



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE DOCTORADO**

TESIS DOCTORAL



**Efecto de recubrimientos activos y
tratamientos con altas presiones en la
biodiversidad bacteriana de dos
alimentos modelo**

**PRESENTADA POR:
IRENE ORTEGA BLÁZQUEZ**

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

JAÉN, Junio de 2018

ISBN

Efecto de recubrimientos activos y tratamientos con altas presiones en la biodiversidad bacteriana de dos alimentos modelo

Memoria para optar al grado de Doctor
Jaén, Junio de 2018

Fdo.: Irene Ortega Blázquez
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^a. Rosario Lucas López, D^a. María José Grande Burgos y D. Antonio Gálvez del Postigo Ruiz**, pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

HACEN CONSTAR: Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: **“Efecto de recubrimientos activos y tratamientos con altas presiones en la biodiversidad bacteriana de dos alimentos modelo”** presentado por **D^{ña}. Irene Ortega Blázquez** ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al Grado de Doctor.

Jaén, Junio de 2018

Fdo.: Rosario Lucas López

Fdo.: María José Grande Burgos

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto P08-AGR-4295 (Junta de Andalucía), el Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (Grupo AGR230), y el Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3).

I.- RESUMEN	3
II.- INTRODUCCIÓN	7
II.1.- La seguridad de los alimentos desde el punto de vista microbiológico	9
II.2.- Envases activos	12
II.2.1.- Aceites esenciales.....	18
II.2.1.1.- Timol.....	22
II.2.2.- Bacteriocinas: La enterocina AS-48.....	24
II.3.- Alta presión hidrostática	30
II.4.- Biodiversidad microbiana: secuenciación masiva	31
II.4.1.-Aplicaciones de la secuenciación masiva.....	34
II.4.2.-Ventajas y desventajas de la secuenciación masiva.....	37
III.- OBJETIVOS	39
IV.- TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	43
IV.1.- Inhibition of biofilm formation on plastic materials by activation with combinations of natural antimicrobials.....	47
IV.2.- Inactivation of <i>Listeria</i> in foods packed in films activated with enterocin AS-48 plus thymol singly or in combination with high-hydrostatic pressure treatment	73
IV.3.- Treatment with high-hydrostatic pressure, activated film packaging with thymol plus enterocin AS-48 and its combination modify the bacterial communities of refrigerated sea bream (<i>Sparus aurata</i>) fillets.....	83

IV.4.- Bacterial diversity of refrigerated fruit puree as affected by treatments with high hydrostatic pressure and activated film packaging.....	95
V.- DISCUSIÓN GENERAL	119
VI.- CONCLUSIONES	135
VII.- REFERENCIAS	139

RESUMEN

Los alimentos se deterioran con el tiempo, principalmente por la acción de organismos vivos (mohos, bacterias, insectos, roedores, etc.), la acción físico-química del entorno (temperatura, humedad relativa, oxígeno, radiaciones, etc.) y la actividad biológica del propio alimento. Las medidas tecnológicas necesarias para evitar o minimizar los efectos adversos de los factores citados han dado lugar a nuevas técnicas de conservación de alimentos. Todas ellas incluyen un amplio conjunto de procedimientos de muy distinta naturaleza y complejidad, entre las que se incluye el envasado con plásticos activados con antimicrobianos o la aplicación de alta presión hidrostática.

Uno de los objetivos de este trabajo era determinar la eficacia de sustancias antimicrobianas presentes en aceites esenciales (carvacrol, timol, eugenol, cinamaldehído y tirosol) y la bacteriocina enterocina AS-48, solos o combinados, en la inhibición de la formación de biopelículas bacterianas, empleando para ello dos tipos de películas de plástico: polietileno de baja densidad, y polietileno-poliámida. En un ensayo preliminar, los mejores resultados se obtuvieron para carvacrol y timol. Se comprobó también que la actividad antimicrobiana incrementaba considerablemente cuando los plásticos eran activados con carvacrol o timol en combinación con enterocina AS-48. Los films de polietileno de baja densidad y de polietileno-poliámida activados con enterocina AS-48 en combinación con carvacrol o timol fueron ensayados para determinar la inhibición de la formación de biopelículas. El film plástico de polietileno-poliámida para envasado al vacío activado con una mezcla de enterocina AS-48 y timol fue el más eficaz tanto en la inactivación de células planctónicas como en la inhibición de la formación de biopelículas en los ensayos realizados con *Listeria innocua*, *Lactobacillus fructivorans*, *Bacillus coagulans* y *Bacillus licheniformis*. Como resultado de este estudio cabe destacar el potencial de los plásticos de polietileno-poliámida activados con una mezcla de timol y enterocina AS-48 en la inhibición de la formación de biofilms por *Listeria* y por bacterias alterantes Gram-positivas.

Una vez comprobada la efectividad de los plásticos activados con antimicrobianos naturales frente a diferentes microorganismos, el segundo paso fue estudiar la eficacia de envases plásticos activados con la enterocina AS-48 más timol por separado, o combinados con alta presión hidrostática (APH) sobre la inactivación de *Listeria innocua* eligiendo como sistemas alimentarios modelo filetes de dorada y en puré de fruta almacenados bajo refrigeración durante 10 días. En las muestras de

pescado control, se detectó la presencia de *L. innocua* en los filetes durante todo el almacenamiento. En las muestras de filete de pescado envasadas con plásticos activados se observó una reducción en los recuentos de *Listeria* de 1,76 ciclos logarítmicos durante la primera mitad del almacenamiento. La aplicación del tratamiento con APH en los filetes envasados con plásticos sin antimicrobianos, redujo los recuentos de *Listeria* en 1,83 ciclos logarítmicos, pero no impidió el crecimiento de los sobrevivientes durante el almacenamiento. El tratamiento combinado con plástico activado y APH, redujo los recuentos viables en 1,88 ciclos logarítmicos y retrasó el crecimiento durante todo el período de almacenamiento. *L. innocua* sobrevivió también en el puré de frutas durante todo el almacenamiento. El envasado del puré de frutas con plástico activado redujo los recuentos de *Listeria* en 1,80 y 2,0 ciclos de registro en los días 0 y 3. Después de ese punto, *Listeria* se mantuvo por debajo de los límites de detección. No se detectaron listerias viables en los purés después de la aplicación del tratamiento con APH individualmente, o en combinación con los plásticos activados. Los resultados del estudio nos indicaron que la eficacia de los plásticos activados frente a *Listeria* está influenciada por el tipo de alimento.

Otro punto interesante era determinar el impacto de las películas de plástico activadas con timol y enterocina AS-48 y el tratamiento de alta presión hidrostática, sobre la carga bacteriana y la diversidad bacteriana de los sistemas alimentarios elegidos como modelo experimental. En primero estudio se determinó el efecto de los tratamientos en filetes de dorada envasados al vacío y almacenados en refrigeración durante 10 días. El envase activado y el tratamiento por APH redujeron los recuentos viables de mesófilos aeróbicos en 1.46 y 2.36 ciclos logarítmicos, respectivamente, mientras que el tratamiento combinado logró una reducción de 4.13 ciclos logarítmicos. Los tratamientos con alta presión hidrostática y los tratamientos combinados retrasaron el crecimiento bacteriano. El grupo predominante en los filetes de dorada fue *Proteobacteria*. La abundancia relativa de *Firmicutes* aumentó al final del almacenamiento tanto en las muestras control como en las muestras tratadas por APH individualmente o en combinación con los plásticos activados. Las unidades taxonómicas operativas (OTUs) predominantes a tiempo 0 en las muestras de control (*Listeria*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Chryseobacterium*) cambiaron rápidamente durante el almacenamiento, con un aumento en la abundancia relativa de *Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella* junto con *Cloacibacterium* y

Lactobacillales al final del almacenamiento. La película activada y el tratamiento por APH indujeron cambios drásticos en la diversidad bacteriana inmediatamente después de los tratamientos, apareciendo *Comamonadaceae*, *Methylobacterium*, *Acidovorax* y *Sphingomonas* como principales OTUs, y también indujeron modificaciones adicionales durante el almacenamiento. La diversidad bacteriana en las muestras envasadas con los plásticos activados fue bastante homogénea durante el almacenamiento, detectándose *Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella* como principales OTUs, asemejándose a las muestras de control. Los tratamientos por APH (individualmente o combinados con películas activadas) dieron como resultado una abundancia relativa alta de *Acinetobacter* seguido de *Pseudomonas* y *Shewanella* al comienzo del almacenamiento, así como una mayor abundancia relativa de bacterias ácido lácticas al final del almacenamiento. Estos resultados sugieren que la dinámica compleja de las poblaciones bacterianas en los filetes de dorada refrigerados está influenciada por el tratamiento con APH y los antimicrobianos aplicados.

Una vez comprobado el efecto de los tratamientos aplicados en las muestras de pescado, el objetivo del siguiente estudio, fue determinar el efecto de los tratamientos compuestos por APH y películas activadas con una combinación de enterocina AS-48 y timol en la carga microbiana y la diversidad bacteriana de un puré de fruta elaborado a partir de plátano, manzana y pera. Se aplicaron tratamientos con APH y envasado en películas activadas solos o combinados y las muestras se almacenaron en frío durante 10 días después de los tratamientos. Solo el tratamiento por APH fue efectivo a la hora de provocar una reducción significativa de los recuentos viables ($P < 0.05$) tras su aplicación así como durante el almacenamiento, en comparación con los controles no tratados. La comunidad bacteriana del puré se determinó mediante secuenciación masiva utilizando la tecnología Illumina, y estaba compuesta principalmente OTUs asignadas a fam. *Comamonadaceae* (23.17%) y a los géneros *Methylobacterium* (21.46%), *Acidovorax* (8.70%) y *Sphingomonas* (6.63%). Al final del almacenamiento se detectó un incremento en la abundancia relativa de *Pseudomonas*, alcanzando el 10.50%. La mayoría de las muestras envasadas con plásticos activados tenían mayores abundancias relativas de los cuatro grupos bacterianos principales indicados anteriormente y una menor abundancia relativa de *Pseudomonas*. La aplicación del tratamiento con APH redujo notablemente las abundancias relativas de

Comamonadaceae, *Methylobacterium*, *Acidovorax* y *Sphingomonas*. Tras la aplicación del tratamiento con APH aumentó la presencia de *Lactobacillales*, pero no durante el almacenamiento, mientras que la abundancia relativa de *Pseudomonas* aumentó hacia el final del almacenamiento. El tratamiento combinado con APH y envasado en plástico activado logró la mayor reducción en las abundancias relativas de *Comamonadaceae* y *Methylobacterium*. Los resultados indicaron que el tratamiento con APH en combinación con plásticos activados fue el que tuvo mayores efectos sobre la diversidad bacteriana del puré de fruta.

INTRODUCCIÓN

II.1.- La seguridad de los alimentos desde el punto de vista microbiológico

Las enfermedades transmitidas por alimentos, ocasionadas normalmente por microorganismos patógenos, constituyen un gran problema de salud pública en todo el mundo. Además de ser una causa importante de morbilidad, suponen una carga económica importante para las naciones, perjuicios para los consumidores y un gran impacto para las empresas de productos alimenticios (Wallace et al., 2000; Rodríguez-Lázaro et al., 2006; González and Rojas, 2005; González-Muñoz and Palomino-Camargo, 2012).

Existen más de 250 enfermedades conocidas que se transmiten a través de alimentos. Su incidencia ha aumentado considerablemente durante las últimas décadas por la rápida globalización del mercado de alimentos y por los profundos cambios en los hábitos alimenticios. Además, este problema se acrecienta con la aparición de nuevas formas de transmisión, el aumento de los grupos de población vulnerables, y el aumento de la resistencia a los compuestos antimicrobianos en los microorganismos patógenos (Rodríguez-Lázaro et al., 2006; González and Rojas, 2005).

Se han descrito alrededor de 40 patógenos de origen alimentario capaces de causar enfermedades en humanos (Rodríguez-Lázaro et al., 2006). De todos ellos, más del 90% de los casos confirmados y las muertes causadas por dichos patógenos han sido atribuidos a bacterias (Hakovirta, 2008). Entre las bacterias más comunes podemos encontrar *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus* o *Yersinia enterocolitica* (González and Rojas, 2005; EFSA-ECDC, 2017). Sin embargo hay que tener en cuenta, que aproximadamente el 98% de los microorganismos que encontramos en los alimentos no son patógenos (Prasad and Sharan, 2009). Por esta razón, sería necesario desarrollar pruebas de diagnóstico que puedan identificar específicamente al microorganismo de interés (Prasad and Sharan, 2009). No obstante, cada vez resulta más evidente que, para comprender el desarrollo y la supervivencia de los patógenos en alimentos, es también necesario conocer el resto de la microbiota presente.

El pescado fresco es una fuente de proteína cada vez más necesaria y que se utiliza para la preparación de diferentes platos, pero al mismo tiempo es altamente perecedero. La principal causa del deterioro del pescado fresco es la actividad metabólica de los microorganismos, que provocan la degradación de las moléculas orgánicas y del tejido, la pérdida de ácidos grasos esenciales, las vitaminas liposolubles y la funcionalidad proteica, la producción de aminas biógenas y la formación de olores desagradables (Gram and Dalgaard, 2002). El pescado fresco puede contener diferentes tipos de bacterias patógenas o productoras de toxinas, principalmente de las pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, así como otras bacterias (McCoy et al., 2011). Entre los microorganismos alterantes del pescado fresco destacan *Shewanella putrefaciens* (Jorgensen et al., 1988), *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas* spp., *Achromobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium* spp. y *Aeromonas* spp. (Dalgaard, 1995, 1993). Algunos autores han descrito que el pescado sin ningún tipo de conserva es deteriorado principalmente por bacterias Gram-negativas fermentadoras (como, por ejemplo, *Vibrionaceae*), mientras que en el deterioro del pescado refrigerado intervienen principalmente bacterias Gram-negativas psicrotolerantes (como *Pseudomonas* spp. y *Shewanella* spp.) (Gram and Huss, 2000; Gram and Dalgaard, 2002). El deterioro del pescado depende también de la atmósfera de envasado. El envasado en atmósfera de CO₂ inhibe a los microorganismos con metabolismo respiratorio, y favorece el desarrollo de *Photobacterium phosphoreum* y bacterias lácticas (Dalgaard, 2000; Gram and Dalgaard, 2002). El envasado al vacío, junto con la refrigeración, la adición de bajas concentraciones de sal y una ligera acidificación inhibe a las bacterias Gram-negativas aerobias (Gram and Dalgaard, 2002). En estas condiciones, la microbiota predominante consiste en bacterias lácticas (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*) junto con bacterias Gram-negativas fermentativas como *P. phosphoreum* y *Enterobacteriaceae* psicrotrofas (Truelstrup et al., 1995; Jorgensen et al., 2000; Leroi et al., 1998).

Los alimentos de origen vegetal pueden ser portadores de microorganismos patógenos (Lund, 2014). Los jugos de fruta fresca y los purés de fruta son un tipo de alimento cada vez más demandado, ya que son ricos en sabor y aportan vitaminas, fibra, y fitonutrientes. Este tipo de productos pueden contener una gran variedad de bacterias alterantes y de microorganismos patógenos para los humanos. Se ha demostrado que los

jugos de fruta pueden transmitir patógenos como *Escherichia coli* entero hemorrágica O157:H7, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y *Cryptosporidium* (Aneja et al., 2014; Berger et al., 2010; Tribst et al., 2009; Yeni et al., 2016). Además de los patógenos, se han detectado bacterias alterantes como *Alicyclobacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Propionibacterium cyclohexanicum*, *Pseudomonas* spp. y bacterias del ácido láctico en frutas cortadas y en zumos de fruta (Carlin 2013; Tribst et al., 2009; Sospedra et al., 2012). Últimamente, con el fin de garantizar la conservación y seguridad de los alimentos y de satisfacer las preferencias de los consumidores de frutas y purés tanto en sabor, frescura y altas cualidades nutricionales y sensoriales, ha aumentado la demanda de métodos alternativos de conservación no térmica (Mittal and Griffiths, 2005).

Uno de los patógenos que despierta mayor preocupación en los alimentos es *Listeria monocytogenes*, ya que si bien su incidencia en los productos para consumo es baja, la mortalidad es muy elevada (EFSA-ECDC, 2017). *L. monocytogenes* es una bacteria Gram-positiva psicrotrofa transmitida por los alimentos, que se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente, como en las plantas, el suelo, los animales, el agua, la suciedad, el polvo y el suelo (McLauchlin et al., 2004; Gandhi and Chikindas, 2007). El número de casos de listeriosis confirmados en Europa ha aumentado de forma estadísticamente significativa durante el periodo de 2008-2016, con un 16.6% de casos letales (EFSA, 2017). La listeriosis afectó sobre todo a personas de edad superior a 64 años, y de forma particular a las mayores de 84 años. Los pescados listos para el consumo y otros productos de la pesca presentaron los porcentajes más altos de este microorganismo, seguidos de otros alimentos de origen animal, como las carnes y los productos lácteos (EFSA, 2015). La FDA recomienda cocinar el pescado fresco de forma que alcance una temperatura interna de 63°C (FDA, 2016). No obstante, la elaboración de productos ligeramente procesados o determinadas prácticas culinarias pueden hacer que se alcancen temperaturas más bajas o que el alimento se contamine una vez preparado. Algunos tipos de pescado, como la dorada, se han introducido en los últimos años como principal ingrediente en la elaboración de productos marinos crudos listos para consumo (como sushi, sahimí, nigrini, carpaccio y otros) (Bolívar et al., 2018). La falta de tratamiento térmico en estos productos incrementa el riesgo de transmisión de patógenos como *L. monocytogenes* (Bolívar et al., 2018).

L. monocytogenes también ha sido descrita en verduras, frutas y puré de frutas (EFSA, 2015, 2017). El consumo de frutas y verduras contaminadas con *L. monocytogenes* dio lugar a brotes de listeriosis (Garner and Kathariou, 2016; McCollum et al., 2013). Por todo esto, es de suma importancia reducir los riesgos de transmisión de esta bacteria a través de la cadena alimentaria. Un enfoque para reducir la transmisión de patógenos transmitidos por los alimentos es la aplicación de compuestos de origen biológico como bacteriocinas y fitoquímicos, adicionados al alimento o bien incorporados en los materiales para envasado (Gálvez et al., 2007; Irkin and Esmer, 2015; Malhotra et al., 2015).

La inocuidad de los alimentos es una de las características principales de la seguridad alimentaria, y está relacionada en la mayoría de los casos con las tecnologías de producción agraria, la manipulación y elaboración de alimentos, constituyendo así una importante prioridad política en todo el mundo (Rodríguez-Lázaro et al., 2006; González-Muñoz and Palomino-Camargo, 2012). La adopción de nuevos enfoques en la aplicación de la tecnología de barreras, como la utilización de envases activados con antimicrobianos naturales en combinación con métodos de procesado no térmicos puede ser una alternativa muy interesante para disminuir el riesgo de transmisión de microorganismos patógenos y mejorar la conservación de los alimentos a la vez que disminuir el impacto del tratamiento sobre sus propiedades organolépticas y físico-químicas. Por otra parte, dado que los alimentos son ecosistemas complejos donde se desarrollan diferentes comunidades microbianas, sería muy conveniente conocer la diversidad microbiana de estos para así poder plantear estrategias de control más adecuadas frente a aquellas poblaciones microbianas que pudieran constituir un mayor riesgo.

II.2.-Envases activos

El aumento de los sistemas de transporte, de distribución, las necesidades de almacenamiento, así como la presencia de grandes supermercados y tiendas de almacén, ha hecho que los alimentos no se consuman directamente del campo, de la granja, o de las instalaciones de procesamiento. Durante todas las etapas que van desde la recogida de la materia prima, el manejo, transporte y almacenamiento, los productos comienzan a

deshidratarse, se deterioran, pierden sus características organolépticas y su valor nutritivo.

Los envases empleados para conservar y comercializar alimentos han ido variando a lo largo de los años como respuesta a factores sociales, para evitar pérdidas económicas, debido al aumento del comercio internacional, o la creciente preocupación por la salud y el consumo de alimentos naturales. Existe en la actualidad una amplia gama de envases y embalajes de diferentes materiales y características que sirven para cubrir las demandas específicas de consumo que se comercializan en las sociedades más desarrolladas. Para cada uso es necesario seleccionar el envase adecuado en función de aspectos como: las características del producto, vida útil deseada, forma de transporte, distribución comercial, mercado consumidor, coste, etc...

La introducción de los materiales de origen polimérico (comúnmente conocidos como plásticos) revolucionó el diseño de los envases y las técnicas de envasado. Estos modernos materiales (los primeros plásticos se desarrollaron durante la II guerra mundial) presentan una serie de propiedades atractivas frente a los clásicos vidrio y metal, como son ligereza, flexibilidad, transparencia u opacidad, inercia química, resistencia térmica, versatilidad de formas, bajo costo de materias primas, fabricación y transformación, compatibilidad con las microondas, o termosellado.

El término genérico “plástico” engloba miles de materiales diferentes, que pueden ser transformados de forma similar, por lo que se pueden conseguir mezclas y estructuras multicapas, incluso con otros materiales como papel, cartón o aluminio, aumentando así sus posibilidades de aplicación y permitiendo una total adaptabilidad del envase a los requisitos de un producto específico (Coles et al., 2003). Por otra parte, los plásticos también encuentran aplicación y llegan a formar parte de los envases metálicos y de vidrio; se aplican barnices y lacas para limitar la corrosión de las latas y mejorar su aspecto y para reducir la fragilidad de los envases de vidrio. Además, se utilizan gomas (polímeros elásticos) en los elementos de cierre de estos envases. En la tabla 1 se muestran los principales plásticos utilizados en la fabricación de envases para alimentos.

Tabla 1.- Principales tipos de plásticos utilizados en los alimentos (Coles et al., 2003)

Nombre	Siglas en inglés
Polietileno, baja y alta densidad	PE (LDPE Y HDPE)
Polipropileno	PP
Polietilén tereftalato	PET
Etileno vinil acetato	EVA
Poliamidas	PA
Poliestireno	PS
Etilén vinil alcohol	EVOH
Acetato de polivinilo	PVA
Cloruro de polivinilo	PVC
Estirenos	S

Tradicionalmente, el principal objetivo de los envases para alimentos ha sido contener y proteger al alimento de los daños físicos que pudieran ocurrir durante el transporte y la comercialización de los mismos, es lo denominado como “envase pasivo”. En los últimos años esto ha cambiado y actualmente el envase se utiliza como un sistema alternativo de conservación de los alimentos, no solo como contenedor de los mismos, sino que se busca de él un efecto positivo y beneficioso sobre el alimento. Este tipo de envase se denomina “envase activo”. Este nuevo enfoque ha permitido la incorporación de nuevos materiales y sistemas que pueden ejercer una interacción positiva entre el envase y el alimento (Galotto and Guarda, 2014). Los envases activos se clasifican dependiendo del aditivo que posean, y entre ellos destacan, los que presentan actividad antimicrobiana o antioxidante.

Los envases con actividad antimicrobiana son capaces de inhibir la acción de los microorganismos causantes de contaminación alimentaria, mientras que los antioxidantes retardan y previenen la aparición de radicales libres en el alimento, actuando en las reacciones de oxidación de las moléculas presentes (Bruna et al., 2014a). La incorporación de estos compuestos a los plásticos para envasado va a permitir alargar la vida útil de los productos envasados. Entre ellos, por ejemplo, los aceites esenciales de plantas y algunos de sus componentes aislados, reúnen la doble propiedad de ser antimicrobianos y antioxidantes (Chiralt, 2014).

Los envases antimicrobianos se pueden clasificar en 2 tipos: por un lado están los que contienen agentes antimicrobianos que migran y por lo tanto pueden entrar en contacto con el alimento, y los que son efectivos frente al crecimiento microbiano en la superficie de los alimentos, sin migración de los agentes antimicrobianos hacia estos (Brody et al., 2001). Si lo miramos desde otro punto de vista, los envases con antimicrobianos se dividen en 2 grupos principales: los biodegradables y los no biodegradables. La mayoría de los polímeros sintéticos utilizados son no biodegradables, se pueden utilizar en diferentes productos, ya que tienen la ventaja de ser más económicos, baja densidad, inertes, se pueden cerrar por termosellado, alta fuerza mecánica, transparencia, etc... (Sung et al., 2013).

Debido a la creciente preocupación por prevenir la contaminación de los alimentos con sustancias químicas y microorganismos patógenos, han aumentado las investigaciones en el desarrollo de envases activos. Estos envases, pueden aportar unas condiciones adicionales al alimento diferentes a las que se consiguen al añadir directamente los compuestos antioxidantes y antimicrobianos a estos, además de cumplir su objetivo principal que es proteger los alimentos de agentes externos (Suppakul et al., 2003; Chen et al., 2010; Pereira de Abreu et al., 2012; Bodini et al., 2013). En los últimos años, ha incrementado el uso de materiales biodegradables y con ello la fabricación de biopolímeros de fuentes renovables, que tienen la característica de poder absorber compuestos activos (Muñoz-Bonilla and Fernandez-García, 2012), dando lugar así a una nueva técnica para obtener seguridad y prolongar la vida útil de alimentos listos para su consumo.

Actualmente los sistemas de envasado de alimentos se enfocan en inhibir la contaminación con microorganismos patógenos. Muchos de estos sistemas se conocen como envases activos o “inteligentes”, que se han desarrollado para cumplir con requerimientos específicos de inocuidad. El fin de estos envases activos es asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos durante toda su vida útil, inhibiendo el crecimiento de microorganismos alterantes y de aquellos microorganismos potencialmente peligrosos para la salud. Sin embargo, hay pocos productos en el mercado con películas antimicrobianas debido a la aún poca aceptación por parte del consumidor y a su alto costo (Sung et al., 2013). Otro de los métodos que ha aumentado su uso en los últimos años, es la incorporación de nanomateriales en el envasado de alimentos; uno de los

puntos clave es el envasado activo, en el que las nanopartículas interactúan directamente con los alimentos obteniendo así la protección de estos debido a su acción como agentes antimicrobianos (Carbone et al., 2016).

Los plásticos activados aumenta la vida útil, la seguridad y la calidad de muchos productos alimenticios al reducir el crecimiento microbiano en alimentos no estériles y minimizar el riesgo de contaminación posterior de los productos procesados (Hotchkiss, 1997). Logran una migración lenta de agentes antimicrobianos desde un área de alta concentración (material de empaque) a un área de baja concentración (alimento), proporcionando una exposición más prolongada de bacterias a antimicrobianos y disminuyendo la pérdida de actividad antimicrobiana al interactuar con la matriz del alimento (Han, 2000). Cuando se utilizan como parte de la tecnología de barreras (Leistner and Gorris, 1995), los plásticos activados pueden mejorar la inactivación de los microorganismos en los alimentos.

Existen diferentes agentes antimicrobianos que se pueden incorporar al material de envasado, y estos pueden ser incorporados como recubrimiento o inmovilizados. Los procesos térmicos, por extrusión, fundición, moldeado e inyección son los más utilizados para la incorporación de los agentes antimicrobianos dentro de los envases (Jokar et al., 2009). En la tabla 2 se muestran los diferentes antimicrobianos que pueden ser utilizados en envases activos. Numerosos estudios han descrito las propiedades de estos envases antimicrobianos frente a diferentes microorganismos en distintos alimentos. Por ejemplo, la actividad antimicrobiana de la nisina ha sido estudiada en carne de pollo para inactivar *Salmonella typhimurium* (Cutter et al., 2001). Dentro de los productos lácteos el envasado con nisina reducía los recuentos de bacterias lácticas, *Listeria innocua* y *S. aureus* en muestras de queso en refrigeración (Scannell et al., 2000). Siragusa y colaboradores en 1999, demostraron también que la nisina incorporada en los envases era capaz de evitar el crecimiento de *Lactobacillus helveticus* y *B. thermosphacta* en muestras de carne. Las bacteriocinas nisina y pediocina son capaces de inhibir por completo el crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en muestras de carne y aves (Ming et al., 1997).

Entre las sustancias químicas, el triclosan adicionado a los plásticos es capaz de inhibir a *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella*

enteritidis y *Brocothrix thermosphacta* (Vermeiren et al., 2002). Chung y colaboradores incorporaron parabenos a los plásticos inhibiendo con estos el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. El sorbato potásico no mostró la efectividad deseada frente a *Candida* spp., *Pichia* spp. o *Penicillium* spp., debido a la limitada migración del sorbato a través del plástico (Devlieghere et al., 2000), pero sin embargo, si se observó mayor efectividad frente a *Penicillium* spp. al adicionar cloruro de benzoilo.

Tabla 2.- Agentes antimicrobianos usados en envases activos (adaptado Martínez Tenorio, 2011).

Agente antimicrobiano	Ejemplo
Ácidos anhídricos	Anhidro benzoico, anhidro sórbico
Ácidos grasos	Ac. palmitoleico, ac. laurico
Ácidos inorgánicos	Ac. fosfórico
Ácidos orgánicos	Ac. acético, ac. benzoico, ac. cítrico, ac. láctico, ac. sórbico, ac. propiónico
Alcoholes	Etanol
Aminas	Hexametil entramina
Antibióticos	Natamicina
Antioxidantes fenólicos	BHA, BHT, TBHQ
Bacteriocinas	Lactacina, nisina, pediocina, sakacina
Compuestos de amonio	Sales cuaternarias de amonio
Compuestos de plantas	Carvacrol, timol, eugenol, geraniol, linalol, citrato, terpinol
Enzimas	Quitinasa, lisozima, B-glucanasa
Fenoles naturales	Catequinas, hidroquinonas, p-cresol
Fungicidas	Dióxido de azufre, Imazalil
Metales	Cobre, plata
Parabenos	Etil parabeno, propil parabeno, metil parabeno
Péptidos antimicrobianos	Cecropina, defensina, magainina
Polisacáridos	Quitosano
Quelantes	Citrato, EDTA, polifosfato, lactoferrina
Sales de ácidos orgánicos	Sorbato potásico, benzoato de sodio

Diversos derivados de especias o hierbas como canela, ajo, mostaza, u orégano, se han utilizado para inhibir a ciertos hongos como *Penicillium comune*, *P. roqueforti*, *Aspergillus flavus* o *Endomyces fibuliger* en productos de panadería (Nielsen and Rios, 2000). En los últimos, años dentro de los antimicrobianos naturales empleados en la

obtención de plásticos activados con para la inhibición de microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos destacan los aceites esenciales de plantas, o sus compuestos bioactivos (Guarda et al., 2011; Cerisuelo et al., 2013; Otero et al., 2014; Muriel-Galet et al., 2012; Ramos et al., 2012; Theinsathid et al., 2012) y las bacteriocinas (Mauriello et al., 2005; Neetoo et al., 2007; Santiago-Silva et al., 2009; Natrajan, and Sheldon, 2000; Perez Espitia et al., 2012; Viedma et al., 2010).

II.2.1.- Aceites esenciales

Entre las sustancias con actividad antimicrobiana destacan los aceites esenciales y sus componentes bioactivos (Burt, 2004). Los aceites esenciales son líquidos de naturaleza aceitosa obtenidos de diferentes partes de las plantas como hojas, ramas, corteza, hierbas, flores, yemas, semillas, madera, frutos o raíces: Son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos, son compuestos olorosos, muy solubles en alcohol y poco solubles en agua (Bullerman, 1997). Los aceites esenciales pueden proporcionar a los plásticos propiedades antimicrobianas y/o antioxidantes, y su composición y las interacciones específicas con el polímero van a determinar su eficacia final como compuesto activo (Atarés and Chiralt, 2016). Muchos antioxidantes son conocidos por presentar actividad antimicrobiana, lo que permite asumir una relación entre las actividades antimicrobianas y antioxidantes; no obstante, puede no existir, o haber poca correlación entre ambas actividades ya que son múltiples los mecanismos involucrados. Los aceites esenciales se han utilizado desde la edad media con fines bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitarios, insecticidas, medicinales y en cosmética. Su actividad antimicrobiana depende de su carácter hidrofílico, o hidrofóbico, los componentes químicos presentes y el tipo de microorganismo con el que se utilice.

Por otro lado, las plantas aromáticas y las especias han sido utilizadas desde tiempos ancestrales para conservar los alimentos y mejorar su sabor. Su actividad antimicrobiana reside con frecuencia en compuestos de naturaleza fenólica, muchos de los cuales han sido caracterizados en profundidad (Burt, 2004; Holley and Patel, 2005; Reichling et al., 2009; Solórzano-Santos and Miranda-Novales, 2012). Destacan entre ellos el carvacrol y timol de los aceites de orégano, el eugenol del aceite de clavo, o el trans-cinamaldehído, presente en el aceite de canela. Todos ellos son reconocidos como

antimicrobianos seguros por la Food and Drug Administration. El tirosol y el hidroxitirosol son también compuestos con actividad antimicrobiana, asociados al olivo y sus derivados como la aceituna de mesa o el aceite de oliva (Capasso et al., 1995; Medina et al., 2007). La actividad antimicrobiana de hierbas y plantas es generalmente atribuida a los compuestos fenólicos presentes en sus extractos o aceites esenciales, y se ha observado que la grasa, proteína, concentración de sal, pH y temperatura afectan la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Nychas, 1995).

