B) or 22 °C (C and D).**

in OD and SD with a pH close to neutrality. This is important because the efficacy of antimicrobial compounds tends to be lower under optimum bacterial growth conditions such as a pH closer to neutrality in the case of *S. aureus*. This is not only because faster metabolism allows a more rapid repair of cell damage caused by antimicrobials, but also because organic acids, when present, have greater antibacterial activity at low pH. Compared with vegetable sauces (often containing acetic or citric acids), OD and SD contain no organic acids added. The greater than additive effects observed in the inactivation of staphylococci in OD and SD by enterocin AS-48 in combination with phenolic compounds suggests a potential use of these antimicrobial combinations as a hurdle against staphylococci accidentally contaminating the drinks. Furthermore, phenolic compounds can also be used as flavoring ingredients, opening additional possibilities for application in flavored drinks or flavored foods (Fenaroli 1995). Phenolic compounds are naturally found in many different essential oils (Burt 2004), and several works have already described the antimicrobial activity of phenolic compounds such as citral, carvacrol, eugenol, and others against *S. aureus* (Karapinar and Aktug 1987; Onawunmi 1989; Lambert and others 2001; Knowles and others 2005).

### Inactivation of *S. aureus* during storage of drinks supplemented with enterocin AS-48 and 2NPOH

The effect of enterocin AS-48 applied singly at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , or at 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in combination with 2NPOH (5.5 mM) was selected for further study in ODA and SDA inoculated with the cocktail of *S. aureus* strains and stored at 10 or 22  $^{\circ}\text{C}$  for 7 d (Figure 2). At 10  $^{\circ}\text{C}$ , staphylococci multiplied slowly in ODA, reaching 6.5 or 7.2 log CFU/mL at days 3 or 7, respectively (Figure 2A). Growth in SDA was still slower for the 1st 2 d, but similar viable counts as in OD at the end of storage (Figure 2B). The single addition of bacteriocin inhibited growth of staphylococci in ODA and reduced viable counts during the 1st 2 d of storage. A non-significant reduction ( $P > 0.05$ ) of 1.0 log cycles was noticed at day 2. Nevertheless, the bacteriocin seemed to have no effect after further incubation, and staphylococci multiplied and reached 6 log CFU/mL at day 7 (Figure 2A). In the soya drink SDA, the single bacteriocin addition had almost no effect. Although viable counts in the bacteriocin-treated samples were always lower than the untreated controls, the differences were not statistically significant ( $P > 0.05$ ). In drinks treated with enterocin AS-48 in combination with 2NPOH and stored at 10  $^{\circ}\text{C}$ , inactivation of staphylococci occurred very fast in OD, with reductions of 4.2 log cycles after 12 h. No viable staphylococci were detected in the treated ODA from days 2 to 7. Inactivation of staphylococci by the combined treatment in SDA took place more slowly, achieving a reduction of 3.8 log cycles after 3 d (Figure 2B), and leaving a residual population of viable staphylococci at day 7.

In the drinks stored at 22  $^{\circ}\text{C}$ , staphylococci grew faster and reached highest viable cell concentrations (8.5 or 8.1 log CFU/mL) at day 2 to 3 of incubation (Figure 2C and 2D). The single addition of enterocin AS-48 achieved maximum reductions of viable counts (1.2 or 1.0 log cycles) at day 1 of storage in both cases. However, recovery of growth was observed during days 2 and 3 of storage, reaching viable counts as high as 6.5 log CFU/mL in ODA (Figure 2C) or 7.3 log CFU/mL in SDA (Figure 2D). In ODA treated with a combination of enterocin AS-48 and 2NPOH, inactivation of staphylococci occurred very fast, and no viable cells were detected after 12 h of storage (Figure 2C). Inactivation of staphylococci in SDA was slower, and no viable cells were detected after day 1 of storage (Figure 2D).

According to a previous study, 2NPOH (0.5%) were also shown to enhance inactivation of *S. aureus* in chocolate syrup when tested in combination with enterocin AS-48 added at 58  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Martínez-Viedma and others 2009). 2NPOH was also shown to enhance the antibacterial activity of enterocin AS-48 against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in deli-type salads (Cobo Molinos and others 2009a,b). Singly added, 2NPOH has previously shown to inhibit foodborne pathogens, including *S. aureus*, in corn flour-based doughs, requiring concentrations greater than 0.5% for inactivation of this bacterium (Ortega Morente and others 2010). Results from the present study highlight the potential of 2NPOH as an enhancer of enterocin AS-48 activity against staphylococci, improving microbial inactivation and preventing recovery of cultures during storage while at the same time reducing the final concentrations of the 2 antimicrobials.

Interestingly, results from the present study also highlight the potential of antimicrobial combinations based on enterocin AS-48 and phenolic compounds or 2NPOH in the control of methicillin-resistant staphylococci. Natural antimicrobials such as bacteriocins and phenolic compounds are becoming increasingly important as candidates for the control of antimicrobial-resistant strains in the food chain (Cotter and others 2013; Allen and others 2014; Arthur and others 2014). 2-Nitropropanol has been safely administered intraruminally to cattle as a potent inhibitor of rumen methanogenesis (Majak and Clark 1980; Anderson and Callaway 2003), and also in chicks against *Salmonella typhimurium* (Jung and others 2004). This compound was also found to be inhibitory toward *Listeria monocytogenes* (Dimitrijevic and others, 2006), and could possibly find application as a feed additive to control foodborne pathogens in the food chain (Anderson and others 2003). The results obtained in the present study suggest possible new applications of combinations based on 2NPOH and enterocin AS-48 in the control of methicillin-resistant staphylococci in the food chain as well.

### Conclusions

Staphylococci can proliferate rapidly in cereal drinks with pH values close to neutrality. The combinations of enterocin AS-48 with phenolic compounds or with 2NPOH show strong bactericidal activity against methicillin-sensitive and MRSA in commercial OD and SD. The combined treatments may be of interest for control of staphylococci. This is important because the spread of methicillin-resistant staphylococci in the food chain is now a matter of concern and also because of the growing interest of consumers toward milk replacements such as cereal milks. The combination of enterocin AS-48 and 2NPOH is an effective hurdle against proliferation of staphylococci in OD and SD. This antimicrobial combination could be exploited as a barrier against staphylococci in OD and SD under conditions posing higher risk of accidentally contamination with the bacterium.

### Acknowledgments

This work was supported by research group AGR230, Plan de Apoyo a la Investigación de la Univ. de Jaén, and Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeIA3.

### Conflict of interest

No conflict of interest to declare.

### References

- Abriouel H, Lucas R, Ben Omar N, Valdivia E, Gálvez A. 2010. Potential applications of the cyclic peptide enterocin AS-48 in the preservation of vegetable foods and beverages. *Probiot Antimicrob Prot* 2:77–89.

- Abriouel H, Valdivia E, Martínez-Bueno M, Maqueda M, Gálvez A. 2003. Method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J Microbiol Methods* 55:599–605.
- Allen HK, Trachsel J, Looft T, Casey TA. 2014. Finding alternatives to antibiotics. *Ann N Y Acad Sci* 1323:91–100.
- Anderson RC, Callaway TR, VanKessel JS, Jung YS, Edrington TS, Nisbet DJ. 2003. Effect of select nitro compounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *Bioresour Technol* 90:59–63.
- Arthur TD, Cavera VL, Chikinda ML. 2014. On bacteriocin delivery systems and potential applications. *Future Microbiol* 9(2):235–248.
- Balaban N, Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61:1–10.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 94:223–253.
- Cobo Molinos A, Abriouel H, Ben Omar N, Lucas R, Valdivia E, Gálvez A. 2009a. Enhanced bactericidal activity of enterocin AS-48 in combination with essential oils, natural bioactive compounds, and chemical preservatives against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salads. *Food Chem Toxicol* 47:2216–2223.
- Cobo Molinos A, Lucas R, Abriouel H, Ben Omar N, Valdivia E, Gálvez A. 2009b. Inhibition of *Salmonella enterica* cells in deli-type salad by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. *Probiot Antimicrob Prot* 1:85–90.
- Cotter PD, Ross RP, Hill C. 2013. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* 11:95–105.
- Doyle ME, Hartmann FA, Lee Wong AC. 2012. Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? *Anim Health Res Revs* 13:157–180.
- EFSA. 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA J* 12:3547.
- Fenaroli G, editor. 1995. *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. Florida: CRC Press.
- Gálvez A, Lucas R, Pérez Pulido R, Grande Burgos MJ. 2014. Food Biopreservation. New York: Springer.
- Grande Burgos MJ, Pérez-Pulido R, López Aguayo MC, Gálvez A, Lucas R. 2014. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: Isolation, mode of action, and possible food applications. *Int J Mol Sci* 15(12):22706–22727.
- Grande MJ, Lucas R, Abriouel H, Valdivia E, Ben Omar N, Maqueda M, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. 2007. Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *J Food Prot* 70:405–411.
- Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastrì E, Wenzel RP. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. *Int J Infect Dis* 14 (Suppl 4):S7–11.
- Jung YS, Anderson RC, Edrington TS, Genovese KJ, Byrd JA, Callaway TR, Nisbet DJ. 2004. Experimental use of 2-nitropropanol for reduction of *Salmonella typhimurium* in the ceca of broiler chicks. *J Food Prot* 67:1945–1947.
- Karapinar M, Aktug SE. 1987. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *Int J Food Microbiol* 4:161–166.
- Knowles JR, Roller S, Murray DB, Naidu AS. 2005. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 71:797–803.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 91:453–462.
- Loir Le Y, Baron F, Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2:63–76.
- Majak W, Clark LJ. 1980. Metabolism of aliphatic nitrocompounds in bovine rumen fluid. *Can J Animal Sci* 60:319–325.
- Maqueda M, Gálvez A, Martínez-Bueno M, Sánchez-Barrena J, González C, Albert A, Rico M, Valdivia E. 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr Prot Pept Sci* 5:399–416.
- Martínez-Viedma P, Abriouel H, Ben Omar N, Lucas R, Gálvez A. 2009. Antistaphylococcal effect of enterocin AS-48 in bakery ingredients of vegetable origin, alone and in combination with selected antimicrobials. *J Food Sci* 74:M384–M389.
- Onawunmi GO. 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Lett Appl Microbiol* 9:105–108.
- Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. 2010. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins* 2:2117–2131.
- Tamarapu S, McKillip JL, Drake M. 2001. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J Food Prot* 64:664–668.
- Tirado C, Schmidt K. 2001. WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. *J Infect* 43:80–84.

## **ARTÍCULO 4**

**María José Grande Burgos, Rosario Lucas López, María Del Carmen López Aguayo, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez Del Postigo Ruiz.**  
**Inhibition of planktonic and sessile *Salmonella enterica* cells by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides.**  
***Food Control* 30, pp. 214 - 221.**



## Inhibition of planktonic and sessile *Salmonella enterica* cells by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides

María José Grande Burgos, Rosario Lucas López, María del Carmen López Aguayo, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez\*

Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Edif. B3, Universidad de Jaén, Campus Las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 March 2012  
Received in revised form  
24 June 2012  
Accepted 10 July 2012

#### Keywords:

Bacteriocin  
Polymyxin  
Biocides  
*Salmonella*  
Biofilm

### ABSTRACT

Enterocin AS-48 was tested against planktonic *Salmonella enterica* UJ3197 in combination with polymyxin B and/or biocides. Enterocin AS-48 added at 50 mg/l or 100 mg/l in combination with 2 mg/l polymyxin B caused partial or complete growth inhibition of *S. enterica* UJ3197 at 24 h incubation. At 2 mg/l, polymyxin B did not enhance significantly the inhibitory effect of biocides against strain UJ3197, except for 25 mg/l cetrimide. The combination of polymyxin B (2 mg/l) and enterocin AS-48 (25 mg/l) significantly inhibited growth of strain UJ3197 in combination with 2.5 or 25 mg/l cetrimide, 25 mg/l hexadecylpyridinium chloride, 500 mg/l chlorhexidine, and also with 0.16 or 1.6 mg/l poly-(hexamethylen guanidinium) hydrochloride. Biofilms formed by four *Salmonella* strains (S62, S64, UJ3197, UJ3198) on polystyrene microtiter plates were treated with biocides singly or in combinations with polymyxin B (2 mg/l), enterocin AS-48 (25 or 50 mg/l) or both. Sessile salmonellae showed an increased tolerance to all biocides tested compared to planktonic cells. At the concentration tested, polymyxin B did not enhance the bactericidal activity for any of the biocides on sessile salmonellae. Enterocin AS-48 improved the activity of most biocides, but only for some of the strains and only for the highest bacteriocin concentration tested in most cases. The combinations of enterocin AS-48 and polymyxin B improved inactivation of sessile salmonellae for all biocides tested, although the degree of inactivation was highly dependent on strain and biocide. The combination of polymyxin B (2 mg/l) and enterocin AS-48 (50 mg/l) improved significantly ( $p < 0.05$ ) the inactivation of all *Salmonella* strains in sessile state by the biocides benzalkonium chloride, cetrimide, triclosan, hexachlorophene, chlorhexidine, poly-(hexamethylen guanidinium) hydrochloride, and P3-oxonia.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

In 2008, salmonellosis was the second most often reported zoonotic disease in humans in the EU, accounting for 131,468 confirmed human cases, of which 3833 occurred in Spain (EFSA, 2010). *Salmonella* was the most frequently reported cause of foodborne outbreaks (35.4% of all outbreaks). The common reservoir of *Salmonella* is the intestinal tract of a wide range of domestic and wild animals, and for that reason a variety of foodstuffs including both food of animal and plant origin can be sources of infection. Transmission often occurs when organisms are introduced in food preparation areas and are allowed to multiply in food, e.g. due to inadequate storage temperatures, inadequate cooking or cross contamination of ready-to-eat (RTE) food.

Biofilm formation plays an important role in the attachment and colonization of *Salmonella enterica* onto biotic and abiotic surfaces (Collignon & Korsten, 2010; Iturriaga, Tamplin, & Escartín, 2007; Joseph, Otta, Karunasagar, & Karunasagar, 2001; Lapidot, Romling, & Yaron, 2006; Vestby, Moretro, Langsrud, Heir, & Nesse, 2009). Biofilm formation has serious implications in industrial, environmental, public health and medical situations (Gilbert, McBain, & Rickard, 2003; Hall-Stoodley, Costerton, & Stoodley, 2004). The occurrence of biofilms in food-processing environments can cause post-processing contamination leading to lowered shelf-life of products and transmission of diseases (Jessen & Lammert, 2003). Sessile micro-organisms are more difficult to mechanically remove from food-contact surfaces and are more resistant to disinfectants compared with planktonic forms (Gilbert, Das, Jones, & Allison, 2001; Morton, Greenway, Gaylarde, & Surman, 1998). Hence there is great interest in development of treatments that will efficiently inactivate sessile bacteria, including *S. enterica*.

\* Corresponding author. Tel.: +34 953 212160; fax: +34 953 212943.  
E-mail address: [agalvez@ujaen.es](mailto:agalvez@ujaen.es) (A. Gálvez).

While many bacteriocins have been investigated for inactivation of foodborne pathogens in foods in planktonic state, only a few studies have explored the possibility of using bacteriocins or their producer strains against sessile bacteria (Ammor, Tauveron, Dufour, & Chevallier, 2006; Bower, McGuire, & Daeschel, 1995; Guerrieri et al., 2009; Kumar, Parvathi, George, Krohne, & Karunasagar, 2009; Leriche, Chassaing, & Carpentier, 1999; Minei, Gomes, Ratti, D'Angelis, & De Martinis, 2008; Winkelströter, Gomes, Thomaz, Souza, & De Martinis, 2011; Zhao, Doyle, & Zhao, 2004). Nisin and sakacin 1 reduced the adherence of *Listeria monocytogenes* to silica and stainless steel surfaces, respectively (Bower et al., 1995; Winkelströter et al., 2011). The antimicrobial activity of bacteriocins can be improved by combination with other antimicrobial substances, but still few studies have investigated the potential for synergy between bacteriocins and disinfectants or biocides. The *Pseudomonas* bacteriocin PsVP-10 was shown to act synergistically with chlorhexidine and triclosan on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in planktonic state as well as in biofilms (Lobos, Padilla, & Padilla, 2009). Another bacteriocin named enterocin AS-48 improved the inactivation of sessile *L. monocytogenes* cells in combination with a variety of biocides (Caballero Gómez, Abriouel, Grande, Pérez Pulido, & Gálvez, 2012). Enterocin AS-48 is a cyclic antimicrobial peptide of great interest for application in food preservation and food sanitation (Abriouel, Lucas, Ben Omar, Valdivia, & Gálvez, 2010; Maqueda et al., 2004). AS-48 has been thoroughly investigated for its antimicrobial activity against foodborne pathogens both in liquid cultures and in foods (Abriouel et al., 2010). However, activity of bacteriocins including enterocin AS-48 on Gram-negative bacteria is limited because of the permeability barrier imposed by the outer cell membrane. Polymyxins are cationic detergent-like cyclic peptides active on Gram-negative bacteria by means of their detergic activity, which disrupts the bacterial outer membrane and the cytoplasmic membrane (Horton & Pankey, 1982). Therefore, polymyxins could improve the activity of bacteriocins on Gram-negative bacteria. In a recent study, it was shown that polymyxin E activity on *Escherichia coli* increased in combination with the bacteriocins nisin or pediocin PA-1 (Naghmouchi, Belguesmia, Baah, Teather, & Drider, 2011). The purpose of the present study was to investigate if polymyxin B could potentiate the effect of enterocin AS-48 against *S. enterica* and if the combination of polymyxin B and enterocin AS-48 could be useful to enhance the antimicrobial activity of biocides against planktonic and sessile *Salmonella* cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

*S. enterica* serovar Enteritidis strains UJ3449 and UJ3197 were isolated from Spanish omelette and grilled pork, respectively, and were both implicated in domestic outbreaks of human salmonellosis. *S. enterica* strains S62 and S64 were isolated from chicken hamburger and mayonnaise, respectively. Strains were propagated at 37 °C in Brain Heart Infusion Broth (BHI, Scharlab, Barcelona) or BHI agar slants and stored at 4 °C for routine use or in glycerol (30% in distilled water) at –80 °C. For preparation of inocula, strains were grown overnight (18 h) in BHI broth.

### 2.2. Antimicrobials

Enterocin AS-48 was obtained from cultured broths of the producer strain *Enterococcus faecalis* A-48-32 after concentration by cation exchange chromatography as described elsewhere (Abriouel, Valdivia, Martínez-Bueno, Maqueda, & Gálvez, 2003).

Bacteriocin concentrates were filtered through 0.22 µm pore size low protein binding filters (Millex GV; Millipore Corp., Belford, MA, USA) under sterile conditions. Bacteriocin concentrates were diluted 20–50-fold in biocide solutions in order to achieve the desired final bacteriocin concentrations of 25 or 50 µg/ml. Polymyxin B solution (1 mg/ml in water) was from Fluka (Madrid, Spain).