Muchos aceites esenciales tienen la capacidad de reducir la concentración de microorganismos viables en los alimentos, pero sin embargo tienen un impacto demasiado fuerte en el sabor y el aroma, lo que limita considerablemente su utilización. No obstante, algunos de los componentes bioactivos de los aceites esenciales presentan una mayor potencia antimicrobiana y un menor impacto en los alimentos, por lo que son considerados buenos candidatos para futuras aplicaciones. Muchos de ellos han sido evaluados en sistemas alimentarios, mostrando buenos resultados en cuanto a la inhibición de microorganismos patógenos o alterantes (Burt, 2004; Devi et al., 2010; Rattanachaikunsopon et al., 2010).

Una de las alternativas para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos o alterantes en alimentos es el empleo de recubrimientos activados con antimicrobianos procedentes de aceites esenciales (Coma, 2008; Vargas et al., 2008; Sung et al., 2013). Mediante esta técnica, el antimicrobiano se libera más lentamente lo que disminuye su inactivación por interacción con los componentes del alimento, proporcionando una protección más prolongada a la vez que se necesitan concentraciones menores de antimicrobiano. Así mismo, el envase activado actúa como barrera contra la contaminación cruzada del alimento con bacterias de origen exógeno, y permite el envasado de los alimentos en atmósferas modificadas.

Recientemente también ha surgido un gran interés por el empleo de antimicrobianos naturales como los aceites esenciales y sus componentes activos en el control de las bacterias resistentes a antibióticos, así como en el control de la formación de biopelículas. De hecho, los compuestos antimicrobianos naturales pueden ser una buena alternativa para combatir las biopelículas bacterianas (Bazaka et al., 2012). Existen diversos estudios con resultados prometedores sobre el empleo de aceites

esenciales o sus componentes activos para la inactivación de biopelículas formadas por microorganismos patógenos (Pérez-Conesa et al., 2006; Lebert et al., 2007; Nostro et al., 2007; Karpanen et al., 2008; Soni et al., 2013; Upadhyay et al., 2013). Algunos componentes activos de los aceites esenciales, son capaces de inhibir la formación de biopelículas incluso cuando se usan a concentraciones subinhibitorias. Así, el carvacrol, el cinamaldehído y el eugenol inhiben la activación génica mediante señales de quórum (Knowles et al., 2005; Niu et al., 2006; Zhou et al., 2006; Burt et al., 2014). Incorporados en films o plásticos para recubrimientos de alimentos, el carvacrol y el cinamaldehído inhiben la formación de biopelículas bacterianas (Nostro et al., 2012). El cinamaldehído impide también la formación de biopelículas por cepas de *E. coli* uropatógenas tanto en placa como en catéteres, lo que se ha considerado de gran significado en el ámbito clínico (Amalaradjou et al., 2011). Las bacteriocinas también interfieren con la formación de biopelículas, como por ejemplo la enterocina AS-48 adsorbida sobre placas de poliestireno frente a *L. monocytogenes* y *Bacillus cereus* (Caballero Gómez et al., 2012, 2013).

Dentro de las frutas y hortalizas la tendencia actual es consumir productos más frescos y sanos, y lo más parecido a su forma original. Sin conservantes químicos como son los benzoatos, nitritos y nitratos, anhídrido sulfuroso (SO₂), entre otros. Esto genera la necesidad de buscar otras alternativas para conservar los productos que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y sean compatibles con el alimento (Álvarez-Parrilla, 2006). Por ejemplo, un compuesto que se está utilizando para sustituir al ácido sórbico en la conservación de los alimentos vegetales es la vainillina, un componente cristalino de la vaina de la vainilla, que es eficaz para la conservación de frutas como la manzana, las fresas o el mango (Blanchard, 2000). En ensaladas de frutas se comprobó que al añadir aceites esenciales de mandarina, cidra, limón y lima, aumentó su vida útil y se redujo la carga microbiana, sin alterar las características organolépticas de las frutas (Lanciotti et. al., 2004). Se han realizado numerosos estudios con plásticos activados con diversos tipos de aceites y extractos de plantas (Glinel et al., 2012). Los aceites esenciales incorporados en películas o recubrimientos han mostrado actividad fungicida frente a un amplio rango de hongos patógenos importantes en postcosecha (Daferera et al., 2000). Rojas-Grau y colaboradores (2007a) estudiaron un recubrimiento a base de puré de manzana, alginato, glicerol y aceite esencial de orégano en trozos de mango, observando una disminución de *Listeria innocua* inoculada en las muestras tratadas.

Cuando se adicionaron al melón cortado recubrimientos a base de alginato, glicerol, y ácido palmítico, se observó inhibición en el crecimiento de *Salmonella enterica*, además de conservar el producto fresco en condiciones óptimas (Raybaudi–Massilia et al., 2008). En estudios realizados por Ponce y colaboradores en 2008, demostraron el efecto inhibitorio de cubiertas comestibles de quitosano con romero en el crecimiento de *L. monocytogenes* en superficie de calabaza.

Los aceites esenciales y sus compuestos antimicrobianos se han estudiado también para la conservación de diferentes tipos de pescados (Hyldgaard et al., 2012; Patel, 2015; Pandey et al., 2017). El aceite esencial de orégano destaca por su actividad como antioxidante (Fasseas et al., 2008), antitripanosoma (Santoro et al., 2007), y antibacteriano (Albado et al., 2001). La doble ventaja que ofrece el aceite esencial de orégano en cuanto a las propiedades sensoriales y la mejora del tiempo de conservación se ha aprovechado en el pescado, prolongando el tiempo de vida útil del producto en comparación con otros métodos de conservación (Viuda-Martos et al., 2009). Otros estudios microbiológicos han demostrado que ciertos aceites esenciales son activos frente a diferentes especies de *Aeromonas* presentes en pescados. Por ejemplo, Hammer y colaboradores en 1999, demostraron que el orégano, la citronela y el tomillo inhibían a *Aeromonas sobria*. Nya y colaboradores en 2010, determinaron que la alicina tenía poder inhibitorio frente a *Aeromonas hydrophila*. En otros estudios los resultados mostraron que al alimentar a la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* con un extracto de ajo en su dieta durante catorce días, aumentó significativamente su supervivencia frente a las no alimentadas con ajo, en las que se detectó *A. hydrophila* (Nya and Austin, 2009).

La incorporación de los aceites esenciales y sus compuestos antimicrobianos como parte de la tecnología de barreras es una alternativa muy interesante, ya que permite potenciar la actividad antimicrobiana a concentraciones más bajas debido a los efectos sinérgicos entre los distintos componentes. A modo de ejemplo, la actividad de la nisina se ve potenciada por compuestos fenólicos naturales (Olasupo et al., 2004), permitiendo incluso la inactivación de *Salmonella* y *Escherichia coli* en zumos (Yuste and Fung, 2004).

II.2.1.1.- Timol

El género *Thymus* (familia *Lamiaceae*) comprende más de 350 especies de plantas aromáticas con características botánicas bastante diferentes y una amplia heterogeneidad química (Adzet et al., 1997). Uno de los componentes más valiosos del tomillo (especialmente de las hojas) es su aceite volátil, que está formado por terpenos, sesquiterpenos y varios compuestos derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, fenoles, éteres, ésteres, etc.), todos ellos responsables del olor y el sabor característicos de la planta (Pourmortazavi and Hajimirsadeghi, 2007). El tomillo es utilizado en alimentos como saborizante (Prakash et al., 1990), en cosméticos y perfumería (Mookherjee et al., 1989) y en las industrias farmacéuticas (Ferley et al., 1988). Las principales propiedades farmacológicas que se le atribuyen son las actividades antimicrobianas, antitusivas, antiespasmódicas y antioxidantes (Hoferl et al., 2009; Soliman and Badeaa, 2002).

El timol y su isómero carvacrol se encuentran entre los constituyentes biológicamente más activos del aceite volátil del tomillo. El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es el principal fenol monoterpeneo presente en el aceite de diversas variedades de tomillo (Hyldgaard et al., 2012; Thompson et al., 2003), y es además un antimicrobiano barato disponible comercialmente. El timol y el carvacrol han demostrado propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas (Braga et al., 2006; Tian and Lai, 2006; Ivanovic et al., 2012). La variedad más estudiada es *Thymus vulgaris* (García Risco et al., 2011; Thompson et al., 2003; Tschiggerl and Bucar, 2011), aunque la atención también se ha centrado en *Thymus zygis* (Moldao-Martins et al., 2000), una variedad de tomillo muy extendida en Portugal y España, así como en *Thymus citriodorus*, una planta cultivada en toda la región del Mediterráneo (Sacchetti et al., 2005).

El aceite de la hoja de tomillo generalmente es obtenido por destilación al vapor (en cuyo caso, de acuerdo con la Farmacopea, se conoce como el aceite esencial de la hierba) o por métodos tradicionales de extracción sólido-líquido como Soxhlet, o extracción bajo reflujo. Aunque estos métodos son relativamente simples, adolecen de varias deficiencias, como un largo tiempo de extracción y un consumo de solvente relativamente alto, por nombrar sólo dos. La extracción mediante líquido presurizado

(PLE), una técnica de extracción de disolvente relativamente reciente, puede, en principio, eliminar algunos de los inconvenientes de los métodos clásicos de extracción con disolventes. El PLE se basa en el uso de disolventes a temperaturas superiores a sus puntos de ebullición normales y a presiones lo suficientemente altas como para mantener el fluido de extracción en estado líquido durante todo el proceso de extracción. Por lo tanto, se pueden realizar procesos de extracción más rápidos, con mayores rendimientos de extracción y menores volúmenes de solventes orgánicos, (Carabias-Martínez et al., 2005).

El timol está aceptado como GRAS ('generalmente reconocido como seguro') y, debido a su baja toxicidad, aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) como aditivo farmacéutico y alimenticio, por lo que no es considerado nocivo para la salud (Falcone et al., 2005). Estas características han aumentado el interés de los investigadores en el potencial de los preparados de este compuesto obtenidos mediante los denominados "solventes verdes" para aplicaciones alimentarias (Ishida and Chapman, 2009; Strati and Oreopoulou, 2011; Hernández et al., 2011; Vicente et al., 2001; Golmakani et al., 2012; Villanueva et al., 2013). Su estructura química es similar a la del carvacrol cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo (Fig. 1). En cuanto a su mecanismo de acción, es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, aumentando la permeabilidad de la membrana y permitiendo la pérdida de lipopolisacárido (Helander et al., 1998).

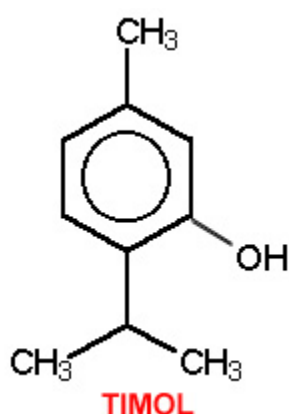


Figura 1.- Estructura química del Timol.

En estudios realizados frente a *Salmonella thiphymurium* y *Staphylococcus aureus* se observó que el timol se unía a las proteínas hidrofóbicas de la membrana

mediante puentes de hidrógeno, modificando así la permeabilidad de la membrana (Juven et al., 1994). También se ha demostrado su actividad frente a las esporas de *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum*, en las que el timol inhibe alguno de los diferentes procesos involucrados en la transición de esporas a células vegetativas, como la germinación, crecimiento y multiplicación celular (Chaibi et al., 1997). Falcon y colaboradores en 2005 demostraron que *Lactobacillus curvatus* y *L. plantarum* eran más resistentes al timol que las cepas de *B. subtilis*, *B. cereus* o *B. licheniformis*, señalando que la actividad era dependiente del pH del medio, la temperatura de incubación y el microorganismo. En estudios realizados en pescado, la adición de timol en combinación con otros factores mejoró la conservación de los filetes de dorada frescos (Altieri et al., 2005), bacalao fresco y hamburguesas de pescado azul (Corbo et al., 2008, 2009; Del Nobile et al., 2009).

II.2.2.- Bacteriocinas: La enterocina AS-48

Las bacteriocinas son péptidos antibacterianos que tienen un espectro de acción bactericida relativamente estrecho sobre cepas de la misma especie o de especies relacionada (Jack et al., 1995). La producción de bacteriocinas por bacterias del ácido láctico (BAL) y su utilización como bioconservantes ha despertado un enorme interés en las dos últimas décadas, siendo numerosas las bacteriocinas estudiadas (como la nisina, pediocina PA-1/AcH, lacticina 3147 y otras) (Cotter et al., 2005; Fimland et al., 2005; Drider et al., 2006; Franz et al., 2007; Beshkova and Frengova, 2012; Zhang et al., 2013a, 2013b). En la actualidad existe una amplia experiencia sobre las posibilidades y limitaciones que ofrecen las bacteriocinas para su aplicación como bioconservantes en alimentos (Cleveland et al., 2001; Deegan et al., 2006; Gálvez et al., 2007, 2008, 2010a, b; Abriouel et al., 2010; Gálvez et al., 2014).

Las enterocinas son las bacteriocinas producidas por los enterococos. La enterocina AS-48 es un péptido circular de 7.2 kDa (Fig. 2) producido por cepas de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* con potente actividad antimicrobiana, cuya estructura, determinantes genéticos y modo de acción son bien conocidos (Maqueda et al., 2004; Abriouel et al., 2010; Grande-Burgos et al., 2014). La actividad de esta bacteriocina frente a bacterias patógenas o alterantes ha sido ampliamente estudiada en varios sistemas alimentarios, incluyendo carnes, productos lácteos, alimentos marinos, y

alimentos vegetales (vegetales crudos, zumos de frutas, alimentos preparados, productos enlatados...) sola o en combinación con otros antimicrobianos (incluidos aceites esenciales y sus componentes bioactivos) y tratamientos físico-químicos (calor, pulsos eléctricos...) (revisado por Abriouel et al., 2010 y Grande-Burgos et al., 2014; Khan et al., 2010; Pérez Pulido et al., 2012; Toledo del Árbol et al., 2016; Grande-Burgos et al., 2017). La enterocina AS-48 cumple muchos de los requisitos considerados como imprescindibles para que una sustancia pueda tener uso tecnológico en conservación de alimentos.



Figura 2.- Estructura de la enterocina AS-48

Otras bacteriocinas como las producidas por diferentes especies de *Bacillus* pueden tener un potencial antimicrobiano comparable o superior a estas bacteriocinas, aunque su potencial en el uso con alimentos no ha sido explorado. Existen numerosos estudios sobre la utilización de bacteriocinas inmovilizadas en diversos tipos de recubrimientos para aplicación en alimentos (revisado por Gálvez et al., 2007). Los estudios previos realizados con nisina inmovilizada en distintos soportes indican que esta forma de aplicación ofrece diversas ventajas frente a la adición directa de bacteriocina al alimento. Es importante resaltar también que la aplicación combinada de bacteriocinas y otros agentes antimicrobianos como parte de la tecnología de barreras

permite bajar las concentraciones mínimas inhibitorias y en algunos casos ampliar extraordinariamente su espectro de acción (sobre todo frente a bacterias Gram negativas).

La enterocina AS-48 se puede aplicar en los alimentos mediante producción in situ y ex situ. Las cantidades de bacteriocina necesarias para inhibir a microorganismos patógenos en sistemas alimentarios son superiores a las establecidas previamente en los estudios realizados en medios de cultivo de laboratorio (Mendoza et al., 1999; Muñoz et al., 2004, 2007; Ananou et al., 2004; Ananou et al., 2005a, 2005b). Esto puede ser debido en parte a las condiciones de procesado de cada alimento, la inestabilidad de la bacteriocina a los cambios de pH del alimento, la inactivación por enzimas, la interacción con aditivos o ingredientes del propio alimento, la adsorción a componentes del alimento, o la baja solubilidad y distribución irregular en la matriz alimentaria (Gálvez et al., 2007). Todos estos factores van a limitar la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos, siendo más complejo cuánto más diversa es la matriz alimentaria. Por esto, en algunos casos, es necesaria su combinación con otros agentes antimicrobianos, o combinada con otras barreras que puedan potenciar su actividad. La enterocina AS-48 (sola o combinada con otros antimicrobianos) es activa frente a patógenos transmitidos por los alimentos y las bacterias que descomponen los mismos (Grande- Burgos et al., 2014).

El potencial de la enterocina AS-48 para controlar los patógenos transmitidos por los alimentos ha quedado demostrado en diferentes tipos de alimentos. En un sistema modelo de salchicha de carne, adicionada de la enterocina AS-48, no se detectó *L. monocytogenes* después de 6 y 9 días de incubación a 20°C (Ananou et al., 2005). En el mismo tipo de carne, la enterocina AS-48 inhibió la proliferación de *S. aureus* cuando se añadió a concentraciones de 30 o 40 µg/g, logrando reducciones significativas en los recuentos de células viables de 2 y 5,3 unidades logarítmicas, respectivamente, en comparación con los controles no tratados (Ananou et al., 2005). En lonchas de jamón cocido adicionado de enterocina a concentraciones de 20, 40 y 60 µg/g solo fue activa frente a *L. monocytogenes* en las muestras almacenadas a 5 y 15°C, aunque no fue suficiente para evitar el recrecimiento de *Listeria* durante el período de almacenamiento de 60 días (Ananou et al., 2009). Las combinaciones de enterocina AS-48 y conservantes químicos (nitrito/nitrato, tripolifosfato de pentasodio, benzoato de sodio o

sorbato de potasio) mejoraron el efecto anti-listeria durante el almacenamiento en refrigeración. En fuet, se investigó el efecto de la enterocina AS-48 frente a *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *S. aureus* durante la maduración y el almacenamiento a 7°C y a temperatura ambiente, en muestras tratadas o no por alta presión hidrostática (Ananou et al., 2010). La enterocina sola causó una disminución rápida y drástica de *L. monocytogenes* y una inhibición significativa de *Salmonella* al final de la maduración (día 10). Los tratamientos a 400 MPa en combinación con enterocina AS-48 dieron lugar a recuentos más bajos de *Salmonella* en comparación con el tratamiento individual por altas presiones. La enterocina AS-48 también es útil para la inhibición de bacterias alterantes de la carne y productos cárnicos, como lo demuestran los estudios realizados en jamón cocido con *Lactobacillus sakei*, *Brochothrix thermosphacta* y *Staphylococcus carnosus* (Baños et al., 2012). Aunque *L. sakei* fue completamente inactivado por la enterocina AS-48 a 60 µg/g, la bacteriocina fue más efectiva cuando se usó combinada con conservantes químicos.

En leche, la cepa productora de bacteriocina *E. faecalis* A-48-32 muestra una fuerte capacidad de crecimiento y es capaz de producir enterocina AS-48 (Muñoz et al., 2006). En queso, *E. faecalis* A-48-32 también fue capaz de producir enterocina AS-48 (Muñoz et al., 2006). El crecimiento de los cultivos iniciadores de queso y la producción de ácido láctico no se vieron afectados por la adición de esta cepa productora de bacteriocina. Durante la maduración del queso sin grasa inoculado con *B. cereus*, la bacteriocina producida fue estable durante los 90 días de período de maduración, y también fue capaz de reducir la población de bacilos en los quesos.

Existen numerosos estudios previos sobre las posibles aplicaciones de las bacteriocinas para la conservación de alimentos marinos (Galvez et al., 2014; Johnson et al., 2017), si bien existen escasos trabajos sobre la aplicación de AS-48 en este tipo de alimentos. La inmersión en una solución de enterocina AS-48 durante 1 minuto retrasó el crecimiento bacteriano y redujo la producción de aminas biógenas en sardinas durante el almacenamiento en refrigeración (Ananou et al., 2014). Otro estudio demostró que la aplicación por pulverización de una solución de enterocina AS-48 redujo los recuentos viables de un cóctel de cepas de *Listeria monocytogenes* en merluza cruda y en filetes de salmón, así como en salmón ahumado, un efecto que fue potenciado por el bacteriófago P100 (Baños et al., 2016). Las bacteriocinas, como por ejemplo la nisina y

los aceites esenciales o sus compuestos antimicrobianos se han incorporado en diferentes materiales de recubrimiento con el fin de conservar el pescado (Neetoo et al., 2008; Lu et al., 2010). Sin embargo, el único uso de compuestos antimicrobianos naturales para inhibir o retrasar el crecimiento bacteriano en productos pesqueros puede requerir la adición de concentraciones demasiado altas que tengan un impacto negativo en el sabor de los alimentos. En cuanto a la enterocina AS-48, no existen estudios previos sobre su aplicación en productos marinos en combinación con compuestos fenólicos. La aplicación de forma combinada, bien en solución o mediante recubrimientos activos, podría reducir la concentración de compuestos fenólicos necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano, disminuyendo de ese modo el impacto sobre los alimentos de origen marino.

En alimentos de origen vegetal, las bacteriocinas podrían ayudar a reducir la transmisión de patógenos a través de estos alimentos crudos, que están implicados en brotes de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias (Doyle et al., 2008). La aplicación de tratamientos de lavado con enterocina AS-48 sola o combinada con otros antimicrobianos fue efectiva en la inactivación de *L. monocytogenes*, *B. cereus* y bacterias entéricas (Cobo et al., 2005). La combinación de enterocina AS-48 con otros agentes antibacterianos también fue efectiva en la inactivación de *L. monocytogenes* y *S. enterica* en ensaladas listas para el consumo (Cobo et al., 2005, 2009) y en la inactivación de *S. aureus* en diferentes tipos de salsas (Grande et al., 2007). En ensaladas, la inactivación de *L. monocytogenes* se potenció mediante la adición de varios aceites esenciales y componentes bioactivos a partir de aceites esenciales y extractos de plantas, como por ejemplo carvacrol, eugenol, timol, terpineol, tirosol e hidroxitirosol, entre otros (Cobo Molinos et al., 2009), mientras que la inactivación de *S. enterica* se potenció significativamente cuando se añadió la bacteriocina en combinación con p-hidroxibenzoico metil éster y con 2-nitropropanol. La actividad antiestafilocócica en las salsas se potenció significativamente mediante la adición combinada de enterocina AS-48 y compuestos fenólicos. En perejil cortado, la aplicación de un recubrimiento de pectina conteniendo bacteriocina y EDTA retraso considerablemente el incremento de los recuentos de aerobios mesófilos totales (Grande Burgos et al., 2017). En fruta entera o troceada, la aplicación de tratamientos de lavado con enterocina AS-48 sola o en combinación con otros antimicrobianos fue efectiva en la inactivación de *L. monocytogenes*, como lo demostró el trabajo realizado sobre trozos

de fruta entera y frutas en rodajas fresas, frambuesas, moras, melón rebanado, sandía, pera, y kiwi (Cobo Molino et al., 2008). En zumos de manzana, la aplicación de recubrimientos de quitosano, pectina, goma de xanto o carboximetil celulosa activados con enterocina AS-48 y EDTA mostró buenos resultados en la inactivación de *L. monocytogenes* (López Aguayo et al., 2016).

En jugos de frutas, la adición de concentraciones bajas de enterocina AS-48 en zumos inoculados con células vegetativas y con endosporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* provocó una inactivación completa de la bacteria y proporcionó protección durante 14 días en jugos de naranja y manzana recién hechos, y hasta 60 y 90 días en varios jugos de frutas comerciales a temperaturas de almacenamiento en el rango de 4 a 37°C (Grande et al., 2005). También se han obtenido resultados satisfactorios frente a bacterias que causan alteraciones en jugo de manzana y sidra de manzana, incluyendo las cepas de *Bacillus licheniformis* LMG 19409, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus diolivorans* y *Pediococcus parvulus*, así como cepas de *L. collinoides* (Martínez-Viedma et al., 2008). La actividad frente de AS-48 a los lactobacilos y pediococos en sidra de manzana fue potenciada por los tratamientos con pulsos eléctricos de alta intensidad (HIPEF) (Martínez-Viedma et al., 2009). La inactivación de patógenos entéricos, como en el caso de *S. enterica* en el jugo de manzana también se potenció por la adición de bacteriocina combinada con HIPEF (Martínez-Viedma et al., 2008) o mediante aplicación en combinación con EDTA y/o calor subletal como en el caso de *E. coli* O157:H7 (Ananou et al., 20005). Para *S. enterica*, se logró la inactivación máxima (4,5 unidades logarítmicas) con el tratamiento HIPEF durante 1000 μ s en combinación con 60 μ g/ml de enterocina AS-48 y una temperatura de tratamiento de 40°C.

La enterocina AS-48 también parece ser un buen candidato para la bioconservación de alimentos vegetales listos para consumo. En los alimentos a base de arroz, la adición de bacteriocina a 20-35 μ g/ml, consiguió una completa inactivación de cepas enterotoxigénicas psicrotróficas de *B. cereus* en muestras almacenadas en un rango de temperatura de 6 a 37°C y también evitó la producción de enterotoxina (Grande et al., 2006). La incorporación de enterocina AS-48 (6 μ g/ml) en alimentos enlatados vegetales de baja acidez (pasta de tomate, zumo de melocotones en conserva y jugo de piña en conserva) causó la inactivación completa o parcial de las células de *B.*

coagulans (Lucas et al., 2006). La bacteriocina también fue altamente efectiva frente a bacterias formadoras de endosporas termófilas en alimentos enlatados (Martínez-Viedma et al., 2009). La enterocina AS-48 también podría encontrar aplicación en pan y productos de panadería, siendo eficaz contra la proliferación de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, así como de cepas de *B. cereus* y *Bacillus pumilus* en una masa experimental de harina de trigo (Martínez-Viedma et al., 2011). En postres, la mayor inactivación de *S. aureus* por AS-48 (50 µg/ml) se observó en la crema pastelera, mientras que la actividad más baja se detectó en postres a base de yogur tipo soja y en postres de gelatina (Martínez-Viedma et al., 2009). *B. cereus* y *L. monocytogenes* también se controlaban bien mediante la adición de bacteriocina (a concentraciones finales de 25-50 o 15-25 µg/ml, respectivamente). Curiosamente, la adición de enterocina AS-48 al pudín de gelatina evitó la licuación de gelatina causada por las proteasas de *Bacillus*.

II.3.- Alta presión hidrostática

Otro de los métodos aplicables para la inactivación de microorganismos en alimentos son los tratamientos por alta presión hidrostática (APH), que figuran a la cabeza entre los métodos no térmicos para procesado de alimentos (Rastogi et al., 2007; Considine et al., 2008; Corbo et al., 2009; Rendueles et al., 2011; Balasubramaniam et al., 2015; Georget et al., 2015). Los tratamientos por APH resultan muy adecuados para la conservación de determinados alimentos, por el bajo impacto que tienen sobre los nutrientes y las propiedades organolépticas.

El control microbiológico es clave en la producción de alimentos seguros tales como platos preparados. En este contexto, los tratamientos mediante alta presión hidrostática pueden ser de gran utilidad para la elaboración de alimentos vegetales y frutas mínimamente procesados, de alta calidad, de fácil preparación, libres de conservantes, y seguros (Wang et al., 2016). En frutas y vegetales, permiten inactivar microorganismos y enzimas y prolongar la vida útil del producto a la vez que mantienen sus propiedades organolépticas, sensoriales, y nutritivas, y conservan los componentes bioactivos. En comparación con el procesamiento térmico, el tratamiento de APH muestra un menor impacto en compuestos de bajo peso molecular, como vitaminas y pigmentos (Sánchez-Moreno et al., 2003; Tauscher, 1995). En los zumos de fruta, la

aplicación de tratamientos de APH a bajas presiones de alrededor de 300 a 400 MPa reduce los costos de utilización de equipos con valores de presión más altos y además se sigue consiguiendo una buena inactivación microbiana (Bayindirli et al., 2006). Sin embargo, la aplicabilidad de esta tecnología en la conservación de alimentos preparados tradicionales (tales como salsas vegetales, puré de frutas o pescados envasados) en combinación con enterocina AS-48 aún no ha sido estudiada.

La alta presión hidrostática puede aplicarse a productos del mar con diversos fines, como inactivación de patógenos transmitidos por los alimentos, reducción de la producción de aminas biógenas, mejora de la vida útil del producto, texturización del producto y recuperación de la carne de marisco (Murchie et al., 2005; Campus, 2010; Wang et al. al., 2016). Sin embargo, el tratamiento de altas presiones en la carne de pescado fresco dio lugar a cambios en la coloración y textura del producto (apariencia cocida) al aumentar la presión y el tiempo de tratamiento (Campus, 2010; Wang et al., 2016). Por tanto, existe un nicho potencial para la aplicación de tratamientos de baja presión en combinación con otras sustancias como los antimicrobianos naturales para la conservación de alimentos marinos.

La eficacia de los tratamientos por APH pueden mejorarse en combinación con otras barreras, como son los compuestos antimicrobianos naturales (Garriga et al., 2002; Masschalck et al., 2003; Vurma et al., 2006). Entre ellos, las bacteriocinas y aceites esenciales y sus compuestos fenólicos son los mejor estudiados. Los antimicrobianos naturales se pueden incorporar a los alimentos de diferentes maneras para su utilización en tratamientos combinados con altas presiones, como es la adición directa, la pulverización o la inmovilización en diferentes soportes (Gálvez et al., 2007).

II.4.- Biodiversidad microbiana: secuenciación masiva

Los métodos microbiológicos clásicos que se suelen utilizar para la detección de microorganismos patógenos en alimentos son laboriosos y requieren de mucho tiempo. Implican el uso de un apropiado medio de pre-enriquecimiento y enriquecimiento, el aislamiento en medios selectivos y la posterior confirmación mediante pruebas bioquímicas morfológicas y/o serológicas. Esta situación, junto con la demanda de resultados inmediatos y a los avances tecnológicos, ha conducido al desarrollo de una

amplia gama de métodos rápidos en las últimas décadas (Rodríguez-Lázaro et al., 2006; Prasad and Sharan, 2009; Gui and Patel, 2011; Glynn et al., 2006).

Siguiendo las tendencias recientes de la microbiología ambiental, la microbiología de los alimentos se ha beneficiado de los avances en biología molecular y ha adoptado nuevas estrategias para detectar, identificar y controlar los microorganismos presentes en los alimentos. En los últimos años, la tecnología de secuenciación masiva (HTS) se ha convertido en una poderosa herramienta para estudiar las comunidades microbianas en los sistemas alimentarios (Ercolini, 2013; Kergourlay et al., 2015). Hoy en día se puede realizar un estudio en profundidad de la diversidad microbiana de los alimentos mediante el uso de métodos de secuenciación masiva (HTS) una vez que se ha obtenido el ADN de la muestra a estudiar.

El estudio de la ecología microbiana de los alimentos ha cambiado drásticamente. La genómica funcional, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica se aplican cada vez más para poder comprender el comportamiento de los microorganismos en los alimentos (O Flaherty and Klaenhammer, 2011). Además, en un futuro próximo, es poco probable que los microbiólogos de alimentos puedan prescindir de la "detección", una de las principales prioridades para desarrollar y optimizar técnicas moleculares para la detección, la identificación y la monitorización de los microorganismos asociados a los alimentos (Ercolini and Cocolin, 2008). Las técnicas independientes de cultivo surgieron para superar las limitaciones del enfoque clásico basado en el cultivo y se han utilizado ampliamente en la microbiología de los alimentos (Ercolini, 2004; Quigley et al., 2011; Cocolin et al., 2011; Giraffa and Neviani 2001). El alcance del análisis microbiano puede depender de los alimentos en concreto, y los microorganismos estudiados pueden ser (i) patógenos, (ii) microorganismos asociados o (iii) microorganismos iniciadores y beneficiosos. Dichas poblaciones microbianas merecen atención debido a su papel en la contaminación de los alimentos, el deterioro o la fermentación (es decir, la producción de alimentos). El estudio de la diversidad microbiana actualmente se puede realizar mediante técnicas de secuenciación masiva (HTS) una vez que se han obtenido los ácidos nucleicos de la matriz alimentaria que se va a estudiar. Se han descrito varias técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) (Shendure and Ji, 2008; Fuller et al., 2009). Las descripciones de los diversos sistemas y plataformas NGS, así como sus ventajas y

desventajas, han sido ampliamente revisadas (Claesson et al., 2010; Suzuki et al., 2011; Gleen, 2011; Liu et al., 2012; Loman et al., 2012).

La presencia y abundancia de microorganismos y genes en un ecosistema alimentario determinado se puede evaluar mediante el estudio del microbioma, que se refiere a los microorganismos y sus genomas en el ambiente en cuestión. El estudio de la microbiota se basa, en la secuenciación del amplicón de ARNr y puede indicar las proporciones de un taxón dentro de una muestra de alimento. Además, la identificación de genes diana específicos nos permite la distribución de los genes dentro de las muestras de alimentos (Fig. 3).

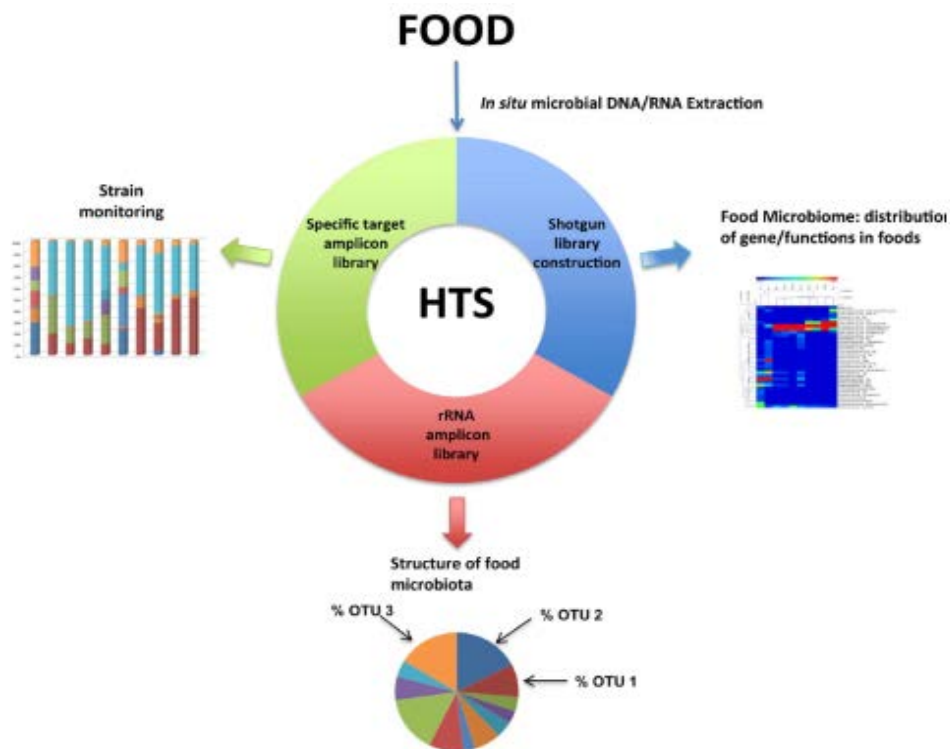


Figura 3.- Aplicaciones de la secuenciación masiva para estudiar la diversidad microbiana de los alimentos (Adaptado de Ercolini, 2013).

La secuenciación del amplicón del 16S rRNA para estudiar la microbiota mediante la técnica HTS es lo más común en ecología microbiana y la única aplicación utilizada en los alimentos. Esto implica el análisis de amplicones que surgen de una

mezcla compleja de genomas microbianos extraídos directamente de una muestra de alimento. Los objetivos para tales análisis son, por supuesto, los genes de interés taxonómico, con el gen 16S rRNA siendo el más utilizado para la identificación de bacterias (Claesson et al., 2010; Bokulich and Mills, 2012). Se secuencian directamente los amplicones de ARNr de ADN/ARN extraídos directamente de los alimentos, y las secuencias se comparan con las bases de datos de referencia para identificar las unidades taxonómicas operativas (OTU). Se calcula el número de lecturas de secuencia identificadas con la misma OTU y luego se proporciona una estimación cuantitativa de la presencia de cada OTU en la muestra analizada. Seguidamente se calcula la abundancia relativa de cada OTU respecto del total de lecturas asignadas en la muestra.

II.4.1.-Aplicaciones de la secuenciación masiva

Esta técnica se aplica principalmente para estudiar la fermentación alimentaria o el deterioro de los alimentos. En ambos casos, las cuestiones clave son la composición de la microbiota y su evolución en el espacio y el tiempo.

La composición de la microbiota mediante HTS basada en el ARNr describe los microorganismos que componen un alimento en concreto. Esto ayuda a caracterizar los productos finales para determinar la proporción entre los microorganismos que forman parte de la fermentación y los microorganismos contaminantes. La diversidad microbiana también puede aportar información sobre las técnicas de producción de los alimentos. De hecho, cuanto más tradicional es el proceso de fabricación, más compleja es la comunidad microbiana encontrada en el producto final. Por el contrario, los alimentos obtenidos industrialmente se caracterizan por consorcios microbianos más simples (Nam et al., 2012).

La distribución espacial de los microorganismos en los alimentos también es un tema muy interesante. Mediante técnicas independientes de cultivo, se demostró que los alimentos con una estructura compleja pueden albergar una distribución heterogénea de microorganismos dentro de sus diferentes partes, como por ejemplo, la corteza, las vetas y el núcleo en un queso (Ercolini et al., 2003). La situación de los microorganismos en los alimentos tiene importantes consecuencias porque pueden afectar a la maduración, el sabor, la protección, el deterioro y la dinámica ecológica en cada parte del alimento. El

uso de métodos de secuenciación de alto rendimiento es importante para dicha investigación, proporcionando información sobre la distribución de los diferentes microorganismos en la matriz del alimento.

Comprender cómo evoluciona la composición de la microbiota con el tiempo es una prioridad en el estudio de la ecología microbiana de los alimentos. Los cambios en las poblaciones microbianas proporcionan información útil para seguir la dinámica de la fermentación natural, controlar el destino de los cultivos iniciadores o adyuvantes u observar los cambios en las poblaciones asociadas a la descomposición de acuerdo con las condiciones de almacenamiento de los alimentos. Recientemente se usó HTS para examinar la sucesión microbiana durante la fabricación tradicional de queso mozzarella, y se demostró que la microbiota asociada con esta producción de lácteos no es tan compleja como se pensaba anteriormente (Ercolini et al., 2012). En la microbiota involucrada en la fabricación de la cerveza ale americana, se descubrió que las enterobacterias predominaban en las etapas de fermentación iniciales, mientras que los lactobacilos y las levaduras tomaban el control en las fases posteriores (Bokulich et al., 2012). En este caso, el análisis por HTS mostró claramente la estabilidad de las bacterias autóctonas en procesos largos y destacó el papel de la microbiota residente en la fermentación.

Poder monitorizar los cambios durante el almacenamiento de alimentos frescos también es de gran importancia. Utilizando la sensibilidad de la secuenciación masiva, se demostró que la microbiota inicial de la carne cambia drásticamente tras el almacenamiento de la misma durante 40 días y que dichos cambios difieren dependiendo de las condiciones de envasado (Ercolini et al., 2011). De hecho, *Brocothrix thermosphacta* y *Pseudomonas* sp. dominaron en la primera y la segunda etapa de almacenamiento aeróbico, respectivamente, mientras que *B. thermosphacta* y *Carnobacterium divergens* se desarrollaron en el primer y segundo período de almacenamiento en atmósfera modificada (MAP), respectivamente. Se observaron más OTUs pertenecientes al grupo de bacterias del ácido láctico (BAL) durante el almacenamiento al vacío, mientras que cuando la carne se almacenó en un envase antimicrobiano activado con nisina, el 95% de las OTU se identificaron como *C. divergens* en las etapas finales de almacenamiento (Ercolini et al., 2011). La detección de tales cambios puede ser interesante para planificar las condiciones de

almacenamiento adecuadas para los productos alimenticios, a fin de inhibir las poblaciones microbianas específicas.

Por otro lado esta técnica, puede ser útil para detectar la contaminación alimentaria por microorganismos patógenos, o para controlar su reducción en los tratamientos aplicados a los alimentos. Aunque la cepa en concreto no era necesariamente patógena, se describió que una cepa de *Escherichia coli* añadida deliberadamente a la leche era metabólicamente activa durante los 7 días de la maduración de los quesos daneses, mientras que disminuía en las etapas posteriores influida por la fermentación (Masoud et al., 2012).

En alimentos vegetales, Leff y Fierer (2013) aplicaron la secuenciación masiva para comparar la microbiota superficial de varias frutas y verduras (incluyendo manzanas, uvas, lechugas, champiñones, pimientos, espinacas, brotes, melocotones, fresas y tomates). La HTS también se aplicó para estudiar los cambios en la microbiota de alimentos vegetales almacenados en frío (espárragos verdes, melocotones, pulpa de mango y cerezas dulces) tratados por APH (Grande Burgos et al., 2017a; Toledo et al., 2016) y también para estudiar los efectos de APH en combinación con la enterocina AS-48 en la diversidad bacteriana de la pulpa de chirimoya (Pérez Pulido et al., 2015) y perejil (Grande Burgos et al., 2017b).

La secuenciación masiva también ha demostrado ser útil para explorar comunidades bacterianas en el intestino de pescado (Ghanbari et al., 2015; Standen et al., 2015; Song et al., 2016), y para caracterizar la microbiota de varios alimentos marinos como filetes de salmón y bacalao, gambas cocidas o filetes de atún de aleta amarilla (Chaillou et al., 2014, Leroi et al., 2015, Silbande et al., 2016) entre otros. A modo de ejemplo, en filetes de corvina roja frescos, los principales grupos bacterianos detectados fueron *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus* y *Kocuria* (Silbande et al., 2018). Por el contrario, tras su almacenamiento a vacío o en atmósfera modificada, la población predominante en el punto de deterioro de los filetes estaba formada por bacterias lácticas, principalmente *Carnobacterium*. En otro estudio, *Acinetobacter* fue el grupo predominante detectado en filetes de carpa común (Zhang et al., 2015). Tras el envasado de los filetes en una atmósfera aerobia, *Pseudomonas* fue el principal grupo detectado en las muestras alteradas. Por el contrario, al final de la vida

útil de las muestras envasadas a vacío predominó *Carnobacterium* seguido de *Aeromonas*, junto con otros grupos en mucha menor proporción (*Shewanella*, *Lactococcus*, y *Pseudomonas*). En otro estudio también realizado sobre filetes de carpa común, los grupos predominantes en las muestras control fueron *Macrocooccus* y *Aeromonas* (Zhang et al., 2017). *Aeromonas* y *Lactococcus* fueron los grupos predominantes en las muestras alteradas tras su almacenamiento a vacío. La adición de aceite de canela disminuyó la abundancia relativa de *Macrocooccus* (Zhang et al., 2017), pero en el caso de *Aeromonas* y *Lactococcus* no se encontraron grandes diferencias entre las muestras control y las tratadas al final de la vida útil de los filetes, con una abundancia relativa muy alta de *Aeromonas* en ambos casos.

II.4.2.-Ventajas y desventajas de la secuenciación masiva

Ninguno de los métodos independientes de cultivo actualmente empleados para estudiar productos alimentarios tienen un rendimiento comparable con HTS. Se pueden analizar miles de secuencias fácilmente, asegurando la identificación rápida y fiable de la mayoría de los microorganismos presentes en las muestras de alimentos. Dependiendo del resultado deseado, se pueden secuenciar muchas muestras a la vez, ahorrando mucho tiempo comparado con otras técnicas utilizadas actualmente. Además, cuando los microbiomas se estudian mediante secuenciación de librerías génicas, se puede obtener información sobre las actividades microbianas a partir de las secuencias de los genes microbianos presentes en la muestra de alimento original, lo que ofrece importantes avances en el estudio de la ecología microbiana de los alimentos. El enfoque de HTS implica una actividad investigadora más segura, con una menor exposición a los reactivos perjudiciales para la salud, como ocurre por ejemplo, para la electroforesis. Además, con algunas tecnologías de secuenciación o mediante el uso de pipeteadores automáticos, existe una contribución casi insignificante del técnico ahorrando así mucho tiempo en el laboratorio (Tabla 3).

Tabla 3.- Ventajas y desventajas del uso de HTS en alimentos.

Ventajas	Desventajas
Alto rendimiento	Necesidad de análisis bioinformático
Detección de varias muestras de alimentos al mismo tiempo	Coste total
Identificación fiable de la mayoría de los microorganismos presentes en las materias primas, durante la producción y almacenamiento de los alimentos	Posibilidades de obtención del equipo para la industria alimentaria
Investigación más segura en comparación con otras técnicas moleculares	
Posibles ideas sobre taxonomía y función actividades en el caso de los estudios de microbioma	

Sin embargo, las desventajas de la técnica (Tabla 3), incluyen la necesidad del análisis bioinformático de datos y, dependiendo de la opción y las condiciones de trabajo específicas, el coste de análisis por muestra. El resultado final de HTS es de miles de secuencias que deben estudiarse para traducirlas a información útil para determinar la biodiversidad microbiana asociada a los alimentos. El análisis bioinformático de la ingente cantidad de datos obtenidos no puede ser realizado por cualquier trabajador de laboratorio, los bioinformáticos deben ser expertos y estar especialmente capacitados para esta actividad y, por lo tanto, las tecnologías HTS no pueden realizarse en cualquier laboratorio y utilizarse de inmediato. Los gastos de análisis han disminuido considerablemente como consecuencia de las nuevas tecnologías de coste inferior actuales y de la competencia entre los proveedores de servicios relacionados con la secuenciación masiva. Sin embargo, el coste inicial del equipo es bastante alto, sobre todo comparado con el coste de un equipo de electroforesis usado para ensayos tradicionales independientes de cultivo. Teniendo en cuenta las ventajas y desventajas, es improbable que la industria alimentaria adquiera fácilmente un equipo y los conocimientos para realizar los análisis de sus alimentos mediante secuenciación masiva. La industria alimentaria probablemente no necesitará el empleo rutinario de esta tecnología y por lo tanto se valdrá de servicios externos para procesar sus propias muestras de alimento.

OBJETIVOS

Las sustancias antimicrobianas naturales resultan cada vez más interesantes para el control de los microorganismos en alimentos, teniendo en cuenta fenómenos que dificultan tremendamente su control como la resistencia a antibióticos y la formación de biopelículas. La enterocina AS-48 es una bacteriocina con un elevado potencial como bioconservante. Determinados componentes activos presentes en aceites esenciales y extractos de plantas muestran una buena actividad antibacteriana frente a microorganismos patógenos. Estudios recientes indican que algunos compuestos activos de aceites esenciales así como algunas bacteriocinas impiden la formación de biopelículas por bacterias patógenas, aunque no existen estudios sobre bacterias alterantes. Con este planteamiento, cabe esperar que las combinaciones de compuestos activos (carvacrol, timol, eugenol, cinamaldehído, tirosol) con enterocina AS-48 presenten mayor actividad antimicrobiana si se aplican inmovilizadas en diferentes tipos de soportes, y que el desarrollo de materiales activados con combinaciones de estos antimicrobianos no solo mejore la inactivación de los microorganismos, sino que interfiera también en las primeras etapas de la formación de biopelículas.

Los tratamientos por alta presión hidrostática (APH), figuran a la cabeza entre los métodos no térmicos para procesado de alimentos, y la inactivación de microorganismos patógenos. El procesado de determinados alimentos por APH requiere la aplicación de tratamientos de baja intensidad de cara a disminuir su impacto sobre las propiedades del alimento. No obstante, los tratamientos de menor intensidad también son menos efectivos en la inactivación de microorganismos. La aplicación de tratamientos por APH de baja intensidad en combinación con antimicrobianos naturales (como los presentes en aceites esenciales y las bacteriocinas) presumiblemente tendría un menor impacto sobre el alimento a la vez que un mayor efecto sobre la inactivación de microorganismos, mejorando la conservación de los alimentos.

La aplicación combinada de plásticos activados con antimicrobianos naturales y tratamientos por APH de baja intensidad parece un enfoque viable para la conservación no térmica de alimentos y para disminuir los riesgos de proliferación de microorganismos durante el almacenamiento, mientras que al mismo tiempo reduce el impacto de los tratamientos en las propiedades fisicoquímicas de los alimentos. A su vez, la eficacia de los antimicrobianos naturales incorporados en los materiales de recubrimiento podría mejor en combinación con otros factores, como la APH.

Existe un creciente interés en comprender los cambios complejos que pueden producirse en la microbiota de los alimentos durante la vida útil del producto como consecuencia de varios factores, como la temperatura de almacenamiento, la atmósfera, los antimicrobianos añadidos o los tratamientos por APH. A pesar de la cantidad de estudios que abordan la eficacia de las APH, aceites esenciales y bacteriocinas en la conservación de alimentos, solo hay información limitada acerca de sus efectos sobre la microbiota de los alimentos. Tampoco se han hecho estudios en profundidad sobre las poblaciones que proliferan en los alimentos tratados durante la vida útil del producto, algunas de las cuales pueden alcanzar concentraciones elevadas a medida que se aproxima la fecha de caducidad. Por otra parte, teniendo en cuenta que los alimentos pueden ser bastante complejos en cuanto a su microbiota, los estudios de diversidad microbiana programados haciendo uso de tecnología de secuenciación masiva nos permitirán conocer mejor el efecto de los films activados con antimicrobianos y los tratamientos por AHP sobre los diferentes grupos de microorganismos que se pueden desarrollar en los alimentos a lo largo de su vida útil.

Teniendo en cuenta los antecedentes arriba mencionados, a la hora de planificar esta tesis doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

- 1- Determinar la efectividad de antimicrobianos derivados de aceites esenciales (carvacrol, timol, eugenol, cinamaldehído, tirosol) y enterocina AS-48 solos o combinados para inhibir la formación de biopelículas en soportes plásticos.
- 2.- Determinar la eficacia de los envases activados con la enterocina AS-48 más timol por separado, o en combinación con alta presión hidrostática sobre la inactivación de *Listeria innocua* en dos alimentos modelo: filetes de dorada y puré de fruta.
- 3- Determinar el impacto de los envases activados con timol y enterocina AS-48 y el tratamiento mediante alta presión hidrostática, solos o combinados, sobre la carga microbiana y la diversidad bacteriana los alimentos objeto de estudio.

TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

ARTÍCULO 1

**Irene Ortega Blázquez, María José Grande Burgos, Rubén Pérez-Pulido,
Antonio Gálvez, Rosario Lucas**

**Inhibition of biofilm formation on plastic materials by activation with
combinations of natural antimicrobials**

***Coatings* (enviado)**

Inhibition of biofilm formation on plastic materials by activation with combinations of natural antimicrobials

Irene Ortega Blázquez, María José Grande Burgos, Rubén Pérez-Pulido,
Antonio Gálvez, Rosario Lucas

Microbiology Division, Department of Health Sciences, University of Jaen,
23071-Jaen, Spain.

*Corresponding author: agalvez@ujaen.es

Abstract

The present study aimed at determining the efficacy of antimicrobials derived from essential oils (carvacrol, thymol, eugenol, cinnamaldehyde, tyrosol) and bacteriocin AS-48, alone or combined in order to inhibit of biofilm formation on plastic supports (low density polyethylene and polyethylene-polyamide films). Best results were obtained with carvacrol and thymol. Antibacterial activity increased considerably when plastic films were activated with enterocin AS-48 in combination with carvacrol or thymol. Low-density polyethylene and polyethylene-polyamide films activated with enterocin AS-48 in combination with carvacrol or thymol were tested for inhibition of biofilm formation. The polyethylene-polyamide vacuum-packaging plastic film activated with a combination of thymol plus enterocin AS-48 was the most effective on inactivation of planktonic cells and inhibition of biofilm formation by *L. innocua*, *Lactobacillus fructivorans*, *Bacillus coagulans* and *Bacillus licheniformis*. Results from the study highlight the potential of polyethylene-polyamide film activated with thymol plus enterocin AS-48 for inhibition of biofilm formation by spoilage Gram-positive bacteria and *Listeria*.

Keywords: phenolic compounds, bacteriocin, biofilm, activated packaging

1. Introduction

Biofilms are defined as microbial communities embedded in a polysaccharide matrix formed at the interface between a solid surface and the fluid that surrounds it (1-3). Biofilms show increased resistance to antibiotics (which poses serious problems in the clinical setting; 4), as well as disinfection processes used in the food industry (5,6). Biofilms are persistent sources of contamination due to the release of planktonic cells and detachment of biofilm portions by mechanical forces. The process of biofilm formation has been studied in detail, and it has been found that in most cases it passes through a series of stages that comprise the initial binding of the bacteria to the substrate in a labile manner, followed of a irreversible binding in which adherent molecules are involved formation of microcolonies, maturation of the biofilm, and finally dispersion of planktonic cells from the mature biofilm (7,8). The ability to form biofilms can vary considerably from one strain to another (9). In most cases, this process is subject to the activation of specific genes through quorum signals (10). Several strategies have been proposed for the control of biofilm formation, such as the use of bacteriocins, bacteriophages, or antimicrobial compounds of diverse nature (11-13).

Bacteriocins are antibacterial peptides that have a spectrum of bactericidal action relatively narrow on strains of the same or related species (14). The production of bacteriocins by lactic acid bacteria (LAB) and its use as biopreservatives has aroused great interest in the last two decades, with numerous bacteriocins being studied (such as nisin, pediocin PA-1/AcH, lactacin 3147 and others), (15-21). At present there is a large body of evidences on the possibilities and limitations of bacteriocins for application as biopreservatives in foods (reviewed by 22-28).

Enterocin AS-48 is a cyclic peptide with potent antimicrobial activity whose structure, genetic determinants and mode of action are well known (28-30). The activity of this bacteriocin against pathogenic or spoiling bacteria in foods of plant origin (raw vegetables, fruit juices, prepared foods, canned products ...) alone or in combination with other antimicrobials (including essential oils and their bioactive components) and physico-chemical treatments (heat, electrical pulses or high-hydrostatic pressure) has been extensively studied by our research group (reviewed by 28, 31-34).

Among the agents with antimicrobial activity, essential oils and their bioactive components also stand out (35). Aromatic plants and spices have been used since ancient times to preserve food and improve its taste. Their antimicrobial activity frequently resides in compounds of phenolic nature, many of which have been characterized in depth (35-38). Among phenolic compounds, we can highlight carvacrol and thymol from oregano oils, eugenol from clove oil, or trans-cinnamaldehyde present in cinnamon oil. All these essential oils are recognized as safe antimicrobials by the Food and Drug Administration. Tyrosol and hydroxytyrosol (two compounds associated with the olive tree and its derivatives such as table olives or olive oil) also show antimicrobial activity (39).

One of the alternatives to prevent the growth of pathogenic or spoiling microorganisms in foods is the use of coatings activated with antimicrobials (40-42). In this way, the antimicrobial is released more slowly which decreases its inactivation through interaction with the food components, providing longer protection at the same time requiring lower concentrations of antimicrobial. Furthermore, the activated packaging serves as barrier against cross contamination of the food with exogenous bacteria, and allows the packaging of the food under modified atmospheres.

Currently, there is a strong interest in the use of natural antimicrobials such as essential oils and their active components in the control of antibiotic-resistant bacteria as well as in the control of biofilm formation. In fact, natural antimicrobial compounds may be a good alternative to combat bacterial biofilms (43). In addition, it is proven that some antimicrobial substances interfere with the formation of biofilms, such as the enterocin AS-48 adsorbed on polystyrene plates against *L. monocytogenes* and *Bacillus cereus* (44). Similarly, some active components of essential oils are able to inhibit the formation of biofilms even when used at subinhibitory concentrations.

2. Material and methods

2.1. Antimicrobial agents

Antimicrobial compounds found in essential oils (carvacrol, thymol, eugenol, cinnamaldehyde, and tyrosol) were from Sigma-Aldrich. Enterocin AS-48 was obtained by cation exchange chromatography as described elsewhere (45).

2.2. Immobilization of different antimicrobials and their combinations

For immobilization tests, we used different plastic materials obtained from supermarkets for use with foods (like wraps, sandwich plastic bags or vacuum-packaging films) as well as commercial Stomacher plastic bags (Table 1).

Plastic materials were cut under aseptic conditions into 1 cm² squares. Activation was performed by immersion of squares in aqueous solutions containing antimicrobials (Table 1) and incubation for 1 h at room temperature with gentle shaking. For each antimicrobial, four different concentrations were tested (Table 1). Antimicrobial were also tested in combination with the bacteriocin enterocin AS-48 at a final bacteriocin concentration of 40 µg/ml (Table 2). The activated plastic squares were

allowed to dry overnight in a biological safety cabinet with ultraviolet light and air stream (Telstar, Madrid, Spain).

The antimicrobial activity of the activated plastic squares was determined by depositing squares on trypticase soya agar plates (TSA, Scharlab, Barcelona, Spain) inoculated with *Listeria innocua* CECT 4030 as indicator bacterium, in triplicate. Following 24 h incubation at 37 °C, the zones of inhibition of bacterial growth (in mm) produced by the diffusion of the antimicrobials in the surrounding the activated material were measured.

2.3. Inhibition of biofilm formation

Plastic squares were activated with a solution containing 0.375% carvacrol or thymol plus 40 µg/ml enterocin AS-48. The activated plastic squares were introduced into sterile 50 ml Falcon tubes containing 5 ml culture media inoculated with 100 µl from an overnight culture of the bacteria to be tested (46): *Bacillus licheniformis* LMG 19409, *Bacillus coagulans* CECT 12, *Lactobacillus fructivorans* CECT 4671 and *L. innocua* CECT 4030. Inoculated cultures containing plastic squares without antimicrobials were used as controls. All samples were incubated at 22 °C with gentle shaking. The culture media used were De Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Scharlab) for lactobacilli and trypticase soya broth (TSB, Scharlab) for the rest of the bacteria tested. At regular intervals of incubation (24, 48 and 72 h), aliquots were taken from the cultures for determination of viable cells by serial dilution and plating on TSA or MRS agar (Scharlab).

In parallel, plastic squares were transferred under aseptic conditions to a new Falcon test tube and rinsed with 5 ml sterile saline solution to remove unattached bacterial cells. After removal of the washing solution, attached cells were recovered in 5

ml sterile saline solution by sonication for 1 min in a sonicator bath (Mod 3510, Branson; Danbury, CT, USA) followed of vortex shaking according to the protocol previously developed in our research group (44). The concentration of viable cells in the resulting suspension was determined by serial dilution and plating. All assays were performed in triplicate.

Biofilm formation on the surfaces of the activated plastic films was followed by fluorescence microscopy. The plastics were washed with sterile saline solution and treated with the BacLight Live/Dead bacterial viability test (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the protocol recommended by the manufactures, and then observed under fluorescence microscopy as described by Nostro et al. (47).

2.4. Statistical analysis

The statistical significance ($p < 0.05$) of differences in viable counts between samples was determined by a paired *t*-test.

3. Results

3.1. Antimicrobial activity of activated films

In a first trial, plastic squares were activated with carvacrol, thymol, eugenol, cinamaldehyde or tyrosol at different concentrations and tested on agar plates inoculated with *Listeria innocua* CECT 4030 (Table 1). The best results were obtained with carvacrol, thymol and eugenol. In the case of carvacrol, inhibition zones exceeding 5 mm from the border of the plastic square were observed for all the plastic materials tested. However, inhibition zones decreased markedly for lower carvacrol concentrations. Nevertheless, no growth was observed under the plastic squares 4, 6, 7 and 8 for carvacrol concentrations as low as 0.25%. For thymol, the largest inhibition

zones were obtained for plastic n° 6, at concentrations of 0.75% and 1.0%. In the case of eugenol, cinnamaldehyde and tyrosol the concentrations tested were higher. Eugenol yielded largest inhibition zones at 2% for plastics 4, 5 and 6. However, the plastic squares became wrinkled and gave off a strong odor. No good results were obtained with cinemaldehyde and tyrosol even at 2%, since only some of the activated plastics yielded inhibition zones, and these were very small.

Control plastic squares not activated with antimicrobials showed no inhibitory activity against *Listeria*.

In order to enhance antimicrobial activity, the two phenolic compounds that showed greatest inhibitory effects at 1% (carvacrol and thymol) were tested in combination with bacteriocin AS-48, choosing two plastics representative of those that gave the best results in the first test, the plastic n° 4: Stomacher® 80 Biomaster closure bag and the plastic n° 6: vacuum packaging film with textured dots. The final concentrations of carvacrol and thymol tested in this case were 0.125, 0.25 and 0.375% in combination with bacteriocin at 40 µg/ml. As shown in Table 2, an increase of inhibition zones against *Listeria* was observed for all combinations at concentrations of 0.25% or above. Large inhibition zones were observed for combinations containing 0.375% of the phenolic compound and bacteriocin.

3.2. Effect of activated films on biofilm formation.

Plastic films numbers 4 (F4) and 6 (F6) activated with carvacrol and thymol (plus bacteriocin) were chosen for assays on inhibition on biofilm formation since they gave the best results among all plastics tested on plate assays. Results on viable cell counts from bacterial cultures carried out with plastic films activated or not with antimicrobials are shown in Table 3.

The activated films F4 containing either carvacrol or thymol in combination with enterocin AS-48 were effective in reducing the levels of viable *Listeria* below the detection limit in the cultured broth (planktonic state). *Listeria innocua* was able to form biofilms on both plastic films without antimicrobials, with no statistical differences between F4 and F6 control films. Activated F4 films also were effective in the inhibition of biofilm formation, since no viable cells were detected from the activated plastic films after 24 and 72 h incubation. Furthermore, viable counts obtained for activated F4 films at 48 h were significantly lower ($p < 0.05$) by 4.53 to 4.80 log cycles compared to the control plastic films without antimicrobials. Film F6 activated with carvacrol plus enterocin AS-48 reduced viable counts in both planktonic and sessile states below detectable levels at 24 and 72 h. It also reduced viable counts significantly ($p < 0.05$) at 48 h incubation for both the planktonic and sessile states by 6.54 and 3.68 log cycles, respectively. F6 film activated with thymol plus enterocin AS-48 was the most effective, since no viable cells were detected from either planktonic or sessile state samples during the whole sampling period.

Tests with *L. fructivorans* indicated that all activated films were able to reduce viable counts of this bacterium in the planktonic state significantly ($p < 0.05$) compared with the controls. This effect was greatest for F6 films at 24 h, since viable cell concentrations were reduced below detectable levels. *L. fructivorans* showed a stronger capacity for biofilm formation on F6 control films, with viable counts 1.85 log cycles higher ($p < 0.05$) than F4 films at 72 h incubation. All activated plastic films were able to inhibit biofilm formation for at least 48 h, but not for 72 h. Yet, the concentrations of viable cells recovered from the activated films after 72 h were significantly lower ($p < 0.05$) by 2.44 to 4.07 log cycles compared to non-activated control plastic films.

Viable counts of planktonic *B. coagulans* cells were significantly lower ($p < 0.05$) for activated F4 films compared to controls, and were also lower ($p < 0.05$) in samples containing F4 films activated with carvacrol compared to thymol. *B. coagulans* showed a greater capacity to form biofilms on F6 control films compared to F4 control films, as shown by the significantly higher ($p < 0.05$) cell concentrations recovered from F6 control films at all sampling points. For the activated F4 films, sessile cell counts at 24 h only were significantly lower ($p < 0.05$) than controls for the films activated with carvacrol plus bacteriocin, but not for the thymol-activated films. However, viable counts were reduced below detectable levels at 72 h for both carvacrol and thymol-activated films, and only some viable cells were detected in the thymol-activated films at 72 h. Activated F6 films showed higher efficacy in reducing both planktonic and sessile *B. coagulans* viable counts, and viable cells only were detected at some points during storage. Remarkably, the F6 film activated with thymol plus bacteriocin was the most effective, since no viable cells were detected for any of the samples.

B. licheniformis grew more slowly in the control samples compared to the rest of the bacteria tested. In the control samples incubated with activated plastic films, viable counts for planktonic cells were below detection levels for most of the samples. The exception was 48 h samples incubated with F4 film activated with carvacrol plus enterocin AS-48, in which viable counts (1.48 log CFU/ml) were significantly lower ($p < 0.05$) than controls by 4.45 log cycles. For the sessile state, viable counts from control F6 films were non-significantly higher than F4 film. In the case of films activated with antimicrobials, no viable cells were detected for any of the films and storage points.

These results were confirmed by fluorescence microscopy. The treated plastic films showed much lower numbers of attached viable cells compared to controls without antimicrobials (Figure 1). This effect on cell viability was dependant on the plastic and the antimicrobial applied in combination with bacteriocin.

4. Discussion

Food packaging films impregnated or coated with antimicrobial agents could potentially extend the shelf life and improve the microbial safety of food products (48). Results from the present study indicated that plastic films activated with carvacrol and thymol showed greatest inhibitory activities compared to the other antimicrobials tested, cinnamaldehyde, eugenol and tyrosol. Previous studies showed that carvacrol and thymol incorporated on plastic films at concentrations of 1% or greater inhibited growth of foodborne pathogens *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* or *B. cereus* and spoilage bacteria *B. thermosphacta* and *Carnobacterium* sp. (49-53). Previous studies also showed that the bactericidal effect of enterocin AS-48 solutions against *L. monocytogenes* was enhanced by several essential oils as well as carvacrol, eugenol, thymol, terpineol, tyrosol and hydroxytyrosol (54). According to results from the present study, the activity of carvacrol and thymol applied on plastic films could be enhanced considerably in combination with enterocin AS-48. This enhanced activity was shown not only on planktonic cells but also on biofilm formation on the two plastic surfaces tested. Results obtained on planktonic cells could be explained by diffusion of the antimicrobials from the plastic film surfaces into the medium. According to the results obtained on planktonic cells, plastic film n° 6 was the best carrier for immobilization of the tested antimicrobials. This plastic film is widely used for vacuum-packaging of foods, so there could be a potential for the commercial application of the activated film.

It is also worth noting that, among the four bacteria included in the study, *L. innocua* was the most sensitive to the antimicrobials tested. Previous studies have shown that *L. monocytogenes* is highly sensitive to enterocin AS-48, with a minimum bactericidal concentration around 1 µg/ml (55). However, another study reported that *L. monocytogenes* was much more resistant to this bacteriocin in the sessile state (44). In the present study, *L. fructivorans* was much more resistant in the planktonic state compared to *Listeria*, in spite of the strong inhibition of biofilm formation observed. The endospore former *B. coagulans* was apparently more resistant than *B. licheniformis*. This difference in resistance could also be related to the lower number of cells found in cultures of *B. licheniformis*. However, both bacteria were very sensitive to the combination of thymol and AS-48 immobilized on film nº 6. By contrast, film nº 4 was much less effective on the higher cell density culture of *B. coagulans*, suggesting that the type of plastic support also has an influence on the efficacy of the activated film.