The commercial sanitizer P3-oxonia (25–35% hydrogen peroxide, 0.83–2.5 N acetic acid, and 0.26–0.66 N peracetic acid) was from ECOLAB (Barcelona, Spain). Poly-(hexamethylen guanidinium) hydrochloride (PHMG) solution (containing 7.8% of PHMG, by weight) was a kind gift of Oy Soft Protector Ltd (Espoo, Finland). Benzalkonium chloride (BC), cetrimide (CT), hexadecylpyridinium chloride (HDP), triclosan (TC), hexachlorophene (CF) and chlorhexidine (CH) were from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). Benzalkonium chloride commercial solution contained 50% (wt/v) of the active compound. Triclosan and hexachlorophene were dissolved (10% wt/v) in 96% ethanol. The remaining biocides were dissolved aseptically in sterile distilled water at final concentrations of 1.0–10.0% (depending of each particular case), and stored at 4 °C for a maximum of 7 days.

### 2.3. Effect of antimicrobial peptides polymyxin B and enterocin AS-48 and biocides on growth of *S. enterica*

*S. enterica* UJ3197 cells (ca.  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml) were inoculated onto Trypticase Soy Broth (TSB, Scharlab, Barcelona) supplemented or not with polymyxin B, enterocin AS-48, biocides or their combinations. After inoculation, broths were distributed (200 µl/well) in triplicate on U-shaped 96-well polystyrene microtiter plates (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ), which were covered with a tight fitting lid and incubated at 30 °C. At desired intervals of incubation (0, 5, 10, and 24 h), the optical density of wells was recorded at 650 nm in a microplate reader iMark TM (BioRad, Madrid) after shaking for 30 s.

Polymyxin B was tested singly at 2, 5 or 10 mg/l or at 2 mg/l in combination with enterocin AS-48 (50 or 100 mg/l) in order to establish possible interactions between the two antimicrobial peptides.

In preliminary trials, biocides were tested singly at four different concentrations each in order to approximate the range of inhibitory concentrations. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the minimum concentration of biocide that completely inhibited growth at 24 h incubation. In order to determine if biocide activity on planktonic *Salmonella* could be potentiated by polymyxin B (2 mg/l) or polymyxin B (2 mg/l) plus enterocin AS-48 (at final concentrations of 12.5 or 25 mg/l), the antimicrobial peptides were tested in TSB broths in combination with biocides at concentrations below or close to their MIC as follows: BC, 1.25, 12.5, 125 mg/l; CT, 2.5, 25, 250 mg/l; HDP, 10, 25, 250 mg/l; TC, 1, 2, 2.5 mg/l; CF, 2.5, 25, 250 mg/l; CH, 25, 250, 500 mg/l; PHMG, 0.016, 0.16, 1.6 mg/l; P3-oxonia, 0.025, 0.1, 0.25%, v/v. Bacterial growth in the bacteriocin/biocide containing broths was determined in microtiter plates incubated at 30 °C as described above.

### 2.4. Determination of bactericidal effects on sessile *Salmonella*

Bacterial suspensions of *Salmonella* strains (ca.  $1.0 \times 10^7$  CFU/ml) prepared in diluted TSB broth (6.0 g/l) were distributed (200 µl/well) on 96-well polystyrene microtiter plates (Becton Dickinson Labware). The plates were incubated at 30 °C for 24 h to allow biofilm formation. Then, the cultured broths were discarded and the biofilms formed on the microtiter plates were washed with 200 µl of sterile saline solution to remove loosely associated

bacterial cells. Aqueous solutions containing polymyxin B (2 mg/l), enterocin AS-48 (25 or 50 mg/l), biocides (which were tested at three different concentrations in a range of 5–20 g/l depending on each biocide), or their combinations were added to the wells and the plates were further incubated at 30 °C for 60 min. After treatments, the biocidal solutions were removed and the wells were washed with 200 µl of Dey/Engley Neutralizing broth (Difco, Barcelona) followed by 200 µl of phosphate buffered saline (PBS) (Merck, Darmstadt, Germany). Biofilms were resuspended in 200 µl PBS by sonication for 1 min in a sonicator bath (Mod 3510, Branson; Danbury, CT, USA) followed by pipetting rigorously for 30 s. Removal of biofilm cells was confirmed by the crystal violet staining method described by Djordjevic, Wiedmann, and McLandsborough (2002). For each treatment, samples from two wells were pooled together and vortexed, followed by serial dilution in sterile saline solution and plating in triplicate on TSA. Viable cell counts obtained after 24 h incubation at 37 °C were used to calculate the average numbers of viable cells expressed as log<sub>10</sub> CFU/ml.

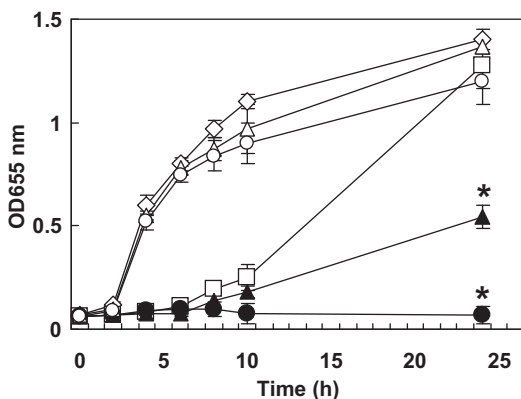
### 2.5. Statistical analysis

All experiments were carried out in duplicate (two experiments per trial), and the average data ± standard deviations were determined with Excel programme (Microsoft Corp., USA). A *t*-test was performed at the 95% confidence interval with Statgraphics Plus version 5.1 (Statistical Graphics Corp, USA), in order to determine the statistical significance of data.

## 3. Results

### 3.1. Inhibition of planktonic salmonellae by enterocin AS-48 in combination with polymyxin B

The inhibitory effect of enterocin AS-48 singly or in combination with polymyxin B was studied on *S. enterica* UJ3197 inoculated in TSB. The bacteriocin had no inhibitory effect on bacterial growth at concentrations of 50 mg/l, and only a weak inhibition was observed at 100 mg/l (Fig. 1). Polymyxin B had strong inhibitory effects at concentrations of 5 or 10 mg/l (data not shown). At 2 mg/l, polymyxin B significantly inhibited growth of *S. enterica* UJ3197 for the first 10 h of incubation, but not in the subsequent hours (Fig. 1). For that reason, a concentration of 2 mg/l polymyxin B was selected for combined tests with enterocin AS-48. The combination of 50 mg/l



**Fig. 1.** Effect of enterocin AS-48 and polymyxin B singly or in combination on growth of *Salmonella enterica* UJ3197. Enterocin AS-48 was tested at 50 mg/l ( $\Delta$ ) or 100 mg/l ( $\circ$ ) singly (open symbols) or in combination (closed symbols) with polymyxin B (2 mg/l). Polymyxin B added singly ( $\square$ ). Control cultures ( $\diamond$ ). Asterisks denote statistically significant ( $p < 0.05$ ) growth inhibition at 24 h.

AS-48 and polymyxin B resulted in growth inhibition that was significantly higher ( $p < 0.05$ ) at 24 h compared to polymyxin B alone, while the combination of 100 mg/l enterocin AS-48 and polymyxin B resulted in complete inhibition of growth (Fig. 1).

### 3.2. Inhibition of planktonic salmonellae by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides

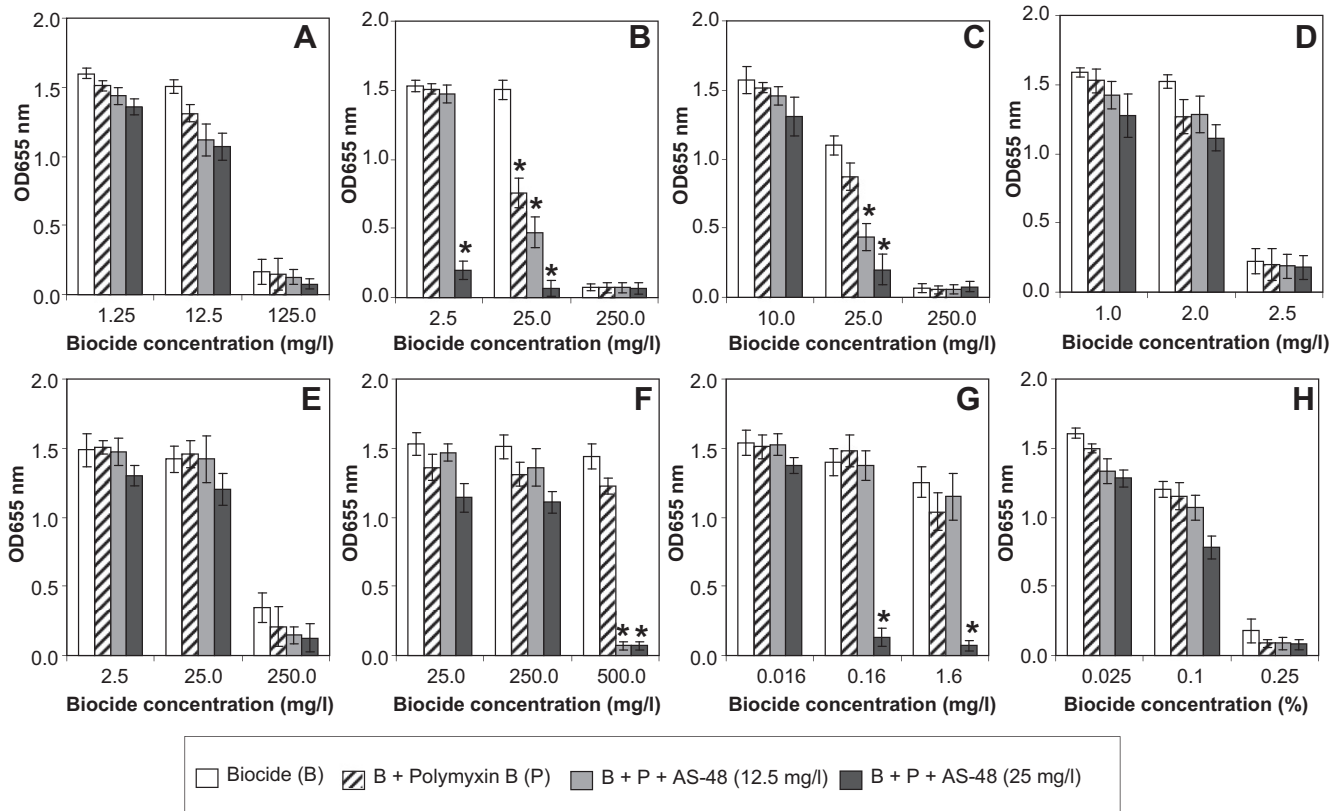
Enterocin AS-48 (12.5 or 25 mg/l) and polymyxin B (2 mg/l) were tested against planktonic *S. enterica* UJ3197 in TSB in combination with different biocides. Polymyxin B (without enterocin AS-48) only improved growth inhibition significantly ( $p < 0.05$ ) for the biocide cetrimide at 25 mg/l. For the combinations containing polymyxin B, enterocin AS-48 and biocide, growth inhibition was observed for all QAC (Fig. 2). For BC, greatest growth inhibition was obtained at 12.5 mg/l biocide in combination with polymyxin B and 25 mg/l enterocin AS-48, but it was not statistically significant ( $p > 0.05$ ) compared to the single biocide treatment (Fig. 2A). For CT at 25 mg/l, significant growth inhibition ( $p < 0.05$ ) was observed for all the combinations tested (polymyxin B and its combinations with enterocin AS-48), while at a ten-fold lower biocide concentration a significant growth inhibition ( $p < 0.05$ ) was observed in combination with polymyxin B and 25 mg/l enterocin AS-48 (Fig. 2B). In the case of HDP, significant growth inhibition ( $p < 0.05$ ) was observed only for the combinations of polymyxin B and enterocin AS-48 at 12.5 or 25 mg/l (Fig. 2C).

Growth inhibition of *S. enterica* UJ3197 by bis-phenols did not increase remarkably in combination with polymyxin B and enterocin AS-48 (Fig. 2D, E). A partial, non-significant ( $p > 0.05$ ) growth inhibition was observed for 2 mg/l TC in combination with polymyxin B and 25 mg/l enterocin AS-48 compared to the single biocide addition (Fig. 2D). The combinations of polymyxin B and enterocin AS-48 with CF did not enhance growth inhibition significantly ( $p > 0.05$ ), and it could also be observed that this biocide required ten-fold higher concentrations for inhibition of *S. enterica* UJ3197 when applied singly compared with TC (Fig. 2E).

Growth inhibition by chlorhexidine at 500 mg/l increased significantly ( $p < 0.05$ ) for the combinations of polymyxin B and enterocin AS-48 at concentrations of 12.5 and 25 mg/l (Fig. 2F). Growth inhibition by the polyguanidine PHMG was enhanced significantly ( $p < 0.05$ ) only by combination with polymyxin B and 25 mg/l enterocin AS-48, both at 0.16 and 1.6 mg/l biocide (Fig. 2G). The inhibitory effect of the commercial solution P3-oxonia was enhanced non-significantly ( $p > 0.05$ ) in the combinations of biocide (0.025% or 0.1%) and polymyxin B plus 25 mg/l enterocin AS-48 (Fig. 2H).

### 3.3. Inactivation of sessile Salmonella by enterocin AS-48 and polymyxin B in combination with biocides

Enterocin AS-48 (25 or 50 mg/l) was tested singly or in combination with polymyxin B (2 mg/l) and biocides on biofilms formed by *S. enterica* strains S62, S64, UJ3197 and UJ3198. Without biocides, neither polymyxin B, enterocin AS-48 nor the combinations of polymyxin B and enterocin AS-48 had any bactericidal effect on any of the *Salmonella* strains tested (Fig. 3A). The single treatment with benzalkonium chloride (10 g/l) reduced viable counts by 2.8–3.9 log cycles, depending on strain. Polymyxin B and BC did not reduce significantly the numbers of viable cells for any of the strains, but the combination of BC and enterocin AS-48 (50 mg/l) significantly reduced the numbers of viable cells for strains S62 and UJ3198 (Fig. 3B). The combination of BC, polymyxin B and 25 mg/l AS-48 significantly reduced the number of viable cells for strains S62 and S64 compared to the single biocide treatment, while the combination of BC, polymyxin B and 50 mg/l AS-48 significantly



**Fig. 2.** Effect biocides benzalkonium chloride (A), cetrimide (B), hexadecylpyridinium chloride (C), triclosan (D), hexachlorophene (E), chlorhexidine (F), poly-(hexamethylen guanidinium) hydrochloride (G), and P3-oxonia commercial sanitizer (H) on growth of *Salmonella enterica* UJ3197, singly or in combinations with polymyxin B (2 mg/l) or polymyxin B plus enterocin AS-48 (added at 12.5 or 25 mg/l). Asterisks denote statistically significant ( $p < 0.05$ ) growth inhibition compared to the single biocide treatment.

reduced the concentration of survivors in biofilms for all strains. Cetrimide (20 g/l) reduced viable counts by 1.6–3.8 log cycles (Fig. 3C). The efficacy of treatments with CT increased significantly for 50 mg/l enterocin AS-48 only in strains S62 and UJ3197 (Fig. 3C). Significant reductions of viability ( $p < 0.05$ ) were observed for CT in combination with AS-48 (25 as well as 50 mg/l) for all the strains. Hexadecylpyridinium chloride (20 g/l) reduced viable counts by 2.6–4.2 log cycles (Fig. 3D). The activity of HDP was potentiated significantly ( $p < 0.05$ ) only for the combinations including polymyxin B and AS-48 and only for strain 64 (Fig. 3D).

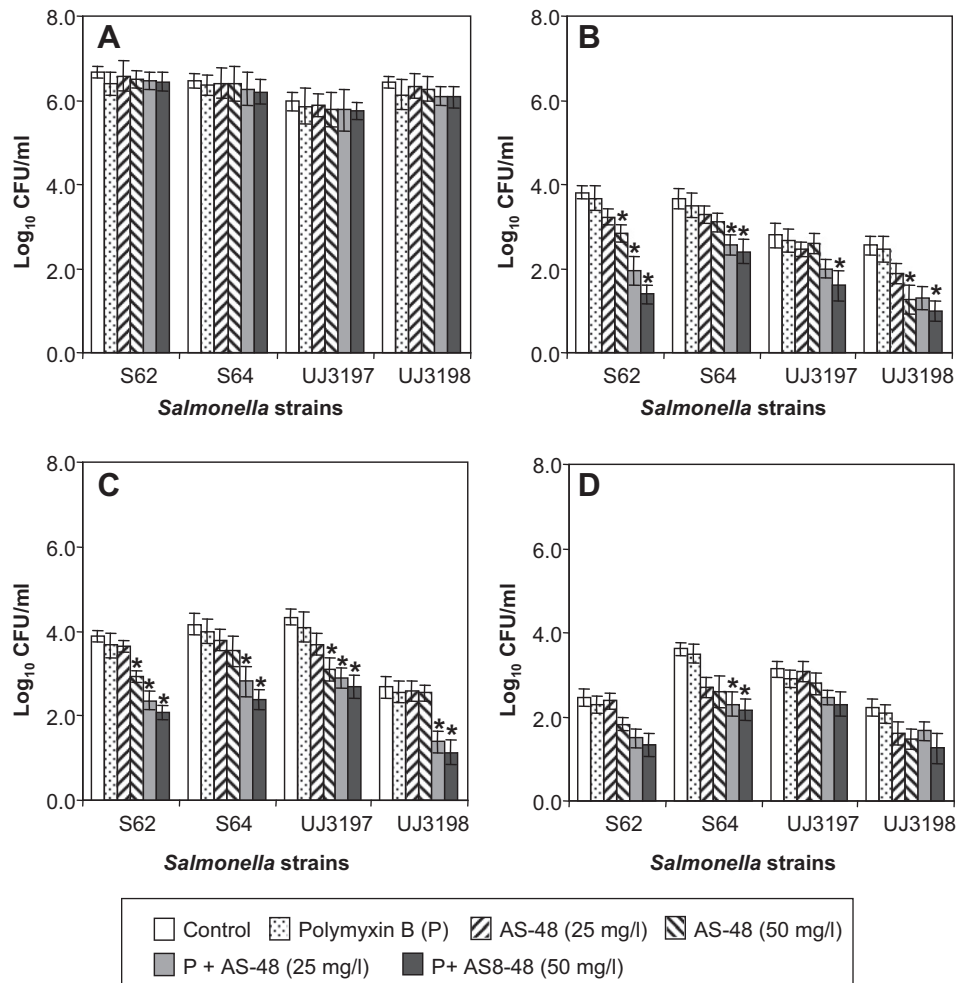
Triclosan (5 g/l) reduced viable counts of sessile salmonellae by 3.7–5.2 log cycles (depending on strain) when tested singly (Fig. 4A). The effect of treatment with TC improved significantly ( $p < 0.05$ ) in combination with 50 mg/l AS-48 for strains S64 and UJ3108 (Fig. 4A). For the combinations of TC with polymyxin B and AS-48, viable counts were reduced significantly for strains S64, UJ3197 and UJ3198 for 25 mg/l bacteriocin, or for all strains in the treatments with 50 mg/l bacteriocin. For strains S62, S64 and UJ3197, no viable salmonellae were detected for most of the combined treatments with biocide, polymyxin B and bacteriocin. Hexachlorophene (20 g/l) was in general less effective than TC against sessile salmonellae (Fig. 4B), reducing viable count by 1.4–2.7 log cycles. The activity of CF was potentiated significantly ( $p < 0.05$ ) in combination with 50 mg/l AS-48 for strains S64 and UJ3198. The combination of CF, polymyxin B and 25 mg/l AS-48 reduced viable counts significantly ( $p < 0.05$ ) for three strains (S62, S64, UJ3198), and increasing the bacteriocin concentration to 50 mg/l reduced viable counts significantly ( $p < 0.05$ ) for all strains.