One of the main causes of food contamination is the formation of bacterial biofilms, because biofilms represent a persistent reservoir of bacteria and provide extra protection against disinfection (56). Results from the present study clearly indicate that activation of plastic films with a combination of phenolic compounds and bacteriocin AS-48 caused strong inhibition of biofilm formation. This inhibitory effect was associated in most cases to a decrease or complete inactivation of planktonic cells as well. However, in some cases, biofilm formation was completely inhibited even in the presence of a relatively high residual population of planktonic cells as in the case of *L. fructivorans* at 24 and 48 h incubation. The observed inhibition of biofilm formation is important, since biofilm formation may protect bacterial cells from antimicrobial substances by creating a diffusion barrier. Previous studies showed that enterocin AS-48 inhibited biofilm formation by *L. monocytogenes* and *B. cereus* (44). Other studies have

shown that bacteriocins can inhibit biofilm formation by human pathogenic bacteria (57-61). Regarding essential oils, several studies have reported on their inhibitory effects of biofilm formation on bacterial pathogens (62-67). Carvacrol, cinnamaldehyde and thymol were reported to inhibit gene activation by quorum sensing and this was related to inhibition of biofilm formation (35, 68-70). Incorporated in plastic films for food packaging, carvacrol and cinnamaldehyde were reported to inhibit biofilm formation (47). Results from the study indicated that the combination of enterocin AS-48 with thymol was superior to carvacrol both on planktonic cells and on inhibition of biofilm formation. Thymol is one of the major constituents of thyme oil (71), and is also commercially available at relatively low price, which makes this compound feasible for food application.

Altogether, results from the present study highlight the potential of thymol in combination with enterocin AS-48 for activation of plastic films intended for food packaging, creating a natural hurdle against proliferation of spoilage and potentially-pathogenic Gram-positive bacteria.

Acknowledgements

This work was supported by grants P08-AGR-4295 (Junta de Andalucía) and Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (Grupo AGR230).

References

1. Branda, S.S.; Vik, A.; Friedman, L.; Kolter, R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 20–26.
2. Jefferson, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *236*, 163–173.
3. Steenackers, H.; Hermans, K.; Vanderleyden, J.; De Keersmaecker, S.C.J. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* **2012**, *45*, 502–531.
4. Hoiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Møli, S.; Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob.* **2010**, *35*, 322–332.
5. Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.W.; Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 95–108.
6. Van Houdt, R.; Michiels, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 1117–1131.
7. Davey, M.E.; O'toole, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 847–867.
8. Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D.G.; Costerton, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, *56*, 187–209.
9. Díez-García, M.; Capita, R.; Alonso-Calleja, C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol.* **2012**, *31*, 173–180.
10. Wu, H.; Song, Z.; Hentzer, M.; Andersen, J.B.; Molin, S.; Givskov, M.; Høiby, N. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *53*, 1054–1061.
11. Coughlan, L.M.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Alvarez-Ordóñez, A. New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1641.
12. Gutiérrez, D.; Rodríguez-Rubio, L.; Martínez, B.; Rodríguez, A.; García, P. Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 825.

13. Sadekuzzaman, M.; Yang, S.; Mizan, M.F.R.; Ha, S.D. Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2015**, *14*, 491–509.
14. Jack, R.W.; Tagg, J.R.; Bay, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 171–200.
15. Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 777–788.
16. Fimland, G.; Johnsen, L.; Dalhus, B.; Nissen-Meyer, J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Peptide Sci.* **2005**, *11*, 688–696.
17. Drider, D.; Fimland, G.; Héchard, Y.; McMullen, L.M.; Prévost, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 564–582.
18. Franz, C.M.A.P.; van Belkum, M.J.; Holzapfel, W.H.; Abriouel, H.; Gálvez, A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping into a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* **2007**, *31*, 293–310.
19. Beshkova, D.; Frengova, G. Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Eng. Life Sci.* **2012**, *12*, 1–14.
20. Zhang, H.; Liu, L.; Hao, Y.; Zhong, S.; Liu, H.; Han, T.; Xie, Y. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product. *Microbiol. Immunol.* **2013a**, *57*, 746–755.
21. Zhang, T.; Pan, Y.; Zhang, J.; Chen, Y.; Chen, L. Molecular cloning and antimicrobial activity of enterolysin A and helveticin J of bacteriolysins from metagenome of Chinese traditional fermented foods. *Food Control.* **2013b**, *31*, 499–507.
22. Cleveland, J.; Montville, T.J.; Nes, I.F.; Chikindas, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *71*, 1–20.
23. Deegan, L.H.; Cotter, P.D.; Hill, R.; Ross P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 1058–1071.
24. Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R.L.; Ben Omar, N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *120*, 51–70.

25. Gálvez, A.; Lucas-López, R.; Abriouel, H.; Valdivia, E.; Ben-Omar, N. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Rev. Biotechnol.* **2008**, *28*, 125–152.
26. Gálvez, A.; Abriouel, H.; Benomar, N.; Lucas, R. Microbial antagonists to foodborne pathogens and biocontrol *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 142–148.
27. Galvez, A.; Lucas, R.; Pérez Pulido, R.; Grande Burgos, M.J. Food Biopreservation (R.W. Hartel, Ed). Springer, NY. **2014**.
28. Abriouel, H.; Lucas, R.; Ben-Omar, N.; Valdivia, E.; Gálvez, A. Potential applications of the cyclic peptide enterocin AS-48 in the preservation of vegetable foods and beverages. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* **2010**, *2*, 77–89.
29. Maqueda, M.; Gálvez, A.; Martínez-Bueno, M.; Sanchez-Barrena, M.J.; González, C.; Albert, A. Peptide AS-48: Prototype of a newclass of cyclic bacteriocins. *Curr. Prot. Pep. Sci.* **2004**, *5*, 399–416.
30. Grande-Burgos, M.J.; Pérez-Pulido, R.; López-Aguayo, M.C.; Gálvez, A.; Lucas, R. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: Isolation, mode of action, and possible food applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 22706–22727.
31. Pérez Pulido, R.; Toledo del Árbol, J.; Grande Burgos, M.J.; Gálvez, A. Bactericidal effects of high hydrostatic pressure treatment singly or in combination with natural antimicrobials on *Staphylococcus aureus* in rice pudding. *Food Control.* **2012**, *28*, 19–24.
32. Toledo del Árbol, J.; Pérez Pulido, R.; La Stora, A.; Grande Burgos, M.J.; Lucas, R.; Ercolini, D.; Gálvez, A. Microbial diversity in pitted sweet cherries (*Prunus avium* L.) as affected by high hydrostatic pressure treatment. *Food Res. Int.* **2016a**, *89*, 790–796.
33. Toledo del Árbol, J.; Pérez Pulido, R.; La Stora, A.; Grande Burgos, M.J.; Lucas, R.; Ercolini, D.; Gálvez, A. Changes in microbial diversity of brined green asparagus upon treatment with high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* **2016b**, *216*, 1–8.
34. Grande Burgos, M.J.; López Aguayo, M.C.; Pérez Pulido, R.; Galvez, A.; Lucas, R. Analysis of the microbiota of refrigerated chopped parsley after treatments with a coating containing enterocin AS-48 or by High-Hydrostatic Pressure. *Food Res. Int.* **2017**, *99*, 91–97.

35. Burt, S.A.; Ojo-Fakunle, V.T.A.; Woertman, J.; Veldhuizen, E.J.A. The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations *PLOS one*. **2014**, *9*, e93414.
36. Holley, R.A.; Patel, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* **2005**, *22*, 273–292.
37. Reichling, J.; Schnitzler, P.; Suschke, U.; Saller, R. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview Aromatic plants. *Forsch Komplementmed* **2009**, *16*, 79–90.
38. Solórzano-Santos, F.; Miranda-Navales, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotech.* **2012**, *23*, 136–141.
39. Capasso, R.; Evidente, A.; Schivo, L.; Orru, G.; Marcialis, M.A.; Cristinzio, G. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Microbiol.* **1995**, *79*, 4.
40. Coma, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 90–103.
41. Vargas, M.; Pastor, C.; Chiralt, A.; McClements, J.; Gonzalez-Martínez, C. Recent Advances in Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *486*, 496–511.
42. Sung, S.Y.; Sin, L.T.; Bee, S.T.; Rahmat, A.R. Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *33*, 110–123.
43. Bazaka, K.; Jacob, M.V.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P. Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 299–311.
44. Caballero Gómez, N.; Abriouel, H.; Grande, M.A.; Pérez Pulido, R.; Gálvez, A. Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* **2012**, *30*, 51–58.
45. Abriouel, H.; Valdivia, E.; Martínez-Bueno, M.; Maqueda, M.; Gálvez, A. Method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J. Microbiol. Meth.* **2003**, *55*, 599–605.
46. Nostro, A.; Scaffaro, R.; D'Arrigo, M.; Botta, L. Development and characterization of essential oil component-based polymer films: a potential approach to reduce bacterial biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9515–9523.

47. Nostro, A.; Scaffaro, R.; D'Arrigo, M.; Botta, L.; Filocamo, A.; Marino, A.; Bisignani, G. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96*, 1029–1038.
48. Kuorwel, K.K.; Cran, M.J.; Sonneveld, K.; Miltz, J.; Bigger, S.W. Essential Oils and Their Principal Constituents as Antimicrobial Agents for Synthetic Packaging Films. *J. Food Sci.* **2011a**, *76*, R164–R177.
49. Persico, P.; Ambrogi, V.; Carfagna, C.; Cerruti, P.; Ferrocino, I.; Mauriello, G. 2009. Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. *Polym. Eng. Sci.* **2009**, *49*, 1447–1455.
50. López, P.; Sánchez, C.; Batlle, R.; Nerín, C. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* **2007a**, *55*, 4348–56.
51. López, P.; Sánchez, C.; Batlle, R.; Nerín, C. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *J. Agric. Food Chem.* **2007b**, *55*, 8814–8824.
52. Gutierrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 142–50.
53. Kuorwel, K.K.; Cran, M.J.; Sonneveld, K.; Miltz, J.; Bigger, S.W. Antimicrobial Activity of Natural Agents Coated on Starch-Based Films against *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.* **2011b**, *75*, E126–E133.
54. Cobo Molinos, A.; Abriouel, H.; Ben Omar, N.; Lucas, R.; Valdivia, E.; Gálvez, A. 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.* **2009a**, *47*, 2216–2223.
55. Mendoza, F.; Maqueda, M.; Gálvez, A.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E. 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 618–625.
56. Srey, S.; Jahid, I.K.; Ha, S.D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control.* **2013**, *31*, 572–585.

57. Kumar, S.; Parvathi, A.; George, J.; Krohne, G.; Karunasagar, I. A study on the effects of some laboratory-derived genetic mutations on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25*, 527–531.
58. Winkelströter, L.K.; Gomes, B.C.; Thomaz, M.R.S.; Souza, V.M.; De Martinis, E.C.P. *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control.* **2011**, *22*, 1404–1407.
59. Sudagidan, M.; Yemenicioğlu, A. Effects of Nisin and Lysozyme on Growth Inhibition and Biofilm Formation Capacity of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Raw Milk and Cheese Samples. *J. Food Prot.* **2012**, *75*, 1627–1633.
60. Bolocan, A.S.; Pennone, V.; O'Connor, P.M.; Coffey, A.; Nicolau, A.I.; McAuliffe, O.; Jordan, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* biofilms by bacteriocin-producing bacteria isolated from mushroom substrate. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *122*, 279–293.
61. Camargo, A.C.; de Paula, O.A.; Todorov, S.D.; Nero, L.A. In Vitro Evaluation of Bacteriocins Activity Against *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2016**, *178*, 1239–1251.
62. Pérez-Conesa, D.; McLandsborough, L.; Weiss, J. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. *J. Food Prot.* **2006**, *69*, 2947–2954.
63. Lebert, I.; Leroy, S.; Talon, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Food Microbiol.* **2007**, *24*, 281–287.
64. Nostro, A.; Sudano Roccaro, A.; Bisignano, G.; Marino, A.; Cannatelli, M.A.; Pizzimenti, F.C.; Cioni, P.L.; Procopio, F.; Blanco, A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.* **2007**, *56*, 519–523.
65. Karpanen, T.J.; Worthington, T.; Hendry, E.R.; Conway, B.R.; Lambert, P.A. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *62*, 1031–1036.
66. Soni, K.A.; Oladunjoye, A.; Nannapneni, R.; Schilling, M.W.; Silva, J.L. Inhibition and inactivation of *Salmonella* Typhimurium biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. *J. Food Protect.* **2013**, *67*, 205–212.

67. Upadhyaya, I.; Upadhyay, A.; Kollanoor-Johny, A.; Baskaran, S.A.; Mooyottu, S.; Darre, M.J.; Venkitanarayanan, K. Rapid inactivation of *Salmonella* Enteritidis on shell eggs by plant-derived antimicrobials. *Poult. Sci.* **2013**, *92*, 3228–3235.
68. Knowles, J.R.; Roller, S.; Murray, D.B.; Naidu, A.S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 797–803.
69. Niu, C.; Afre, S.; Gilbert, E.S. Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *43*, 489–494.
70. Zhou, X.X.; Li, W.F.; Ma, G.X.; Pan, Y.J. The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements. *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 285–295.
71. Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Meyer, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol.* **2012**, *3*, 12.

Table 1: Antimicrobial activity of activated films.

Antimicrobials	Film*							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Carvacrol 0.25%	-	-	-	+	-	+	+	+
Carvacrol 0.5%	-	-	-	+	-	+	+	+
Carvacrol 0.75%	+	-	++	+	++	+	+	+
Carvacrol 1.0%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Thymol 0.25%	-	-	-	-	-	+	-	-
Thymol 0.5%	-	-	+	+	-	+	+	+
Thymol 0.75%	-	-	+	+	-	+++	++	+
Thymol 1.0%	++	+	+	+	+	+++	++	+
Eugenol 0.5%	-	-	-	-	-	+	+	+
Eugenol 1.0%	+	+	+	+	+	+	+	+
Eugenol 1.5%	+	+	+	+	++	++		+
Eugenol 2.0%	+	++	+	+++	+++	+++	++	+
Tyrosol 0.5%	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyrosol 1.0%	-	-	-	-	-	+	-	+
Tyrosol 1.5%	-	-	-	-	-	+	-	+
Tyrosol 2.0%	-	-	-	-	-	+	-	+
Cinnamaldehyde 0.5%	-	-	-	-	-	-	-	-
Cinnamaldehyde 1.0%	-	-	-	-	-	-	-	-
Cinnamaldehyde 1.5%	-	-	-	-	-	-	-	-
Cinnamaldehyde 2.0%	-	-	-	-	-	-	+	+

*1: Sandwich bag with clasp. 2: Sandwich bag without clasp. 3: Stomacher® 80 Biomaster standard bag. 4: Stomacher® 80 Biomaster closure bag. 5: Transparent saran wrap. 6: Vacuum-packaging film with textured dots. 7: Vacuum-packaging film with textured hexagons. 8: Vacuum-packaging film with textured squares. Films 1 to 5 were made from low-density polyethylene. Films 6 to 8 were from polyethylene-polyamide. Antibacterial activity was recorded as - (no activity), + (clear inhibition zones under the activated film), ++ (clear inhibition zones extending 2 to 5 mm from the border mark of the activated film) or +++ (clear inhibition zones extending > 5 mm from the border mark of the activated film).

Table 2: Antimicrobial activity of activated films combined with bacteriocin.

Antimicrobial	Film	
	4	6
AS-48	++	++
Carvacrol 0.125% + AS-48	++	++
Carvacrol 0.25% + AS-48	+++	+++
Carvacrol 0.375% + AS-48	++++	++++
Thymol 0.125% + AS-48	++	++
Thymol 0.25% + AS-48	+++	+++
Thymol 0.375% + AS-48	++++	++++

Film 4: Stomacher® 80 Biomaster closure bag. 6: Vacuum packaging film with textured dots. Antibacterial activity was recorded as – (no activity), + (clear inhibition zones below the activated film), ++ (clear inhibition zones extending 2 to 5 mm from the border mark of the activated film), +++ (clear inhibition zones extending 5 to 8 mm from the border mark of the activated film), or ++++ (clear inhibition zones extending > 8 mm from the border mark of the activated film).

Table 3. Effect of plastic films activated with carvacrol or thymol in combination with enterocin AS-48 on biofilm formation by different bacteria.

Bacteria and treatment	Planktonic cells (log CFU/ml)			Sessile cells (log CFU/ml)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>Listeria innocua</i>						
F4C	9.17 ± 0.07	9.32 ± 0.03	8.82 ± 0.04	7.15 ± 0.15	7.14 ± 0.19	7.08 ± 0.11
F4Cvc-AS-48	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	2.61 ± 0.29	<1.0
F4Thy-AS-48	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	2.34 ± 0.04	<1.0
F6C	8.91 ± 0.10	8.92 ± 0.18	8.85 ± 0.10	7.40 ± 0.28	7.18 ± 0.15	7.23 ± 0.18
F6Cvc-AS-48	<1.0	2.38 ± 0.15	<1.0	<1.0	3.50 ± 0.08	<1.0
F6Thy-AS-48	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
<i>Lactobacillus fructivorans</i>						
F4C	7.51 ± 0.15	8.45 ± 0.07	9.51 ± 0.18	4.40 ± 0.08	5.20 ± 0.21	4.87 ± 0.24
F4Cvc-AS-48	3.34 ± 0.13	4.15 ± 0.21	5.50 ± 0.17	<1.0	<1.0	2.43 ± 0.32
F4Thy-AS-48	3.50 ± 0.20	3.54 ± 0.20	4.48 ± 0.28	<1.0	<1.0	2.18 ± 0.25
F6C	7.78 ± 0.11	8.56 ± 0.18	9.45 ± 0.07	4.80 ± 0.18	6.20 ± 0.28	6.67 ± 0.32
F6Cvc-AS-48	<1.0	3.48 ± 0.15	5.47 ± 0.18	<1.0	<1.0	2.60 ± 0.41
F6Thy-AS-48	<1.0	3.50 ± 0.14	4.47 ± 0.10	<1.0	<1.0	3.36 ± 0.23
<i>Bacillus coagulans</i>						
F4C	6.12 ± 0.17	8.19 ± 0.27	8.30 ± 0.12	3.63 ± 0.18	5.96 ± 0.23	6.28 ± 0.25
F4Cvc-AS-48	2.47 ± 0.07	1.30 ± 0.14	2.20 ± 0.24	1.69 ± 0.17	<1.0	<1.0
F4Thy-AS-48	4.93 ± 0.23	4.46 ± 0.23	3.32 ± 0.21	3.17 ± 0.29	<1.0	1.0 ± 0.18
F6C	6.00 ± 0.16	8.35 ± 0.21	8.11 ± 0.16	5.36 ± 0.12	7.45 ± 0.16	8.08 ± 0.25
F6Cvc-AS-48	<1.0	1.48 ± 0.25	1.60 ± 0.27	<1.0	1.84 ± 0.19	<1.0
F6Thy-AS-48	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
<i>Bacillus licheniformis</i>						
F4C	3.0 ± 0.08	5.93 ± 0.14	6.40 ± 0.19	1.95 ± 0.17	3.91 ± 0.15	4.28 ± 0.25
F4Cvc-AS-48	<1.0	1.48 ± 0.11	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
F4Thy-AS-48	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
F6C	3.70 ± 0.19	6.65 ± 0.18	7.22 ± 0.31	1.77 ± 0.10	4.98 ± 0.25	4.86 ± 0.23
F6Cvc-AS-48	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
F6Thy-AS-48	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0

F4: Stomacher® 80 Biomaster closure bag. F6: Vacuum-packaging film with textured dots. C, control films not activated with antimicrobials. Cvc-AS-48: Films activated with carvacrol plus enterocin AS-48. Thy-AS-48: Films activated with thymol plus enterocin AS-48.

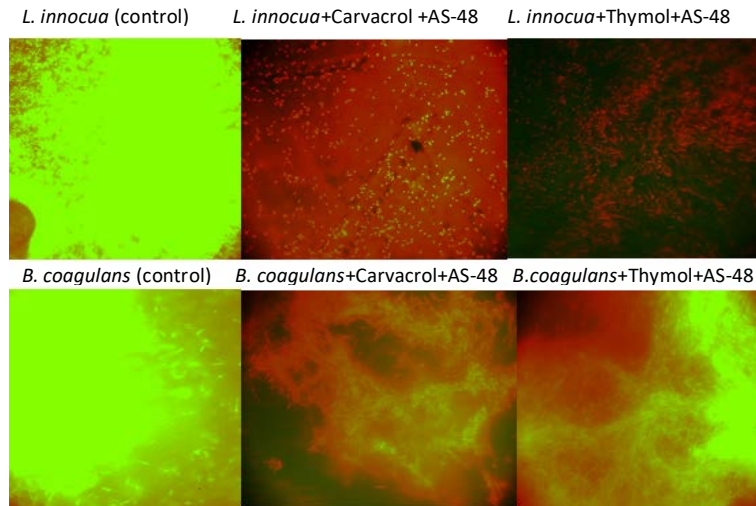


Figure 1. Live-dead viability staining of biofilms formed by *L. innocua* and *B. coagulans* on control and activated plastic films.

ARTÍCULO 2

**Irene Ortega Blázquez, María José Grande Burgos, Rubén Pérez-Pulido,
Antonio Gálvez, Rosario Lucas**

**Inactivation of *Listeria* in foods packed in films activated with
enterocin AS-48 plus thymol singly or in combination with high-
hydrostatic pressure treatment.**

***Coatings* 7:204.**

Article

Inactivation of *Listeria* in Foods Packed in Films Activated with Enterocin AS-48 plus Thymol Singly or in Combination with High-Hydrostatic Pressure Treatment

Irene Ortega Blázquez, María José Grande Burgos, Rubén Pérez-Pulido, Antonio Gálvez * and Rosario Lucas

Department of Health Sciences, University of Jaen, 23071 Jaén, Spain; iob00003@red.ujaen.es (I.O.B.); mjgrande@ujaen.es (M.J.G.B.); rppulido@ujaen.es (R.P.-P.); rluca@ujaen.es (R.L.)

* Correspondence: agalvez@ujaen.es; Tel.: +34-953-212160

Academic Editor: Stefano Farris

Received: 16 October 2017; Accepted: 15 November 2017; Published: 18 November 2017

Abstract: The aim of the present study was to determine the efficacy of films activated with enterocin AS-48 plus thymol singly, or in combination with high-hydrostatic pressure (HHP) on the inactivation of *Listeria innocua* in sea bream fillets and in fruit puree stored under refrigeration for 10 days. *L. innocua* proliferated in control fish fillets during storage. The activated film reduced viable *Listeria* counts in fillets by 1.76 log cycles and prevented growth of survivors until mid-storage. Application of HHP treatment to fillets packed in films without antimicrobials reduced *Listeria* counts by 1.83 log cycles, but did not prevent the growth of survivors during storage. The combined treatment reduced viable counts by 1.88 log cycles and delayed growth of survivors during the whole storage period. *L. innocua* survived in puree during storage. The activated film reduced *Listeria* counts by 1.80 and 2.0 log cycles at days 0 and 3. After that point, *Listeria* were below the detection limit. No viable *Listeria* were detected in the purees after application of HHP treatment singly, or in combination with the activated film. Results from the study indicate that the efficacy of activated films against *Listeria* is markedly influenced by the food type.

Keywords: *Listeria*; activated film; bacteriocin; thymol; high-hydrostatic pressure; fish fillets; fruit puree

1. Introduction

Listeria monocytogenes is a psychrotrophic foodborne Gram-positive bacterium which is widely found in the environment, such as in plants, soil, animal, water, dirt, dust, and silage [1,2]. In the EU, there was a statistically significant increasing trend of listeriosis over 2008–2015, with a case fatality of 17.7% [3]. Ready-to-eat (RTE) fish and other fishery products showed the highest percentages of non-compliance at retail, followed by other foods of animal origin, such as meats and dairy products [3]. *L. monocytogenes* was also reported in vegetables, fruits, and fruit puree [3]. Consumption of fruits and vegetables contaminated with *L. monocytogenes* resulted in outbreaks of listeriosis [4,5]. Therefore, it is of the utmost importance to reduce the risks for transmission of this bacterium through the food chain.

One approach to reduce transmission of foodborne pathogens is the application of biologically-derived compounds like bacteriocins and phytochemicals in antimicrobial food packaging [6–8]. Antimicrobial packaging increases the shelf life, safety, and quality of many food products by reducing microbial growth in non-sterile foods and minimizing the hazard of post-contamination of processed products [9]. Antimicrobial packaging achieves a slow migration of antimicrobial agents from an area of high concentration (packaging material) to an area of low concentration (food), providing a more prolonged exposure of bacteria to antimicrobials and decreasing

the loss of antimicrobial activity upon interaction with the food matrix [10]. When used as part of hurdle technology [11], activated films can improve microbial inactivation in foods.

Films activated with natural antimicrobials have been tested for inhibition of foodborne pathogens in several studies, as exemplified by bacteriocins [12–17] and plant essential oils, or their bioactive compounds [18–24]. Enterocins are the bacteriocins produced by enterococci. Enterocin AS-48 is a 7.2-kDa circular peptide produced by *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* strains [25]. Enterocin AS-48 (either singly, or in combination with other antimicrobials) is active against foodborne pathogens and food spoilage bacteria [25]. The anti-*Listeria* activity of enterocin AS-48 can be potentiated by thymol [26] and by high-hydrostatic pressure (HHP) [27]. The combined application of films activated with natural antimicrobials and HHP treatments of low intensity seems a feasible approach for non-thermal preservation of foods and for decreasing the risks of proliferation of survivors during storage, while at the same time reducing the impact of treatments on the food physico-chemical properties.

The aim of the present study was to determine the anti-*Listeria* effects of films activated with a mixture of enterocin AS-48 and thymol (a cheap, commercially available antimicrobial), singly, or in combination with a mild HHP treatment. Foods having pH values close to neutral (sea bream fillets) or acidic pH (fruit puree) were chosen as model food systems for the assays.

2. Materials and Methods

2.1. Inoculum Preparation

Listeria innocua (CECT 4030) was used as a surrogate of *L. monocytogenes*. The strain was supplied by the Spanish Type Culture Collection (CECT, Burjasot, Valencia, Spain). The bacterium was cultivated overnight at 37 °C on trypticase soy broth (TSB, Scharlab, Barcelona, Spain) and diluted ten-fold in sterile saline solution.

2.2. Preparation of Activated Plastic Bags

Enterocin AS-48 was prepared by cation exchange chromatography following a previously-described procedure [28]. Thymol was from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Polyethylene-polyamide bags (10 × 15 cm²) were activated by addition of 1 mL enterocin AS-48 solution (0.5 µg/µL) plus 1 mL 0.5% thymol followed by hand rubbing to ensure impregnation of the whole inner bag surface. After incubation for one hour at ambient temperature, the remaining liquid inside the bags was removed and the bags were allowed to dry for one hour in a biosafety cabinet (Telstar, Madrid, Spain) under UV irradiation in order to avoid contamination.

2.3. Sample Preparation, Treatments, and Microbiological Analysis

The efficacy of activated bags against *Listeria* was tested in two model food systems: a fruit puree, having an acidic pH, and fish fillets having a pH close to neutrality. Fruit puree was prepared from Golden Delicious apples, pears, and bananas bought at a local supermarket. Fruits were peeled under aseptic conditions and mixed in equal amounts. The fruit mixture was processed with a domestic blender for 1 min to obtain the fruit puree. Fillets from sea bream (*Sparus aurata*) with skin were purchased at a local supermarket and cut into 5 g portions with a sterile knife under aseptic conditions. The pH of samples was measured with a pH meter (Crison, Barcelona, Spain). All food samples (5 g fruit puree, 5 g sea bream portions) were spiked with *L. innocua* to yield approximately 5.3–5.5 log CFU/g, packed in the activated bags and sealed under vacuum. In parallel, food samples spiked with *L. innocua* were packed in bags that had not been activated with any antimicrobial treatment. For each type of food and treatment, two batches (each one in triplicate) were prepared. Half of the samples (packed in films activated with antimicrobials, or not) were treated by high-hydrostatic pressure (HHP) at 300 MPa for 5 min while the rest were not treated. HHP treatment was applied with a Stansted Fluid Power LTD HHP equipment (SFP, Essex, UK) operating under standard conditions

described elsewhere [29]. All samples (packed in films with or without antimicrobials, and treated by HHP, or not) were stored at 5 °C for 10 days. At desired incubation times, bags (in triplicate) were removed and the food content was pooled and homogenized with 10 mL sterile buffered peptone water (Scharlab, Barcelona, Spain). The resulting homogenate was serially diluted in sterile saline solution (0.85% NaCl, Scharlab) and plated in triplicate on polymyxin B-acriflavine-lithium chloride-ceftazidime-aesculin-mannitol (PALCAM) agar with added antibiotic supplement (Scharlab). The average number of colonies obtained after 24–48 h incubation of the plates at 37 °C was used to calculate the viable cell concentration (expressed as log colony forming units (CFU)/g).

2.4. Statistical Analysis

The average data \pm standard deviations from replicates were determined with Excel programme (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). A paired *t*-test was performed at the 95% confidence interval in order to determine the statistical significance of data (Statgraphics Plus version 5.1, Statistical Graphics Corp., Princeton, NJ, USA).

3. Results

Sea bream fillets (pH 6.48) inoculated with *L. innocua* were packed in plastic bags activated or not with antimicrobials and then treated or not by HHP (Table 1). For the controls (samples packed in plastic bags without antimicrobials and without HHP treatment), viable *Listeria* counts already increased by day 5, and were significantly higher ($p < 0.05$) by 1.7 log cycles at the end of storage period. The activated film packaging significantly ($p < 0.05$) reduced viable cell counts by 1.76 log cycles, and delayed growth of the bacterium during storage. Viable *Listeria* counts for samples packed in the activated film remained significantly ($p < 0.05$) lower than controls by 1–2.67 log cycles within the first seven days of storage. However, *Listeria* counts reached the same value as controls by the end of storage period. Application of HHP treatment to samples packed in films without antimicrobials reduced *Listeria* counts significantly ($p < 0.05$) by 1.83 log cycles. However, multiplication of survivors during storage resulted in viable counts that were not significantly lower ($p > 0.05$) than controls for storage times 3, 5, and 7. Application of HHP treatment to samples packed in activated films achieved a significant ($p < 0.05$) reduction of viable counts by 1.88 log cycles. Growth of survivors was also delayed until the end of storage, with a significant ($p < 0.05$) increase in the concentration of *Listeria* of only one log cycle. Compared to the single activated film treatment, the combined treatment achieved a more prolonged delay in growth of the surviving *Listeria* population and achieved significantly ($p < 0.05$) lower viable counts at the end of storage (day 10), but not earlier. Compared to the single HHP treatment, the HHP treatment in combination with the activated film achieved significantly ($p < 0.05$) lower *Listeria* counts (1.28–3.15 log cycles) during storage times 3, 5, and 7.

Table 1. Viable cell counts for *Listeria* in sea bream fillets challenged with the bacterium and stored under refrigeration. Fillets were packed in polyethylene-polyamide bags without any treatment (controls), or in bags activated with 0.5% thymol plus 80 mg/mL enterocin AS-48. When indicated, packed fillets were treated by HHP (300 MPa, 5 min).

Treatment	Storage Time (Days)				
	0	3	5	7	10
Control	5.30 \pm 0.09	4.93 \pm 0.08	6.03 \pm 0.22	6.36 \pm 0.12	7.02 \pm 0.21
Activated film (AF)	3.54 \pm 0.15	3.88 \pm 0.21	3.36 \pm 0.22	4.06 \pm 0.46	6.85 \pm 0.38
HHP	3.47 \pm 0.16	4.75 \pm 0.17	6.06 \pm 0.39	6.56 \pm 0.18	5.20 \pm 0.42
AF-HHP	3.42 \pm 0.21	3.47 \pm 0.31	3.25 \pm 0.25	3.41 \pm 0.29	4.49 \pm 0.22

Note: Data (log CFU/g) are the average of two replicates \pm standard deviation.

Listeria was unable to proliferate in the fruit puree having an acidic pH of 4.52. (Table 2). The concentrations of viable *Listeria* in the control fruit puree (films not activated) decreased slowly

during the first seven days of storage (being 0.9 log cycles lower at day 7) and more rapidly during late storage (being 2 log cycles lower at day 10). For samples packed in the activated film, viable *Listeria* counts were significantly lower ($p < 0.05$) than controls by 1.8 and 2.0 log cycles at times 0 and 3, respectively. Furthermore, counts were below the detection limit (1.0 log CFU/g) for the remaining storage period. For the samples treated by HHP singly or in combination with the activated film, no viable *Listeria* were detected at any sampling point.

Table 2. Viable cell counts for *Listeria* in fruit puree challenged with the bacterium and stored under refrigeration. Fruit puree was packed in polyethylene-polyamide bags without any treatment (controls), or in bags activated with 0.5% thymol plus 80 mg/mL enterocin AS-48. When indicated, packed puree was treated by HHP (300 MPa, 5 min).

Treatment	Storage Time (Days)				
	0	3	5	7	10
Control	5.49 ± 0.08	4.77 ± 0.12	4.38 ± 0.11	4.60 ± 0.14	3.27 ± 0.29
Activated film (AF)	3.69 ± 0.12	2.69 ± 0.14	<1.0	<1.0	<1.0
HHP	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
AF-HHP	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0

Note: Data (log CFU/g) are the average of two replicates ± standard deviation.