The single treatment with chlorhexidine (20 g/l) reduced viable counts of sessile salmonellae by 1.9–3.3 log cycles (Fig. 5A). The activity of chlorhexidine on sessile salmonellae was potentiated by

enterocin AS-48 only in strains S64 and UJ3197 (Fig. 5A). The differences in strain sensitivity to the combined treatments including chlorhexidine, polymyxin B and enterocin AS-48 were remarkable, with significant reductions of viable counts for the two bacteriocin concentrations tested in strains S64, UJ3197 and UJ3198, while strain S62 was significantly inactivated only for the highest bacteriocin concentration in the combined treatments compared to the single biocide treatment. In contrast, strain S64 seemed to be the most sensitive, since no viable salmonellae were detected for the highest bacteriocin concentration tested. Poly-(hexamethylen guanidinium) hydrochloride (16 g/l) reduced viable counts by 1.8–2.6 cycles when tested singly (Fig. 5B). The activity of PHMG was only potentiated by combinations including polymyxin B and AS-48 (Fig. 5B). The observed reductions of viable counts in sessile salmonellae were statistically significant ( $p < 0.05$ ) in most strains (except for 25 mg/l AS-48 in strain UJ3197). Inactivation of salmonellae by the commercial sanitizer P3-oxonia tested at 2% (2.2–3.4 log reductions) increased significantly ( $p < 0.05$ ) only for 50 mg/ml bacteriocin in the case of strain UJ3198 (Fig. 5C). All the combined treatments including P3-oxonia, polymyxin B and enterocin AS-48 reduced viable counts of strain 3198 significantly, but only the treatments including 50 mg/l bacteriocin reduced viable counts significantly for the rest of the strains.

#### 4. Discussion

In a previous study, we showed that enterocin AS-48 could improve the activity of biocides against planktonic as well as sessile *L. monocytogenes* cells (Caballero Gómez et al., 2012). Therefore, it would be interesting to determine if similar effects could be demonstrated on *S. enterica*. Being a Gram-negative bacterium,



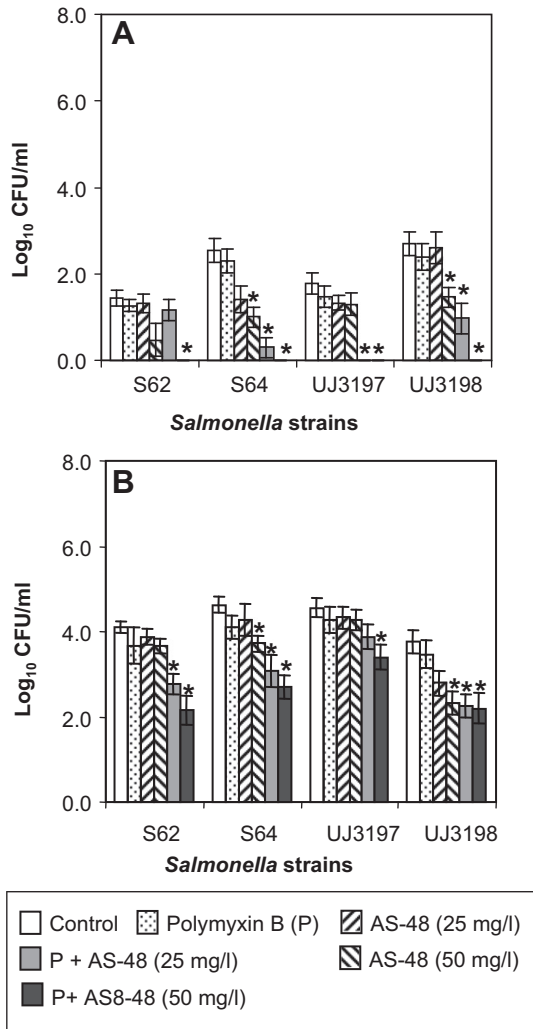
**Fig. 3.** Effect of polymyxin B (2 mg/l), enterocin AS-48 (25 or 50 mg/l) or both without biocides (A) or in combination with 10 g/l benzalkonium chloride (B), 20 g/l cetrimide (C) and 20 g/l hexadecylpyridinium chloride (D) against sessile *Salmonella enterica* strains S62, S64, UJ3197 and UJ3198. Asterisks denote statistically significant ( $p < 0.05$ ) inactivation of salmonellae compared to the single biocide treatment.

*S. enterica* shows an increased resistance to bacteriocins (Gálvez, Abriouel, Lucas-López, & Ben Omar, 2007). Enterocin AS-48 acts on the bacterial cytoplasmic membrane, and needs to overcome the outer membrane permeability barrier in order to reach its lethal target (Gálvez, Maqueda, Martínez-Bueno, & Valdivia, 1991). The natural resistance of *S. enterica* to enterocin AS-48 can be overcome by outer membrane-permeabilizing treatments (such as EDTA or heat) (Abriouel, Valdivia, Gálvez, & Maqueda, 1998) but also by treatment with other chemicals such as trisodium phosphate, lactic acid, peracetic acid, polyphosphoric acid, *p*-hydrobenzoic acid or 2-nitro-propanol (Cobo Molinos et al., 2008, 2009) or by high-intensity pulsed-electric field treatments (Martínez Viedma et al., 2008). The present study showed that *S. enterica* treated with subinhibitory concentrations of polymyxin B also became sensitive to low concentrations of enterocin AS-48. This synergy could be explained by the detergent-like action of polymyxins on the bacterial outer membrane, and opens new possibilities for application of enterocin AS-48 in combination with polymyxins similar to previous reports on polymyxin E and nisin or pediocin PA-1 (Naghmouchi et al., 2011).

Since biocides are widely used in sanitation of food-related environments such as the surfaces of industrial equipments in contact with foods (Holah, 2000; Jones, Jampani, Newman, & Lee, 2000), it would be interesting to see if the activity of biocides on *S. enterica* could be potentiated by enterocin AS-48 in combination

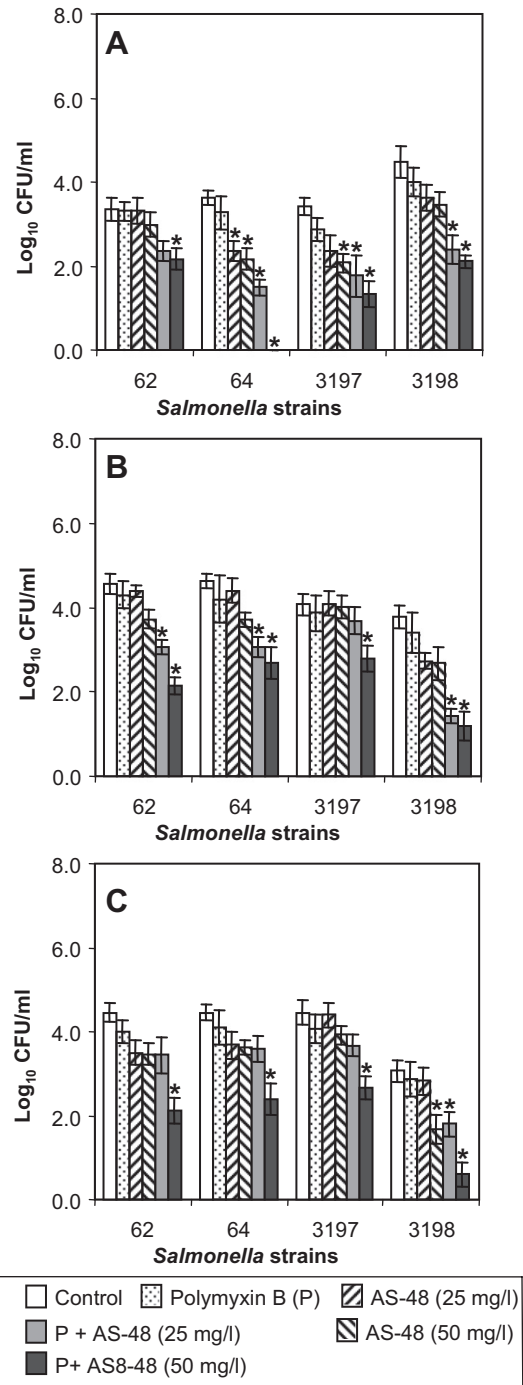
with polymyxin B. While a subinhibitory concentration of polymyxin B improved the inhibitory activity of only one biocide on planktonic salmonellae, a subinhibitory combination of polymyxin B (2 mg/l) and enterocin AS-48 (25 mg/l) improved remarkably the inhibitory effects of four of the biocides tested (cetrimide, hexadecylpyridinium chloride, chlorhexidine and poly-(hexamethylen guanidinium) hydrochloride) and it also caused a partial growth inhibition in combination with the rest of biocides. These results may be of interest in the development of biocide formulations with improved activity on salmonellae and reduced biocide content.

Biocides are important in sanitizing food-contact surfaces both in the home and in food-processing plants, where bacteria tend to persist embedded in biofilms (Kusumaningrum, Riboldi, Hazeleger, & Beumer, 2003; Kusumaningrum, Paltinaite, et al., 2003). Biofilms are surface-associated, three-dimensional multicellular structures whose integrity depends upon the extracellular matrix produced by their constituent bacterial cells (Branda, Vik, Friedman, & Kolter, 2005; Jefferson, 2004). Biofilm formation is one of the main problems for disinfection in the food industry and in other industrial and health sectors as well (Chia, Goulter, McMeekin, Dykes, & Fegan, 2009; Jun et al., 2010). Numerous studies have documented the ability of *Salmonella* spp. to adhere and form biofilms on surfaces such as plastic, cement, glass, and stainless steel (Dhir & Todd, 1995; Joseph et al., 2001) and on food surfaces as well (Lapidot et al., 2006; Iturriaga et al., 2007; Kroupitski, Pinto, Brandl,



**Fig. 4.** Effect of polymyxin B (2 mg/l), enterocin AS-48 (25 or 50 mg/l) or both in combination with 5 g/l triclosan (A) or 20 g/l hexachlorophene (B) against sessile *Salmonella enterica* strains S62, S64, UJ3197 and UJ3198. Asterisks denote statistically significant ( $p < 0.05$ ) inactivation of salmonellae compared to the single biocide treatment.

[Belausov, & Sela, 2009](#); [Patel & Sharma, 2010](#); [Vestby et al., 2009](#)). *S. enterica* forms biofilms that are relatively resistant to chemical sanitizing treatments. A previous study reported an MIC value of 0.5 mg/l for triclosan against planktonic *S. enterica* serovar Typhimurium ([Tabak et al., 2007](#)), which is slightly lower than the 2.5 mg/l value obtained in the present study. Nevertheless, at 1 g/l it only achieved a one-log reduction of viable counts when tested on sessile *Salmonella* ([Tabak et al., 2007](#)). The tolerance of *Salmonella* towards triclosan in the biofilm was attributed to low diffusion through the extracellular matrix, but also to the induced expression of genes involved in reduced influx of triclosan, increased efflux of the compound and enhanced exopolysaccharides production. In the present study, treatment with 5 g/l triclosan failed to completely inactivate sessile salmonellae, while the combinations with polymyxin B and enterocin AS-48 did. TC was also the biocide with greater bactericidal effects on sessile salmonellae when applied singly (5 g/l compared to 20 g/l for the rest of biocides). Triclosan blocks lipid biosynthesis by specifically inhibiting the enzyme enoyl-acyl carrier protein reductase ([Levy et al., 1999](#)), resulting in multiple secondary effects derived from alterations in lipid and phospholipid metabolism ([Schweizer, 2001](#)). A synergistic



**Fig. 5.** Effect of polymyxin B (2 mg/l), enterocin AS-48 (25 or 50 mg/l) or both in combination with 20 g/l chlorhexidine (A), 16 g/l poly-(hexamethylen guanidinium) hydrochloride (B) or with 2.0% (v/v) of the sanitizer P3-oxonia (C) against sessile *Salmonella enterica* strains S62, S64, UJ3197 and UJ3198. Asterisks denote statistically significant ( $p < 0.05$ ) inactivation of salmonellae compared to the single biocide treatment.

effect between triclosan and enterocin AS-48 would be expected from the mechanism of action of this bacteriocin, which interacts with the phospholipids in the bacterial cytoplasmic membrane ([Gálvez et al., 1991](#)).

Remarkably, results from the present study indicated that sessile *S. enterica* cells were much more tolerant to biocides than their planktonic cells, and, with the exception of triclosan, biocide concentrations up to 20 g/l failed to reduce viable populations

below 2.5–4.5 log. In addition, biocide tolerance in the sessile salmonellae was observed for all four strains tested, with slight differences in sensitivity between strains. The concentrations tested in our study are much higher than those commonly used in the industry. For example, benzalkonium chloride, chlorhexidine digluconate, and polyhexamethylenebiguanide formulations are used for sanitizing the surfaces of utensils and instruments in the food industry at concentrations of 0.05–0.2%, 0.01–0.02%, and 0.1–0.2% as the active ingredient, respectively, while hypochlorite solutions are usually used to a maximum of 200 mg/l chlorine (Ueda & Kuwabara, 2007). However, tolerance to commonly used biocide concentrations among sessile salmonellae has also been reported previously (Moretro et al., 2009; Ueda & Kuwabara, 2007). By using commercial disinfectant solutions, Moretro et al. (2009) reported that exposure to acidic peroxygen-based disinfectants resulted in complete reduction (>4 log) of the number of *Salmonella* on stainless steel coupons while in general, disinfectants based on cationic tensides, glutaraldehyde or hypochlorite did not show sufficient bactericidal effect on salmonellae. In another study, at the recommended user concentrations, only sodium hypochlorite showed 100% reduction in viable *Salmonella* cells in biofilms (Wong et al., 2010). Benzalkonium chloride and chlorhexidine gluconate were the least effective against biofilms, followed by quaternary ammonium compound which only showed 100% reduction in viable cells from 5-day-old biofilms. While many studies indicate that salmonellae from food environments are sensitive to disinfectants in their planktonic state (Davison et al., 2003; Gradel, Randall, Sayers, & Davies, 2005; Moretro, Midtgaard, Nesse, & Langsrud, 2003), more work is needed on biocide tolerance in the sessile state. Following disinfection, biofilms containing surviving salmonellae may act as reservoirs for contamination of foods and other items either by direct contact with the contaminated surfaces or by the release of planktonic bacteria that may spread away from the biofilm.

There is a need to improve the efficacy of biocides in the food industry to completely solve the problems of biofilm formation. At the same time, there is a need to reduce the negative impact of biocides and detergents such as toxicity, corrosive effects, ease of removal and the subsequent sensory value effects on the final products (Moretro et al., 2009). The use of biosolutions containing enzymes, phages, interspecies competitions, microbially-derived antimicrobial compounds (Simões, Simões, & Vieira, 2010), essential oils (Valeriano et al., 2012) and natural plant molecules (Chorianopoulos, Giaouris, Skandamis, Haroutounian, & Nychas, 2008) has been proposed as an alternative to biocides in the food industry. Within this context, enterocin AS-48 could improve the efficacy of biocides either directly, as in the case of *L. monocytogenes* (Caballero Gómez et al., 2012) or together with polymyxin B or another outer membrane-permeabilizing agent for inactivation of Gram-negative bacteria.

## Acknowledgements

This work was supported by research project AGL2008-01553/ALI (MICINN, FEDER). Maria Jose Grande was beneficiary of a Juan de la Cierva postdoctoral grant. We also acknowledge the University of Jaen research programme and the Campus Agroalimentario CeiA3.

## References

- Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2010). Potential applications of the cyclic peptide enterocin AS-48 in the preservation of vegetable foods and beverages. *Probiotic and Antimicrobial Proteins*, 2, 77–89.
- Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A., & Maqueda, M. (1998). Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the action of the bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4623–4626.
- Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Gálvez, A. (2003). Method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 599–605.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 2—behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food Control*, 17, 462–468.
- Bower, C. K., McGuire, J., & Daeschel, M. A. (1995). Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 992–997.
- Branda, S. S., Vik, A., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13, 20–26.
- Caballero Gómez, N., Abriouel, H., Grande, M. A., Pérez Pulido, R., & Gálvez, A. (2012). Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 30, 51–58.
- Chorianopoulos, N. G., Giaouris, E. D., Skandamis, P. N., Haroutounian, S. A., & Nychas, G. J. E. (2008). Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1586–1596.
- Chia, T. W., Goulter, R. M., McMeekin, T., Dykes, G. A., & Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26, 853–859.
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Lucas, R., Valdivia, E., Ben Omar, N., & Gálvez, A. (2008). Combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 for inactivation of Gram-negative bacteria in soybean sprouts. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2912–2921.
- Cobo Molinos, A., Lucas, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2009). Inhibition of *Salmonella enterica* cells in deli-type salad by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1, 85–90.
- Collignon, S., & Korsten, L. (2010). Attachment and colonization by *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, and *Staphylococcus aureus* on stone fruit surfaces and survival through a simulated commercial export chain. *Journal of Food Protection*, 73, 1247–1256.
- Davison, S., Benson, C. E., Munro, D. S., Rankin, S. C., Ziegler, A. E., & Eckroade, R. J. (2003). The role of disinfectant resistance of *Salmonella enterica* serotype enteritidis in recurring infections in Pennsylvania egg quality assurance program monitored flocks. *Avian Diseases*, 47, 143–148.
- Dhir, V. K., & Todd, C. E. R. (1995). Susceptibility of suspended and surface-attached *Salmonella enteritidis* to biocides and elevated temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1731–1738.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., & McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2950–2958.
- EFSA. (2010). The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal*, 1946.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas-López, R., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51–70.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (1991). Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on bilayers by peptide antibiotic AS-48. *Journal of Bacteriology*, 173, 886–892.
- Gilbert, P., Das, J. R., Jones, M. V., & Allison, D. G. (2001). Assessment of resistance towards biocides following the attachment of microorganisms to, and growth on, surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 248–254.
- Gilbert, P., McBain, A. J., & Rickard, A. H. (2003). Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 245–248.
- Gradel, K. O., Randall, L., Sayers, A. R., & Davies, R. H. (2005). Possible associations between *Salmonella* persistence in poultry houses and resistance to commonly used disinfectants and a putative role of *mar*. *Veterinary Microbiology*, 107, 127–138.
- Guerrieri, E., de Niederhäusern, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I., et al. (2009). Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control*, 20, 861–865.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 95–108.
- Holah, J. T. (2000). Cleaning and disinfection. In C. Dennis, & M. F. Stringer (Eds.), *Chilled foods: A comprehensive guide* (pp. 397–428). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Horton, J., & Pankey, M. D. (1982). Polymyxin B, colistin, and sodium colistimethate. *Medical Clinics of North America*, 66, 135–142.
- Iturriaga, M. H., Tamplin, M. L., & Escartin, E. F. (2007). Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature. *Journal of Food Protection*, 70, 30–34.

- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236, 163–173.
- Jessen, B., & Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 265–269.
- Jones, R. D., Jampani, H. B., Newman, J. L., & Lee, A. S. (2000). Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control*, 28, 184–196.
- Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 367–372.
- Jun, W., Kim, M. S., Cho, B., Millner, P. D., Chao, K., & Chan, D. E. (2010). Microbial biofilm detection on food contact surfaces by macro-scale fluorescence imaging. *Journal of Food Engineering*, 99, 314–322.
- Kroupitski, Y., Pinto, R., Brandl, M. T., Belausov, E., & Sela, S. (2009). Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1876–1885.
- Kumar, S., Parvathi, A., George, J., Krohne, G., & Karunasagar, I. (2009). A study on the effects of some laboratory-derived genetic mutations on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 527–531.
- Kusumaningrum, H. D., Paltinaite, R., Koomen, A. J., Hazeleger, W. C., Rombouts, F. M., & Beumer, R. R. (2003). Tolerance of *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* to surface cleaning and household bleach. *Journal of Food Protection*, 66, 2289–2295.
- Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 227–236.
- Lapidot, A., Romling, U., & Yaron, S. (2006). Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 229–233.
- Leriche, V., Chassaing, D., & Carpentier, B. (1999). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 169–182.
- Levy, C. W., Roujeinikova, A., Sedelnikova, S., Baker, J. B., Stuitje, A. R., Slabas, A. R., et al. (1999). Molecular basis for triclosan activity. *Nature*, 398, 383–384.
- Lobos, O., Padilla, A., & Padilla, C. (2009). In vitro antimicrobial effect of bacteriocin PsVP-10 in combination with chlorhexidine and triclosan against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* strains. *Archives of Oral Biology*, 54, 230–234.
- Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Sánchez-Barrena, J., González, C., Albert, A., et al. (2004). Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Current Protein and Peptide Science*, 5, 399–416.
- Martínez Viedma, P., Sobrino, A., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas López, R., Valdivia, E., et al. (2008). Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against *Salmonella enterica* in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 244–249.
- Minei, C. C., Gomes, B. C., Ratti, R. P., D'Angelis, C. E. M., & De Martinis, E. C. P. (2008). Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Food Protection*, 71, 634–638.
- Moretto, T., Midtgaard, E. S., Nesse, L. L., & Langsrud, S. (2003). Susceptibility of *Salmonella* isolated from fish feed factories to disinfectants and air-drying at surfaces. *Veterinary Microbiology*, 94, 207–217.
- Moretto, T., Vestby, L. K., Nesse, L. L., Storheim, S. E., Kotlarz, K., & Langsrud, S. (2009). Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1005–1012.
- Morton, L. H. G., Greenway, D. L. A., Gaylarde, C. C., & Surman, S. B. (1998). Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 247–259.
- Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Baah, J., Teather, R., & Drider, D. (2011). Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 162, 99–107.
- Patel, J., & Sharma, M. (2010). Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 41–47.
- Schweizer, H. P. (2001). Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 202, 1–7.
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 573–583.
- Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K. R., Chikindas, M. L., et al. (2007). Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 267, 200–206.
- Ueda, S., & Kuwabara, Y. (2007). Susceptibility of biofilm *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* to detergents and sanitizers. *Biocontrol Science*, 12, 149–153.
- Valeriano, C., Oliveira, T. L. C., Carvalho, S. M., Cardoso, M. G., Alves, E., & Piccoli, R. H. (2012). The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control*, 25, 673–677.
- Vestby, L. K., Moretto, T., Langsrud, S., Heir, E., & Nesse, L. L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 27, 5–20.
- Winkelströter, L. K., Gomes, B. C., Thomaz, M. R. S., Souza, V. M., & De Martinis, E. C. P. (2011). *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, 22, 1404–1407.
- Wong, H. S., Townsend, K. M., Fenwick, S. G., Maker, G., Trengove, R. D., & O'Handley, R. M. (2010). Comparative susceptibility of *Salmonella* Typhimurium biofilms of different ages to disinfectants. *Biofouling*, 26, 859–864.
- Zhao, T., Doyle, M. P., & Zhao, P. (2004). Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3996–4003.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

Los resultados del presente estudio indican que la aplicación de recubrimientos sin bacteriocina reduce de forma variable los recuentos de células viables de *Listeria* en trozos de manzana. Este efecto podría atribuirse al bajo pH de los recubrimientos y también a la presencia de ácido acético. Sin embargo, en el caso del quitosano, la fuerte reducción en los recuentos podría atribuirse a la propia actividad antimicrobiana de este polisacárido. Dependiendo del grado de desacetilación, el quitosano puede tener una extensa cadena de grupos amino C2, con valores de pKa en torno a 6,5 que podrían pasar a forma protonada en condiciones de baja acidez (Wang y Heuzey, 2016). El efecto antimicrobiano del quitosano se debe a su carácter policationico, que favorece la interacción con las paredes de las células microbianas y las membranas citoplasmáticas cargadas negativamente. Estas interacciones dan lugar a una disminución de la estabilidad osmótica, disrupción de la membrana y eventual fuga de elementos del citoplasma (Banergee et al., 2010; Ma et al., 2008; Sanpuiet al., 2008). Además, el quitosano puede entrar en el núcleo de bacterias y hongos inhibiendo la síntesis proteica y de ARNm, uniéndose al ADN (Blecher et al., 2011; Ma et al., 2008; Qi et al., 2005).

El propósito principal del presente estudio fue determinar si la actividad antimicrobiana de los recubrimientos en alimentos podría mejorarse mediante la adición de enterocina AS-48. Presumiblemente, la aplicación de recubrimientos en alimentos, permitiría una mayor duración de la actividad de la bacteriocina en la superficie del alimento así como la liberación lenta y gradual de moléculas de la misma. Este enfoque también beneficiaría los recubrimientos en sí, evitando posiblemente la contaminación cruzada de las superficies cortadas y otros efectos tales como prevención de la oxidación y pérdida de volumen. Estudios previos demostraron que la aplicación de tratamientos de lavado con soluciones acuosas conteniendo enterocina AS-48 tuvieron resultados variables en la inactivación bacteriana dependiendo del sustrato alimenticio utilizado (Cobo-Molinos et al., 2005, 2008). La aplicación de tratamientos de lavado con enterocina AS-48 (25 µg/ml) redujo los recuentos de viables de *Listeria monocytogenes* CECT 4032 en brotes de alfalfa aproximadamente 2,3 ciclos logarítmicos y entre 1,8 y 2,0 ciclos log en brotes de soja. Sin embargo, estos tratamientos tuvieron un efecto mucho más limitado en espárragos (Cobo-Molinos et al., 2005). Además, la aplicación de tratamientos de lavado similares redujo los

recuentos de viables de *L. monocytogenes* CECT 4032 de 1 a 1,3 ciclos logarítmicos en frambuesas, de 3,4 ciclos en trozos de pera o 2,9 ciclos en rodajas de kiwi y sólo 0,6 a 1 ciclos log en melón en rodajas y en sandía (Cobo-Molinos et al., 2008). Los resultados del presente estudio indican que la bacteriocina debería utilizarse en recubrimientos a una concentración de al menos 40 µg/ml, ya que esto aseguraría una disminución más homogénea durante el tiempo de almacenado que con una concentración de 20 µg/ml. Esta concentración recomendada es más alta en comparación con los resultados realizados en estudios anteriores usando soluciones de inmersión como se ha indicado anteriormente. Estas diferencias podrían explicarse teniendo en cuenta que en los estudios previos sólo se utilizó una cepa de *L. monocytogenes* frente al cóctel de cepas utilizadas en el presente trabajo. Además, en el presente estudio también se introdujo un tratamiento con tripsina durante el procesado de la muestra, para evitar posibles efectos de absorción de la bacteriocina en los recuentos en placa. Comparando las reducciones en los recuentos de viables para los diferentes recubrimientos suplementados con enterocina AS-48 a 40 µg/ml a tiempo 0 y 7 días después del almacenado, claramente se comprobó que los revestimientos con goma xantana, pectina y quitosano presentaban mejores resultados, tanto en la reducción temprana de la viabilidad (de 2,0 a 3,6 ciclos de log) como en la reducción del recuento final (3,6 a 4,0 ciclos log) en comparación con los controles sin recubrimientos. En el caso de recubrimientos con quitosano, la adición de bacteriocina no parecía mejorar la actividad del propio quitosano. Dado que la enterocina AS-48 tiene una carga positiva neta, podríamos especular que el polímero desacetilado (también cargado positivamente) y la bacteriocina podrían competir por los sitios de unión en la bacteria y que la saturación de las cargas negativas haría que el quitosano dificultara la unión de la enterocina. Los recubrimientos de carboximetilcelulosa adicionada de enterocina AS-48 también lograron altas reducciones (3,1 log ciclos) al final del almacenamiento, aunque la reducción inicial fue muy leve. Dado que la carboximetilcelulosa tiene una carga negativa y la enterocina AS-48 está cargada positivamente, se esperaría una liberación lenta de moléculas de bacteriocina desde este sustrato. Sin embargo, estas interacciones son más débiles en condiciones ácidas (pH 5,0) que en las soluciones de revestimiento utilizadas considerando que el polímero tiene un valor pKa de 4,3. Otros soportes tales como almidón de patata, k-carragenato y la metil celulosa también lograron altas reducciones en los recuentos finales de células viables entre 2,5 y 2,6 log. Por el contrario, los recubrimientos de alginato y caseína mostraron actividades antimicrobianas más bajas.

La adición de lactato sódico potenció la actividad antimicrobiana de los recubrimientos muy débilmente. En combinación con la enterocina AS-48, el lactato sódico mejoró levemente la inactivación de *Listeria*, detectándose solamente tras 7 días de incubación. Sin embargo, en estudios previos, la adición de lactato sódico mejoró la inactivación de *L. monocytogenes* en las superficies de frutas (excepto en manzanas) cuando se aplicó en combinación con la enterocina AS-48 como tratamiento de lavado (Cobo-Molinos et al., 2008). El lactato sódico también mejoró la actividad de la enterocina AS-48 frente a *Bacillus cereus* (Grande et al., 2006) y *Staphylococcus aureus* (Ananou et al., 2007). Otros estudios mostraron que el acetato sódico mejoró la inactivación de *L. monocytogenes* junto con la incorporación de nisina en revestimientos de zeína aplicados en salchichas de pavo (Lungu y Johnson, 2005) y también con nisina incorporada en películas plásticas recubiertas de quitosano aplicadas sobre el salmón (Ye et al., 2008), o cuando la nisina y el lactato de sodio se inyectaron en pescado ahumado (Nykanen et al., 2000). El lactato sódico en combinación con nisina o con pediocina aplicado para la descontaminación de productos frescos también mejoró la inactivación de *L. monocytogenes* (Bari et al., 2005; Ukuku, et al., 2005). En otro estudio, el lactato sódico también aumentó la actividad antibacteriana de la lacticina 3147 (Scannell et al., 2000).

Al contrario que con el lactato sódico, se obtuvieron resultados prometedores para el EDTA. La adición de EDTA a una concentración final de 20 mM en combinación con 40 µg/ml de enterocina AS-48 mejoró notablemente la inactivación del cóctel de cepas de *L. monocytogenes* en revestimientos de quitosano, pectina y goma de xantana y también aunque en menor medida en el recubrimiento de carboximetil celulosa, reduciendo los recuentos de células viables por debajo de los niveles de detección temprana durante el almacenamiento. El EDTA actúa como un agente quelante pudiendo desestabilizar las membranas de las células bacterianas mediante la formación de complejos con cationes divalentes, secuestrando a cationes que actúan como puentes salinos entre macromoléculas de la membrana tales como los lipopolisacáridos (Vaara, 1992; Shelef y Seiter, 1993). En las bacterias Gram-positivas, los agentes quelantes pueden interferir en el crecimiento bacteriano al secuestrar cationes divalentes que son necesarios para el correcto funcionamiento del metabolismo bacteriano y para la estabilización de la membrana (Reidmiller et al., 2006). Se sabe que el EDTA inhibe el crecimiento al privar a los microorganismos de factores esenciales de

crecimiento tales como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Fe^{2+}$ , inhibiendo así muchas enzimas que necesitan estos cationes como cofactores (Banin et al., 2006). El EDTA potencia la actividad de la nisina, lisozima y la monolaurina frente a bacterias Gram-negativas (Razavi-Rohani y Griffiths, 1994; Sinigaglia et al., 2008; Stevens et al., 1991). El EDTA mejora también la actividad de varios antimicrobianos (incluyendo la lisozima, ovotransferrina, nisina y otras bacteriocinas) frente a *Listeria* y otros Gram-positivos (Ananou et al., 2007; Bari et al., 2005; Branen y Davidson, 2004; Buncic et al., 1995; Ferrocino et al., 2013; Gänzle et al., 1999; Gill y Holley, 2003; Ko et al., 2008; Martínez-Viedma et al., 2010; Mastromatteo et al., 2010; Parente et al., 1998; Zhang y Mustapha, 1999). En conclusión, los resultados del presente estudio indican que la eficacia en los recubrimientos a base de enterocina AS-48 y sustancias poliméricas naturales frente *L. monocytogenes* en trozos de manzana se potencia mediante la incorporación de EDTA. En particular, los recubrimientos con pectina de manzana combinada con enterocina AS-48 y EDTA parecen muy atractivos no sólo debido a su alta actividad antilisteria sino también porque la pectina, debido a que es un polímero natural derivado de la misma fruta, sería preferida por los consumidores en comparación con polímeros procedentes de otras fuentes.

El perejil es ampliamente utilizado como condimento en cocina. Los preparados de perejil cortado listo para usar podrían tener un mercado importante en diferentes ámbitos del sector alimentario (como hoteles, restaurantes y servicios de catering). No obstante, al tratarse de un vegetal crudo, podría transmitir microorganismos patógenos. De acuerdo con los resultados del presente estudio, el perejil picado presenta una elevada carga microbiana capaz de proliferar durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración, alcanzando hasta 9,34 log UFC/g y ocasionando contaminación en los alimentos. La microbiota bacteriana del perejil está compuesta principalmente por Proteobacterias del género *Pseudomonas*. Este grupo bacteriano también se ha descrito en la microbiota de otros alimentos vegetales (Lee et al., 2013; Pérez Pulido et al., 2015; Toledo del Árbol et al., 2016b). Durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración, el principal cambio detectado en la diversidad bacteriana consistió en una disminución de la abundancia relativa de *Pseudomonas* y un aumento en la abundancia relativa de otras bacterias asociadas a plantas del filo Bacteroidetes, principalmente *Flavobacterium* y *Sphingobacterium*.

La aplicación de un recubrimiento combinado de pectina-bacteriocina-EDTA redujo los recuentos de viables en 3,75 ciclos logarítmicos y además retrasó el crecimiento bacteriano hasta el final del tratamiento. La enterocina AS-48 actúa de forma activa sobre la membrana citoplasmática bacteriana principalmente en bacterias Gram-positivas (Grande Burgos et al., 2014). Su espectro inhibitorio puede extenderse a bacterias Gram-negativas en combinación con agentes alterantes de la membrana externa tales como el EDTA (Ananou et al., 2005). Además, se ha demostrado que el EDTA inhibe el crecimiento bacteriano al privar a los microorganismos de factores esenciales de crecimiento tales como el  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Fe^{2+}$ , inhibiendo así muchas enzimas que necesitan estos cationes como cofactores (Baninet et al., 2006). Por tanto, podría esperarse que el tratamiento combinado reduzca una carga microbiana compuesta principalmente de bacterias Gram-negativas.

De hecho, los resultados de la diversidad bacteriana indicaron que el tratamiento con recubrimientos redujo notablemente la abundancia relativa de *Pseudomonas*. Sin embargo, otros grupos bacterianos mostraron abundancias relativas altas en las muestras tratadas inmediatamente después del tratamiento o durante el inicio del tratamiento. En particular, *Acinetobacter* representó el 70,60% del total de unidades taxonómicas (OTUs) al tercer día del tratamiento. Aunque la mayoría de las especies de *Acinetobacter* son organismos ambientales no patógenos, las especies adaptadas a los entornos clínicos están originando serios problemas de salud (Wong et al., 2017). El hecho de que las Enterobacterias como *Shigella* y *Salmonella* muestren una alta abundancia relativa en las muestras tratadas a tiempo 0 merece una especial atención. Aunque estos dos grupos bacterianos no se detectaron durante el almacenamiento, existe la preocupación de que puedan causar enfermedades transmitidas por los alimentos, como la aparición de brotes de *Shigella* demostrados anteriormente. Un estudio previo sobre *S. boydii* de un brote asociado con el consumo de perejil contaminado concluyó que *S. boydii* presenta un factor genético sigma rpoS, que desempeña un papel vital en la supervivencia de la bacteria en condiciones de baja acidez. Los microorganismos entéricos han desarrollado varios mecanismos inducibles para sobrevivir al estrés ácido transitorio (Foster, 2000; Foster y Moreno, 1999). Dado que el recubrimiento utilizado en el presente estudio se acidificó a pH 5,0 con ácido acético, podríamos sugerir una mayor tolerancia de bacterias entéricas a otras condiciones de estrés en el alimento ensayado después de la inducción de estrés ácido.

La aplicación de un tratamiento por alta presión hidrostática (APH) en el perejil consiguió una reducción similar en los recuentos de células viables a los tratamientos con recubrimientos activos y también retrasó el crecimiento microbiano durante el almacenado en condiciones de refrigeración. El tratamiento por APH se aplicó bajo las mismas condiciones ácidas (ácido acético al 0,5%) que en el recubrimiento activo. Sin embargo, las principales bacterias que se detectaron en las muestras tratadas fueron *Enterobacterias*. No se detectó la presencia de enterobacterias presuntamente patógenas como *Salmonella* y *Shigella* o su abundancia relativa fue muy baja en las muestras tratadas con APH, excepto *Shigella* al décimo día de almacenamiento. Mientras que la abundancia relativa de *Pseudomonas* también se redujo, otros grupos bacterianos típicamente asociados con plantas o suelo (como *Sphingomonas*, *Rahnella* o *Dyella*) parecían prevalecer. No hay estudios previos sobre la aplicación de tratamientos por APH para la conservación del perejil. Desde el punto de vista microbiológico, los resultados del presente estudio sugieren que las APH podría aplicarse para reducir la carga microbiana del perejil picado. Existe un interés creciente en el uso de tratamientos de APH para la descontaminación de productos frescos, como lo demuestra un estudio sobre la aplicación de esta tecnología para la descontaminación de *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 en cebollas verdes (Neetoo et al., 2011). Sin embargo, se necesitan trabajos adicionales basados en pruebas diseñadas con cepas patógenas específicas para evaluar la eficacia del uso de APH en la inactivación de patógenos transmitidos por los alimentos en el perejil.