4. Discussion

Results from the present study indicate that both the activated film and the HHP treatment achieved similar initial reductions in the concentration of viable *L. innocua* as a surrogate of *L. monocytogenes* in sea bream fillets. While the HHP treatment did not prevent further proliferation of survivors during food storage, the activate film delayed growth at least until day 7. Compared to other methods for bacteriocin addition such as dipping or spraying with bacteriocin solutions, activated films provide the advantage of a slow release of antimicrobials into the medium while, at the same time, can also provide some protection against bacteriocin degradation by tissue proteases or by complexation with food components [6]. Although the combined treatment of activated films with HHP did not improve inactivation of *Listeria* significantly compared to the activated films alone, it still delayed proliferation of survivors for the whole storage period, indicating a longer protection against *Listeria*. A previous study reported that spray application of enterocin AS-48 at 0.37 µg/cm² reduced viable counts of *L. monocytogenes* by 1.68 and 1.9 log cycles in raw hake and raw salmon fillets, respectively [30]. This effect was similar to the one obtained in the present study for films activated with a higher concentrated bacteriocin solution in combination with thymol. These results would suggest that the amount of antimicrobials adsorbed on the plastic films was low and/or that diffusion of bacteriocin and thymol into the fish tissue was slower compared to the more direct application by spray.

In the present study, *Listeria* was inoculated in the fish fillets at a concentration high enough to allow determination of log reductions of at least 4 log cycles. However, the initial concentrations of the bacterium in raw foods are expected to be much lower. For example, one recent study [31] reported that out of the 17.6–18.4% of the 301 marine fresh and smoked fish samples positive for *L. monocytogenes*, only three samples had viable *Listeria* counts above 2 log CFU/g, the highest concentration being 3.88 log CFU/g. Considering an initial concentration of 3 log CFU/g in the raw material, the combined treatment of enterocin and HHP would reduce the viable cell concentration below the threshold level of 100 viable cells per gram of food.

In the fruit puree, *Listeria* was unable to multiply possibly because of the acidic pH of the fruit, but it did survive quite well during the first seven days of storage. Previous studies have shown that *L. monocytogenes* can grow in a number of vegetables [32–34], in non-acidic fruits [35,36] and in acidic fruits such as tomatoes [37], peeled Hamlin oranges [38], sliced raspberries, pear or kiwi [36], and in Golden Delicious apple slices [39,40]. In 2014, a listeriosis outbreak occurring in the USA was linked

to commercially-produced, prepackaged whole caramel apples [4]. A previous study showed that edible coatings activated with enterocin AS-48 at concentrations of 20 or 40 µg/mL reduced the viable cell concentrations of *L. monocytogenes* on apple cubes and improved inactivation of the bacterium in a concentration-dependent way during storage [41]. Results from the present study indicated that, under acidic pH condition, *L. innocua* was much more sensitive to treatment with activated films containing enterocin AS-48 and thymol and also to HHP treatment compared to results obtained on sea bream fillets having a pH value close to neutrality. It would be expected that the stress conditions imposed by acidic pH could decrease the capacity of *Listeria* to repair cell damage caused by enterocin AS-48 and thymol as well as by the HHP treatment. Previous studies have shown that inactivation of microorganisms by HHP treatments greatly depends on the food matrix and the pH of the food product [42]. Acid stress may enhance tolerance to HHP, but at the same time organic acids may act synergistically with HHP [42]. Another study [43] reported an additional 3 log CFU/g reduction in *L. monocytogenes* when pressurized at (353 MPa, 10 min, 45 °C) in buffer at pH 4.0 as compared with pH 6.0. A faster diffusion of antimicrobials into the puree could also contribute to the observed effects. Previous studies have shown that the anti-*Listeria* effect of enterocin AS-48 greatly depends on the medium, with bactericidal concentrations ranging from as low as 0.8 µg/mL in brain-heart infusion broth [44] to 0.8 µg/g in cooked ham [45]. According to results from the present study, and presuming a low *Listeria* load in fruit purees, both the activated film and the HHP treatment of low intensity would be effective in improving the safety of purees.

5. Conclusions

Thymol plus enterocin AS-48 incorporated in activated films delayed the proliferation of *Listeria* population in seabream fillets and induced gradual inactivation of the bacterium in fruit puree. Combination of activated films with HHP treatment provided a longer protection against *Listeria* proliferation in fillets. HHP treatment was more effective in fruit puree, achieving complete inactivation of *Listeria* population.

Acknowledgments: This work was supported by research grant UJA2014/06/25 and the University of Jaen's Plan de Apoyo a la Investigación (research structure AGR230). We also acknowledge the Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeiA3.

Author Contributions: Rosario Lucas and María José Grande Burgos conceived and designed the experiments; Irene Ortega Blázquez and Rubén Pérez-Pulido performed the experiments; Rosario Lucas and Antonio Gálvez analyzed the data; Rosario Lucas and Antonio Gálvez wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. McLauchlin, J.; Mitchell, R.T.; Smerdon, W.J.; Jewell, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *92*, 15–33. [[CrossRef](#)]
2. Gandhi, M.; Chikindas, M.L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *113*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* **2016**, *14*, 4634.
4. Garner, D.; Kathariou, S. Fresh produce-associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, and insights. *J. Food Prot.* **2016**, *79*, 337–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. McCollum, J.T.; Cronquist, A.B.; Silk, B.J.; Jackson, K.A.; O'Connor, K.A.; Cosgrove, S.; Gossack, J.P.; Parachini, S.S.; Jain, N.S.; Etestad, P.; et al. Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 944–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R.L.; Ben Omar, N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *120*, 51–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Irkin, R.; Esmer, O.K. Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 6095–6111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Malhotra, B.; Keshwani, A.; Kharkwal, H. Antimicrobial food packaging: Potential and pitfalls. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Hotchkiss, J. Food packaging interactions influencing quality and safety. *Food Addit. Contam.* **1997**, *14*, 601–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Han, J.H. Antimicrobial food packaging. *Food Technol.* **2000**, *54*, 56–65.
11. Leistner, L.; Gorris, L.G.M. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* **1995**, *6*, 2–46. [[CrossRef](#)]
12. Mauriello, G.; de Luca, E.; la Storia, A.; Villani, F.; Ercoloni, D. Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Lett. Appl. Microbiol.* **2005**, *41*, 464–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Neetoo, H.; Ye, M.; Chen, H.Q. Effectiveness and stability of plastic films coated with nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **2007**, *70*, 1267–1271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Santiago-Silva, P.; Soares, N.F.F.; Nobrega, J.E.; Junior, M.A.W.; Barbosa, K.B.F.; Volp, A.C.P.; Zerdas, E.R.M.A.; Würllitzer, N.J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control* **2009**, *20*, 85–89. [[CrossRef](#)]
15. Natrajan, N.; Sheldon, B.W. Efficacy of nisin coated polymer films to inactivate *Salmonella typhimurium* on fresh broiler skin. *J. Food. Prot.* **2000**, *63*, 1189–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Perez Espitia, P.J.; Soares, N.F.F.; Coimbra, J.S.R.; Andrade, N.J.; Cruz, R.S.; Medeiros, E.A.A. Bioactive peptides: Synthesis, properties and applications in the packaging and preservation of food. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, *11*, 187–204. [[CrossRef](#)]
17. Viedma, P.M.; Ercolini, D.; Ferrocino, I.; Abriouel, H.; Omar, N.B.; Lopez, R.L.; Galvez, A. Effect of polyethylene film activated with enterocin EJ97 in combination with EDTA against *Bacillus coagulans*. *LWT Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 514–518. [[CrossRef](#)]
18. Guarda, A.; Rubilar, J.F.; Miltz, J.; Galotto, M.J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *146*, 144–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Cerisuelo, J.P.; Bermudez, J.M.; Aucejo, S.; Catala, R.; Gavara, R.; Hernandez-Munoz, P. Describing and modeling the release of an antimicrobial agent from an active PP/EVOH/PP package for salmon. *J. Food Eng.* **2013**, *116*, 352–361. [[CrossRef](#)]
20. Otero, V.; Becerril, R.; Santos, J.A.; Rodríguez-Calleja, J.M.; Nerin, C.; García-López, M.L. Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control* **2014**, *42*, 296–302. [[CrossRef](#)]
21. Muriel-Galet, V.; Cerisuelo, J.P.; López-Carballo, G.; Lara, M.; Gavara, R.; Hernández-Muñoz, P. Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 195–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Muriel-Galet, V.; López-Carballo, G.; Gavara, R.; Hernández-Muñoz, P. Antimicrobial food packaging film based on the release of f LAE from EVOH. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 239–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ramos, M.; Jiménez, A.; Peltzer, M.; Garrigós, M.C. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *J. Food Eng.* **2012**, *109*, 513–519. [[CrossRef](#)]
24. Theinsathid, P.; Visessanguan, W.; Kruenate, J.; Kingcha, Y.; Keeratipibul, S. Antimicrobial activity of lauric arginate-coated polylactic acid films against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on cooked sliced ham. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, M142–M149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Grande-Burgos, M.J.; Pérez-Pulido, R.; López-Aguayo, M.C.; Gálvez, A.; Lucas, R. The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: Isolation, mode of action, and possible food applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 22706–22727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Molinos, A.C.; Abriouel, H.; López, R.L.; Omar, N.B.; Valdivia, A.; Gálvez, A. 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 salad. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 2216–2223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ananou, S.; Garriga, M.; Jofré, A.; Aymerich, T.; Gálvez, A.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E. Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages. *Meat Sci.* **2010**, *84*, 594–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Abriouel, H.; Valdivia, E.; Martínez-Bueno, M.; Maqueda, M.; Gálvez, A. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J. Microbiol. Methods* **2003**, *55*, 599–605. [[CrossRef](#)]
29. Del Árbol, J.T.; Pulido, R.P.; Grande, M.J.; Gálvez, A.; Lucas, R. Survival and high-hydrostatic pressure inactivation of foodborne pathogens in salmorejo, a traditional ready-to-eat food. *J. Food Sci.* **2015**, *80*, M2517–M2521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Baños, A.; García-López, J.D.; Núñez, C.; Martínez-Bueno, M.; Maqueda, M.; Valdivia, E. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fish by enterocin AS-48 and *Listeria* lytic bacteriophage P100. *LWT Food Sci. Technol.* **2016**, *66*, 672–677. [[CrossRef](#)]
31. Wieczorek, K.; Osek, J. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. *Food Microbiol.* **2017**, *64*, 164–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Harris, L.J.; Farber, J.N.; Beuchat, L.R.; Parish, M.E.; Suslow, T.V.; Garret, E.H.; Busta, F.F. Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2003**, *2*, 78–141. [[CrossRef](#)]
33. Penteado, A.L.; Leitao, M.F.F. Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *92*, 89–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Molinos, A.C.; Abriouel, H.; Omar, N.B.; Valdivia, E.; Lucas, R.; Maqueda, M.; Cañamero, M.M.; Gálvez, A. Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 7781–7787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ukuku, D.O.; Fett, W. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated on cantaloupe surfaces and efficacy of washing treatments to reduce transfer from rind to fresh-cut pieces. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 924–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Molinos, A.C.; Abriouel, H.; Omar, N.B.; Lucas, R.; Valdivia, E.; Gálvez, A. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 2460–2467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Beuchat, L.R.; Brackett, R.E. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 1367–1371. [[PubMed](#)]
38. Pao, S.; Brown, G.E.; Schneider, K.R. Challenge studies with selected pathogenic bacteria on freshly peeled Hamlin orange. *J. Food Sci.* **1998**, *63*, 359–362. [[CrossRef](#)]
39. Conway, W.S.; Leverentz, B.; Saftner, R.A.; Janisiewicz, W.J.; Sams, C.E.; Leblanc, E. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. *Plant Dis.* **2000**, *84*, 177–181. [[CrossRef](#)]
40. Alegre, I.; Abadias, M.; Anguera, M.; Oliveira, M.; Viñas, I. Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 70–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Del Carmen López Aguayo, M.; Burgos, M.J.G.; Pulido, R.P.; Gálvez, A.; López, R.L. Effect of different activated coatings containing enterocin AS-48 against *Listeria monocytogenes* on apple cubes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2016**, *35*, 177–183. [[CrossRef](#)]
42. Alpas, H.; Kalchayanand, N.; Bozoglu, F.; Ray, B. Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *60*, 33–42. [[CrossRef](#)]
43. Stewart, C.M.; Jewett, F.F.; Dunne, C.P.; Hoover, G.H. Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Saf.* **1997**, *17*, 23–36. [[CrossRef](#)]
44. Mendoza, F.; Maqueda, M.; Gálvez, A.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E. 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 618–625. [[PubMed](#)]
45. Ananou, S.; Baños, A.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M.; Gálvez, A.; Valdivia, E. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. *Food Control* **2010**, *21*, 478–486. [[CrossRef](#)]



ARTÍCULO 3

**Irene Ortega Blázquez, María José Grande Burgos, Rubén Pérez-Pulido,
Antonio Gálvez, Rosario Lucas**

**Treatment with high-hydrostatic pressure, activated film packaging with
thymol plus enterocin AS-48 and its combination modify the
bacterial communities of refrigerated sea bream
(*Sparus aurata*) fillets.**

***Frontiers in Microbiology* 9:314.**



Treatment With High-Hydrostatic Pressure, Activated Film Packaging With Thymol Plus Enterocin AS-48, and Its Combination Modify the Bacterial Communities of Refrigerated Sea Bream (*Sparus aurata*) Fillets

Irene Ortega Blázquez, María J. Grande Burgos, Rubén Pérez-Pulido, Antonio Gálvez* and Rosario Lucas

Microbiology Division, Department of Health Sciences, University of Jaen, Jaen, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Avelino Alvarez-Ordóñez,
Universidad de León, Spain

Reviewed by:

Hélène Simonin,
Agrosup Dijon, France
Elisa Gayán Ordás,
KU Leuven, Belgium

*Correspondence:

Antonio Gálvez
agalvez@ujaen.es

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 25 September 2017

Accepted: 09 February 2018

Published: 28 February 2018

Citation:

Ortega Blázquez I, Grande Burgos MJ, Pérez-Pulido R, Gálvez A and Lucas R (2018) Treatment With High-Hydrostatic Pressure, Activated Film Packaging With Thymol Plus Enterocin AS-48, and Its Combination Modify the Bacterial Communities of Refrigerated Sea Bream (*Sparus aurata*) Fillets. *Front. Microbiol.* 9:314. doi: 10.3389/fmicb.2018.00314

The aim of this study was to determine the impact of activated plastic films with thymol and enterocin AS-48 and high-hydrostatic pressure (HP) treatment on the bacterial load and bacterial diversity of vacuum-packaged sea bream fillets under refrigerated storage for 10 days. The activated film and the HP treatment reduced aerobic mesophiles viable counts by 1.46 and 2.36 log cycles, respectively, while the combined treatment achieved a reduction of 4.13 log cycles. HP and combined treatments resulted in longer delays in bacterial growth. *Proteobacteria* were the dominant phyla in sea bream fillets. The relative abundance of *Firmicutes* increased by the end of storage both in controls and in samples treated by HP singly or in combination with the activated films. The predominant operational taxonomic units (OTUs) found at time 0 in control samples (*Listeria*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Chryseobacterium*) rapidly changed during storage (with an increase of *Vibrio*, *Photobacterium*, and *Shewanella* together with *Cloacibacterium* and *Lactobacillales* by the end of storage). The activated film and the HP treatment induced drastic changes in bacterial diversity right after treatments (with *Comamonadaceae*, *Methylobacterium*, *Acidovorax*, and *Sphingomonas* as main OTUs) and also induced further modifications during storage. Bacterial diversity in activated film samples was quite homogeneous during storage (with *Vibrio*, *Photobacterium*, and *Shewanella* as main OTUs) and approached control samples. HP treatments (singly or in combination with activated films) determined a high relative abundance of *Acinetobacter* (followed by *Pseudomonas* and *Shewanella*) during early storage as well as a higher relative abundance of lactic acid bacteria by the end of storage. The results indicate that the complex dynamics of bacterial populations in the refrigerated sea bream fillets are markedly influenced by treatment and antimicrobials applied.

Keywords: fish fillets, thymol, bacteriocin, high-hydrostatic pressure, biodiversity

INTRODUCTION

Fresh fish is a convenient protein ready for preparation of many dishes, but at the same time it is highly perishable. The main cause of deterioration of fresh fish is the metabolic activity of spoilage seafood microorganisms that provoke degradation of organic molecules and fish tissue, loss of essential fatty acids, fat-soluble vitamins and protein functionality, production of biogenic amines, and formation of off-odors (Gram and Dalgaard, 2002).

Natural antimicrobials and non-thermal treatments such as high-hydrostatic pressure (HP), singly or in combination are attractive candidates for preservation of fish and fish products. Previous studies have addressed possible applications of bacteriocins for food preservation, including seafoods (Galvez et al., 2014; Johnson et al., 2017). Enterocin AS-48 is a broad-spectrum circular bacteriocin with a generally-recognized as safe (GRAS) status (Grande Burgos et al., 2014). Immersion in an enterocin AS-48 solution for 1 min delayed bacterial growth and reduced biogenic amine production in sardines during refrigerated storage (Ananou et al., 2014). Spray-application of an enterocin AS-48 solution reduced viable counts of a cocktail of *Listeria monocytogenes* strains on raw hake and salmon fillets as well as on smoked salmon, an effect that was potentiated by bacteriophage P100 (Baños et al., 2016).

Essential oils and their antimicrobial compounds have been studied for preservation of different types of foods (Hyldgaard et al., 2012; Patel, 2015; Pandey et al., 2017). Addition of thymol in combination with other hurdles improved the preservation of fresh packed plaice fillets (Altieri et al., 2005), sea bream, fresh cod, and fresh blue fish burgers (Corbo et al., 2008, 2009; Del Nobile et al., 2009). The antibacterial activity of enterocin AS-48 can be potentiated by essential oils and phenolic compounds (Grande Burgos et al., 2014). Thymol in combination with enterocin AS-48 improved inactivation of *L. monocytogenes* in salads (Cobo Molinos et al., 2009). Combinations of enterocin AS-48 and phenolic compounds such as thymol could also offer new possibilities for fish preservation.

Bacteriocins and essential oils or their antimicrobial compounds have been incorporated on different coating materials with the purpose of preserving fish products, as exemplified by nisin (Neetoo et al., 2008; Lu et al., 2010). However, the only use of natural antimicrobial compounds to inhibit or delay bacterial growth in fish products may require addition of too high concentrations having a negative impact on food flavor. The efficacy of natural antimicrobials incorporated on coating materials could be improved in combination with other hurdles such as HP. HP can be applied on seafood products with several purposes such as inactivation of foodborne pathogens, reduction of biogenic amine production, improving the product shelf life, product texturization, and recovery of fish meat (Murchie et al., 2005; Campus, 2010; Wang et al., 2016). However, pressure treatment of fresh fish flesh formed products whose color deteriorated (cooked appearance) with increasing pressure as well as holding time (Campus, 2010; Wang et al., 2016). Decreasing the intensity of HP treatment reduces the

impact on the food properties, but it also decreases its effects on inactivation of microorganisms. Application of HP treatments of low intensity in combination with natural antimicrobials would presumably have a greater effect on inactivation of microorganisms, improving the preservation of fish products.

There is also a growing interest on understanding the complex changes in the food microbiota that may occur during product shelf life as influenced by several factors such as storage temperature, atmosphere, and added antimicrobials. High throughput sequencing (HTS) technology is a powerful tool for studying microbial communities in food systems (Ercolini, 2013; Kergourlay et al., 2015). HTS has proven to be useful in exploring bacterial communities in fish intestine (Ghanbari et al., 2015; Standen et al., 2015; Song et al., 2016) and seafood products (Chaillou et al., 2015; Zhang et al., 2017). In spite of the many studies carried out on the synergistic activities of natural antimicrobials and treatments such as HP, there is still limited information on the effect of such treatments on bacterial populations in fish products. The aim of the present study was to determine the impact of selected treatments (natural antimicrobials thymol and enterocin AS-48 applied on an activated plastic film and HP treatment) on the bacterial load and bacterial diversity of sea bream fillets under refrigerated storage.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation

Fresh sea bream (*Sparus aurata*) fillets with skin were purchased from a local supermarket and kept under refrigeration until use (for not longer than 24 h). Fillets were cut into 5 g portions with a sterile knife, and the portions were sealed under vacuum in polyethylene–polyamide bags activated or not with antimicrobials as described below.

Bags (10 × 15 cm) prepared from polyethylene–polyamide film were activated by addition of 1 ml 0.5% thymol (Sigma, Madrid, Spain) plus 1 ml of partially-purified bacteriocin enterocin AS-48 (0.8 mg/ml) prepared as described elsewhere (Abriouel et al., 2003). Briefly, bacteriocin from cultured broths of the producer strain *Enterococcus faecalis* A-48-32 were concentrated by cation exchange chromatography. Bacteriocin concentrates were dialyzed with distilled water for 24 h by using 2,000 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. The concentrations of antimicrobials used for the study were the ones that achieved highest number of log reductions in viable cell counts while having lowest impact (aromatic odor) on the sensory properties of sea bream fillets among preliminary tests carried out using combinations of 1 ml thymol solutions at 0.25, 0.5, and 0.75% and 1 ml bacteriocin solutions at 0.4 and 0.8 mg/ml. Bags were rubbed by hand to ensure mixing and homogeneous distribution of antimicrobial solutions and incubated for 60 min at ambient temperature to facilitate adsorption of antimicrobials. Then, excess liquid was removed and the bags were allowed to dry for 60 min on filter paper in a biosafety cabinet (Telstar, Madrid,

Spain) under UV irradiation. Activated bags were used within 24 h of preparation. Bags not activated with antimicrobials were also kept for 60 min under UV irradiation in a biosafety cabinet.

High-Hydrostatic Pressure Treatment

The vacuum-packed sea bream fillets were treated by high-HP at low intensity (300 MPa for 5 min at ambient temperature). This treatment was selected among trials at 200, 300, and 400 MPa (5 min each) because it achieved highest number of log reductions while having lowest impact on the natural color of fillets. HP treatment was applied by using a Stansted Fluid Power LTD high pressure Iso-Lab system (model FPG9400B711; SFP, Essex, UK). Come-up speed was 75 MPa/min. Decompression was immediate. Pressurization fluid was water with added 10% propylenglycol. The temperature inside the vessel during treatments ranged between 23 and 27°C. The temperature of samples was 24.5°C at the end of treatment. The samples were placed on ice right after treatment.

The following treatments were applied (two replicates, each one in triplicate): C, controls packed in bags not activated with antimicrobials. AF, samples packed in bags activated with antimicrobials. HP, samples packed in bags not activated with antimicrobials, treated by HP. AF-HP, samples packed in bags activated with antimicrobials, treated by HP. Samples were stored for 10 days at 5°C. At desired incubation times, bags (in triplicate) were removed and the food content was pooled and homogenized with 10 ml sterile saline solution. The resulting homogenate was serially diluted in sterile saline solution and plated in triplicate on trypticase soya agar (TSA; Scharlab, Barcelona, Spain) for determination of total aerobic mesophiles. The average number of colonies obtained after 24–48 h incubation of the plates at 37°C was used to calculate the viable cell concentration [expressed as Log₁₀ colony forming units (CFU)/g].

DNA Extraction

For each sampling point, aliquots (5 ml) from food homogenates were mixed in sterile 50 ml test tubes and centrifuged at 600 × *g* for 5 min in order to remove solids. An aliquot (1.5 ml) of the resulting supernatant was then transferred to an Eppendorf test tube and centrifuged at 13,500 × *g* for 5 min to recover microbial cells. The pellet was resuspended in 0.5 ml sterile saline solution each. Then, Propidium Monoazide (PMATM, GenIUL, S.L, Barcelona, Spain) was added to block subsequent PCR amplification of the genetic material from dead cells (Nocker et al., 2007) as described by Elizaquível et al. (2012). DNA from PMA-treated cells was extracted by using a GenEluteTM 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).

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 (Caporaso et al., 2011) using Illumina technology essentially as described elsewhere (Grande Burgos et al., 2017). DNA template was adjusted to 10–12 ng in each PCR reaction. The amplicon sequencing protocol targets the V3 and V4 regions of the 16S genes with the primers designed surrounding conserved regions (Klindworth et al., 2013). Following the Illumina amplicon libraries protocol, DNA amplicon libraries were generated using a limited cycle PCR (KAPA HiFi HotStart ReadyMix, KK2602; KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA), then Illumina sequencing adaptors and dual-index barcodes were added to the amplicon. Libraries were then normalized and pooled prior to sequencing. The sample containing indexed amplicons was then loaded onto the MiSeq reagent cartridge v3 (MS-102-3003; San Diego, CA, USA) and onto the instrument along with the flow cell. Automated cluster generation and paired-end sequencing with dual indexes reads was performed (2 × 300 bp run). 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 ≥20 for more than 99% of the sequence were extracted for further analysis. All sequences with ambiguous base calls were discarded. After filtering, 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. Each read was assigned to the taxon corresponding to the Best Blast Hit over a threshold of similarity ($e < 1E-15$). The sequencing output files were deposited in the Sequence Read Archive (SRA) service of the European Bioinformatics Institute (EBI) database under Accession Number PRJEB22751.

Statistical Analysis

Data on viable cell counts for the different treatments and storage times were analyzed with *t*-test and two-way ANOVA at $P < 0.05$ (Microsoft Excel). Diversity indices Shannon Wierer (H'), Simpson (D) and Chao1 were calculated using the statistical software packages Paleontological Statistics (PAST). Euclidean distance matrix was obtained with SPSS software.

RESULTS

Effect of Treatments on Bacterial Inactivation

When control sea bream fillets packed in plastic bags without antimicrobials were stored under refrigeration, viable cell counts (total aerobic mesophiles) increased gradually and were 1.14 log cycles higher by the end of storage period (Table 1). Microbial inactivation was significantly influenced ($P < 0.05$) by activated film packaging, HP treatment, and the combination of activated film and HP. For samples packed in the activated plastic bags, viable cell counts were reduced significantly ($P < 0.05$) by 1.45 log cycles at time 0. However, viable counts obtained during storage were not significantly lower ($P > 0.05$) than untreated controls. The HP treatment applied to samples packed in films without activation with antimicrobials reduced viable cell counts significantly ($P < 0.05$) by 2.36 log cycles. Furthermore, viable counts in the HP-treated samples also remained significantly

TABLE 1 | Viable cell counts for total aerobic mesophiles in sea bream fillets stored under refrigeration.

	Storage time (days)				
	0	2	5	7	10
Control	5.97 ± 0.09 ^a	6.22 ± 0.15 ^a	6.58 ± 0.11 ^a	6.55 ± 0.07 ^a	7.11 ± 0.15 ^a
Activated film (AF)	4.51 ± 0.05 ^b	6.09 ± 0.31 ^a	6.09 ± 0.31 ^a	6.10 ± 0.32 ^a	6.93 ± 0.08 ^a
HP	3.61 ± 0.19 ^b	3.01 ± 0.09 ^b	3.96 ± 0.12 ^b	5.64 ± 0.38 ^a	6.81 ± 0.25 ^a
AF-HP	1.84 ± 0.09 ^c	1.30 ± 0.25 ^c	3.91 ± 0.18 ^b	4.92 ± 0.19 ^b	7.16 ± 0.36 ^a

Data (Log₁₀ CFU/g) are the average of two replicates ± standard deviation.

^{a,b,c} down columns indicate significantly different ($P < 0.05$) values.

($P < 0.05$) lower than controls by 3.21 and 2.62 log cycles for storage times 2 and 5, respectively. However, a remarkable increase in viable counts was noticed by day 7 and after. Application of HP treatment to samples packed in films activated with antimicrobials provided best results, achieving a significant ($P < 0.05$) reduction of 4.13 log cycles. Although viable cell counts for the combined treatment increased during late storage (days 5, 7, and 10), they still remained significantly ($P < 0.05$) lower than the untreated controls for storage times 2, 5, and 7 (by 4.92, 2.67, and 1.63 log cycles, respectively). Compared with the activated film alone, microbial inactivation was influenced significantly ($P < 0.05$) by the combined treatment, which achieved additional and significant ($P < 0.05$) reductions of viable counts (2.67, 4.79, 2.18, and 1.18 log cycles for storage times 0, 2, 5, and 7, respectively). Compared with the single HP treatment, the combined treatment with activated films achieved additional and significant ($P < 0.05$) reductions of viable counts of 1.77 and 1.71 log cycles at storage times 0 and 2, respectively.

Effect of Treatments on Bacterial Diversity

The numbers of reads assigned to OTUs was comprised between 77,780 and 190,124 (Table 2). Nevertheless, in spite of the in-depth coverage provided by Illumina sequencing, differences in copy number of the 16S rRNA gene sequencing need to be taken into consideration as well as the variability that may occur between samples. Control samples showed higher alpha diversity values compared with samples packed in the activated films or with samples treated by HP alone (Table 2). In samples from the combined treatments, alpha diversity values decreased at days 2 and 5 but then increased again during storage. *Proteobacteria* were the predominant phylum in the controls as well as in most of the treated samples, with relative abundances ranging from 54.06 up to 99.79% (Figure 1). In control samples, the relative abundance of *Proteobacteria* decreased toward the end of storage, while other phyla (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*) increased. For the HP treated samples, the relative abundance of *Firmicutes* increased toward the end of storage, reaching 71.91% at day 10 (HP10). This sample had the lowest relative abundance of *Proteobacteria* (27.58%). For the combined treatments, *Firmicutes* had higher relative abundances both after treatment (AF-HP0, 29.30%) and by the end of storage (AF-HP7, 33.79%; AF-HP10, 29.95%). The rest of phyla (19 in total) had very low relative abundances, and altogether accounted for <1.3% OTUs.

TABLE 2 | Number of sequences (reads) and observed diversity for 16S rRNA amplicons for the different samples analyzed in this study.

Sample	N° of reads	Shannon index	Simpson index	Chao 1 index
UNTREATED CONTROLS				
C0	77,780	2.59	0.88	150.6
C2	83,091	1.79	0.77	77.5
C5	190,124	1.91	0.79	116.1
C7	120,747	3.22	0.91	208.2
C10	94,357	2.42	0.86	126
ACTIVATED FILM				
AF0	106,044	2.79	0.88	131.1
AF2	92,738	1.64	0.74	113
AF5	83,014	1.92	0.79	108
AF7	84,833	1.98	0.75	142.5
AF10	78,491	1.73	0.74	110.8
HIGH HYDROSTATIC PRESSURE				
HP0	99,732	0.99	0.78	107.6
HP2	94,189	1.96	0.71	123
HP5	89,368	1.72	0.73	150.1
HP7	98,761	1.72	0.74	110.5
HP10	81,864	1.94	0.74	132.5
ACTIVATED FILM PLUS HIGH HYDROSTATIC PRESSURE				
AF-HP0	114,530	3.34	0.94	172
AF-HP2	90,700	1.68	0.68	132.3
AF-HP5	98,905	1.96	0.76	142.6
AF-HP7	96,927	2.30	0.84	150.8
AF-HP10	97,467	3.44	0.94	157.8

Comparison of the relative abundances of OTUs clustered at genus level indicated important differences between controls and treated samples that depended on treatment and also on storage time (Figure 2). For the control samples, OTUs assigned to genus *Listeria* (mainly *Listeria seeligeri*) showed highest relative abundance at time 0 (C0, 24.90%). OTUs assigned to *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, and *Enterobacteriaceae* were also relevant (with relative abundances comprised between 12 and 13%), and to a less extent *Chryseobacterium* (8.88%). The bacterial diversity of control samples changed markedly during storage. By day 2, the main bacterial groups detected at time 0 were displaced by other groups, mainly *Vibrio* (mostly *Vibrio rumoiensis*), *Photobacterium* (mostly *Photobacterium angustum*),

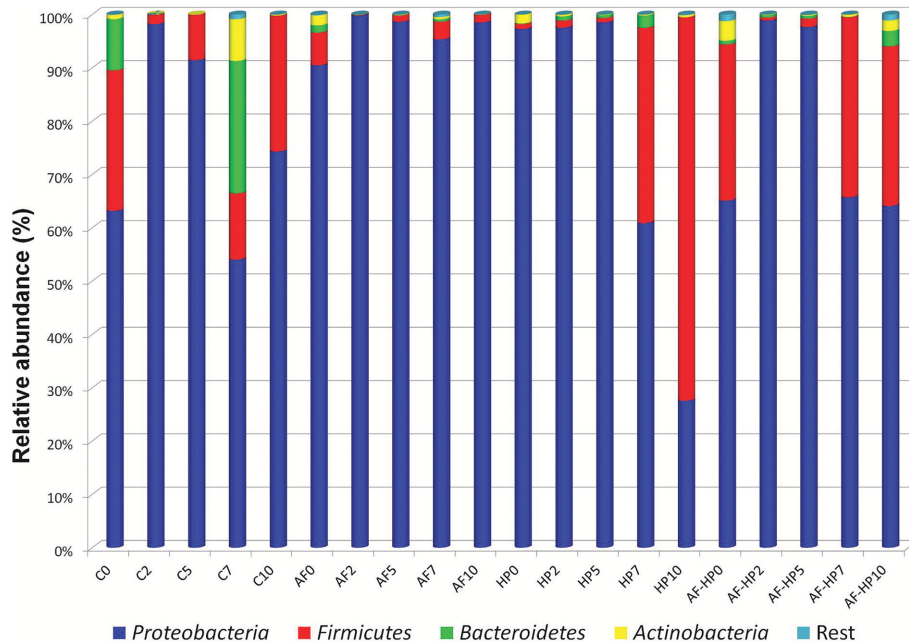


FIGURE 1 | Relative abundance of OTUs based on paired-end 16S rRNA gene sequencing analysis of DNA from refrigerated sea bream fillets. Controls packed in films without activation with antimicrobials (C); samples packed in films activated with thymol plus enterocin AS-48 (AF); samples packed in films without activation and treated by high-hydrostatic pressure (HP); samples packed in activated films and treated by high-hydrostatic pressure (AF-HP). Sampling was performed at days 0, 2, 5, 7, and 10. OTUs were grouped at Phylum level.

and *Shewanella*. The first two groups were still important at the end of storage, but other groups (*Comamonadaceae*, *Lactobacillales*, and *Cloacibacterium*) also became relevant at some points during mid to late storage.