La enterocina AS-48 podría utilizarse también para el control de estafilococos en alimentos, evitando la producción de enterotoxinas. Los estafilococos productores de enterotoxina pueden causar intoxicaciones alimentarias y también llevar en su genoma determinantes genéticos que confieren resistencia a los antibióticos. Debido a los cambios que se han producido en nuestros hábitos culturales, los sustitutos de la leche, como leches de cereales, han ido creciendo en popularidad en occidente como productos con digestibilidad mejorada, que evitan los problemas asociados con la intolerancia a la lactosa, o son beneficios para la salud. No sólo se utilizan como bebidas, sino también como productos culinarios en la preparación de platos. En el estudio realizado empleando cuatro bebidas comerciales (A, B, C, D) de avena (AV) y de soja (S), los resultados obtenidos indicaron que *S. aureus* puede multiplicarse en la soja y en bebidas de avena en condiciones de almacenamiento inadecuadas. Por lo tanto, si las bebidas se

contaminan de forma cruzada con estafilococos, existe el riesgo de que la bacteria se multiplique y cause una descomposición del alimento y posiblemente una intoxicación alimentaria. Los resultados del presente estudio indican que un cóctel elaborado a partir de estafilococos resistentes a la meticilina y productores de enterotoxinas fueron capaces de multiplicarse en bebidas de avena y soja almacenadas durante 24 h a 22 °C, aumentando así la concentración de células viables desde 2,0 a 2,8 ciclos logarítmicos. Los resultados obtenidos tras la adición de diferentes antimicrobianos en las bebidas de avena A (AVA) y de soja A (SA) indicaron que el carvacrol, geraniol, eugenol, citral o 2NPOH solamente presentan una débil actividad antimicrobiana frente al cóctel de cepas de estafilococos ensayadas. El carvacrol, geraniol y eugenol lograron un resultado estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ ) en comparación con el control sin tratar. El citral y el 2-Nitropropanol (2NPOH) lograron una reducción no significativa ( $P > 0,05$ ) de los recuentos de células viables en bebidas. Se obtuvieron resultados similares aplicando solamente la enterocina AS-48. Por el contrario, no se detectaron estafilococos viables en las bebidas AVD o SA tratadas con cualquiera de las combinaciones de enterocina AS-48 y compuestos antimicrobianos. El efecto inhibitor del 2NPOH (5,5 mM) en combinación con la enterocina AS-48 (25 µg/ml) fue corroborado en cuatro ensayos diferentes con un cóctel de cepas de estafilococos inoculadas a una concentración aproximada de 5,0 log<sub>10</sub> UFC/ml en bebida de soja. Mientras que con el 2NPOH se produjo una leve inhibición del crecimiento y solo se obtuvo una ligera disminución del número de células viables, con el tratamiento combinado de enterocina AS-48 y 2NPOH no se detectaron estafilococos viables en ninguna de las bebidas después de 24 h de incubación.

En un estudio previo, se demostró que la actividad antibacteriana de la enterocina AS-48 frente a *S. aureus* CECT 976 en salsas vegetales (todas ellas con valores de pH ácidos) se potenciaba con varios compuestos fenólicos, incluyendo el carvacrol, el geraniol, el eugenol y el citral, entre otros (Grande et al., 2007). Resultados similares se obtuvieron en el presente estudio para el cóctel de 2 cepas inoculadas en bebidas de avena y soja con un pH cercano a la neutralidad. Esto es importante debido a que la eficacia de los compuestos antimicrobianos tiende a ser menor bajo condiciones óptimas de crecimiento bacteriano tales como pH más cercano a la neutralidad en el caso de *S. aureus*. Esto no es únicamente porque un metabolismo más rápido permite una reparación más rápida del daño celular sino porque además a pH bajo, los

antimicrobianos y los ácidos orgánicos tienen una mayor actividad antibacteriana. En comparación con salsas vegetales (que a menudo contienen ácidos acético o cítrico), las bebidas de avena y de soja no contienen ácidos orgánicos añadidos. La mayor eficacia obtenida en la inactivación de los estafilococos en bebidas de avena y de soja cuando se utilizó AS-48 en combinación con compuestos fenólicos sugiere un uso potencial de estas combinaciones antimicrobianas como barrera frente a estafilococos que contaminan accidentalmente las bebidas. Además, los compuestos fenólicos pueden utilizarse como ingredientes aromatizantes (Fenaroli 1995). De forma natural los compuestos fenólicos están presentes en muchos aceites esenciales diferentes (Burt, 2004), y varios trabajos ya han descrito la actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos tales como el citral, carvacrol, eugenol y otros frente a *S. aureus* (Karapinar y Aktug, 1987; Onawunmi, 1989; Lambert et al., 2001; Knowles et al., 2005).

Por otro lado se ensayó el efecto de la enterocina AS-48 adicionada de forma individual a 50 µg/ml, o de forma combinada (25 µg/ml) con 2NPOH (5,5 mM) para un estudio adicional en las bebidas AVA y SA inoculadas con un cóctel de cepas de *S. aureus* y almacenadas a temperaturas de 10 y 22 °C durante 7 días. A 10 °C, los estafilococos se multiplicaron lentamente en AVA, alcanzando entre 6,5 y 7,2 log UFC/ml a los días 3 y 7, respectivamente. El crecimiento en SA fue aún más lento para el primer y segundo día, pero el recuento de viables en AVA fue similar al final del tratamiento. La adición de bacteriocina solamente inhibió el crecimiento de estafilococos en AVA y redujo los recuentos de células viables durante el primer y segundo día de tratamiento. Se observó una reducción no significativa ( $p > 0,05$ ) de 1,0 ciclos logarítmicos al segundo día. Sin embargo, la bacteriocina parecía no tener ningún efecto en la incubación posterior y los estafilococos se multiplicaron llegando a alcanzar los 6 log UFC/ml en el día 7. En la SA, la adición sólo de bacteriocina casi no tuvo efecto. A pesar de que los recuentos viables en las muestras tratadas con bacteriocina fueron siempre más bajos que los controles no tratados, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). En bebidas tratadas con enterocina AS-48 combinada con 2NPOH y almacenadas a 10 °C, la inactivación de los estafilococos ocurrió muy rápidamente en AV, reduciéndose 4.2 log a las 12 h. No se detectaron estafilococos viables en el tratamiento de AVA entre los días 2 y 7. La inactivación de los estafilococos por tratamiento combinado en SA tuvo lugar de forma más lenta, de 3,8 ciclos después de 3 d, dejando una población residual de estafilococos viables al

séptimo día. En las bebidas almacenadas a 22 °C, los estafilococos crecieron rápidamente alcanzando concentraciones de células viables más altas (8,5 ó 8,1 log UFC/ml) a los 2 y 3 días de incubación. La adición de enterocina AS-48 solamente alcanzó unas reducciones máximas en los recuentos de viables (1,2 y 1,0 ciclos log) en el primer día de tratamiento en ambos casos. Sin embargo, la recuperación del crecimiento observado durante los días 2 y 3 de tratamiento, alcanzó cifras de recuentos de viables tan altas como 6.5 log UFC/ml en AVA o 7,3 log UFC/ml en SA. En la AVA tratada con una combinación de enterocina AS-48 y 2NPOH, la inactivación de estafilococos fue muy rápida y no se detectaron células viables después de 12h de tratamiento. La inactivación de estafilococos en SA fue más lenta, no detectándose células viables desde el primer día de almacenamiento. Según un estudio previo, el 2NPOH (0,5%) se utilizó para aumentar la inactivación de *S. aureus* en sirope de chocolate combinándolo con la enterocina AS-48 adicionada a concentración de 58 µg/ml (Martínez-Viedma et al., 2009). El 2NPOH también demostró potenciar la actividad antibacteriana de la enterocina AS-48 frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* en ensaladas (Cobo Molinos et al., 2009a, b). El 2NPOH adicionado de forma individual ha demostrado previamente su actividad frente a patógenos alimentarios (incluyendo *S. aureus*) en harinas a base de maíz, requiriendo concentraciones mayores de 0,5% (Ortega Morente et al., 2010). Los resultados del presente estudio ponen de relieve el efecto potenciador del 2NPOH en la actividad de la enterocina AS-48 frente a estafilococos, mejorando la inactivación de esta bacteria, evitando la recuperación de los cultivos durante el tratamiento, a la vez que permite utilizar concentraciones más bajas de ambos antimicrobianos.

Curiosamente, los resultados del presente estudio potencian también el uso de combinaciones antimicrobianas basadas en la enterocina AS-48 y en los compuestos fenólicos o el 2NPOH en el control de la resistencia de estafilococos a la meticilina. Los antimicrobianos naturales, como las bacteriocinas y los compuestos fenólicos son candidatos cada vez más importantes en el control de cepas resistentes a los antimicrobianos en la cadena alimentaria (Cotter et al., 2013; Allen et al., 2014; Arthur et al., 2014). El 2NPOH se ha administrado de forma segura intrarruminalmente al ganado como un potente inhibidor de la metanogénesis en el rumen (Majak y Clark, 1980; Anderson y Callaway, 2003) y también en polluelos frente a *Salmonella typhimurium* (Jung et al., 2004). También se encontró que este compuesto inhibía el

crecimiento de *Listeria monocytogenes* (Dimitrijevic et al., 2006), y podría posiblemente aplicarse como aditivo en la alimentación para patógenos en la cadena alimentaria (Anderson et al., 2003). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren la posibilidad de nuevas aplicaciones para combinaciones de 2NPOH y enterocina AS-48 en el control de estafilococos resistentes a la meticilina en la cadena alimentaria.

Las bacteriocinas podrían también ser útiles en el control de la transmisión de patógenos en la cadena alimentaria evitando la contaminación a partir de las superficies que entran en contacto con el alimento. En un estudio anterior, se demostró que la enterocina AS-48 podría mejorar la actividad de los biocidas frente a células planctónicas de *L. monocytogenes* (Caballero Gómez et al., 2012). Por tanto era interesante determinar si podían producirse efectos similares en *Salmonella enterica* debido a que *S. enterica* es una bacteria Gram-negativa, y muestra una mayor resistencia a las bacteriocinas (Gálvez et al., 2007). La enterocina AS-48 actúa sobre la membrana citoplasmática bacteriana traspasando la barrera de permeabilidad de la membrana externa (Gálvez et al., 1991). La resistencia natural de *S. enterica* a la enterocina AS-48 podría disminuirse no sólo mediante tratamientos que permeabilizan la membrana externa (tales como EDTA o tratamientos térmicos) (Abriouel et al., 1998), sino también con tratamientos con otros productos químicos como el fosfato trisódico, ácido láctico, ácido paracético, ácido polifosfórico, ácido p-hidroxibenzoico o 2NPOH (Cobo Molinos et al., 2008, 2009) o mediante tratamientos con pulsos eléctricos de alta intensidad (Martínez Viedma et al., 2008). En el presente estudio se demostró que *S. enterica* tratada con concentraciones subinhibitorias de polimixina B también se sensibilizó frente a concentraciones bajas de enterocina AS-48. Esta sinergia podría explicarse por la acción detergente de las polimixinas en la membrana externa bacteriana, lo que abre nuevas posibilidades de aplicación de la enterocina AS-48 en combinación con polimixinas de forma similar a lo descrito en estudios previos con polimixina E y nisina o pediocina PA-1 (Naghmouchi et al., 2011). Dado que los biocidas se utilizan ampliamente en la higienización de ambientes como las superficies de los equipos industriales que están en contacto con los alimentos (Holah, 2000; Jones et al., 2000), sería interesante ver si la actividad de los biocidas frente a *S. enterica* podría potenciarse por la enterocina AS-48 en combinación con polimixina B. Mientras que una concentración subinhibitoria de polimixina B mejoró la actividad inhibitoria de

sólo un biocida en células planctónicas de *Salmonella*, una combinación subinhibitoria de polimixina B (2 mg/l) y enterocina AS-48 (25 mg/l) mejoró notablemente los efectos inhibitorios de cuatro de los biocidas ensayados (cetrimida, cloruro de hexadecilpiridinio, clorhexidina y poli hexametil guanidinio) además de causar un aumento parcial de la inhibición en combinación con el resto de biocidas. Estos resultados podrían tener un interés especial en el desarrollo de formulaciones de biocidas mejorando así la actividad de estos frente a salmonelas y reduciendo la concentración de los mismos.

Los biocidas son importantes en la desinfección de las superficies en el hogar y en las plantas procesadoras de alimentos, donde las bacterias persisten incrustadas en forma de biofilms (Kusumaningrum et al., 2003). Los biofilms son estructuras multicelulares tridimensionales asociadas a la superficie, cuya integridad depende de la matriz extracelular producida por sus células bacterianas constituyentes (Branda et al., 2005; Jefferson, 2004). La formación de biofilms es uno de los principales problemas en la desinfección de la industria alimentaria y en otros sectores de salud (Chia et al., 2009; Jun et al., 2010). Numerosos estudios han demostrado la capacidad de *Salmonella* spp. de adherirse y formar biofilms sobre superficies tales como plástico, cemento, vidrio y acero inoxidable (Dhir y Todd, 1995; Joseph et al., 2001) y en las superficies de los alimentos (Lapidot et al., 2006; Iturriaga et al., 2007; Kroupitski, et al., 2009; Patel y Sharma, 2010; Vestby et al., 2009). *S. enterica* forma biofilms que son relativamente resistentes a los tratamientos con desinfectantes. Un estudio anterior mostró que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del triclosán frente a células planctónicas de *S. enterica* serotipo Typhimurium era 0,5 mg/l (Tabak et al., 2007), que es ligeramente inferior a la concentración de 2,5 mg/l obtenida en el presente estudio. Sin embargo, cuando se realizaban recuentos de células viables, con una concentración de 1 g/l sólo se alcanzaba una reducción en un log en los recuentos (Tabak et al., 2007). La tolerancia de los biofilms de *Salmonella* al triclosán se atribuyó no sólo a una baja difusión a través de la matriz extracelular, sino también a la expresión inducida de los genes implicados en la reducción de la entrada de triclosán, el aumento de la salida del compuesto y el aumento en la producción de exopolysacáridos. En el presente estudio, el tratamiento con 5 g/l de triclosán no inactiva completamente las salmonelas en estado sétil, mientras que sí lo hace la combinación de polimixina B y enterocina AS-48. El triclosan fue también el biocida con mayores efectos bactericidas sobre las salmonelas

sésiles cuando fue aplicado de forma individual (5 g/l en comparación con los 20 g/l necesarios para el resto de biocidas). El triclosan bloquea la biosíntesis de lípidos inhibiendo específicamente la enzima enoyl-acil[proteína transportadora de acilos] reductasa (Levy et al., 1999), lo que da como resultado múltiples efectos secundarios derivados de alteraciones en el metabolismo de los lípidos y fosfolípidos (Schweizer, 2001). Cabría esperar que el triclosan tuviese un efecto sinérgico con la enterocina AS-48, dado que ésta interactúa con los fosfolípidos de la membrana citoplasmática bacteriana (Gálvez et al., 1991). Notablemente, los resultados del presente estudio indicaron que las células sésiles de *S. enterica* eran mucho más tolerantes a los biocidas que las células planctónicas y con la excepción del triclosán, las concentraciones de biocida de hasta 20 g/l no lograron reducir las poblaciones viables por debajo de 2,5-4,5 logs. Además, se observó tolerancia a los biocidas para las cuatro cepas en estado sésil, con solo leves diferencias de sensibilidad entre cepas.

Las concentraciones de biocida ensayadas en nuestro estudio son mucho más altas que las utilizadas comúnmente en la industria. Por ejemplo, el cloruro de benzalconio, la clorhexidina, y la polihexametilenbiguanida se utilizan para desinfectar las superficies de utensilios e instrumentos en la industria alimentaria a concentraciones de 0,05 y 0,2%, 0,01 y 0,02%, y 0,1 a 0,2%, respectivamente, mientras que las soluciones de hipoclorito se utilizan normalmente hasta un máximo de 200 mg/l de cloro (Ueda y Kuwabara, 2007). Sin embargo, la tolerancia a altas concentraciones de biocidas en salmonelas en estado sésil ha sido descrita anteriormente (Moretro et al., 2009; Ueda y Kuwabara, 2007). Mediante el uso de soluciones desinfectantes comerciales, Moretro et al. (2009) encontraron que la exposición a desinfectantes ácidos a base de peróxigeno dio lugar a una inactivación completa (> 4 log) de la población de *Salmonella* en cupones de acero inoxidable, mientras que en general, los desinfectantes a base de agentes tensioactivos catiónicos, glutaraldehído o hipoclorito no mostraron suficiente efecto bactericida sobre las salmonelas. En otro estudio, el hipoclorito de sodio mostró una reducción del 100% en la concentración de células viables de *Salmonella* en biofilms a las concentraciones de uso recomendadas (Wong et al., 2010). El cloruro de benzalconio y el gluconato de clorhexidina fueron los menos efectivos frente a los biofilms, seguidos por el compuesto de amonio cuaternario que sólo mostró una reducción del 100% en las células viables de biofilms de 5 días.

Si bien muchos estudios indican que las salmonelas procedentes de ambientes alimentarios son sensibles a los desinfectantes (Davison et al., 2003; Gradel et al., 2005; Moretro et al., 2003), se necesitan más estudios sobre la tolerancia a los biocidas en estado sésil. Después de la desinfección, los biofilms que contienen salmonelas supervivientes pueden actuar como reservorios para la contaminación de alimentos y otros productos, ya sea por contacto directo con las superficies contaminadas o por la liberación de bacterias planctónicas que puedan propagarse en los biofilms. Es necesario mejorar la eficacia de los biocidas en la industria de alimentos para resolver completamente los problemas de la formación de biofilm y al mismo tiempo, es necesario reducir el impacto negativo de los biocidas y detergentes como su toxicidad, efectos corrosivos, dificultad de eliminación y efectos posteriores en el valor sensorial de los productos (Moretro et al., 2009). El uso de biosoluciones que contienen enzimas, bacteriófagos, productos microbianos, compuestos antimicrobianos (Simões y Vieira, 2010), aceites esenciales (Valeriano et al., 2012) y moléculas vegetales naturales se ha propuesto como una alternativa a los biocidas en la industria alimentaria (Chorianopoulos et al., 2008). En este contexto, la enterocina AS-48 podría mejorar la eficacia de los biocidas ya sea directamente, como en el caso de *L. monocytogenes* (Caballero Gómez et al., 2012) o junto con la polimixina B u otro agente externo permeabilizante de la membrana para la inactivación de bacterias Gram-negativas.