Activated film packaging induced an early, transient change in the microbiota of samples. The main OTUs detected at time 0 (AF0) belonged to *Comamonadaceae* (23.19%), *Methylobacterium* (21.37%), *Acidovorax* (7.62%), and *Sphingomonas* (6.57%) (Figure 2). However, the relative abundances of these bacterial groups decreased markedly by day 2. Furthermore, the main OTUs detected for the activated film samples during storage (AF2 to AF10) belonged to *Vibrio*, *Photobacterium*, and *Shewanella*, resembling the bacterial diversity of control samples.

The HP-treated samples (HP0) showed a similar profile as AF0 samples, with *Comamonadaceae* (29.07%), *Methylobacterium* (33.88%), *Acidovorax* (9.86%), and *Sphingomonas* (8.76%) as main OTUs (Figure 2). As in the activated films, these bacterial groups also decreased rapidly in relative abundance during early storage of HP-treated samples. However, *Vibrio* and *Photobacterium* had very low relative abundances during storage. Instead, *Acinetobacter* (mainly *Acinetobacter guillouiae* and *Acinetobacter johnsonii*) showed very high relative abundances at days 2 and 5 (HP2, 50.5%; HP5, 43.03%). *Pseudomonas* and *Shewanella* were also relevant in the HP-treated samples during mid-storage. Furthermore, *Lactobacillales* and *Carnobacterium* became the predominant OTUs during late storage (HP7, HP10).

Samples packed in the activated film and then treated by high-HP (AF-HP0) showed lower relative abundances of *Methylobacterium* (12.00%), *Comamonadaceae* (11.58%), *Acidovorax* (3.54%), and *Sphingomonas* (2.91%) compared to the single HP treatment, and higher relative abundances of *Enterococcus* (12.56%), *Enterobacteriaceae* (7.19%), *Lactobacillaceae* (5.68%), *Xanthomonadaceae* (4.88%), and *Escherichia* (3.50%) (Figure 2). However, the relative abundances of these groups decreased rapidly during storage while other groups resembling the microbiota of the single HP treatment increased. Thus, the predominant OTUs detected in samples from the combined treatment at days 2 and 5 belonged to *Acinetobacter* (AF-HP2, 52.88%; AF-HP5, 40.65%) followed by *Shewanella* and *Pseudomonas* in lower proportions. There was also a change in the microbiota during late storage, with increases in the relative abundances of OTUs assigned to *Photobacterium*, *Vibrio*, *Shewanella*, and *Enterobacteriaceae* at day 7, *Comamonadaceae* and *Methylobacterium* at day 10, and *Lactobacillales* at both days 7 and 10.

Principal coordinates analysis indicated that most of the activated film samples (AF2 to AF10) as well as control samples C2 and C5 clustered together, as they had high relative abundances for OTUs assigned to *Vibrio*, *Photobacterium*, and *Shewanella* (Figure 3). Samples just treated by the activated film (AF0), HP (HP0), or both (AF-HP0) formed a separate cluster (with *Comamonadaceae*, *Methylobacterium*, *Acidovorax*, and *Sphingomonas* as main OTUs in common). Samples treated by HP and samples from the combined treatment also clustered

	Controls					Activated film					High hydrostatic pressure					Activated film + high hydrostatic pressure				
	C0	C2	C5	C7	C10	AF0	AF2	AF5	AF7	AF10	HP0	HP2	HP5	HP7	HP10	AF-HP0	AF-HP2	AF-HP5	AF-HP7	AF-HP10
<i>Listeria</i>	24.90	0.00	0.00	0.00	0.79	0.00	0.00	0.03	0.00	0.09	0.00	0.15	0.08	0.01	0.01	0.59	0.06	0.46	3.17	0.42
<i>Acinetobacter</i>	12.49	2.31	2.09	0.39	0.11	2.59	5.99	10.78	0.09	0.04	0.79	50.50	43.03	0.35	0.25	0.94	52.88	40.65	0.04	0.59
<i>Vibrio</i>	0.06	24.59	20.56	1.89	11.79	0.00	29.41	17.33	14.75	39.84	0.00	2.97	0.11	0.04	0.58	0.49	0.38	0.19	10.18	1.94
<i>Photobacterium</i>	0.02	33.44	36.20	3.85	20.50	0.01	37.60	35.63	42.86	14.29	0.00	5.47	0.21	1.03	1.41	0.52	0.25	0.32	21.85	5.62
<i>Pseudomonas</i>	12.08	8.23	8.83	0.97	7.36	6.26	2.92	3.42	2.88	6.37	1.11	8.55	18.06	37.39	2.75	2.72	10.72	14.98	6.96	2.02
<i>Shewanella</i>	2.82	19.17	12.54	1.29	9.67	0.64	16.26	18.04	16.50	24.98	0.01	9.45	21.52	0.22	0.88	0.33	13.44	19.43	9.73	2.01
Fam. Comamonadaceae (Other)	4.18	0.05	0.03	10.24	4.25	23.19	0.05	0.14	1.63	0.10	29.07	1.22	0.28	0.49	6.72	11.58	0.73	0.93	1.11	10.93
<i>Methylobacterium</i>	2.87	0.01	0.01	7.05	3.68	21.37	0.03	0.21	1.74	0.09	33.88	0.82	0.17	0.26	6.16	12.00	0.36	0.84	0.88	9.27
Fam. Enterobacteriaceae (Other)	12.91	4.26	5.24	0.55	6.70	4.34	2.87	6.28	6.62	5.39	0.00	1.30	3.57	9.76	0.92	7.19	0.70	5.02	7.52	3.08
<i>Psychrobacter</i>	3.73	0.02	0.01	0.01	0.03	0.20	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.14	0.13	9.99	0.27	0.08	0.04	0.00	0.02	0.00
<i>Acidovorax</i>	0.86	0.00	0.00	3.27	1.33	7.62	0.00	0.03	0.43	0.02	9.86	0.27	0.06	0.09	2.17	3.54	0.14	0.21	0.44	3.25
<i>Sphingomonas</i>	0.60	0.01	0.00	1.36	0.67	6.57	0.01	0.05	0.43	0.03	8.76	0.12	0.04	0.05	1.10	2.91	0.12	0.25	0.17	1.91
Fam. Pseudomonadaceae (Other)	1.30	0.15	0.18	2.76	0.35	4.01	0.06	0.13	0.19	0.23	0.07	0.34	0.69	0.46	0.68	5.24	0.33	0.71	0.26	5.95
<i>Stenotrophomonas</i>	0.43	0.04	0.08	0.01	0.18	0.20	0.17	0.81	0.06	0.08	0.14	3.84	5.65	0.05	0.19	0.22	6.98	6.30	0.08	0.15
O. Lactobacillales (Other)	0.04	1.11	7.44	0.35	22.65	0.14	0.00	0.04	0.03	0.07	0.00	0.06	0.05	1.71	30.12	0.53	0.01	0.09	26.73	13.52
<i>Carnobacterium</i>	0.06	0.47	0.55	0.12	0.52	0.00	0.05	0.87	1.93	0.90	0.00	0.03	0.32	31.75	39.82	0.34	0.00	0.00	1.24	0.53
Fam. Lactobacillaceae (Other)	0.06	0.00	0.00	0.15	0.12	0.84	0.00	0.02	0.12	0.02	0.00	0.09	0.03	0.00	0.00	5.68	0.02	0.14	0.06	1.43
<i>Enterococcus</i>	0.01	0.01	0.01	1.44	0.03	1.36	0.02	0.03	0.03	0.02	0.00	0.54	0.08	0.01	0.06	12.56	0.31	0.20	0.09	3.64
<i>Cloacibacterium</i>	0.02	0.00	0.00	22.93	0.00	0.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.09
<i>Agrobacterium</i>	0.20	0.14	0.19	0.47	0.00	0.88	0.38	0.86	0.08	0.01	1.25	8.50	2.73	0.02	0.17	0.48	7.73	4.63	0.04	0.61
<i>Corynebacterium</i>	0.19	0.00	0.00	5.72	0.01	0.34	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.03	0.00	0.00	0.59	0.00	0.04	0.31	0.30
<i>Chryseobacterium</i>	8.88	0.03	0.02	0.00	0.01	0.36	0.04	0.03	0.00	0.02	0.00	0.55	0.12	2.28	0.01	0.54	0.12	0.08	0.02	0.10
<i>Enhydrobacter</i>	5.19	0.01	0.00	0.04	0.00	0.86	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.01	0.02	0.00	0.14	0.01	0.00	0.00	0.42
Fam. Xanthomonadaceae (Other)	0.21	0.01	0.01	1.14	0.05	1.03	0.01	0.03	0.08	0.06	0.00	0.10	0.12	0.06	0.47	4.88	0.11	0.28	0.10	4.41
<i>Escherichia</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.06	3.50	0.00	0.01	0.01	0.95
Fam. Bacillaceae (Other)	0.07	0.00	0.00	4.24	0.08	0.27	0.01	0.01	0.07	0.05	0.00	0.04	0.05	0.04	0.08	2.05	0.02	0.07	0.14	4.23
<i>Bradyrhizobium</i>	0.31	0.00	0.00	0.87	0.48	1.84	0.00	0.03	0.28	0.01	4.24	0.08	0.01	0.02	0.54	0.99	0.03	0.12	0.11	0.82
<i>Serratia</i>	0.03	0.11	0.35	0.00	2.68	0.00	0.03	0.42	0.67	2.59	0.00	0.01	0.00	0.01	0.10	0.07	0.00	0.01	2.72	1.34
<i>Comamonas</i>	0.07	0.06	0.05	0.02	0.00	0.02	0.10	0.17	0.02	0.01	0.03	2.12	0.75	0.00	0.02	0.01	2.35	1.17	0.01	0.01
Rest (<2%)	5.38	5.76	5.59	28.87	5.93	14.29	3.99	4.58	8.51	4.67	10.78	2.58	2.05	3.90	4.46	19.29	2.16	2.87	5.99	20.47

FIGURE 2 | Heatmap of bacterial diversity in sea bream samples based on the relative abundance at genus level. The values represent the relative abundance of OTUs clustered at the Genus level. OTUs not assigned to genus were computed in the nearest higher taxonomic level. Color scale: 0, white; 100, dark magenta. Controls packed in films without activation with antimicrobials (C); samples packed in films activated with thymol plus enterocin AS-48 (AF); samples packed in films without activation and treated by high-hydrostatic pressure (HP); samples packed in activated films and treated by high-hydrostatic pressure (AF-HP). Sampling was performed at days 0, 2, 5, 7, and 10.

together for days 2 and 5 (HP2, HP5, AF-HP2, AF-HP5) as they shared in common high relative abundances of *Acinetobacter* followed by *Pseudomonas* and *Shewanella*. The treated samples from late storage HP10 and AF-HP10 also clustered closely, and shared high relative abundances of *Lactobacillales*. Control samples from late storage also had a high relative abundance of *Lactobacillales*, but they clustered more closely to samples from the combined treatment AF-HP7 because they had similar relevant relative abundances of *Vibrio* and *Photobacterium*.

DISCUSSION

Results presented in this study indicate that reduction of the initial microbial load in sea bream fillets and retardation of its growth during refrigerated storage can be improved considerably by application of combined treatments such as films activated with a mixture of thymol plus the bacteriocin enterocin AS-48 and a mild high-HP treatment. The combined treatment had the advantage of increasing microbial inactivation at the beginning, and still kept viable cell counts in the packed fillets 1.2 log cycles lower than the untreated controls at day 7 of storage. Compared to other methods for bacteriocin addition such as

dipping or spraying with bacteriocin solutions, activated films provide the advantage of a slow release of antimicrobials into the medium while at the same time can also provide some protection against bacteriocin degradation by tissue proteases or by complex formation with food components (Gálvez et al., 2007). Although bacteriocins can show synergistic effects with other natural antimicrobials and with non-thermal food processing treatments such as HP (Galvez et al., 2014; Mathur et al., 2017), there are no previous studies on the combined effect of activated packaging with thymol plus enterocin AS-48 and HP treatment. Inability to repair multiple damages caused by the combined action of different antimicrobials most likely results in energy exhaustion and cell death. Furthermore, damage to the outer membrane of Gram-negative bacteria caused by some antimicrobials and/or treatments results in cell permeabilization and faster diffusion of bacteriocins such as enterocin AS-48 to its main cellular target, the bacterial cytoplasmic membrane (Gálvez et al., 1991).

Considering that foods are complex ecosystems containing a mixture of bacterial species that may change in relative abundance during storage depending of different environmental factors such as storage temperature and the presence of antimicrobial substances, among others, it is important to study

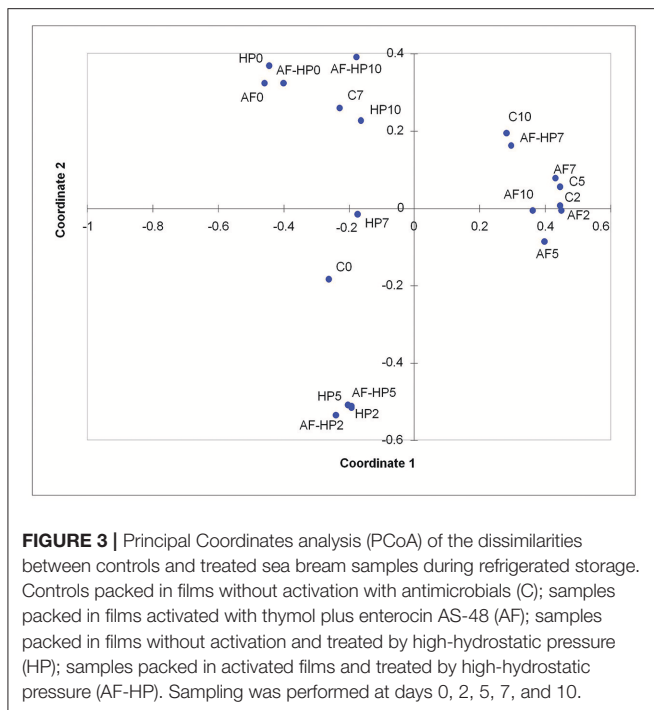


FIGURE 3 | Principal Coordinates analysis (PCoA) of the dissimilarities between controls and treated sea bream samples during refrigerated storage. Controls packed in films without activation with antimicrobials (C); samples packed in films activated with thymol plus enterocin AS-48 (AF); samples packed in films without activation and treated by high-hydrostatic pressure (HP); samples packed in activated films and treated by high-hydrostatic pressure (AF-HP). Sampling was performed at days 0, 2, 5, 7, and 10.

the changes in the bacterial diversity of foods after application of food preservation methods. The data obtained by HTS can throw light on the behavior of potentially pathogenic and spoilage bacteria in foods during storage. Nevertheless, the influence of the method used to assess the biodiversity on the results needs to be taken into consideration. For example, differences in copy number of the 16S rRNA gene can cause quantification problems. Furthermore, results will also depend on sample variability. Considering these limitations, the results obtained in the present study by HTS revealed that the main bacterial groups detected in the fresh fillets after being packed in vacuum (*Listeria*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, and members of *Enterobacteriaceae*) were rapidly displaced by other bacterial groups during storage (mainly members of *Vibrio*, *Photobacterium*, and *Shewanella* together with other groups such *Cloacibacterium*, *Lactobacillales*, and *Comamonadaceae* appearing during late storage). Previous studies reported that *Shewanella putrefaciens* was found to be very important for spoilage of packed cod (Jorgensen et al., 1988) as well as *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas* spp., *Achromobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium* spp., and *Aeromonas* spp. (Dalgaard et al., 1993; Dalgaard, 1995). It is worth mentioning that OTUs for *Listeria* detected in the present study were assigned to *L. seeligeri* and that *L. monocytogenes* was not detected in the sea bream fillets. While isolates of the species *L. seeligeri* are typically hemolytic, this species is generally considered non-pathogenic (Orsi and Wiedmann, 2016). Furthermore, OTUs assigned to *Listeria* had very low relative abundance in all treated samples. *L. monocytogenes* is very sensitive to enterocin AS-48, but it is also known for its high barotolerance and its wide pressure resistance variation between

strains (Bruschi et al., 2017). Compared to *L. monocytogenes*, there are scarce data on pressure resistance variations between strains of *L. seeligeri*.

Packing in the activated film induced drastic changes on the sea bream microbiota. All relevant groups in control samples (C0) had reduced relative abundances in samples packed in the activated films (AF0), where OTUs assigned to *Comamonadaceae* and *Methylobacterium* (and to a less extent also *Acidovorax* and *Shewanella*) became predominant. Members of fam. *Comamonadaceae* have been described as part of the culturable microbiota of zebra fish (Cantas et al., 2012), and *Methylobacterium* has been described as a commensal bacterium from the skin of the salmonid brook charr (*Salvelinus fontinalis*) (Boutin et al., 2014). During storage, the bacterial communities of sea bream fillets packed in the activated films seemed to become quite stable, and the main groups detected (*Vibrio*, *Photobacterium*, and *Shewanella*) were the same as in the untreated controls. These results would be expected since the activated films did not prevent bacterial growth during storage. A possible explanation for the observed low efficacy of activated films during storage could be that added antimicrobials decreased below their minimum inhibitory concentrations upon diffusion from the activated film to the fish tissue, together with perhaps partial degradation of bacteriocin molecules by tissue proteases. The results also suggest that these bacterial groups are less sensitive to the antimicrobials employed, thymol and enterocin AS-48 and/or have a greater capacity to survive in the fish fillets under stress conditions. Since enterocin AS-48 acts on the bacterial cytoplasmic membrane (Gálvez et al., 1991), this bacteriocin has much lower activity against Gram-negative bacteria. Nevertheless, large differences in sensitivity to the bacteriocin have also been reported among Gram-negatives (Gálvez et al., 1989). By contrast, thymol can freely cross the cell wall and therefore inhibit the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria by interacting with the phospholipid bi-layer of cell membranes, resulting in metabolite dissipation (Hyldgaard et al., 2012). The possible species-dependence of the synergistic action of thymol with enterocin AS-48 deserves to be investigated in further studies.

The HP-treated samples had much lower relative abundances of OTUs assigned to *Vibrio* and *Photobacterium* compared with controls (C2, C5, C10) and with activated film packaging samples (AF2 to AF10). This may suggest a higher sensitivity of these bacterial groups to HP treatment. Compared to the single HP treatment, the combined treatment (activated film-HP) decreased the relative abundance at time 0 of *Comamonadaceae* and *Methylobacterium* and increased that of *Firmicutes* (mainly *Enterococcus* and *Lactobacillaceae*). However, samples from both treatments had similar bacterial compositions during storage. These results could be explained because the activated film alone only had limited effects on bacterial diversity during storage as discussed above. It is also worth mentioning that the main bacterial group detected during early storage of samples treated by HP (singly or in combination with the activated film) was *Acinetobacter*. Genus *Acinetobacter* has been reported as a member of the bacterial community of sea bream (*S. aurata*) larvae early after hatching (Califano et al., 2017) and also as one

of the dominant genera of the intestinal microbiota of Antarctic fish (Song et al., 2016). *Acinetobacter* was also predominant in salted bighead carp (*Aristichthys nobilis*) refrigerated fillets (Liu et al., 2017), in farmed sea bream (*S. aurata*) (Parlapani et al., 2013) and in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) packed in sealed polyvinyl chloride bags during the first 6 days of chill storage (Wang et al., 2014). *Acinetobacter* was also detected in common carp (*Cyprinus carpio*) fillets packed in air or under vacuum and stored under refrigeration (Zhang et al., 2015). In the present study, most OTUs included in this group were assigned to the environmental species *A. guillouiae* and to *A. johnsonii*, which rarely causes human infections (Montaña et al., 2016). Nevertheless, further studies need to be carried out in order to determine the potential risks of *Acinetobacter* in the sea bream fillets as well as resistance of the bacterium to inactivation by HP. *Acinetobacter*, together with *Pseudomonas* and *Shewanella* seemed to be the main spoilage bacteria during early storage in the HP-treated samples and also in the samples from the combined treatment (AF-HP). The observed higher relative abundances of these bacterial groups could be explained by several factors such as higher capacity to repair cellular damage induced by HP treatment, a higher capacity for utilization of available nutrients, ammensalism, or inactivation of competitors by HP treatment.

Carnobacterium and *Lactobacillales* were detected at high relative abundances in the HP-treated samples during late storage. *Lactobacillales* were also the most relevant group during late storage of samples from the combined treatment (AF-HP7, AF-HP10). These results would suggest that HP had selected lactic acid bacteria. Similar results have been reported by high-throughput sequencing studies in mango pulp (Pérez Pulido et al., 2017) and by culture-dependent methods in meat products

treated by HP (Garriga et al., 2004; Diez et al., 2009; Han et al., 2011).

Altogether, results from the present study reveal the complexity of bacterial populations in sea bream fillets and how these can be influenced by application of different preservation methods and storage time. The activated film and the HP treatment distinctively selected for different bacterial communities during food storage. While the HP treatment (applied singly or in combination) was most clearly associated with a predominance of OTUs assigned to lactic acid bacteria toward the end of storage, the high relative abundance of OTUs assigned to *Acinetobacter* in the HP-treated samples deserves further investigation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IO carried out sample preparation, microbiological analysis and DNA extraction for biodiversity studies. MG participated in supervision of the experimental work and interpretation of data. RP-P contributed with high-HP processing, data analysis and preparation of graphical material for the manuscript. RL was responsible for planning and supervision of the study. RL and AG carried out global analysis of the results and wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grant UJA2014/06/25 and the University of Jaen's Plan de Apoyo a la Investigación (research structure AGR230). We also acknowledge the Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeiA3.

REFERENCES

- Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., and 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. *J. Microbiol. Methods* 55, 599–605. doi: 10.1016/S0167-7012(03)00202-1
- Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M. A., and Sinigaglia, M. (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1294–1302. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02740.x
- Ananou, S., Zentar, H., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Maqueda, M., and Valdivia, E. (2014). The impact of enterocin AS-48 on the shelf-life and safety of sardines (*Sardina pilchardus*) under different storage conditions. *Food Microbiol.* 44, 185–195. doi: 10.1016/j.fm.2014.06.008
- Baños, A., García-López, J. D., Núñez, C., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., and Valdivia, E. (2016). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fish by enterocin AS-48 and *Listeria* lytic bacteriophage P100. *LWT Food Sci. Technol.* 66, 672–677. doi: 10.1016/j.lwt.2015.11.025
- Boutin, S., Sauvage, C., Bernatchez, L., Audet, C., and Derome, N. (2014). Inter individual variations of the fish skin microbiota: host genetics basis of mutualism? *PLoS ONE* 9:e102649. doi: 10.1371/journal.pone.0102649
- Bruschi, C., Komora, N., Castro, S. M., Saraiva, J., Ferreira, V. B., and Teixeira, P. (2017). High hydrostatic pressure effects on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*: evidence for variability in inactivation behaviour and in resistance to pediocin bacHA-6111-2. *Food Microbiol.* 64, 226–231. doi: 10.1016/j.fm.2017.01.011
- Califano, G., Castanho, S., Soares, F., Ribeiro, L., Cox, C. J., Mata, L., et al. (2017). Molecular taxonomic profiling of bacterial communities in a gilthead seabream (*Sparus aurata*) hatchery. *Front. Microbiol.* 8:204. doi: 10.3389/fmicb.2017.00204
- Campus, M. (2010). High pressure processing of meat, meat products and seafood. *Food Eng. Rev.* 2, 256–273. doi: 10.1007/s12393-010-9028-y
- Cantas, L., Sorby, J. R., Aleström, P., and Sorum, H. (2012). Culturable gut microbiota diversity in zebrafish. *Zebrafish* 9, 26–37. doi: 10.1089/zeb.2011.0712
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., and Turnbaugh, P. J. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4516–4522. doi: 10.1073/pnas.1000080107
- Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christeans, S., Denis, C., et al. (2015). Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *ISME J.* 9, 1105–1118. doi: 10.1038/ismej.2014.202
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., López, R. L., Omar, N. B., Valdivia, E., and Gálvez, A. (2009). 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 salad. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2216–2223. doi: 10.1016/j.fct.2009.06.012
- Corbo, M. R., Di Giulio, S., Conte, A., Speranza, B., Sinigaglia, M., and Del Nobile, M. A. (2009). Thymol and modified atmosphere packaging

- to control microbiological spoilage in packed fresh cod hamburgers. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 1553–1560. doi: 10.1111/j.1365-2621.2008.01822.x
- Corbo, M. R., Speranza, B., Filippone, A., Granatiero, S., Conte, A., and Sinigaglia, M. (2008). Study on the synergic effect of natural compounds on the microbial quality decay of packed fish hamburger. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 261–267. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.014
- Dalgaard, P. (1995). Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 305–317. doi: 10.1016/0168-1605(94)00136-T
- Dalgaard, P., Gram, L., and Huss, H. H. (1993). Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* 9, 283–294. doi: 10.1016/0168-1605(93)90020-H
- Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., Speranza, B., Sinigaglia, M., Conte, A., Caroprese, M., et al. (2009). Combined effect of MAP and active compounds on fresh blue fish burger. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 281–287. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.024
- Diez, A. M., Jaime, I., and Rovira, J. (2009). The influence of different preservation methods on spoilage bacteria populations inoculated in morcilla de Burgos during anaerobic cold storage. *Int. J. Food Microbiol.* 132, 91–99. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.019
- Elizaquivel, P., Sánchez, G., and 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 Cont.* 25, 704–708. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.12.003
- Ercolini, D. (2013). High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3148–3155. doi: 10.1128/AEM.00256-13
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., and Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51–70. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001
- Galvez, A., Lucas, R., Pérez-Pulido, R., and Grande Burgos, M. J. (2014). *Food Biopreservation*. New York, NY: Springer.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., and Valdivia, E. (1989). Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms. *Res. Microbiol.* 140, 57–68. doi: 10.1016/0923-2508(89)90060-0
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., and Valdivia, E. (1991). Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* 173, 886–892. doi: 10.1128/jb.173.2.886-892.1991
- Garriga, M., Grebol, N., Aymerich, M. T., Monfort, J. M., and Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf-life. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 451–457. doi: 10.1016/j.ifset.2004.07.001
- Ghanbari, M., Kneifel, W., and Domig, J. K. (2015). A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. *Aquaculture* 448, 464–475. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.033
- Gram, L., and Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 262–266. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00309-9
- Grande Burgos, M. J., López-Aguayo, M. C., Pérez Pulido, R., Galvez, A., and Lucas, R. (2017). Analysis of the microbiota of refrigerated chopped parsley after treatments with a coating containing enterocin AS-48 or by high-hydrostatic pressure. *Food Res. Int.* 99, 91–97. doi: 10.1016/j.foodres.2017.05.011
- Grande Burgos, M. J., Pérez-Pulido, R., López-Aguayo, M. C., Gálvez, A., and Lucas, R. (2014). The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22706–22727. doi: 10.3390/ijms151227206
- Han, Y., Jiang, Y., Xu, X., Sun, X., Xu, B., and Zhou, G. (2011). Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Sci.* 88, 682–688. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.02.029
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3:12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012
- Johnson, E. M., Jung, D. Y., Jin, D. Y., Jayabalan, D. R., Yang, D. S. H., and Suh, J. W. (2017). Bacteriocins as food preservatives: challenges and emerging horizons. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7, 1–25. doi: 10.1080/10408398.2017.1340870
- Jorgensen, B. R., Gibson, D. M., and Huss, H. H. (1988). Microbiological quality and shelf life prediction of chilled fish. *Int. J. Food Microbiol.* 6, 295–307. doi: 10.1016/0168-1605(88)90023-2
- Kergourlay, G., Taminiou, B., Daube, G., and Champomier Vergès, M. C. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *Int. J. Food Microbiol.* 213, 31–39. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.010
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41:e1. doi: 10.1093/nar/gks808
- Liu, X., Zhang, Y., Li, D., and Luo, Y. (2017). Characterization of the microbiota in lightly salted bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at 4°C. *Food Microbiol.* 62, 106–111. doi: 10.1016/j.fm.2016.11.007
- Lu, F., Ding, Y., Ye, X., and Liu, D. (2010). Cinnamon and nisin in alginate–calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. *LWT Food Sci. Technol.* 43, 1331–1335. doi: 10.1016/j.lwt.2010.05.003
- Mathur, H., Field, D., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2017). Bacteriocin-antimicrobial synergy: a medical and food perspective. *Front. Microbiol.* 8:1205. doi: 10.3389/fmicb.2017.01205
- Montaña, S., Schramm, S. T., Traglia, G. M., Chiemi, K., Parmeciano Di Noto, G., Almuzara, M., et al. (2016). The genetic analysis of an *Acinetobacter johnsonii* clinical strain evidenced the presence of horizontal genetic transfer. *PLoS ONE* 11:e0161528. doi: 10.1371/journal.pone.0161528
- Murchie, L. W., Cruz-Romero, M., Kerry, J. P., Linton, M., Patterson, M. F., Smiddy, M., et al. (2005). High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6, 257–270. doi: 10.1016/j.ifset.2005.04.001
- Neetoo, H., Ye, M., Chen, H., Joerger, R. D., Hicks, D. T., and Hoover, D. G. (2008). Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 8–15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.043
- Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M. D., and Camper, A. K. (2007). Use propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5111–5117. doi: 10.1128/AEM.02987-06
- Orsi, R. H., and Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5273–5287. doi: 10.1007/s00253-016-7552-2
- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., and Bajpai, V. K. (2017). Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. *Front. Microbiol.* 7:2161. doi: 10.3389/fmicb.2016.02161
- Parlapani, F. F., Meziti, A., Kormas, K. A., and Boziaris, I. S. (2013). Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiol.* 33, 85–89. doi: 10.1016/j.fm.2012.09.001
- Patel, S. (2015). Plant essential oils and allied volatile fractions as multifunctional additives in meat and fish-based food products: a review. *Food Addit. Contam. A. Chem. Anal.* 32, 1049–1064. doi: 10.1080/19440049.2015.1040081
- Pérez Pulido, R., Grande Burgos, M. J., Gálvez, A., and Lucas, R. (2017). Changes in bacterial diversity of refrigerated mango pulp before and after treatment by high hydrostatic pressure. *LWT Food Sci. Technol.* 78, 289–295. doi: 10.1016/j.lwt.2016.12.050
- Song, W., Li, L., Huang, H., Jiang, K., Zhang, F., Chen, X., et al. (2016). The gut microbial community of antarctic fish detected by 16S rRNA gene sequence analysis. *Biomed. Res. Int.* 2016:3241529. doi: 10.1155/2016/3241529
- Standen, B. T., Rodiles, A., Peggs, D. L., Davies, S. J., Santos, G. A., and Merrifield, D. L. (2015). Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 8403–8417. doi: 10.1007/s00253-015-6702-2

- Wang, C. Y., Huang, H. W., Hsu, C. P., and Yang, B. B. (2016). Recent advances in food processing using high hydrostatic pressure technology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 527–540. doi: 10.1080/10408398.2012.745479
- Wang, H., Luo, Y., Huang, H., and Xu, Q. (2014). Microbial succession of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) filets during storage at 4°C and its contribution to biogenic amines' formation. *Int. J. Food Microbiol.* 190, 66–71. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.021
- Zhang, Y., Li, D., Lv, J., Li, Q., Kong, C., and Luo, Y. (2017). Effect of cinnamon essential oil on bacterial diversity and shelf-life in vacuum-packaged common carp (*Cyprinus carpio*) during refrigerated storage. *Int. J. Food Microbiol.* 249, 1–8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.008
- Zhang, Y., Li, Q., Li, D., Liu, X., and Luo, Y. (2015). Changes in the microbial communities of air-packaged and vacuum-packaged common carp (*Cyprinus carpio*) stored at 4°C. *Food Microbiol.* 52, 197–204. doi: 10.1016/j.fm.2015.08.003
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2018 Ortega Blázquez, Grande Burgos, Pérez-Pulido, Gálvez and Lucas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ARTÍCULO 4

**María José Grande Burgos, Irene Ortega Blázquez, Rubén Pérez-Pulido,
Antonio Gálvez, Rosario Lucas**

**Bacterial diversity of refrigerated fruit puree as affected by treatments
with high hydrostatic pressure and activated film packaging**

***LWT-Food Science and Technology* (en revisión)**

1 **Bacterial diversity of refrigerated fruit puree as affected by treatments with high**
2 **hydrostatic pressure and activated film packaging**

3

4 **María José Grande Burgos^a, Irene Ortega Blázquez^a, Rubén Pérez-Pulido^a,**
5 **Antonio Gálvez^{a,*}, Rosario Lucas^a**

6

7

8 ^aMicrobiology Division, Department of Health Sciences, University of Jaen, Jaen, Spain

9

10 **Corresponding author. Present address: Área de Microbiología. Departamento de*
11 *Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Edif. B3. Universidad de*
12 *Jaén. Campus Las Lagunillas s/n. 23071-Jaén, Spain. Tel.: 34-953-212160; fax: 34-*
13 *953-212943.*

14 Email address: agalvez@ujaen.es

15

16

17

18 ABSTRACT

19 The aim of the present study was to determine the effect of treatments consisting of high
20 hydrostatic pressure (HP) and films activated with a combination of enterocin AS-48
21 and thymol (AF) on the microbial load and bacterial diversity of a fruit puree made
22 from banana, apple and pear. HP and AF treatments were applied singly or in
23 combination (AFHP) and samples were chill stored for 10 days after treatments. Only
24 the HP treatment was effective in reducing viable counts significantly ($P < 0.05$) after
25 treatment and during storage compared with untreated controls (C). The bacterial
26 community of the puree was determined with Illumina high throughput sequencing, and
27 was composed mainly of members assigned to fam. *Comamonadaceae* (23.17%) and
28 genera *Methylobacterium* (21.46%), *Acidovorax* (8.70%) and *Sphingomonas* (6.63%).
29 *Pseudomonas* became relevant by the end of storage (10.50%). Most of the AF samples
30 had higher relative abundances of the main four bacterial groups indicated above and
31 lower relative abundance of *Pseudomonas*. Application of the HP treatment markedly
32 reduced the relative abundances of *Comamonadaceae*, *Methylobacterium*, *Acidovorax*
33 and *Sphingomonas*. *Lactobacillales* increased in relative abundance upon application of
34 HP treatment, but not during storage, while *Pseudomonas* increased towards the end of
35 storage. The combined treatment AFHP achieved the greatest reduction in the relative
36 abundances of *Comamonadaceae* and *Methylobacterium*. Altogether, the results
37 indicate that HP treatment in combination with AF had the greatest effects on the
38 bacterial diversity of the fruit puree.