**CONCLUSIONES**

1. Entre los recubrimientos ensayados frente a un cóctel de *Listeria monocytogenes* inoculada en manzana cortada, solamente el quitosano tuvo un efecto bactericida significativo.
2. La enterocina AS-48, incorporada en los diferentes recubrimientos ensayados, mostró cinéticas de inactivación del cóctel de listerias que dependían de la concentración de bacteriocina, el tiempo de incubación y el tipo de recubrimiento.
3. La adición de EDTA junto con AS-48 mejoró la inactivación de las listerias, obteniéndose los mejores resultados para los recubrimientos de quitosano, pectina y xantano.
4. La aplicación de recubrimientos de pectina acondicionada con enterocina AS-48 y EDTA en perejil cortado, al igual que los tratamientos por alta presión hidrostática, redujo la carga microbiana inicial de forma significativa y retrasó la proliferación de la fracción superviviente durante el almacenaje en frío.
5. Los estudios de biodiversidad microbiana revelaron que la microbiota del perejil cortado estaba compuesta en su mayoría por *Proteobacteria* del género *Pseudomonas*.
6. Los tratamientos aplicados redujeron la abundancia relativa de *Proteobacteria* e incrementaron la de *Firmicutes* en el caso del recubrimiento de pectina, o la de *Actinobacteria* en el tratamiento por altas presiones.
7. Los dos tratamientos aplicados influyeron también de forma diferente en los cambios en la microbiota observados durante el almacenaje de las muestras en refrigeración.
8. La enterocina AS-48 adicionada a 25 ug/ml solo redujo levemente la concentración de células de un cóctel formado por una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y otra toxigénica inoculadas en bebidas de avena y de soja.

9. Las combinaciones de enterocina AS-48 con carvacrol, geraniol, eugenol, citral o 2-nitropropanol a concentraciones subinhibitorias provocó la completa inactivación de los estafilococos en las bebidas de soja.
10. La combinación de AS-48 y 2-nitropropanol mostró una elevada eficacia en las diferentes bebidas de avena y soja tanto a 10 °C como a 22°C.
11. Las células de *Salmonella enterica* que forman biopelículas sobre placas de poliestireno presentan una elevada resistencia a los biocidas.
12. El tratamiento combinado con enterocina AS-48 y polimixina B incrementó el efecto bactericida de la mayoría de los biocidas ensayados frente a cuatro cepas de *Salmonella enterica* en estado sénil.

## **REFERENCIAS**

Abengózar, M.Á., Cebrián, R., Saugar, J.M., Gárate, T., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Rivas, L. (2017). Enterocin AS-48 as Evidence for the Use of Bacteriocins as New Leishmanicidal Agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 24.e02288-16.

Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A., & Maqueda, M. (1998). Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the action of the bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4623-4626.

Abriouel, H., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (2002). Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production and spore outgrowth on strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Applied of Environmental Microbiology*, 68, 1473–1477.

Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Gálvez, A. (2003). A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 599– 605.

Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., & Gálvez, A. (2005). Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by the food isolate *Enterococcus faecium* RJ16. *Systematic of Applied Microbiology*, 28, 383-397.

Abriouel, H., Lucas, R., Ben-Omar, N., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2010). Potential applications of the cyclic peptide enterocin AS-48 in the preservation of vegetable foods and beverages. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2, 77–89.

Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Omar, N.B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201-232.

Achipiz, S., Castillo, A., Mosquera, S., Hoyos, J.L., & Navia, D.P. (2013). Efecto de recubrimiento a base de almidón sobre la maduración de la guayaba (*Psidium guajava*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2, 92-100.

Ackers, M.L., Phur, N., Tauxe, R. (2000). Laboratory-based surveillance of *Salmonella* serotype typhi infections in the United States: antimicrobial resistance on the rise. *The Journal of the American Medical Association*, 283, 2668-2673.

Alegre, I., Abadias, M., Anguera, M., Oliveira, M., & Viñas, I. (2010). Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiology*, 27(1), 70–76.

Allen, H.K., Trachsel, J., Looft, T., & Casey, T.A. (2014). Finding alternatives to antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1323, 91–100.

Alvarez-Parrilla, (2005) .Uso de agente antimicrobianos para la conservación de frutas. Dialnet.

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O.P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology Biotechnology*, 100, 2939-2951.

Alzamora, S.M. (1997). Preservación. Alimentos conservados por factores combinados. En: J.M. Aguilera (Ed.). *Temas en tecnologías de Alimentos.1*. México. CYTED.IPN.P. 45- 48.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 2dbehaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food Control*, 17, 462-468.

Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., & Valdivia, E. (2005a). Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 179-190.

Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2005b). Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of applied microbiology*, 99, 1364-1372.

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., & Valdivia, E., (2005c). Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Science*, 71, 549-556.

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., & Valdivia, E. (2007). Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and chemical preservatives against *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 45(1), 19–23.

Ananou, S., Muñoz, A., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2008). Optimization of the production of enterocin AS-48 on a whey-based substrate. *International Dairy Journal*, 18, 923–927.

Ananou, S., Muñoz, A., Martínez-Bueno, M., González-Tello, P., Gálvez, A., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2010). Evaluation of an enterocin AS-48 containing bioactive powder obtained by spray-drying. *Food of Microbiology*, 27, 58–63.

Ananth, V., Dickson, J.S., Olson, D.G., & Murano, E.A. (1998). Shelf life extension, safety, and quality of fresh pork loin treated with high hydrostatic pressure. *Journal of Food Protection*, 61, 1649–1656.

Anderson, R.C., Callaway, T.R., VanKessel, J.S., Jung, Y.S., Edrington, T.S., & Nisbet, D.J. (2003). Effect of select nitro compounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *Bioresour Technology*, 90, 59–63.

Appendini, P., & Hotchkiss, J.H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovation Food Science Emerging Technology*, 3, 113–126.

Arroyo, G. Sanz, P.D. & Préstamo, G. (1997). Effect of high pressure on the reduction of microbial populations in vegetables. *Journal Applied Microbiology*, 82, 735-742.

Artés, F., Castañer, M., & Gil, M.I. (1998). Enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Food Science and Technology International*, 4(6), 377–389.

Artés, F. & Allende, A. (2005). Chapter 26: Minimal fresh processing of vegetables, fruits and juices. *Emerging technologies for food processing*, 792, 677– 716

Arthur, T.D., Cavera, V.L., & Chikindas, M.L. (2014). On bacteriocin delivery systems and potential applications. *Future Microbiology*, 9(2),235–248.

Arvanitoyannis, I., & Gorris, L.G.M. (1999). Edible and Biodegradable Polymeric Materials for Food Packaging or Coating. In: *Processing Foods: Quality Optimization and Process Assessment*, pp. 357–371. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Asaka, M., & Hayashi, R. (1991). Activation of polyphenol oxidase in pear fruits by high pressure treatment. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 2439-2440.

Avena-Bustillos, R.J., Cisneros-Zevallos, L.A., Krochta, J.M., & Saltveit, M.E. (1994). Application of casein-lipid edible film emulsions to reduce white blush on minimally processed carrots. *Postharvest Biological Technology*, 4, 319–329.

Avena-Bustillos, R.J., Krochta, J.M., and Saltveit, M.E. (1997). Water vapor resistance of red delicious apples and celery sticks coated with edible caseinate-acetylated monoglyceride films. *Journal Food Science*, 62, 351–354.

Balaban, N., & Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 1–10.

Balasubramaniam, V.M., Martínez-Monteagudo, S.I., & Rockendra, G. (2015). Principles and Application of High Pressure–Based Technologies in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 435-462.

Baldwin, E., Hagenmaier, R. & Bai, J. (2012). *Edible coatings and films to improve food quality*. Boca Raton: CRC Press.

Banerjee, M., Mallick, S., Paul, A., Chattopadhyay, A., & Ghosh, S. (2010). Heightened reactive oxygen species generation in the antimicrobial activity of three component iodinated chitosan–silver nanoparticle composite. *Langmuir*, 26, 5901–5908.

Banin, E., Brady, K.M., & Greenberg, E.P. (2006). Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2064–2069.

Barba, F.J., Esteve, M.J., & Frígola, A. (2012). High Pressure Treatment Effect on Physicochemical and Nutritional Properties of Fluid Foods During Storage: A Review. *Comp. Rev. Food Science Food Safety*, 11, 307-322.

Bari, M.L., Ukuku, D.O., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K., & Kawamoto, S. (2005). Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *Journal of Food Protection*, 68(7), 1381–1387.

Bari, M.L., Ukuku, D.O., Mori, M., Kawamoto, S., & Yamamoto, K. (2008). Effect of hydrostatic pressure pulsing on the inactivation of *Salmonella enteritidis* in liquid whole egg. *Foodborne Pathogens and Diseases*, 5, 175–182.

Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Review*, 27, 870-926.

Benito, A., Ventoura, G., Casadei, M., Robinson, T., & Mackey, B. (1999). Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1564–1569.

Beshkova, D., & Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, 12(4):1-14.

Beuchat, L.R., & Brackett, R.E. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1367–1371.

Beuchat, L.R. (2001). Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. *Microbial food contamination*. Wilson CL.SDroby London UK Chap.11:149-169.

Beuchat, LR. (1996). Pathogenic microorganism associated with fresh produce. *Journal Food Protection*, 59, 204-216.

Bico, S.L., Raposo, M.F., Morais., R.M.S., & Morais, M.M.. (2009). Combined effects of chemical dip and/ or carrageenan coating and/or controlled atmosphere on quality of fresh-cut banana. *Food Control* 20(5), 508–514.

Blanchard, J. (2000). Los antimicrobianos naturales refuerzan la seguridad en los alimentos. Tesis Doctoral.

Blecher, K., Nasir, A., & Friedman, A. (2011). The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*, 2, 395–401.

Bower, C.K., McGuire, J., & Daeschel, M.A. (1995). Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 992-997.

Bozoglu, F., Alpas, H., & Kaletunç, G. (2004). Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40, 243–247.

Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13, 20-26.

Branen, J.K., & Davidson, P.M. (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), 63–74.

Brenner, F., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, R. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2465-2467.

Buchanan, R.L. & Phillips, J.G. (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration, and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 53, 370–376.

Buncic, S., Fitzgerald, S., Bell, C.M., & Hudson, R.G. (1995). Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperatures. *Journal of Food Safety*, 15(3), 247–264.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.

Buxton, J., Fyfe, M., King, A., Paccagnella, A., Campbell, K., Ellis, A., et al. (1999). Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infection in the United States and Canada associated with unpasteurized orange juice—the British Columbia Experience. *Canada Communicable Disease Report*, 25, 161–164.

Caballero Gómez, N., Abriouel, H., Grande, M.A., Pérez Pulido, R., & Gálvez, A. (2012). Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 30, 51-58.

Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E.T. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, 67, 833–848.

Callej6, R.M., Rodr6guez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M.C., & Troncoso, A.M. (2015). Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12, 32-38.

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*, 108(1), 4516–4522.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1999). Outbreaks of *Shigella sonnei* infection associated with eating fresh parsley--United States and Canada, July-August 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 48(14), 285-289.

Centers for Disease Control and Prevention. (2012, Mayo 15). Retrieved from National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonellosis/#what>

Cha, D.S., & Chinnan, M.S. (2004). Biopolymer-based antimicrobial packaging: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 223–237.

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.

Chapman, J.S. (2003). Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration Biodegradation*, 51,133-138.

Chawner, J.A., & Gilbert. P. (1989b). Interaction of the bisbiguanides alexidine and chlorhexidine with phospholipid vesicles: evidence for separate modes of action. *Journal Applied Bacterial*, 66, 253-258.

Cheftel, J.C. (1995). High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*, 1, 75–90.

Chen, H., & Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* . 2:82-100.

Chia, T.W., Goulter, R.M., McMeekin, T., Dykes, G.A., & Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26, 853-859.

Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Skandamis, P.N., Haroutounian, S.A., & Nychas, G.J.E. (2008). Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1586-1596.

Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., & Hernández, P.E. (2001). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science Technology International*, 7 (4):281- 305.

Ciolacu, L., Nicolau, A.I., & Hoorfar, J. (2014). Global safety of fresh produce. A handbook of best practice, innovative commercial solutions and case studies. Sawston, UK: Woodhead Publishing Limited.

Cobo-Molinos, A., Abriouel, H., Ben-Omar, N., Valdivia, E., Lucas, R., Maqueda, M., Gálvez, A. (2005). Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7781–7787.

Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Lucas, R., Valdivia, E., Ben Omar, N., & Gálvez, A. (2008). Combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 for inactivation of Gram-negative bacteria in soybean sprouts. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2912-2921.

Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Lucas López, R., Ben Omar, N., Valdivia, E., & Galvez, A. (2008). Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. *Food Microbiology*, 25, 762-770.

Cobo-Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2008). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. *Journal of Food Protection*, 71, 2460–2467.

Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2009a). Enhanced bactericidal activity of enterocin AS-48 in combination with essential oils, natural bioactive compounds, and chemical preservatives against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salads. *Food Chemical Toxicology*, 47,2216–2223.

Cobo Molinos, A., Lucas, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2009b). Inhibition of *Salmonella enterica* cells in deli-type salad by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1, 85–90.

Collignon, S., & Korsten, L. (2010). Attachment and colonization by *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, and *Staphylococcus aureus* on stone fruit surfaces and survival through a simulated commercial export chain. *Journal of Food Protection*, 73,1247-1256.

Conway, S. B., Leverentz, R. A., Saftner, W. J., Janisiewicz, C. E., & Leblanc, S. E. (2000). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. *Plant Disease*, 84, 177–181.

Cooksey, K. (2007) Effectiveness of antimicrobial food packaging materials Pages 980-987 | Published online: 16 Feb 2007.

Corcoran, M., Morris, D., De-Lappe, N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P., Cormican, M. (2014). Commonly Used Disinfectants Fail To Eradicate *Salmonella enterica* Biofilms from Food Contact Surface Materials. *Applied Environmental Microbiology*, 80:1507–1514.

Cotter, P.D., Hill, C., & Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777–788.

Cotter, P.D., Ross, R.P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11, 95-105.

D'Aoust, J.Y. (2000). *Salmonella*. The Microbiological Safety and Quality of Food. Aspen, MD.

Da Silva, M.V., Gibbs, P.A., & Kirby, R.M. (1998). Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (*Trachurus trachurus*). *Journal of Applied Microbiology*, 84, 802–810.

Davidson, P.M. (2001). Chemical preservatives and natural antimicrobial compound. *Food Microbiology and Fundamentals* Ed. Doyle MP, LR Beuchat, TJ Montville (Eds). ASM Press Whashington D.c. USA. Chap.29:593-627.

Davison, S., Benson, C.E., Munro, D.S., Rankin, S.C., Ziegler, A.E., & Eckroade, R.J. (2003). The role of disinfectant resistance of *Salmonella enterica* serotype enteritidis in recurring infections in Pennsylvania egg quality assurance program monitored flocks. *Avian Diseases*, 47, 143e148.

De Azevedo, H.M.C. (2012). Edible coatings. *Advances in fruit processing technologies*, 345–361.

De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13 :194-199.

Del Valle, (2003). *Preservación de frutas y hortalizas, mediante métodos artesanales.*

Denoya, G., & M. Ardanaz. (2012). Aplicación de tratamientos combinados de aditivos sobre la inhibición del pardeamiento enzimático en manzanas cv. Granny Smith mínimamente procesadas. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 38(3): 263–267.

Dhall, R. K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 435–450.

Dhir, V.K., & Todd, C.E.R. (1995). Susceptibility of suspended and surface-attached *Salmonella enteritidis* to biocides and elevated temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1731-1738.

Díaz Torres, M.L. (1999). Análisis y expresión de los genes implicados en la producción y resistencia frente a AS-48. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Díaz, M., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Fernández, M., Soler-González, A.S.S., Ramírez-Rodrigo, H., & Maqueda, M. (2003). Characterization of a new operon, as- 48EFGH, from the as-48 gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1229-1236.

Díaz-Maroto, M., Pérez-Coello, M., & Cabezudo, M. (2002). Effect of different drying methods on the volatile components of parsley (*Petroselinum crispum* L.). *European Food Research and Technology*, 215(3), 227–230.

Dimov, S.G., Ivanova, P.M., Harizanova, N.T. & Ivanova, I.V. (2005). Bioactive peptides used by bacteria in the concurrence for the ecological niche: general classification and mode of action (overview). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2, 3-22.

Djordjevic, D., Wiedmann, M., & McLandsborough, L.A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2950-2958.

Doyle, ME., Hartmann, FA., & LeeWong, AC. (2012). Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? *Animal Health Research Reviews*, 13:157–180.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M., & Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 564–582.

EFSA. (2010). The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal*, 1946.

EFSA. (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 12:3547.

EFSA (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13(1), 3991 (165 pp.).

Elizaquivel, P., Sánchez, G., & Aznar, R. (2012). Quantitative detection of viable foodborne *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control*, 25, 704–708.

El-Ziney, M.G., Debevere, J., & Jakobsen, M. (2000). Reuterin. In: Naidu, A.S. (Ed.), *Natural Food Antimicrobial Systems*, 567–587.

Escriu, R., & Mor-Mur, M. (2009). Role of quantity and quality of fat in meat models inoculated with *Listeria innocua* or *Salmonella Typhimurium* treated by high pressure and refrigerated stored. *Food Microbiology*, 26, 834–840.

Eshtiaghi, M.N., & Knorr, D. (1993). Potato cubes response to water blanching and high hydrostatic pressure. *Journal Food Science*, 58, 1371-1373.

FAO-WHO (2015). Codex alimentarius. General standard for food additives. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/gsfa/en/>

Farber J.M., & Peterkin P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology Review*, 55(3): 476-511.

Farrell, A.P., Kennedy, C.J., Wood, A., Johnston, B.D., & Bennett, W.R. (1998). Acute toxicity of a didecyldimethylammonium chloridebased wood preservative, Bardac 2280, to aquatic species. *Environmental Toxicology Chemistry*, 17, 1552-1557.

Farzaei, M.H., Abbasabadi, Z., Reza, M., Ardekani, S., & Rahimi, R. (2013). Parsley: A review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 33(6), 815–826.

FDA Code of Federal Regulations (1998). Title 21, part 172: food additives permitted for direct addition to food for human consumption, subpart B: Food preservatives, sec. 172. 120 calcium disodium EDTA.

FDA. 2001. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce.

Fenaroli, G. (1995). Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. Florida: CRC Press. Ferrocino, I., La-Storia, A., Torrieri, E., Musso, S. S., Mauriello, G., Villani, et al. (2013). Antimicrobial packaging to retard the growth of spoilage bacteria and to reduce the release of volatile metabolites in meat stored under vacuum at 1 °C. *Journal of Food Protection*, 76(1), 52–58.

Fernández Márquez, M.L., Grande Burgos, M. J., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R. (2017). Biocide tolerance and antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from hen eggshells. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2-182.

Fernández, M., Martínez-Bueno, M., Martín, M.C., Valdivia, E., & Maqueda, M. (2007). Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1350–1361.

Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., & Nissen-Meyer, J. (2005). Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *Journal of Peptide Science*, 11, 688- 696.

Folli, C., Ramazzina, I., Arcidiaco, P., Stoppini, M., & Berni, R. (2003). Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 143-149.

Foster, J. W., & Moreno, M. (1999). Inducible acid tolerance mechanisms in enteric bacteria. *Novartis Foundation Symposium*, 221, 55-69.

Foster, J.W. (2000). Microbial responses to acid stress. *Bacterial Stress Responses*. American Society for Microbiology, 99–115.

Franz, C.M.A.P., van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, H., & Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping into a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 293-310.

Gabrielsen, C., Brede, D.A., Nes, I.F., & Diep, D.B. (2004). Circular bacteriocins: Biosynthesis and mode of action. *Applied Environmental of Microbiology*, 80, 6854–6862.

Gálvez, A. (1984). Producción de sustancias antibacterianas por estreptococos del grupo D. Tesis de Licenciatura. Universidad de Granada

Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A., & Montoya, E. (1986). Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS- 48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 32, 765-771.

Gálvez, A., Giménez-Gallego, G., Maqueda, M., & Valdivia, E. (1989a). Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. liquefaciens S-48. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 437-441.

Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (1991). Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on bilayers by peptide antibiotic AS-48. *Journal of Bacteriology*, 173, 886-892.

Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas-López, R., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.

Gálvez, A., Lucas, R., Pérez Pulido, R., & Grande Burgos, M.J. (2014). *Food Biopreservation*. New York: Springer.

Gänzle, M. G., Weber, S., & Hammes, W. P. (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 46(3), 207–217.

García, M.A., Ferrero, C., Bértola, N., Martino, M., & Zaritzky, N. (2002). Edible coatings from cellulose derivatives to reduce oil uptake in fried products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 391–397.

García, M., Casariego, A., Díaz, R., & Roblejo, L. (2014). Effect of edible chitosan/zeolite coating on tomatoes quality during refrigerated storage. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26, 238-246.

Garner, D., & Kathariou, S. (2016). Fresh produce-associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, and insights. *Journal of Food Protection*, 79(2), 337–344.

Genigeorgis, C.A. (1989). Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *International Journal Food Microbiology*, 9, 327–360.

Ghandi, M., & Chikindas, M.L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1–15

Gilbert, P., Das, J.R., Jones, M.V., & Allison, D.G. (2001). Assessment of resistance towards biocides following the attachment of microorganisms to, and growth on, surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 248-254.

Gilbert, P., McBain, A.J., & Rickard, A.H. (2003). Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 245-248

Gill, A.O., & Holley, R.A. (2003). Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 251–259.

Glass, K.A., Golden, M.C., Wanless, B., Bedale, W., & Czuprynski, C. (2015). Growth of *Listeria monocytogenes* within a caramel-coated apple microenvironment, 6(5), e01232-15.

González, C., Langdon, G.M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., & Rico, M. (2000). Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97, 11221-1126.

Gradel, K.O., Randall, L., Sayers, A.R., & Davies, R.H. (2005). Possible associations between *Salmonella* persistence in poultry houses and resistance to commonly used disinfectants and a putative role of mar. Veterinary Microbiology, 107, 127-138.

Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., & Gálvez, A. (2006). Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from ropy cider by enterocin AS-48. Journal of Applied Microbiology, 101, 422–428.

Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., & Gálvez, A. (2006). Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. International Journal of Food Microbiology, 106, 185–194.

Grande, M<sup>a</sup>.J., Abriouel, H., Lucas, R., Valdivia, E., N. Ben Omar, N., Martínez-Cañamero, M., & Gálvez, A. (2007). Efficacy of enterocin AS-48 against bacilli in ready-to-eat vegetable soups and purees. Journal of Food Protection, 70 , 2339-2345.

Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., & Gálvez, A. (2007). Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Protection 70, 405–411.

Grande Burgos, M.J., Kovács, A.T., Mirończuk, A.M., Abriouel, H., Gálvez, A., & Kuipers, O.P. (2009). Response of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to challenges with sublethal concentrations of enterocin AS-48. BMC Microbiology, 28, 227.

Grande-Burgos, M. J., Pérez-Pulido, R., López-Aguayo, M. C., 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, 22706–22727.

Grasso, E.M., Somerville, J.A., Balasubramaniam, V.M., & Lee, K. (2010). Minimal effects of high-pressure treatment on *Salmonella* enterica serovar Typhimurium inoculated into peanut butter and peanut products. *Journal of Food Science*, 75, E522–E526.

Gravesen, A., Jydegaard Axelsen, A.-M., Mendes da Silva, J., Hansen, T.B., & Knøchel, S. (2002). Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 756-64.

Grimont, P.A.D., & Weill, F.X. (2007), *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*. Paris, France: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*.

Gross, M., & Jaenické, R. (1994). Proteins under pressure. *European Journal Biochemistry*, 221, 617-630.

Guder, A., Wiedemann, I. & Sahl, H.G. (2000). Posttranslationally modified bacteriocins-the lantibiotics. *Biopolymers*, 55(1):62-73.

Guerrieri, E., de Niederhäusern, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., & Anacarso, I. (2009). Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control*, 20, 861-865.

Guilbert, S., Gontard, N., & Gorris, L.G.M. (1996). Prolongation of the shelf life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensm. Wiss. Technol*, 29:10–17.

Guinebretière, M.H., Berge, O., Normand, P., Morris, C., Carlin, F., & Nguyen-The, C. (2002). Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4520-4530.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 95e108.

Harold, F.M., Baarda, J.R., & Abrams, A. (1969). Dio 9 and qhlorhexidine: inhibitors of membrane bound ATPase and of cation transport in *Streptococcus faecalis*. *Biochimica Biophysica*, 183, 129-136.

Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., & Garret, E. H. (2003). Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 78–141.

Hayashi, R. (1989b). Application of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development. En: *Engineering and Food*. 2, pp 815- 826. Spiess, W y Schubert, H. (ed.). Elsevier Appl. Sci. London

Heimbach, J., Rieth, S., Mohamedshah, F., Slesinski, R., Samuel-Fernando, P., & Sheenan, T. (2000). Safety assessment of iron EDTA [sodium iron (Fe<sup>3+</sup>) ethylene diamine tetraacetic acid]: Summary of toxicological, fortification and exposure data. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 99–111.

Heintz, M.L., Ruble, R.D., Wagner, D.E., & Tatini, S.R. (2000). Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *Journal of Food Protection*, 63, 579–592.

Herrero, A.M., & Romero de Ávila, M.D. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 50, 71–74.

Hilborn, E.D., Mermin, J.H., Mshar, P.A., Hadler, J.H., Voetsch, A., Wojtkunski, C., Swartz, M., Mshar, R., Lambert-Fair, M.A., Farrar, J.A., Glynn, M.K., & Slutsker, L. (1999). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 contaminations associated with consumption of mesclun lettuce. *Archives of Internal Medicine*, 159, 1758-1764.

Hite, B. H., Giddins, N. J., & Weakly, C. E. (1914). The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. *West Virginia Agriculture Experiment Station*, 146, 2-67.

Holah, J.T. (2000). Cleaning and disinfection. Chilled foods: A comprehensive guide, 397-428.

Holtzel, A., Ganzle, M.G., Nicholson, G.J., Hammes, W.P., & Jung, G. (2000). The first low-molecular-weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic acid. *Angewandte Chemie. International Edition*, 39, 2766–2768

Holzappel, W.H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 343–362.

Horby, P.W., O'Brien, S.J., Adak, G.K., Graham, C., Hawker, J.I., Hunter, P., Lane, C., & Lawson, A.J. (2003). A national outbreak of multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type (DT) 104 associated with consumption of lettuce. *Epidemiology and Infection*, 130, 169-178.

Horton, J., & Pankey, M.D. (1982). Polymyxin B, colistin, and sodium colistimethate. *Medical Clinics of North America*, 66, 135-142.

Huang, E., Zhang, L., Chung, Y.K., Zheng, Z., & Yousef, A.E. (2013). Characterization and application of enterocin RM6, a bacteriocin from *Enterococcus faecalis*. *BioMed Research International*, 206917.

Hugo, W.B., & Russell, A.D. (1982). Types of antimicrobial agents. In (Eds.) Russell, AD., Hugo, WB., Ayliffe, GAJ., *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation*, Blackwell, Oxford, 8-106.

Hun, J.H., & Cennadios, A. (2005). Edible films and coatings: a review. *Innovations in Food Packaging*, 240–262.

Inoue, A., & Horikoshi, K.A. (1989). *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* 338:264-266.

Ippolito, G., Leone, S., Lauria, F.N., Nicastrì, E., & Wenzel, RP. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. *International Journal of Infectious Diseases*, 14 (4), 7-11.

Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P., & Jiang, X. (2004). Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection*, 67(7), 1365-1370.

Iturriaga, M.H., Tamplin, M.L., & Escartín, E.F. (2007). Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature. *Journal of Food Protection*, 70, 30-34.

Jablonski, L.M., & Bohach, G. (2001). *Staphylococcus aureus*. In: Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. (eds): *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington: 411–434.

Jefferson, K.K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236, 163-173.

Jessen, B., & Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 265-269.

Jiang, Z., Neetoo, H., & Chen, H. (2011). Efficacy of freezing, frozen storage and edible antimicrobial coatings used in combination for control of *Listeria monocytogenes* on roasted turkey stored at chiller temperatures. *Food Microbiology*, 28, 1394–1401.

Johannessen, G.S., Loncarevic, S., & Kruse, H. (2002). Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 199–204.

Johnston, L.M., Jaykus, L.A., Moll, D., Martinez, M.C., Anciso, J., Mora, B., & Moe, C.L. (2005). A field study of the microbiological quality of fresh produce. *Journal of Food Protection*, 68(9), 1840-1847.

Jones, R.D., Jampani, H.B., Newman, J.L., & Lee, A.S. (2000). Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control*, 28, 184-196.

Joosten, H.M.L.J., Nuñez, M., Devreese, B., van Beeumen, J., & Marugg, J.D. (1996). Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA4. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4220-4223.

Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D.R. A., & Bolton, F.J. (2002). Prevalence and number of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chicken in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 151–164.

Jorgensen, H.J., Mork, T., & Rørvik, L.M. (2005). The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal Dairy Science*, 88, 3810-3817.

Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 367-372

Jun, W., Kim, M.S., Cho, B., Millner, P.D., Chao, K., & Chan, D.E. (2010). Microbial biofilm detection on food contact surfaces by macro-scale fluorescence imaging. *Journal of Food Engineering*, 99, 314-322.

Jung, Y.S., Anderson, R.C., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Byrd, J.A., Callaway, T.R., & Nisbet, D.J. (2004). Experimental use of 2-nitropropanol for reduction of *Salmonella typhimurium* in the ceca of broiler chicks. *Journal of Food Protection*, 67, 1945–1947.

Jurado, R.L., Farley, M., Pereira, E., Harvey, R.C., Schuchat, A., & Wenger, J.D. (1993). Increased risk of meningitis in bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases* 17, 224-227.

Kallen, A.J., Hageman, J., Gorwitz, R., Beekmann, S.E., & Polgreen, P.M. (2007). Characteristics of *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia during the 2006-2007 influenza season. *Clinical infectious diseases:an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45, 1655.

Karapinar, M., & Aktug, S.E. (1987). Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. *International Journal of Food Microbiology*, 4, 161–166.

Kawai, Y., Ishii, Y., Uemura, K., Kitazawa, H., Saito, T., & Itoh, T. (2001). *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food of Microbiology*, 18, 407–415.

Kechrid, A., Pérez-Vázquez, M., Smaoui, H., Hariga, D., Rodríguez- Baños, M., Vindel, A., & Del Campo, R. (2011). Molecular analysis of community-acquired methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bacteraemic and osteomyelitis infections in children from Tunisia. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17, 1020- 1026.

Khelef, N., Lecuit, M., Buchrieser, C., Cabanes, D., Dussurget, O., & Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. In *The Prokaryotes*. Springer.

Kimura, K., Ida, M., Yosida, Y., Ohki, K., Fukumoto, T., & Sakui, N. (1994). Comparison of keeping quality between pressure-processed jam and heat-processed jam: changes in flavor components, hue, and nutrients during storage. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 58, 1386-1391.

Kisluk, G., & Yaron, S. (2012). Presence and persistence of *Salmonella enterica* serotype typhimurium in the phyllosphere and rhizosphere of spray-irrigated parsley. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4030-4036.

Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 39–86.

Knowles, J.R., Roller, S., Murray, D.B., & Naidu, A.S. (2005). Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied Environmental Microbiology* 71:797–803

Ko, K.Y., Mendonca, A.F., & Ahn, D.U. (2008). Effect of ethylenediaminetetraacetate and lysozyme on the antimicrobial activity of ovotransferrin against *Listeria monocytogenes*. *Poultry Science*, 87(8), 1649–1658.

Kokoszka, S., & Lenart, A. (2007). Warsaw Edible coatings - formation, characteristics and use - a review. Agricultural University (Poland). Faculty of Food Technology .

Kopecka-Leitmanova, A., Devinsky, F., Mlynarcik, D., & Lacko, I. (1987). Interaction of ADMAOs and quaternary ammonium salts with membrane and membrane-associated processes in *E. coli* cells: mode of action. *Drug Metabolism Drug Interaction*, 7, 29-51.

Krochta, J.M., & Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51, 61–74.

Kroupitski, Y., Pinto, R., Brandl, M.T., Belausov, E., & Sela, S. (2009). Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1876-1885.

Kumar, C.G., & Anand, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42, 9-27.

Kumar, S., Parvathi, A., George, J., Krohne, G., & Karunasagar, I. (2009). A study on the effects of some laboratory-derived genetic mutations on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 527-531.

Kuorwel, K.K., Cran, M.J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S.W. (2011). Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. *Journal of Food Science*, 76(3), 90–102.

Kusumaningrum, H.D., Paltinaite, R., Koomen, A.J., Hazeleger, W.C., Rombouts, F.M., & Beumer, R.R. (2003). Tolerance of *Salmonella Enteritidis* and *Staphylococcus aureus* to surface cleaning and household bleach. *Journal of Food Protection*, 66, 2289-2295.

Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C., & Beumer, R.R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 227-236.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., & Nychas, G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453–462.

Lampel, K.A., Al-Khaldi, S., & Cahill, S.M. (2012). *Salmonella* species. In T. Hammack, *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins U.S. Food and Drug Administration*, 12- 16.

Langdon, G.M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., & Rico, M. (1998). Sequence specific 1H assignment and secondary structure of the bacteriocin AS-48 cyclic peptide. *Journal of Biomolecular NMR*, 12, 173-175.

Lapidot, A., Romling, U., & Yaron, S. (2006). Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 229-233.

Lecuit, M. (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes Infection*, 1216–1225.

Lee, D. H., Kim, J. B., Kim, M., Roh, E., Jung, K., Choi, M., Oh, C., Choi, J., Yun, J., & Heu, S. (2013). Microbiota on spoiled vegetables and their characterization. *Journal of Food Protection*, 76(8), 1350-1358.

Leistner, L., & Gorris, L.G.M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 41-46.

Leistner, L., & Rodel, W. (1976). The stability of immediate moisture foods with respect to microorganism. *Intermediate Moisture Foods*, 120. *Preservación. Alimentos conservados por factores combinados*. J.M. Aguilera (Ed.). *Temas en tecnologías de Alimentos.1. México. CYTED.IPN.P.* 45-48

Leistner, L., (1978). Hurdle effect and energy saving. In: Downey, W.K. (Ed.), *Food Quality and Nutrition*, Applied Science Publishers, 553-557.

Leistner, L., (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181-186.

Leistner, L., & Gould, G.W. (2002). *Hurdle technologies: Combination treatments for food stability, safety and quality*. Springer, New York, 194.

Lerdthanankul, S. & Krochta, J.M. (1996). Edible coating effects on post harvest quality of green bell peppers. *Journal Food Science*, 61, 176–179.

Leriche, V., Chassaing, D., & Carpentier, B. (1999). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 169-182.

Letien, C., Vachion, C., Mateescu, M.A., & Lacroix, M. (2001). Milk protein coatings prevent oxidative browning of apples and potatoes. *Journal of Food Science*, 66, 512–516.

Levy, C.W., Roujeinikova, A., Sedelnikova, S., Baker, J.B., Stuitje, A.R., & Slabas, A.R. (1999). Molecular basis for triclosan activity. *Nature*, 398, 383-384.

Lin, D., & Zhao, Y. (2007). Innovation in development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6, 1–15.

Liu, X., Ng, C., & Ferenci, T. (2000). Global adaptations resulting from high population densities in *Escherichia coli* cultures. *Journal of Bacteriology*, 182, 4158 - 4164

Lober, B. (1997). Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 24, 1-11.

Lobos, O., Padilla, A., & Padilla, C. (2009). In vitro antimicrobial effect of bacteriocin PsVP-10 in combination with chlorhexidine and triclosan against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* strains. *Archives of Oral Biology*, 54, 230-234.

Loir Le, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research*, 2, 63–76.

López Aguayo, M. C., Grande Burgos, M. J., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R. (2016). Effect of different activated coatings containing enterocin AS-48 against *Listeria monocytogenes* on apple cubes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 35, 177-183.

López-Malo, A., Alzamora, S.M., & Guerrero, S. (2000). Natural antimicrobials from plants. *Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamental Aspects and Applications*. New York. pp 201-215.

Lourdin, D., Coignard, L., Bizot, H., & Colonna, P. (1997). Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. *Polymers*, 38, 5401–5406.

Lungu, B., & Johnson, M.G. (2005). Fate of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of model Turkey frankfurter pieces treated with zein coatings containing nisin, sodium diacetate, and sodium lactate at 4 °C. *Journal of Food Protection*, 68, 855–859.

Ma, Y., Zhou, T., & Zhao, C. (2008). Preparation of chitosan-nylon-6 blended membranes containing silver ions as antibacterial materials. *Carbohydrate Research*, 343, 230–237.

Maftoonazad, N., & Ramaswamy, H.S. (2005). Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 617–624.

Magnusson, J., & Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1-5.

Maillard, J.Y. (2007). Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *Journal Hospital Infection*, 65, 60–72.

Maisnier-Patin, S., Forni, E., & Richard, J. (1996). Purification, partial characterisation and mode of action of enterococin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 255-270.

Majak W, & Clark L.J. (1980). Metabolism of aliphatic nitrocompounds in bovine rumen fluid. *Canadian Journal of Animal Science*, 60, 319–325.

Manijeh, M., Mohammad, J., & Kermanshahi-Roha, K. (2008). Biofilm formation by *Salmonella enteritidis* on food contact surfaces. *Journal of Biological Sciences*, 8, 502–505.

Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (1998). Widespread production of AS-48-like bacteriocins in strains of *Enterococcus faecalis*? *Molecular Microbiology*, 29, 1318–1319.

Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Sanchez-Barrena, M.J., González, C., & Albert, A. (2004). Peptide AS-48: Prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Current Protein and Peptide Science*, 5, 399–416.

Martínez Viedma, P., Sobrino, A., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas López, R., & Valdivia, E. (2008). Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against *Salmonella enterica* in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 244-249.

Martínez-Viedma, P., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., & Gálvez, A. (2009). Antistaphylococcal effect of enterocin AS-48 in bakery ingredients of vegetable origin, alone and in combination with selected antimicrobials. *Journal of Food Science*, 74, 384–389.

Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Maqueda, M., & Valdivia, E. (1990a). Genetic stability of the antagonistic character of *Enterococcus faecalis* ssp. *liquefaciens* and the detection of a new inhibitory bacteriocin-like substance. *Folia Microbiologica* 35, 113-123.

Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Samyn, B., Van Beeumen, J., Coyette, J., & Valdivia, E. (1994). Determination of the gene sequence and molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *Journal of Bacteriology* 176, 6334-6339.

Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Gálvez, A., Coyette, J., & Maqueda, M. (1998). Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology* 27, 347-358.

Martínez-Viedma, P., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2009). Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* in canned foods and drinks by addition of enterocin AS-48. *Food Microbiology*, 26, 289–293.