39

40 Keywords: fruit puree; biodiversity; high-pressure processing; activated packaging;
41 bacteriocin; thymol

42

43 **1. Introduction**

44 Consumers increasingly demand fresh and convenient healthy foods. Fresh fruit
45 purees are attractive food products for infant feeding, but also for the elderly and for
46 people in general interested in consumption of ready-to-eat foods rich in fibre, vitamins,
47 antioxidants and other bioactive compounds. However, fresh fruit juices and fruit purees
48 may contain a variety of spoilage microorganisms as well a human pathogenic bacteria.
49 Juices have been reported to transmit pathogens such as enterohaemorrhagic
50 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and
51 *Cryptosporidium* (Aneja, Dhiman, Aggarwal, & Aneja, 2014; Berger et al., 2010;
52 Tribst, Sant'Ana, & de Massaguer, 2009; Yeni, Yavaş, Alpas, & Soyer, 2016).
53 *Alicyclobacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Propionibacterium*
54 *cyclohexanicum*, *Pseudomonas* spp., and lactic acid bacteria have been detected as
55 spoilage bacteria in cut fruit and juices (Carlin, 2013; Tribst, Sant'Ana, & de Massaguer,
56 2009; Sospedra, Rubert, Soriano, & Mañes, 2012). In order to ensure food preservation
57 and safety and to satisfy consumer preferences for fresh-tasting fruits and purees with
58 high nutritional and sensory qualities, the demand for alternative non-thermal
59 preservation methods has increased (Mittal & Griffiths, 2005).

60 High-pressure processing (HP) technology is widely applied for preservation of
61 different types of foods, including vegetable foods (Wang, Huang, Hsu, & Yang, 2016).
62 Compared to thermal processing, HP treatment shows less impact on low molecular
63 weight compounds, like vitamins and pigments (Sánchez-Moreno, Plaza, de Ancos, &
64 Cano, 2003; Tauscher, 1995). In fruit juices, application of HP treatments at low
65 pressures of around 300 to 400 MPa reduce capital equipment costs compared to higher
66 pressure values while still being effective in microbial inactivation (Bayindirli, Alpas,
67 Bozoglu, & Hizal, 2006). A previous study from our group reported that application of
68 an HP treatment at 300 MPa for 5 min achieved a logarithmic reduction of around 5 log
69 cycles on *Listeria innocua* inoculated on a fruit puree made from banana, apple and pear
70 (Ortega Blázquez et al., 2017). The efficacy of HP treatments can be improved in
71 combination with other hurdles such as natural antimicrobial compounds (Garriga et al.,
72 2002; Masschalck, Deckers, & Michiels, 2003; Vurma et al., 2006). Among them,
73 bacteriocins and essential oils and their phenolic compounds are the best studied.
74 Natural antimicrobials can be incorporated in foods in different ways such as direct
75 addition, spraying, or immobilization on different supports (Gálvez, Abriouel, López, &
76 Ben Omar, 2007). Thymol is one of the major constituents of thyme oil (Hyldgaard,

77 Mygind, & Meyer, 2012; Thomson et al., 2003) and is a cheap antimicrobial
78 commercially available. Enterocin AS-48 is a circular bacteriocin that has shown
79 promising results as a preservative in previous studies carried out in various food
80 systems including meats, dairy products and vegetable foods (Grande-Burgos et al.,
81 2014).

82 In spite of the number of studies addressing the efficacy of HP, essential oils and
83 bacteriocins in food preservation, there is still limited information about their effects on
84 the food microbiota. In recent years, high-throughput sequencing (HTS) technology has
85 emerged as a powerful tool for studying microbial communities in food systems
86 (Ercolini, 2013; Kergourlay, Taminiau, Daube, & Champomier Vergès, 2015). Leff and
87 Fierer (2013) compared the surface microbiota of several fruits and vegetables
88 (including apples, grapes, lettuce, mushrooms, peaches, peppers, spinach, sprouts,
89 strawberries and tomatoes) by 454 pyrosequencing analysis targeting the 16S rRNA
90 region. HTS has also been applied to study the changes in the microbiota of chill-stored
91 vegetable foods (green asparagus, peaches, mango pulp and sweet cherries) treated by
92 HP (Grande Burgos et al., 2017a; Toledo et al., 2016) and also to study the effects of
93 HP in combination with enterocin AS-48 on the bacterial diversity of cherimoya pulp
94 (Pérez Pulido et al., 2015) and parsley (Grande Burgos et al., 2017b).

95 The aim of the present study was to determine the bacterial diversity of a fruit
96 puree stored under refrigeration and the effects on the microbiota of a mild HP
97 treatment applied singly or in combination with an activated film packaging containing
98 the natural antimicrobials thymol and enterocin AS-48.

99

100 **2. Materials and Methods**

101 *2.1. Sample preparation and treatments*

102 Fruit puree was prepared right before use from Golden delicious apples, pears
103 and bananas bought at a local supermarket. Fruits were peeled under aseptic conditions
104 and mixed in equal amounts by weight. The fruit mixture was processed with a
105 domestic blender for 1 min to obtain the fruit puree. The pH of the puree (pH 4.48) was
106 determined with a pH meter (Crison, Barcelona, Spain).

107 Polyethylene–polyamide bags (10 x 15 cm) were activated with antimicrobials
108 by addition of 1 ml 0.25% thymol (Sigma, Madrid, Spain) plus 1 ml solution of
109 partially-purified bacteriocin enterocin AS-48 (0.5 mg/ml) prepared as described
110 elsewhere (Abriouel et al., 2003). The bags were rubbed by hand in order to ensure

111 mixing and homogeneous distribution of antimicrobial solutions, and incubated for 60
112 min at ambient temperature to facilitate adsorption of antimicrobials. Then, excess
113 liquid was removed and the bags were allowed to dry for 60 min on filter paper inside a
114 biosafety cabinet (Telstar, Madrid, Spain) under UV irradiation to prevent microbial
115 contamination. Activated bags were used within 24 h of preparation. Control bags not
116 activated with antimicrobials were also kept for 60 min under UV irradiation in a
117 biosafety cabinet.

118 Aliquots (5 g) of the puree were packed inside the bags, followed by sealing
119 under vacuum. Two replicates (each one in triplicate) were prepared for each
120 experimental condition. Controls (C) consisted of puree packed in bags not activated
121 with antimicrobials. Activated film samples (AF) consisted of puree packed in bags
122 activated with enterocin AS-48 and thymol. High-hydrostatic pressure treatment was
123 applied to samples packed in bags without antimicrobials (HP) and also to samples
124 packed in activated bags (AFHP). HP treatment (300 MPa, 5 min at room temperature)
125 was applied by using a Stansted Fluid Power LTD Iso-Lab system (model
126 FPG9400B711; SFP, Essex, UK), with a come-up speed of 75 MPa/min.
127 Decompression was immediate. Pressurization fluid was water with added 10%
128 propylenglycol. The temperature inside the vessel during treatments ranged between
129 23.5 and 27.1 °C. The temperature of samples was 24.2 °C at the end of treatment. The
130 samples were placed on ice right after HP treatment. All samples were stored for 10
131 days at 5 °C. At desired incubation times, bags (in triplicate) from each treatment
132 condition (C, AF, HP, AFHP) were removed and the food content was homogenized
133 with 10 ml sterile saline solution. The resulting homogenate was serially diluted in
134 sterile saline solution and plated in triplicate on trypticase soya agar (TSA; Scharlab,
135 Barcelona, Spain) for determination of total aerobic mesophiles. The average number of
136 colonies obtained after 24-48 h incubation of the plates at 37 °C was used to calculate
137 the viable cell concentration (expressed as Log₁₀ colony forming units (CFU)/g).

138

139 2.2. DNA Extraction

140 For each sampling point and replicate, aliquots (5 ml) from homogenates were
141 mixed in sterile 50 ml test tubes and centrifuged at 600 x g for 5 min in order to remove
142 solids. An aliquot (1.5 ml) of the resulting supernatant was then transferred to an
143 Eppendorf test tube and centrifuged at 13.500 x g for 5 min to recover microbial cells.
144 The pellets were resuspended in 0.5 ml sterile saline solution each. Then, propidium

145 monoazide (PMATM, GenIUL, S.L, Barcelona, Spain) was added to block subsequent
146 PCR amplification of the genetic material from dead cells (Nocker, Sossa-Fernandez,
147 Burr, & Camper, 2007) as described by Elizaquivel et al., 2012. DNA from PMA-
148 treated cells was extracted by using a GenEluteTM Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-
149 Aldrich). The resulting DNA from the two batch replicates and same sampling point
150 was pooled into a single sample. DNA concentration and quality were measured with a
151 NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, United Kingdom).

152

153 *2.3. DNA Sequencing and Analysis*

154 In order to study bacterial diversity, 16S rRNA gene sequences were obtained by
155 means of Illumina technology essentially as described elsewhere (Caporaso et al., 2011;
156 Grande Burgos et al., 2017). DNA template was adjusted to 10-12 ng in each PCR
157 reaction. The amplicon sequencing protocol targets the V3 and V4 regions of the 16S
158 genes with the primers designed surrounding conserved regions (Klindworth et al.,
159 2013). Following the Illumina amplicon libraries protocol, DNA amplicon libraries
160 were generated using a limited cycle PCR, (KAPA HiFi HotStart ReadyMix, KK2602;
161 KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA). Then, Illumina sequencing adaptors and
162 dual-index barcodes were added to the amplicon. Libraries were normalized and pooled
163 prior to sequencing. The sample containing indexed amplicons was then loaded onto the
164 MiSeq reagent cartridge v3 (MS-102-3003; San Diego, CA, USA) and onto the
165 instrument along with the flow cell. Automated cluster generation and paired-end
166 sequencing with dual indexes reads was performed (2 x 300 bp run). After
167 demultiplexing, paired end reads were joined together with the fastq-join program
168 (<https://expressionanalysis.github.io/ea-utils/>). Only reads that had quality value (QV)
169 scores of ≥ 20 for more than 99% of the sequence were extracted for further analysis.
170 All sequences with ambiguous base calls were discarded. After filtering, sequence reads
171 were assigned to operational taxonomic units (OTUs) based on sequence similarity for
172 each read to 16S rRNA genes from the NCBI nt database by using BLASTN function.
173 Each read was assigned to the taxon corresponding to the Best Blast Hit over a
174 threshold of similarity ($e < 1E-15$).

175

176 *2.4. Statistical Analysis*

177 Data on viable cell counts for the different treatments and storage times were
178 analysed by one-way ANOVA (Microsoft Excel). Diversity indices Shannon Wiever

179 (H), Simpson (D) and Chao 1 were calculated using the statistical software packages
180 Paleontological Statistics (PAST). Euclidean distance matrix was obtained with SPSS
181 software.

182

183 3. Results

184 3.1. Effect of treatments on microbial inactivation

185 Total viable cell counts of control samples only increased significantly (1.13
186 logs, $P < 0.05$) by day 7, but then decreased during late storage (Table 1). Viable cell
187 counts from samples packed in the activated film did not differ significantly ($P > 0.05$)
188 from controls for the first two days, although they were significantly lower ($P < 0.05$)
189 during late storage, i.e. 1.78 and 1.21 logs lower at day 7 and 10, respectively. The
190 single HP treatment reduced viable counts below detectable levels ($< 1 \log \text{CFU/g}$) right
191 after treatment, followed by an increase in counts at days 2 and 7. At those points (HP2,
192 HP7), viable count were significantly lower ($P < 0.05$) than controls by 2.02 and 3.13
193 log cycles. The combined treatment was the most effective, since it reduced viable cell
194 counts below detectable levels for most of the treatment times, except at day 2, in which
195 counts were still significantly lower ($P < 0.05$) than controls and AF samples.

196

197 3.2. Effect of treatments on bacterial diversity

198 The number of operational taxonomic units (OTUs), the Chao 1 and Shannon
199 indices of controls and treated samples are reported in Table 2. The number of OTUs
200 was comprised between 38681 and 128099 depending on the sample. The highest
201 diversity indices were observed in samples from the HP treatment (both singly and in
202 combination with the activated film). Highest Chao 1 index value was observed in
203 samples from the combined treatment at the end of storage time.

204 *Proteobacteria* were the predominant group in the fruit puree, exceeding 60% in
205 relative abundance for most of the food samples, except for the combined treatment at
206 day 10 (Fig. 1A). *Proteobacteria* showed highest relative abundances in control samples
207 (82 to 87%) and in activated film samples (73.8 to 97.7%). *Firmicutes* were the second
208 most abundant group, and showed highest relative abundances in some samples treated
209 with activated films (AF7, 16.26%), in HP-treated samples (specially in HP0, 24.67%
210 and HP10, 15.43%) and in samples from the combined treatment (as exemplified by
211 AFHP0, 23.38% and AFHP10, 20.49%). *Actinobacteria* also showed higher relative
212 abundances in HP-treated samples (for both the single and the combined treatment

213 AFHP) compared with controls and the single AF treatment samples. *Bacteroidetes*
214 showed much lower relative abundances, except for samples from the combined
215 treatment at the end of storage.

216 The distribution of OTUs assigned to genus level or the closest higher taxon is
217 shown in Fig. 1B. The groups with highest relative abundance in the control samples
218 (C0) were fam. *Comamonadaceae* (23.17%) followed by *Methylobacterium* (21.46%),
219 *Acidovorax* (8.70%) and *Sphingomonas* (6.63%). The sum of OTUs assigned to fam.
220 *Pseudomonadaceae* plus genus *Pseudomonas* amounted to 8.09%. *Lactobacillaceae*
221 had a low relative abundance (2.13%). The relative abundance of these bacterial groups
222 remained quite stable during storage of the control samples, except for the increase in
223 OTUs assigned to *Pseudomonas* at the end of storage (10.50%).

224 The bacterial diversity from purees packed in the activated films resembled that
225 of the control samples, except that *Comamonadaceae* and *Methylobacterium* had higher
226 relative abundances for most of the sampling points. Similarly, *Acidovorax* and
227 *Sphingomonas* also had higher relative abundances (specially at early sampling points
228 AF0 and AF2 but also for AF10 in the case of *Acidovorax*), while *Pseudomonas* had
229 lower relative abundance at all sampling points.

230 Application of the high pressure treatment markedly reduced the relative
231 abundances of *Comamonadaceae* (11.48%), *Methylobacterium* (9.29%), *Acidovorax*
232 (3.13%) and *Sphingomonas* (1.67%) while other groups (*Lactobacillales*,
233 *Photobacterium*, *Pseudomonadaceae*) increased. During storage, *Comamonadaceae* and
234 *Methylobacterium* only increased in relative abundance in samples from day 7 (HP7),
235 but then decreased by day 10. *Lactobacillales* and *Photobacterium* were not relevant
236 OTUs during storage of the HP-treated samples, but *Pseudomonas* did increase in
237 relative abundance to 23.68% at the end of storage.

238 Application of the combined treatment (AFHP0) achieved a still greater
239 reduction in the relative abundances of *Comamonadaceae* (7.50%) and
240 *Methylobacterium* (6.67%). The relative abundance of these two groups increased by
241 day 2, but then decreased gradually during storage and reached lowest values among all
242 samples (4.67%, 4.30%) at day 10. *Lactobacillales* had low relative abundances in all
243 samples from the combined treatments, but *Pseudomonas* did increase during storage
244 and reached highest relative abundance at day 7 (AFHP7, 10.55%).

245 The similarities between controls and activated film samples were shown in the
246 Principal Coordinates Analysis (Fig. 3). Most of the controls and activated film samples

247 clustered closely (except AF7), while the HP-treated samples were more dispersed. The
248 most distantly-related samples were from HP treatment singly or in combination with
249 activated film at time 0 (HP0, AFHP0) and end of storage (HP10, AFHP10).

250

251 **4. Discussion**

252

253 Freshly-made fruit purees are attractive ready-to-eat foods. The stability of these
254 refrigerated foods depends on microbial spoilage. The possible risk for foodborne
255 pathogens being present also needs to be evaluated. According to results from the
256 present study, fruit puree made from bananas, apples and pears had a low microbial load
257 that was not able to proliferate sufficiently to cause spoilage during ten days of chill
258 storage. As a matter of fact, a decrease in viable counts was observed by the end of
259 storage. Application of a mild HP treatment achieved a reduction of bacterial load of at
260 least two log cycles. Even though there was a slight increase in the number of survivors
261 during storage (as indicated by data from days 2 and 7), the HP treatment was
262 considered to be an effective method for processing of the fruit puree since viable
263 counts in the treated samples were always significantly lower than controls. The
264 efficacy of HP treatments depends on several parameters like pressure intensity, holding
265 time, temperature, and the food pH among others (Considine et al., 2008). It has been
266 proposed that bacterial cells exhibit a higher sensitivity to HP treatment in conditions of
267 low pH because they are unable to repair the immediate damage, hence lowering their
268 tolerance to the unfavorable pH and organic acids present in the juices (Garcia-Graells,
269 Hauben, & Michiels, 1998; Alpas, Kalchayanand, Bozoglu, & Ray, 2000; Bayindirli,
270 Alpas, Bozoglu, & Hizal, 2006). In a previous study, HP treatment at 300 MPa (5 min)
271 achieved a reduction of 5 log cycles on *Listeria innocua* inoculated on a fruit puree
272 made from banana, apple and pear (Ortega Blázquez et al., 2017). Another study
273 reported reductions of between 4 and 5 log cycles for three major bacteria of concern in
274 foods (*E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*) in apricot, orange
275 and sour cherry juices (having pH values comprised between 3.30 and 3.80) after
276 application of HP treatments at 250 MPa for 5 min and 30 °C (Bayindirli, Alpas,
277 Bozoglu, & Hizal, 2006). Reductions exceeding 7 log cycles were reported when
278 treatments were applied at a higher pressure of 350 MPa.

279 The increase in viable counts observed in the present study after the HP
280 treatment could be due to recovery of sublethally-injured cells. Previous studies have

281 shown that the proportion of sublethally-injured cells increases as the intensity of HP
282 treatment decreases (Somolinos, García, Pagán, & Mackey, 2008). Nevertheless, cell
283 recovery also depends on environmental factors, and the low pH of the fruit puree
284 would be expected to act as a barrier against repair of damaged cells, especially those
285 not adapted to acidic environments. The activated film packaging was not effective in
286 reducing total microbial counts, and only delayed bacterial growth during storage.
287 While activated films may be highly effective on food surfaces, they may have a more
288 limited effect in liquid or semisolid foods due to dilution of the antimicrobials below
289 their minimum inhibitory concentration and also to the fact that the target bacteria could
290 be distributed through the whole food matrix rather than on the food surface.

291 Metagenomic studies provide new insights on the bacterial communities from
292 foods. This is the first metagenomic study on a fruit puree. The results obtained indicate
293 that the bacterial diversity of the fruit puree was represented by *Comamonadaceae* and
294 *Methylobacterium* as main groups. The family *Comamonadaceae* is a large and diverse
295 bacterial family (Willems, 2014) that includes genus *Acidovorax*, also detected in the
296 study. It is tempting to suggest that the OTUs not assigned to genus but included in
297 Fam. *Comamonadaceae* could also belong to *Acidovorax*. The species *Acidovorax*
298 *citrulli* is known as the causal agent of bacterial fruit blotch disease of cucurbit plants
299 (Willems et al., 1992). Although we have found no previous study on *Acidovorax* being
300 present in the type of fruits used in the present work, previous metagenomic studies
301 have reported this bacterium as member of the microbiota of diseased soil from banana
302 farms (Xue et al., 2015) and from the interior of banana plant pseudostem (Rossmanna
303 et al., 2012). Therefore we could speculate that bananas could be the primary source for
304 *Acidovorax* in the puree.

305 *Methylobacterium* spp. can be found in association with more than 70 species of
306 plants (Omer, Tombolini, & Gerhardson, 2004), actively colonizing the root, branches
307 and leaves (Andreote et al., 2006; Omer, Tombolini, & Gerhardson, 2004).
308 *Methylobacterium* has been reported as member of the bacterial communities from the
309 apple phyllosphere (Yashiro & McManus, 2012) and from pseudostems of banana
310 plants (Suhaimi et al., 2017). Furthermore, *Methylobacterium* also been detected in
311 strawberry fruit, where it has been postulated to contribute to development of
312 strawberry flavour (Nasopoulou et al., 2014). This is the first report on
313 *Methylobacterium* as a relevant bacterial group in the metagenome of a fruit puree.
314 Altogether, results from the metagenomic study suggest that the main representatives in

315 the microbiome of the puree are plant-associated bacteria. Members of
316 *Comamonadaceae* and *Methylobacterium* rarely cause disease in immunocompetent
317 persons (Li, Tarrand, & Han, 2015; Osborne et al., 2014). Therefore, the puree could be
318 considered a safe product unless accidentally contaminated with human pathogenic
319 bacteria able to survive in the food such as enteric bacteria or *Listeria monocytogenes*.

320 The relative abundances of the major bacterial groups found in the control
321 samples did not change remarkably during storage. However, changes were observed in
322 the treated samples, depending on treatment. The fact that *Comamonadaceae*,
323 *Methylobacterium*, *Acidovorax* and *Sphingomonas* had higher relative abundances in
324 the activated film samples compared with controls for most of the sampling points
325 suggests that these groups were less affected by the antimicrobials included in the
326 activated film. Thymol is active on both Gram-positive and Gram-negative bacteria
327 (Hyldgaard, Mygind, & Meyer, 2012), but also a previous study reported that, in
328 general, Gram-positive bacteria were more sensitive to inhibition by plant essential oils
329 than the Gram-negative bacteria (Smith-Palmer, Stewart, & Fyfe, 1998). Enterocin AS-
330 48 is only active on Gram-positives, unless the bacterial outer membrane permeability is
331 altered (Gálvez et al., 1991). These observations are in agreement with the low effect of
332 the activated films on the major bacterial groups detected in the metagenomic study.

333 The main effect observed after application of HP treatment was a reduction in
334 the relative abundance of the predominant groups found in controls (mainly
335 *Comamonadaceae*, *Methylobacterium*, *Acidovorax* and *Sphingomonas*). By contrast, an
336 increase in the relative abundance of *Lactobacillales* was observed upon application of
337 HP treatment, although this group was not relevant in the treated samples during
338 storage. Previous studies have reported that HP treatments select lactic acid bacteria in
339 mango pulp (Pérez Pulido, Grande Burgos, Gálvez, & Lucas, 2017), fish fillets (Ortega
340 Blázquez et al., 2018) and meat products (Garriga et al., 2004; Diez, Jaime, & Rovira,
341 2009; Han et al., 2011). This may be related to the general observation that Gram-
342 negative bacteria are more sensitive to HP treatments than Gram-positives (Smelt,
343 1998). The largest reductions in the relative abundances of *Comamonadaceae*,
344 *Methylobacterium*, *Acidovorax* were observed in the combined treatment AFHP. It is
345 tempting to suggest that, although the AF did not decrease the viability of the main
346 bacterial groups when applied singly, it still was able to have an effect on cells
347 sensitized by the HP treatment.

348 In conclusion, results from the study indicate that the main bacterial groups
349 associated with fruit puree are plant-associated bacteria having a low potential as human
350 pathogens. These bacterial populations seem to be affected to a greatest extent by mild
351 HP treatment in combination with activated film packaging. The combined treatment
352 causes greatest changes in the bacterial diversity of the purees.

353

354 **Acknowledgements**

355 This work was supported by research grant UJA2014/06/25 and the University
356 of Jaen`s Plan de Apoyo a la Investigación (research structure AGR230). We also
357 acknowledge the Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario CeiA3.

358

359 **References**

- 360 Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Gálvez, A. (2003).
361 Method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48
362 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *Journal of*
363 *Microbiological Methods*, 55, 599–605.
- 364 Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., & Ray, B. (2000). Interactions of high
365 hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of
366 pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens.
367 *International Journal of Food Microbiology*, 60, 33–42.
- 368 Andreote, F. D., Lacava, P. T., Gai, C. S., Araujo, W. L., Maccheroni, W., van
369 Overbeek, L. S., van Elsas, J. D., & Azevedo, J. L. (2006). Model plants for
370 studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella*
371 *fastidiosa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 419–426.
- 372 Aneja, K. R., Dhiman, R., Aggarwal, N. K., & Aneja, A. (2014). Emerging Preservation
373 Techniques for Controlling Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Fruit
374 Juices. *International Journal of Microbiology*, 2014, 758942.
- 375 Bayindirli, A., Alpas, H., Bozoglu, F., & Hızal, M. (2006). Efficiency of high pressure
376 treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple,
377 orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control*, 17, 52–58.
- 378 Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel,
379 G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human
380 pathogens. *Environmental Microbiology*, 12, 2385-2397.

- 381 Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., &
382 Turnbaugh, P. J. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of
383 millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of*
384 *Sciences*, *108*, 4516–4522.
- 385 Carlin, F. (2013). Fruits and vegetables. In M. P. Doyle & R. L. Buchanan (Eds.), *Food*
386 *microbiology. Fundamentals and frontiers* (4th edition). (pp. 187-201).
387 Washington, D. C.: ASM Press.
- 388 Considine, K. M., Kelly, A. L., Fitzgerald, G. F., Hill, C., & Sleator, R. D. (2008).
389 *FEMS Microbiology Letters*, *281*, 1-9.
- 390 Diez, A. M., Jaime, I., & Rovira, J. (2009). The influence of different preservation
391 methods on spoilage bacteria populations inoculated in *morcilla* de Burgos during
392 anaerobic cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, *132*, 91-99.
- 393 Ercolini, D. (2013). High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in
394 the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and*
395 *Environmental Microbiology*, *79*, 3148–3155.
- 396 Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., & Valdivia, E. (1991). Permeation of
397 bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and
398 channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *Journal of*
399 *Bacteriology*, *173*, 886–892.
- 400 Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based
401 strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*,
402 *120*, 51–70.
- 403 Garcia-Graells, C., Hauben, K. J. A., & Michiels, C. W. (1998). High pressure
404 inactivation and sublethal injury of pressure-resistant *Escherichia coli* mutants in
405 fruit juices. *Applied and Environment Microbiology*, *64*, 1566–1568.
- 406 Garriga, M., Aymerich, M. T., Costa, S., Monfort, J. M., & Hugas, M. (2002).
407 Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model
408 system during storage. *Food Microbiology*, *19*, 509–518.
- 409 Garriga, M., Grebol, N., Aymerich, M. T., Monfort, J. M., & Hugas, M. (2004).
410 Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial
411 meat products over its shelf-life. *Innovative Food Science and Emerging*
412 *Technologies*, *5*, 451-457.
- 413 Grande-Burgos, M. J., Pérez-Pulido, R., López-Aguayo, M. C., Gálvez, A., & Lucas, R.
414 (2014). The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action,

415 and possible food applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 15,
416 22706–22727.

417 Grande Burgos, M. J., López Aguayo, M. C., Pérez Pulido, R., Galvez, A., & Lucas, R.
418 (2017). Analysis of the microbiota of refrigerated chopped parsley after treatments
419 with a coating containing enterocin AS-48 or by high-hydrostatic pressure. *Food*
420 *Research International*, 99, 91–97.

421 Grande Burgos, M. J., López Aguayo, M. C., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R.
422 (2017a). Analysis of the bacterial biodiversity of peaches under refrigerated storage
423 after treatment by high hydrostatic pressure. *Foods and Bioproducts Processing*,
424 102, 55-61.

425 Grande Burgos, M. J., López Aguayo, M. C., Pérez Pulido, R., Galvez, A., & Lucas, R.
426 (2017b). Analysis of the microbiota of refrigerated chopped parsley after
427 treatments with a coating containing enterocin AS-48 or by High-Hydrostatic
428 Pressure. *Food Research International*, 99, 91-97.

429 Han, Y., Jiang, Y., Xu, X., Sun, X., Xu, B., & Zhou, G. (2011). Effect of high pressure
430 treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat*
431 *Science*, 88, 682–688.

432 Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G., & Champomier Vergès, M. C. (2015).
433 Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *Int. J.*
434 *Food Microbiology*, 213, 31–39.

435 Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation:
436 mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers*
437 *in Microbiology*, 3, 12.

438 Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Oliver
439 Glöckner, F. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers
440 for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids*
441 *Research*, 41, e1.

442 Leff, J. W., & Fierer, N. (2013). Bacterial Communities Associated with the Surfaces of
443 Fresh Fruits and Vegetables. *PLoS ONE*, 8, e59310.

444 Li, L., Tarrand, J. J., & Han, X. Y. (2015). Microbiological and clinical features of four
445 cases of catheter-related infection by *Methylobacterium radiotolerans*. *Journal of*
446 *Clinical Microbiology*, 53, 1375-1379.

447 Masschalck, B., Deckers, D., & Michiels, C. W. (2003). Sensitization of outer-
448 membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* to

449 antimicrobial peptides under high pressure. *Journal of Food Protection*, 66, 1360–
450 1367.

451 Mittal, G. S., & Griffiths, M.W. (2005). Pulsed electric field processing of liquid foods
452 and beverages. In: Sun DW, editor. Emerging technologies for food processing.
453 Boston: Academic Press; pp. 99–139.

454 Nasopoulou, C., Pohjanen, J., Koskimäki, J. J., Zabetakis, I., & Pirttilä, A. M. (2014).
455 Localization of strawberry (*Fragaria x ananassa*) and *Methylobacterium*
456 *extorquens* genes of strawberry flavor biosynthesis in strawberry tissue by in situ
457 hybridization. *Journal of Plant Physiology*, 171, 1099-1105.

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

461 Omer, Z. S., Tombolini, R., & Gerhardson, B. (2004). Plant colonization by pink-
462 pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). *FEMS Microbiology*
463 *Ecology*, 47, 319–326.

464 Orsborne, C., Hardy, A., Isalska, B., Williams, S. G., & Muldoon, E. G. (2014).
465 *Acidovorax oryzae* catheter-associated bloodstream infection. *Journal of Clinical*
466 *Microbiology*, 52, 4421-4424.

467 Ortega Blázquez, I., Grande Burgos, M. J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R.
468 (2017). Inactivation of *Listeria* in foods packed in films activated with enterocin
469 AS-48 plus thymol singly or in combination with high-hydrostatic pressure
470 treatment. *Coatings*, 7, 204.

471 Ortega Blázquez, I., Grande Burgos, M. J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., & Lucas, R.
472 (2018). Treatment with high-hydrostatic pressure, activated film packaging with
473 thymol plus enterocin AS-48 and its combination modify the bacterial communities
474 of refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets. *Frontiers in Microbiology*, in
475 press.

476 Pérez Pulido, R., Toledo, J., Grande, M. J., Gálvez, A., & Lucas, R. (2015). Analysis of
477 the effect of high hydrostatic pressure treatment and enterocin AS-48 addition on
478 the bacterial communities of cherimoya pulp. *International Journal of Food*
479 *Microbiology*, 196, 62-69.

480 Pérez Pulido, R., Grande Burgos, M. J., Gálvez, A., & Lucas, R. (2017). Changes in
481 bacterial diversity of refrigerated mango pulp before and after treatment by high
482 hydrostatic pressure. *LWT - Food Science and Technology*, 78, 289-295.

483 Rossmanna, B., Müllera, H., Smallab, K., Mpiirac, S., & Tumuhairwed, J. B., Stavere,
484 C., & Berga, G. (2012). Banana-Associated Microbial Communities in Uganda Are
485 Highly Diverse but Dominated by Enterobacteriaceae. *Applied and Environmental*
486 *Microbiology*, 78, 4933-4941.