Martínez-Viedma, P., Ercolini, D., Ferrocino, I., Abriouel, H., Ben-Omar, N., Lucas-López, R., & Gálvez, A. (2010). Effect of polythene film activated with enterocin EJ97 in combination with EDTA against *Bacillus coagulans*. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 514–518.

Marquez, G.R.P., Mariniello, L., Esposito, M., Giosafatto, C.V.L., & Porta, R. (2017). Fresh-cut fruit and vegetable coatings by transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin edible films *LWT - Food Science and Technology*, 75, 124–130.

Mastromatteo, M., Lucera, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M.R. (2010). Synergic antimicrobial activity of lysozyme, nisin, and EDTA against *Listeria monocytogenes* in ostrich meat patties. *Journal of Food Science*, 75(7), 422–429.

McAuliffe, O., Ross, R.P. & Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3):285-308.

McCollum, J.T., Cronquist, A.B., Silk, B.J., Jackson, K.A., O'Connor, K.A., & Cosgrove, S. (2013). Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *New England Journal of Medicine*, 369(10), 944–953.

McHugh, T. H., & Senesi, E. (2000). Apple wraps: A novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. *Journal Food Science*, 65, 480–485.

McMurry, L.M., Oethinger, M., & Levy, S.B. (1998). Over expression of *marA*, *SoxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 166, 305-309.

McQuiston, J.R., Herrera-Leon, S., Wertheim, B.C., Doyle, J., Fields, P.I., Tauxe, R.V., & Logsdon, J.M. (2008). Molecular phylogeny of the salmonellae: relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *Journal Bacteriology*, 190, 7060–7067.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., & Shapiro, C. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607–625.

Meheriuk, M., & Lau, D.L. (1988). Effect of two polymeric coatings on fruit quality of ‘Bartlett’ and ‘Anjou’ pears. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113, 222–226.

Mei, Y., Zhao, Y., Yang, J. & Furr, H. (2002). Using edible coating to enhance nutritional and sensory qualities of baby carrots . *Sensory and Nutritive Qualities of Food*, 67, 1964-1968.

Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., & Gibbs, P.A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21, 213–216.

Mendoza, F., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (1999). Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 618-625.

Min, S.C., Kang, B.R., Han, S. H., Anderson, A.J., Park, J.Y., Lee, Y.H., Cho, B.H., Yang, K.Y., Ryu, C.M., & Kim, Y.C. (2008). 2R,3R-Butanediol, a Bacterial Volatile Produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, Is Involved in Induction of Systemic Tolerance to Drought in *Arabidopsis thaliana* Molecular Plant Microbe Interaction, 21, 1067-1075

Minei, C.C., Gomes, B.C., Ratti, R.P., D'Angelis, C.E.M., & De Martinis, E.C. P. (2008). Influence of peroxyacetic acid and nisin and coculture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Journal of Food Protection, 71, 634-638.

Montalbán-López, M., Spolaore, B., Pinato, O., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., & Fontana, A. (2008). Characterization of linear forms of the circular enterocin AS-48 obtained by limited proteolysis. FEBS Letters, 582, 3237–3242.

Montalbán-López, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., & Maqueda, M. (2011). Expression of linear permuted variants from circular enterocin AS-48. Biochimie, 93, 549–555.

Montalbán-López, M., Sánchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martínez Bueno, M. & Maqueda, M. (2011). Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. Current Pharmaceutical Biotechnology, 12(8):1205-1220.

Moreira, M., Pereda, M., Marcovich, N., & Roura, S. (2011). Antimicrobial effectiveness of bioactive packaging materials from edible chitosan and casein polymers: assessment on carrot, cheese, and salami. Journal of Food Science, 76, 54-63.

Moretro, T., Midtgaard, E.S., Nesse, L.L., & Langsrud, S. (2003). Susceptibility of *Salmonella* isolated from fish feed factories to disinfectants and air-drying at surfaces. Veterinary Microbiology, 94, 207-217.

Moretro, T., Heir, E., Nesse, L.L., Vestby, L.K., & Langsrud, S. (2012). Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. Food Research International, 45, 532–544.

Moretro, T., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Storheim, S.E., Kotlarz, K., & Langsrud, S. (2009). Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. Journal of Applied Microbiology, 106, 1005-1012.

Morton, L.H.G., Greenway, D.L.A., Gaylarde, C.C., & Surman, S.B. (1998). Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 247-259.

Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., & Valdivia, E. (2004). Biocontrol of psychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a non fat hard type cheese by an enterococcal strain-producing enterocin AS- 48. *Journal of Food Protection*, 67, 1517-1521.

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, 760–769.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S. & Pfaller, M.A. (2003). *Microbiología médica*.

Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Baah, J., Teather, R., & Drider, D. (2011). Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 162, 99e107.

Naidu, A.S., Unal, R., & Tulpinski, J. (2006). Bacteriocins: antimicrobial activity and applications. *Food Biotechnology*, 1391-1437.

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.

Neetoo, H., Ye, M., & Chen, H. (2010). Bioactive alginate coatings to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon slices and fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 326–331.

Neetoo, H., Nekoozadeh, S., Jiang, Z., & Chen, H. (2011). Application of high hydrostatic pressure to decontaminate green onions from *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 28, 1275-1283.

Nguyen-the, C., & Carlin, F., (2000). Fresh and processed vegetables. *The Microbiological Safety and Quality of Food*.

NicAogáin, K., & O'Byrne, C.P. (2016). The Role of Stress and Stress Adaptations in Determining the Fate of the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* in the Food Chain. *Front Microbiology*, 7, 1865

Nichols, G.L., Little, C.L., Mithani, V., & de Louvois, J. (1999). The microbiological quality of cooked rice from restaurants and take-away premises in the United Kingdom. *Journal of Food Protection* 62, 877-882.

Nisperos-Carriedo, M. O., Baldwin, E.A., & Shaw, P.E. (1992b). Development of an edible coating for extending postharvest life of selected fruits and vegetables. *Proceedings of the annual meeting of the Florida State Horticultural Society*, 104, 122–125.

Nocker, A., Cheung, C.Y., & Camper, A.K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 310–320.

Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M., & Camper, A.K. (2007). Use propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5111–5117.

Nychas, G.J.E. (1995). *Natural Antimicrobials from plants. New Methods of food preservation* . Springer.

Nykanen, A., Weckman, K., & Lapvetelainen, A. (2000). Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 63–72.

Olivas, G.I., & Barbosa-Cánovas, G.V. (2005). Edible coatings for fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*, 45, 657–670.

Onawunmi, G.O. (1989). Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*, 9, 105–108.

Oppergård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G. & Nissen-Meyer, J. (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13,(4), 210-219.

Orsi, R.H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology Biotechnology*, 100, 5273-5287.

Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R., & Gálvez, A. (2010). Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. *Toxins*, 2, 2117–2131

Pao, S., Brown, G.E., & Schneider, K.R. (1998). Challenge studies with selected pathogenic bacteria on freshly peeled Hamlin orange. *Journal of Food Science*, 63, 359–362.

Parente, E., Giglio, M. A., Ricciardi, A., & Clementi, F. (1998). The combined effect of nisin, leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1–2), 65–75.

Parish, M.E., Narcisco, J.A., & Friedrich, L.M. (1997). Survival of *Salmonella* in orange juice. *Journal of Food Safety*, 61, 280–284.

Park, H.J., Chinnan, M.S., & Shewfelt, R.L. (1994). Edible corn-zein film coatings to extend storage life of tomatoes. *Journal. Food Process Preservation*, 18:317–331.

Park, E.J., Oh, S.W., & Kang, D.H. (2008). Fate of *Salmonella tennessee* in peanut butter at 4 and 22°C. *Journal of Food Protection*, 73, M82–M86.

Pascall, M.A., & Lin, S.J. (2013). The Application of Edible Polymeric Films and Coatings in the Food Industry. *Journal of Food Processing & Technology*, 4, e116.

Patel, J., & Sharma, M. (2010). Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 41e47.

Pei, H.N., Chen, X.G., Li, Y., & Zhou, H.Y. (2008). Characterization and ornidazole release in vitro of a novel composite film prepared with chitosan/poly(vinyl alcohol)/alginate. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85, 566–572.

Penteado, A.L., & Leitao, M.F.F. (2004). Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 89–94.

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, 19–24.

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.

Petrone, P.V. (2006). La principal causa del deterioro de los alimentos es el ataque de los diferentes tipos de microorganismos.

Pires, S.M., De Knecht, L., & Hald, T. (2011). SCIENTIFIC / TECHNICAL REPORT submitted to EFSA: Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union. Denmark: DTU Food. National Food Institute.

Pizato, S., Cortez-Vega, W. R., de Souza, J.T.A., Prentice-Hernández, C., & Borges, C.D. (2013). Effects of different edible coatings in physical, chemical and microbiological characteristics of minimally processed peaches (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Food Safety*, 33, 30–39.

Porrero, M., García, M., Cubillo, I., Rivero, E., Herrera, L., Mariano, E., & Moreno, M.A. (2006). Salmonelosis. *Salmonelosis y Huevos*, 28- 32

Pothakamury, U.R., Barbosa-Cánovas, G., & Swanson, B.G. (1995). The pressure builds for better food processing. *Chemical Engineering Progress*, 45-53.

Prats, G., & Coll, P. (1998). Géneros *Shigella*, *Salmonella* y *Yersinia*. *Microbiología Médica*, 246- 249.

Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K.M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal Applied Microbiology*, 90, 494-507.

Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2005). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339, 2693–2700.

Qi, H., Hu, W., Jiang, A., Tian, M., & Li, Y. (2011). Extending shelf-life of fresh-cut ‘Fuji’ apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12, 62–66.

Raibaudi (2006). *Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas*. Universidad de Lleida.

Ramos, O., Fernandes, J.C., Silva, S., Pintado, M.E., & Malcata, F. (2012). Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 533-552.

Razavi-Rohani, S.M., & Griffiths, M.W. (1994). The effect of mono and polyglycerol laurate on spoilage and pathogenic bacteria associated with foods. *Journal of Food Safety*, 14, 131–151.

Real decreto 1054/2002, de 11 de octubre, que regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas.

Realini, C.E., & Marcos, B. (2014). Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, 98, 404–419.

Reidmiller, J.S., Smith, W.L., Sawyer, M.M., Osburn, B.I., Stott, J.L., & Cullor, J.S. (2006). Antimicrobial properties of the chelating agent EDTA on streptococcal bovinemastitis isolates. *Journal of Food Protection*, 69(6), 1460–1462.

Riley, M.A., & Wertz, J.E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Review of Microbiology*, 56, 117-137.

Rocourt, J., & Cossart, P. (1997). *Listeria monocytogenes*. *Food microbiology*, 337-352.

Rodrigues, D., Cerca, N., Teixeira, P., Oliveira, R., Ceri, H., & Azeredo, J. (2011). *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* enteritidis biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. *Microbial Drug Resistance*, 17, 181–189.

Rodrigues-Freitas, I., Cortez-Vega, W. R., Pizato, S., Prentice-Hernández, C., & Borges, C.D. (2013). Xanthan gum as a carrier of preservative agents and calcium chloride applied on fresh-cut apple. *Journal of Food Safety*, 33, 229–238.

Rojas-Grau, M.A. (2007). Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples. *Food Hydrocolloids*, 21, 118 – 127.

Rojas-Grau, M.A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009a). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 438 – 447.

Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Di Venere, D. & Salerno, M. (2002). Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Food Microbiology and Safety*, 67, 1862-1867.

Ross, R.P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3–16.

Russell, AD. (2003). Biocide usage and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations, *Lancet Infection Disease*, 3, 794-803.

Russell, AD. (2004). Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *Journal Hospital Infection*, 57, 97-104.

Samyn, B., Martínez-Bueno, M., Devreese, B., Maqueda M., Gálvez, A., Valdivia, E., Coyette, J., & van Beeumen, J. (1994). The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Letters*, 352, 87–90.

Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B., Santos-López, E., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, E. & Regalado, C. (2014). Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 1-18.

Sanpui, P., Murugadoss, A., Prasad, P.V., Ghosh, S.S., & Chattopadhyay, A. (2008). The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 142–146.

Savadogo, A., Ouattara, A.T., Bassole, H.N., & Traore, S.A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5 (9), 678-683.

Sayanjali, S., Ghanbarzadeh, B., & Ghiassifar, S. (2011). Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. *Food Science and Technology Research*, 44, 1133–1138.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M., & Roy, S. L. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7–15.

Scannell, A.G., Ross, R.P., Hill, C., & Arendt, E.K. (2000). An effective lacticin biopreservative in fresh pork sausage. *Journal of Food Protection*, 63, 370–375.

Schweizer, H.P. (2001). Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 202, 1-7.

Shelef, L., & Seiter, J. (1993). Indirect antimicrobials. In P. M. Davidson, & A. L. Braner (Eds.), *Antimicrobials in foods* (pp. 544–555). New York: Marcel Dekker.

Simões, M., Simões, L.C., & Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT e Food Science and Technology*, 43, 573-583.

Simon, J.E., & Quinn, J. (1988). Characterization of essential oil of parsley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 467–472.

Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Pati, S., & Del Nobile, M.A. (2008). Use of active compounds for prolonging the shelf life of mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 18, 624–630.

Smith, S., Geeson, J., & Stow, J. (1987). Production of modified atmospheres in deciduous fruits by the use of films and coatings. *Hortic Science*, 22, 772–776.

Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., & Klaenhammer, T.R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3613–3615.

Stoyanova, L.G., Ustyugova, E.A. & Netrusov, A.I. (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3), 229-243.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš, A., Habjanič, K. & Matošić, S. (2010). Antimicrobial activity - the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48 (3), 296-307.

Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K.R., & Chikindas, M. L. (2007). Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 267, 200-206.

Talan, D.A., Krishnadasan, A., Gorwitz, R.J., Fosheim, G.E., Limbago, B., Albrecht, V., & Moran, G.J. (2011). Comparison of *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in US emergency department patients, 2004 and 2008. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 53

Tamaoka, T. Itoh, N., & Hayashi, R. (1991). High pressure effect on Maillard reaction. *Agricultural Biological Chemistry*, 55, 2071- 2074.

Tamarapu S, McKillip JL, & Drake, M. (2001). Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *Journal of Food Protection*, 64, 664–668.

Tapia, M., Rojas-Graü, M., Rodríguez, F., Ramírez, J., Carmona, A. & Martin-Belloso, O. (2007). Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *Food Engineering and Physical Properties*, 72, 190-196.

Thomas, L.V., & Clarkson, M.R., Delves-Broughton, J. (2000). Nisin. *Natural food antimicrobial systems*, 463-524.

Tirado, C., & Schmidt, K. (2001). WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. *Journal of Infection*, 43, 80– 84.

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.

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.

Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., & Ike, Y. (1997). Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *Journal of Bacteriology* 179, 7843-7855.

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.

Ueda, S., & Kuwabara, Y. (2007). Susceptibility of biofilm *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis* and *Staphylococcus aureus* to detergents and sanitizers. *Biocontrol Science*, 12, 149e153.

Ukuku, D.O., & Fett, W. (2002). Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated on cantaloupe surfaces and efficacy of washing treatments to reduce transfer from rind to fresh-cut pieces. *Journal of Food Protection*, 65, 924–930.

Ukuku, D.O., Bari, M.L., Kawamoto, S., & Isshiki, K. (2005). Use of hydrogen peroxide in combination with nisin, sodium lactate and citric acid for reducing transfer of bacterial pathogens from whole melon surfaces to fresh-cut pieces. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 225–233.

Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 56, 395–411.

Valdés, A., Burgos, N., Jiménez, A., & Garrigós, M.C. (2015). Natural pectin polysaccharides as edible coatings. *Coatings*, 5, 865–886.

Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L., del Río, M.A., & Pérez-Gago, M.B. (2011). Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 872–900.

Valeriano, C., Oliveira, T.L.C., Carvalho, S.M., Cardoso, M.G., Alves, E., & Piccoli, R.H. (2012). The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control*, 25, 673-677.

Vargas, M., Albors, A. & Chiralt, A. (2011). Application of chitosan- sunflower oil edible films to pork meat hamburgers. *Procedia Food Science*, 1, 39-43.

Velázquez, G., Vázquez, P., Vázquez, M., & Torres, J.A. (2005). Aplicaciones del procesamiento de alimentos por alta presión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4, 343-352.

Velkov, T., Thompson, P.E., Nation, R.L., & Jian, L. (2010). Structure—Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *Journal Medicinal Chemistry*, 53, 1898-1916.

Vestby, L.K., Moretro, T., Langsrud, S., Heir, E., & Nesse, L.L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 27, 5e20.

Vestby, L.K., Moretro, T., Langsrud, S., Heir, E., & Nesse, L.L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 27, 5-20.

Wadamori, Y., Gooneratne, R., & Hussain, M.A. (2017). Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. *Journal Science Food Agriculture*, 97, 1396-1403.

Wang, X.Y., & Heuzey, M.C. (2016). Chitosan-based conventional and pickering emulsions with long-term stability. *Langmuir*, 32(4), 929-936.

Walti Chanes, J., & Bermúdez Aguirre, D. (1997). Nuevas tendencias en el procesamiento de alimentos. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas Puebla Santa Catarina Mártir, Cholula, Puebla. México

Wieneke, A.A. (1991). Comparison of four kits for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. *International Journal Food Microbiology*, 14, 305-312.

Winkelströter, L.K., Gomes, B.C., Thomaz, M.R.S., Souza, V.M., & De Martinis, E.C.P. (2011). *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, 22, 1404-1407.

Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., & Spellberg, B. (2017). Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), 409-447.

Wong, H.S., Townsend, K.M., Fenwick, S.G., Maker, G., Trengove, R.D., & O'Handley, R.M. (2010). Comparative susceptibility of *Salmonella Typhimurium* biofilms of different ages to disinfectants. *Biofouling*, 26, 859-864.

Yaldagard, M., Mortazavi, S.Y., & Tabatabaie, F. (2008). The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: a review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, 7, 2739-2767.

Yamazaki, K., Yamamoto, T., Kawai, Y., & Inoue, N., (2004). Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiology* 21, 283-289

Ye, M., Neetoo, H., & Chen, H. (2008). Effectiveness of chitosan-coated plastic films incorporating antimicrobials in inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 31(3), 235–240.

Zhang , H., Liu, L., Hao, Y., Zhong, S., Liu, H., Han, T., & Xie, Y. (2013a). Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product. *Microbiology and Immunology*, 57(11), 746-755.

Zhang, H., Chen, F., Wang, X., & Yao, H.-Y. (2006). Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Research International*, 39(8), 833–839.

Zhang, S., & Mustapha, A. (1999). Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. *Journal of Food Protection*, 62, 1123–1127.

Zhang, T., Pan, Y., Zhang, J., Chen, Y., & Chen, L. (2013b). Molecular cloning and antimicrobial activity of enterolysin A and helveticin J of bacteriolysins from metagenome of Chinese traditional fermented foods. *Food Control*, 31(2): 499-507.

Zhao, T., Doyle, M. P., & Zhao, P. (2004). Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3996e4003.

Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I. & Hamida, J.B. (2010). A new structure based classification of gram-positive bacteriocins. *Protein Journal*, 29(6):432-439.