487 Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2003). Vitamin C,
488 provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high-pressurized orange juice
489 during refrigerated storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 647-
490 653.

491 Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure
492 processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 152–158.

493 Smith-Palmer, A., Stewart, J., & Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant
494 essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in*
495 *Applied Microbiology*. 26, 118–122.

496 Somolinos, M., García, D., Pagán, R., & Mackey, B. (2008). Relationship between
497 sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic
498 pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Applied and Environmental*
499 *Microbiology*, 74, 7570-7577.

500 Sospedra, I., Rubert, J., Soriano, J. M., & Mañes, J. (2012). Incidence of
501 microorganisms from fresh orange juice processed by squeezing machines. *Food*
502 *Control*, 23, 282-285.

503 Suhaimi, N. S. M., Goh, S. Y., Ajam, N., Othman, R. Y., Chan, K. G., & Thong, K. L.
504 (2017). Diversity of microbiota associated with symptomatic and non-symptomatic
505 bacterial wilt-diseased banana plants determined using 16S rRNA metagenome
506 sequencing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 168.

507 Tauscher, B. (1995). Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical
508 aspects. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, 200, 3–13.

509 Thompson, J. D., Chalchat, J. C., Michet, A., Linhart, Y. B., & Ehlers, B. (2003).
510 Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and
511 composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of*
512 *Chemical Ecology*, 29, 859–880.

513 Toledo del Árbol, J., Pérez Pulido, R., La Stora, A., Grande Burgos, M. J., Lucas, R.,
514 Ercolini, D., & Gálvez, A. (2016). Changes in microbial diversity of brined green
515 asparagus upon treatment with high hydrostatic pressure. *International Journal of*
516 *Food Microbiology*, 216, 1–8.

517 Toledo del Árbol, J., Pérez Pulido, R., La Stora, A., Grande Burgos, M. J., Lucas, R.,
518 Ercolini, D., & Gálvez, A. (2016). Microbial diversity in pitted sweet cherries
519 (*Prunus avium* L.) as affected by high hydrostatic pressure treatment. *Food*
520 *Research International*, 89, 790-796.

521 Tribst, A. A., Sant'Ana A, S., & de Massaguer, P. R. (2009). Review: Microbiological
522 quality and safety of fruit juices--past, present and future perspectives. *Critical*
523 *Reviews in Microbiology*, 35, 310-39.

524 Vurma, M., Chung, Y. K., Shellhammer, T. H., Turek, E. J., & Yousef, A. E. (2006).
525 Use of phenolic compounds for sensitizing *Listeria monocytogenes* to high-
526 pressure processing. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 263–269.

527 Wang, C. Y., Huang, H. W., Hsu, C. P., & Yang, B. B. (2016). Recent Advances in
528 Food Processing Using High Hydrostatic Pressure Technology. *Critical Reviews in*
529 *Food Science and Nutrition*, 56, 527-540.

530 Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K., & de Ley, J. (1992).
531 Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as
532 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. *nov.*, comb. *nov.*, *Acidovorax avenae*
533 subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*.
534 *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 107-119.

535 Willems, A. (2014). The Family *Comamonadaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F.,
536 Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*, Springer, Berlin,
537 Heidelberg. pp 777-851.

538 Xue, C., Penton, C. R., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q., Li, R., Ruan, Y., & Shen, Q.
539 (2015). Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of
540 Panama disease. *Scientific Reports*, 5, 11124.

541 Yashiro, E., & McManus, P. S. (2012). Effect of streptomycin treatment on bacterial
542 community structure in the apple phyllosphere. *PLoS One*. 7, e37131.

543 Yeni, F., Yavaş, S., Alpas, H., & Soyer, Y. (2016). Most Common Foodborne
544 Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce: A Review of Recent Outbreaks.
545 *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1532-1544.

546

547 **Table 1**

548 Viable cell counts for total aerobic mesophiles in fruit puree stored under refrigeration.

549

550

	Storage time (days)			
	0	2	7	10
Control	3.25 ± 0.21 ^a	3.77 ± 0.09 ^a	4.38 ± 0.15 ^a	2.69 ± 0.13 ^a
Activated film (AF)	2.95 ± 0.07 ^a	3.80 ± 0.31 ^a	2.60 ± 0.17 ^b	1.48 ± 0.08 ^b
HP	<1.0 ^b	1.75 ± 0.29 ^b	1.25 ± 0.08 ^b	<1.0 ^b
AFHP	<1.0 ^b	1.05 ± 0.07 ^b	<1.0 ^b	<1.0 ^b

551 *Data (Log₁₀ CFU/g) are the average of two replicates ± standard deviation.*

552 ^{a, b} *down columns indicate significantly different (P < 0.05) values.*

553

554

555 **Table 2**

556 Number of sequences (reads) and observed diversity for 16S rRNA amplicons for the
 557 different puree samples analyzed in this study.

Sample	N° of reads	Shannon index	Simpson index	Chao 1 index
Untreated controls				
C0	106768	2.92	0.88	94.0
C2	38681	2.88	0.88	132.5
C7	128099	3.08	0.90	163.1
C10	81766	2.93	0.89	156.0
Activated film				
AF0	77648	2.08	0.79	98.93
AF2	81633	2.61	0.85	123.0
AF7	58979	3.40	0.94	207.2
AF10	64700	2.38	0.82	131.7
High hydrostatic pressure				
HP0	101808	3.14	0.93	169.0
HP2	34632	3.24	0.93	180.1
HP7	50431	3.11	0.91	138.0
HP10	81992	3.15	0.90	184.0
Activated film plus high hydrostatic pressure				
AFHP0	105883	3.72	0.96	205.2
AFHP2	48073	3.13	0.92	160.7
AFHP7	39574	3.35	0.94	168.9
AFHP10	73687	3.09	0.91	327.0

558

559

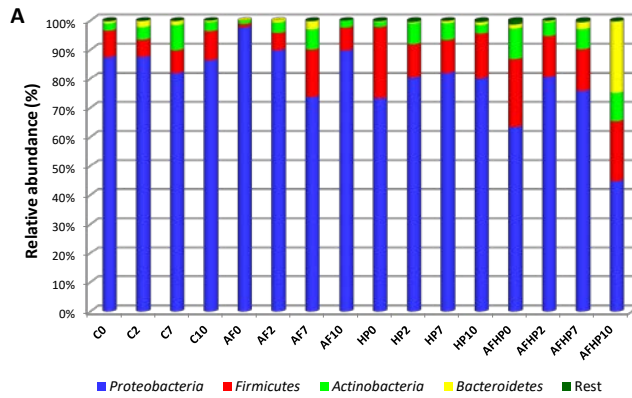


Figure 1A

561

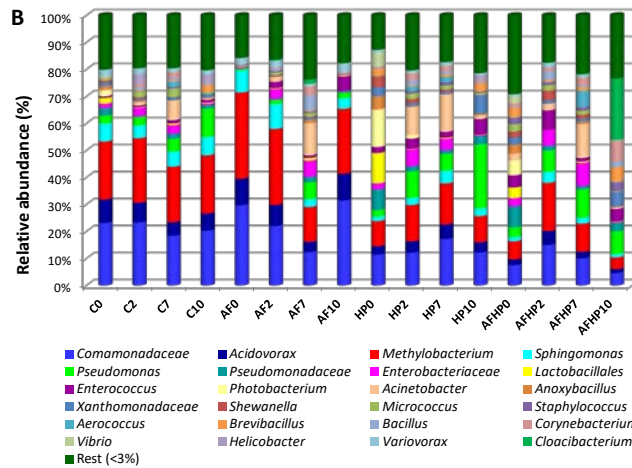
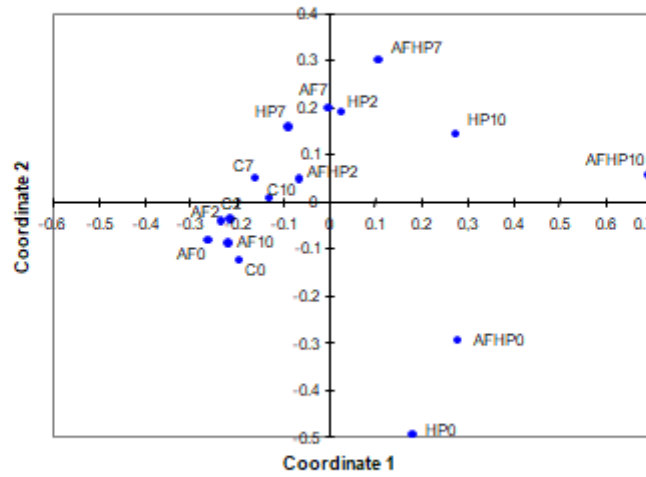


Figure 1B

562

563 **Fig. 1.** Relative abundance of operational taxonomic units (OTUs) based on paired-end 16S rRNA gene
 564 sequencing analysis of the bacterial community from refrigerated fruit puree. OTUs were clustered at
 565 phylum (A) or genus (B) level. Controls packed in films without activation with antimicrobials (C);
 566 samples packed in films activated with thymol plus enterocin AS-48 (AF); samples packed in films
 567 without activation and treated by high-hydrostatic pressure (HP); samples packed in activated films and
 568 treated by high-hydrostatic pressure (AFHP). Sampling was performed at days 0, 2, 7 and 10.



570

571 **Fig. 2.** Principal Coordinates analysis (PCoA) of the bacterial community from fruit puree samples after
 572 treatments and refrigerated storage. Controls packed in films without activation with antimicrobials (C);
 573 samples packed in films activated with thymol plus enterocin AS-48 (AF); samples packed in films
 574 without activation and treated by high-hydrostatic pressure (HP); samples packed in activated films and
 575 treated by high-hydrostatic pressure (AFHP). Sampling was performed at days 0, 2, 7 and 10.

576

DISCUSIÓN GENERAL

Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral era determinar la actividad de diferentes tipos de plásticos activados con varios compuestos fenólicos. Las películas de envasado de alimentos impregnadas o recubiertas con agentes antimicrobianos podrían prolongar la vida útil de los mismos y mejorar así la seguridad microbiana de los productos alimenticios (Kuorwel et al., 2011a). Los resultados del presente estudio mostraron que las películas de plástico activadas con carvacrol y timol presentaban las mayores actividades inhibitorias en comparación con los otros antimicrobianos probados, como el cinamaldehído, eugenol y tirosol. Estudios previos demostraron que el carvacrol y el timol incorporados en películas de plástico a concentraciones del 1% o más, inhibieron el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos como *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* o *B. cereus* y de bacterias alterantes como *B. thermosphacta* y *Carnobacterium* sp. (Persico et al., 2009; López et al., 2007a; López et al., 2007b; Gutierrez et al., 2009; Kuorwel et al., 2011b). Estudios previos también demostraron que el efecto bactericida de las soluciones de enterocina AS-48 frente a *L. monocytogenes* fue potenciado por varios aceites esenciales, como por carvacrol, eugenol, timol, terpineol, tirosol e hidroxitirosol (Cobo Molinos et al., 2009a).

De acuerdo con los resultados del presente estudio, la actividad del carvacrol y del timol aplicados en películas plásticas podría mejorar considerablemente en combinación con la enterocina AS-48. La potenciación de esta actividad se mostró no solo en las células planctónicas sino también en la formación de biofilms en las dos superficies plásticas ensayadas. Los resultados obtenidos en las células planctónicas podrían explicarse por la difusión de los antimicrobianos presentes en las superficies del plástico al medio. De acuerdo con los resultados obtenidos en células planctónicas, la película plástica nº 6 fue el mejor vehículo para la inmovilización de los antimicrobianos ensayados. Esta película de plástico es ampliamente utilizada para el envasado al vacío de alimentos, por lo que podría existir una potencial aplicación comercial de la misma. También vale la pena señalar que, de las cuatro bacterias incluidas en el estudio, *L. innocua* fue la más sensible a los antimicrobianos ensayados. Estudios previos han demostrado que *L. monocytogenes* es altamente sensible a la enterocina AS-48, con una concentración bactericida mínima de alrededor de 1 µg/ml (Mendoza et al., 1999). Sin embargo, otro estudio demostró que en estado sésil, *L.*

monocytogenes era mucho más resistente a esta bacteriocina (Caballero Gómez et al., 2012).

En el presente estudio, *L. fructivorans* fue mucho más resistente en el estado planctónico en comparación con *Listeria*, a pesar de la fuerte inhibición que se observaba en la formación de biofilm. Las células de *B. coagulans* parecían ser más resistentes que las de *B. licheniformis*. Esta diferencia en la resistencia también podría estar relacionada con el menor número de células encontradas en cultivos de *B. licheniformis*. Sin embargo, ambas bacterias fueron muy sensibles a la combinación de timol y AS-48 inmovilizada en la película n° 6. Por el contrario, la película n° 4 fue mucho menos efectiva en el cultivo de mayor densidad celular de *B. coagulans*, lo que sugiere que el tipo de soporte plástico podría influir también sobre la eficacia de la película activada.

Una de las principales causas de contaminación de los alimentos es la formación de biofilms bacterianos, porque los biofilms representan un reservorio persistente de bacterias y brindan por tanto una protección adicional frente a la desinfección (Srey et al., 2013). Los resultados del presente estudio indican claramente que la activación de películas plásticas con una combinación de compuestos fenólicos y bacteriocina AS-48 provocó una fuerte inhibición de la formación de biofilms. Este efecto inhibitor se asoció también en la mayoría de los casos a una disminución o inactivación completa de las células planctónicas. Sin embargo, en algunos casos, la formación de biofilms se inhibió completamente incluso en presencia de una población residual relativamente alta de células planctónicas, como en el caso de *L. fructivorans* a las 24 y 48 h de incubación. La inhibición observada de la formación de biofilms es importante, ya que la formación de estos puede proteger a las células bacterianas de sustancias antimicrobianas creando una barrera de difusión. Estudios previos demostraron que la enterocina AS-48 inhibía la formación de biofilms formados por *L. monocytogenes* y *B. cereus* (Caballero Gómez et al., 2012). Otros estudios han demostrado que las bacteriocinas pueden inhibir la formación de biofilms por bacterias patógenas humanas (Kumar et al., 2009; Winkelströter et al., 2011; Sudagidan et al., 2012; Bolocan et al., 2017; Camargo et al., 2016). En cuanto a los aceites esenciales, varios estudios han demostrado sus efectos inhibidores en la formación de biofilms en patógenos bacterianos (Pérez-Conesa et al., 2006; Lebert et al., 2007; Nostro et al., 2007;

Karpanen et al., 2008; Soni et al., 2013; Upadhyaya et al., 2013). Se ha descrito que el carvacrol, el cinamaldehído y el timol inhibieron la activación génica mediada por sensores de quórum relacionándolo con la inhibición de la formación de biofilms (Burt et al., 2014; Knowles et al., 2005; Niu et al., 2006; Zhou et al., 2006). La incorporación de carvacrol y cinamaldehído en películas de plástico para el envasado de alimentos, inhiben la formación de biofilms (Nostro et al., 2012). Los resultados del estudio indicaron que la combinación de enterocina AS-48 con timol era superior a carvacrol tanto en células planctónicas como en la inhibición de formación de biofilms. El timol es uno de los principales constituyentes del aceite de tomillo (Hyldgaard et al., 2012), y también está disponible comercialmente a un precio relativamente bajo, lo que hace que este compuesto sea factible para la aplicación en alimentos. En conjunto, los resultados del presente estudio resaltan el potencial del timol en combinación con enterocina AS-48 para la activación de películas plásticas destinadas al envasado de alimentos, creando así una barrera natural frente a la proliferación de bacterias Gram-positivas potencialmente patógenas y alterantes.

Los resultados obtenidos en la tesis nos indican que tanto los plásticos activados como el tratamiento por APH lograron reducciones iniciales similares en los recuentos de viables de *L. innocua* en filetes de dorada. Si bien el tratamiento por APH no pudo evitar una mayor proliferación de supervivientes durante el tiempo de almacenado de alimentos, el plástico activo retrasó el crecimiento al menos hasta el día 7. En comparación con otros métodos de adición de bacteriocina como la inmersión o pulverización, los plásticos activados ofrecen la ventaja de una liberación gradual de antimicrobianos en el medio mientras que, al mismo tiempo, también puede proporcionar cierta protección frente a la degradación de la bacteriocina por proteasas tisulares o por la formación de complejos con compuestos presentes en los alimentos (Gálvez et al., 2007). Una ventaja común a los envases antimicrobianos y los tratamientos por APH es que la acción antimicrobiana se ejerce sobre el producto envasado, evitando el riesgo posterior de contaminación cruzada. Los resultados obtenidos indicaron que, aunque el tratamiento combinado de plásticos activados con APH no mejoró significativamente la inactivación de *Listeria* en comparación con el tratamiento de plásticos activados solamente, sin embargo sí que retrasó la proliferación de sobrevivientes durante todo el período de almacenado, lo que indica por tanto una protección más prolongada frente a *Listeria*.

Un estudio previo demostró que la aplicación de enterocina AS-48 mediante pulverización a $0,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ reducía los recuentos de células viables de *L. monocytogenes* entre 1,68 y 1,9 ciclos logarítmicos en merluza cruda y filetes de salmón crudos, respectivamente (Baños et al., 2016). Este efecto fue similar al obtenido en el presente estudio para plásticos activados con una solución de bacteriocina más concentrada, en combinación con timol. Estos resultados sugieren que la cantidad de antimicrobianos adsorbidos en las películas plásticas era baja y/o que la difusión de bacteriocina y timol en el pescado era más lenta en comparación con una aplicación más directa mediante pulverización.

En el presente estudio, *Listeria* se inoculó en los filetes de pescado a una concentración lo suficientemente alta como para conseguir reducciones de al menos 4 ciclos logarítmicos. Sin embargo, se espera que las concentraciones iniciales de la bacteria en los alimentos crudos sean mucho más bajas. Por ejemplo, un estudio reciente (Wieczorek and Oseket, 2017) demostró que entre el 17.6-18.4% de las 301 muestras de peces frescos y ahumados marinos positivos para *L. monocytogenes*, solo tres muestras tenían recuentos de *Listeria* superiores a 2 log UFC/g, siendo la concentración más alta 3.88 log UFC/g. Considerando una concentración inicial de 3 log UFC/g en la materia prima, el tratamiento combinado de enterocina y APH reduciría la concentración de células viables por debajo de 100 células viables por gramo de alimento.

En el puré de fruta ensayado, *Listeria* fue incapaz de multiplicarse posiblemente debido al pH ácido de la fruta, pero sobrevivió bastante bien durante los primeros siete días de almacenamiento. Estudios previos han demostrado que *L. monocytogenes* puede crecer en diferentes verduras (Harris et al., 2003; Penteado and Leitao, 2004; Molinos et al., 2005), en frutas no ácidas (Ukuku and Fett, 2002; Molinos et al., 2008) y en frutas ácidas como los tomates (Beuchat and Brackett, 1991), naranjas Hamlin peladas (Pao et al., 1998), en rodajas de frambuesa, pera o kiwi (Molinos et al., 2008), y en rodajas de manzana Golden Delicious (Conway et al., 2000; Alegre et al., 2010). En 2014, un brote de listeriosis que se produjo en los Estados Unidos, se relacionó con el consumo de manzanas recubiertas de caramelo (Garner and Kathariou, 2016). Un estudio previo mostró que los recubrimientos comestibles activados con enterocina AS-48 a concentraciones de 20 o 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ reducen la concentración de células viables de *L.*

monocytogenes en cubos de manzana y mejoran la inactivación de la bacteria durante el almacenamiento en función de la concentración de bacteriocina empleada (López Aguayo et al., 2016). Los resultados del presente estudio indicaron que, bajo condiciones de pH ácido, *L. innocua* era mucho más sensible al tratamiento con plásticos activados que contenían enterocina AS-48 y timol y también al tratamiento por APH, en comparación con los resultados obtenidos en filetes de dorada que tenían un valor de pH cercano a la neutralidad. Cabría esperar que las condiciones de estrés impuestas por el pH ácido pudieran disminuir la capacidad de *Listeria* para reparar el daño celular causado por la enterocina AS-48 y el timol, así como por el tratamiento con APH.

Estudios previos han demostrado que la inactivación de microorganismos por los tratamientos de APH depende en gran medida de la matriz de los alimentos y de su pH (Alpas et al., 2000). El estrés ácido puede aumentar la tolerancia al tratamiento con APH, pero al mismo tiempo los ácidos orgánicos pueden actuar de forma sinérgica con dicho tratamiento (Alpas et al., 2000). Otro estudio (Stewart et al., 1997) demostró el papel potenciador del pH ácido, obteniendo una reducción adicional de 3 log UFC/g en *L. monocytogenes* cuando se presurizó (353 MPa, 10 min, 45 °C) en tampón a pH 4.0 en comparación con pH 6.0. En nuestro caso, además del pH más ácido en comparación al pescado, también cabría esperar una difusión más rápida de los antimicrobianos en el puré, lo que contribuiría a una mejor inactivación de las listerias en el interior del alimento. Estudios previos han demostrado que el efecto frente a *Listeria* de la enterocina AS-48 depende en gran medida del medio, con concentraciones bactericidas que van desde tan solo 0,8 µg/ml en caldo de infusión de cerebro-corazón (Mendoza et al., 1999) a 40 µg/g en jamón cocido (Ananou et al., 2010). De acuerdo con los resultados del presente estudio, y suponiendo una baja carga de *Listeria* en los purés de fruta, tanto en plásticos activados como el tratamiento con APH de baja intensidad, serían efectivos para mejorar la seguridad de los purés.

Por otro lado, los resultados presentados en este estudio indican que la reducción de la carga microbiana inicial en filetes de dorada y el retraso de su crecimiento durante el almacenamiento refrigerado se pueden mejorar considerablemente mediante la aplicación de tratamientos combinados tales como películas activadas con una mezcla de timol más enterocina AS-48 y un tratamiento leve de alta presión hidrostática (APH).

El tratamiento combinado tenía la ventaja de aumentar la inactivación microbiana al principio, y aun así mantener los recuentos de células viables en los filetes envasados, 1,2 ciclos logarítmicos más bajos que los controles no tratados en el día 7 de almacenamiento. Aunque las bacteriocinas pueden mostrar efectos sinérgicos con otros antimicrobianos naturales y con tratamientos no térmicos de procesamiento de alimentos como la APH (Gálvez et al., 2014; Mathur et al., 2017), no existen estudios previos sobre el efecto combinado de los envases activados con timol más enterocina AS-48 y tratamiento por APH. El intento de las células de reparar los daños múltiples causados por la acción combinada de diferentes antimicrobianos conduce al agotamiento de las reservas energéticas y finalmente a la muerte celular. Además, el daño a la membrana externa de bacterias Gram-negativas causado por algunos antimicrobianos y / o tratamientos da como resultado la permeabilización celular permitiendo una difusión más rápida de las bacteriocinas tales como la enterocina AS-48 a su principal diana celular, la membrana citoplásmica bacteriana (Gálvez et al., 1991).

Considerando que los alimentos son ecosistemas complejos que contienen una mezcla de especies bacterianas que pueden cambiar en abundancia relativa durante el almacenamiento dependiendo de diferentes factores ambientales como la temperatura de almacenamiento y la presencia de sustancias antimicrobianas, entre otros, es importante estudiar los cambios en la diversidad bacteriana de alimentos después de la aplicación de métodos de conservación de alimentos. Los datos obtenidos por secuenciación masiva pueden arrojar luz sobre el comportamiento de las bacterias potencialmente patógenas y alterantes en los alimentos durante el almacenamiento. Sin embargo, se debe tener en cuenta la influencia del método utilizado para evaluar la biodiversidad en los resultados. Por ejemplo, las diferencias en el número de copias del gen 16S rRNA pueden causar problemas de cuantificación. Además, los resultados también dependerán de la variabilidad de la muestra. Teniendo en cuenta estas limitaciones, los resultados obtenidos en el presente estudio por secuenciación masiva revelaron que los principales grupos bacterianos detectados en los filetes frescos después de ser envasados al vacío (*Listeria*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium* y miembros de *Enterobacteriaceae*) fueron rápidamente desplazados por otros grupos de bacterianos durante el almacenamiento (principalmente miembros de *Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella* junto con otros grupos como *Cloacibacterium*, *Lactobacillales* y

Comamonadaceae que aparecen durante el almacenamiento tardío). Estudios previos informaron que *Shewanella putrefaciens* resultó ser muy importante para el deterioro del bacalao envasado (Jorgensen et al., 1988), así como de *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas* spp., *Achromobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Flavobacterium* spp. y *Aeromonas* spp. (Dalgaard, 1995; Dalgaard et al., 1993).

Vale la pena mencionar que las OTUs para *Listeria* detectadas en el presente estudio se asignaron a la especie *Listeria seeligeri* y que no se detectó *Listeria monocytogenes* en los filetes de dorada. Si bien los aislados de la especie *L. seeligeri* son típicamente hemolíticos, esta especie generalmente se considera no patógena (Orsi and Wiedmann, 2016). Además, las OTUs asignadas a *Listeria* tenían una abundancia relativa muy baja en todas las muestras tratadas. *L. monocytogenes* es muy sensible a la enterocina AS-48, pero también es conocida por su alta barotolerancia y su amplia variación de resistencia a la presión entre diferentes cepas (Bruschi et al., 2017). Comparado con *L. monocytogenes*, hay pocos datos sobre las variaciones de resistencia a la presión entre las cepas de *L. seeligeri*.

El envase activado indujo cambios drásticos en la microbiota de la dorada. Todos los grupos relevantes en las muestras control presentaron una abundancia relativa inferior en las muestras envasadas con plásticos activados, donde las OTUs asignadas a *Comamonadaceae* y *Methylobacterium* (y en menor medida también a *Acidovorax* y *Shewanella*) pasaron a ser predominantes. Los miembros de familia *Comamonadaceae* se han descrito como parte de la microbiota cultivable de los peces cebrá (Cantas et al., 2012), y se ha descrito a *Methylobacterium* como una bacteria comensal de la piel de la trucha de río (*Salvelinus fontinalis*) (Boutin et al., 2014). Durante el almacenamiento, las comunidades bacterianas de filetes de dorada envasados con plásticos activados se volvieron bastante estables, y los principales grupos detectados (*Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella*) fueron los mismos que en los controles no tratados. Estos resultados se podrían esperar ya que las películas activadas no previenen el crecimiento bacteriano durante el almacenamiento. Una posible explicación de la baja eficacia observada para las películas activadas durante el almacenamiento podría ser que los antimicrobianos añadidos disminuyeron por debajo de sus concentraciones inhibitorias mínimas tras la difusión desde la película activada al alimento, unido posiblemente a una parcial degradación de las moléculas de bacteriocina por proteasas tisulares. Los resultados

también sugieren que estos grupos bacterianos son menos sensibles a los antimicrobianos empleados, el timol y la enterocina AS-48 y/o tienen una mayor capacidad para sobrevivir en los filetes de pescado bajo condiciones de estrés. Dado que la enterocina AS-48 actúa sobre la membrana citoplásmica bacteriana (Gálvez et al., 1991), esta bacteriocina tiene una actividad mucho menor frente a bacterias Gram-negativas. Sin embargo, también se han descrito grandes diferencias en la sensibilidad a la bacteriocina entre las Gram-negativas (Gálvez et al., 1989). Por el contrario, el timol puede atravesar libremente la pared celular y, por lo tanto, inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas al interactuar con las bicapas de fosfolípidos de las membranas celulares, provocando la pérdida de metabolitos (Hyldgaard et al., 2012).

Las muestras tratadas con APH tenían abundancias relativas más bajas para las OTUs asignadas a *Vibrio* y *Photobacterium* en comparación con los controles (muestras C2, C5, C10) y con las muestras envasadas con la película activada (muestras AF2 a AF10). Esto puede sugerir una mayor sensibilidad de estos grupos bacterianos al tratamiento con APH. En comparación con el tratamiento individual por APH, el tratamiento combinado (película activada-APH) disminuyó la abundancia relativa en el tiempo 0 de *Comamonadaceae* y *Methylobacterium* y aumentó la de *Firmicutes* (principalmente *Enterococcus* y *Lactobacillaceae*). Sin embargo, las muestras de ambos tratamientos tenían composiciones bacterianas similares durante el almacenamiento. Estos resultados podrían explicarse porque la película activada sola tuvo un efecto limitado sobre la diversidad bacteriana durante el almacenamiento como se discutió anteriormente.

También vale la pena mencionar que el principal grupo bacteriano detectado al comienzo del periodo de almacenamiento de las muestras tratadas con APH (individualmente o en combinación con la película activada) fue *Acinetobacter*. El género *Acinetobacter* se ha descrito como componente de la comunidad bacteriana de larvas de dorada (*Sparus aurata*) en poco después de la eclosión (Califano et al., 2017) y también como uno de los géneros dominantes de la microbiota intestinal de peces antárticos (Song et al., 2016). *Acinetobacter* también predominaba en filetes refrigerados de carpa cabeza (*Aristichthys nobilis*) (Liu et al., 2017), en dorada de granja (*Sparus aurata*) (Parlapani et al., 2013) y en filetes de carpa herbívora

(*Ctenopharyngodon idellus*) envasados al vacío en bolsas de cloruro de polivinilo, durante los primeros 6 días de almacenamiento en frío (Wang et al., 2014). *Acinetobacter* también se detectó en filetes de carpa común (*Cyprinus carpio*) envasados al aire o al vacío y almacenados en refrigeración (Zhang et al., 2015). En el presente estudio, la mayoría de las OTUs incluidas en este grupo se asignaron a la especie ambiental *A. guillouiae* y a *A. johnsonii*, que rara vez causa infecciones en humanos (Montaña et al., 2016). No obstante, es necesario realizar más estudios para determinar los riesgos potenciales de *Acinetobacter* en los filetes de dorada y la resistencia de la bacteria a la inactivación por APH. *Acinetobacter*, junto con *Pseudomonas* y *Shewanella* parecían ser las principales bacterias alterantes durante los primeros días de almacenamiento en las muestras tratadas con APH y también en las muestras con el tratamiento combinado (AF-APH). Las mayores abundancias relativas observadas de estos grupos bacterianos podrían explicarse en función de varios factores, como una mayor capacidad para reparar el daño celular inducido por el tratamiento con APH, una mayor capacidad de utilización de nutrientes disponibles y el amensalismo o inactivación de los competidores por tratamiento con APH.

Carnobacterium y *Lactobacillales* presentaban abundancias relativas altas al final del almacenamiento en las muestras tratadas con APH. *Lactobacillales* también fue el grupo más relevante al final del almacenamiento de las muestras del tratamiento combinado (AF-APH7, AF-APH10). Estos resultados sugerirían una selección de las bacterias del ácido láctico tras los tratamientos por APH. Resultados similares han sido descritos por estudios de secuenciación masiva en pulpa de mango (Pérez Pulido et al., 2017) y por métodos dependientes del cultivo en productos cárnicos tratados por APH (Garriga et al., 2004; Diez et al., 2009; Han et al., 2011). En conjunto, los resultados del presente estudio revelan la complejidad de las poblaciones bacterianas en los filetes de dorada y cómo estas pueden verse afectadas por la aplicación de diferentes métodos de conservación y tiempo de almacenamiento. Las diferentes comunidades bacterianas se comportaron de forma distinta durante el almacenamiento de alimentos en los alimentos envasados en films activos y en los tratados por APH. Mientras que el tratamiento con APH (aplicado solo o en combinación) se asoció claramente con un predominio de OTUs asignadas a bacterias del ácido láctico hacia el final del periodo de almacenamiento, la alta abundancia relativa de OTUs asignadas a *Acinetobacter* en las muestras tratadas con APH debe ser investigada más a fondo.

Los purés de fruta recién hechos son unos alimentos atractivos y listos para el consumo. La estabilidad de estos alimentos refrigerados depende del deterioro causado por los microorganismos. También es necesario evaluar el posible riesgo de transmisión de patógenos que estén presentes en estos alimentos. De acuerdo con los resultados del presente estudio, el puré de frutas elaborado con plátanos, manzanas y peras presentaba una baja carga microbiana que no fue capaz de proliferar lo suficiente como para causar deterioro durante los diez días de almacenamiento en frío. De hecho, se observó una disminución en los recuentos viables al final del periodo de almacenamiento. La aplicación de un tratamiento por APH de baja intensidad logró una reducción de la carga microbiana de al menos dos ciclos logarítmicos. Aunque hubo un ligero aumento en el número de sobrevivientes durante el almacenamiento (como lo indican los datos de los días 2 y 7), se consideró que el tratamiento por APH era un método efectivo para procesar el puré de fruta ya que los recuentos de células viables en las muestras tratadas fueron siempre significativamente más bajos que los controles.

La eficacia de los tratamientos de APH depende de varios parámetros como son la intensidad de la presión, el tiempo de almacenamiento, la temperatura y el pH de los alimentos, entre otros (Considine et al., 2008). Se considera que las células bacterianas muestran una mayor sensibilidad al tratamiento con APH en condiciones de bajo pH porque no pueden reparar el daño celular, por lo tanto, disminuyen su tolerancia al pH desfavorable y a los ácidos orgánicos presentes en los zumos (García-Graells et al., 1998; Alpas et al., 2000; Bayindirli et al., 2006). Como se ha discutido en los estudios preliminares, el tratamiento por APH a 300 MPa (5 min) logró una reducción de 5 ciclos log en el puré de fruta hecho de plátano, manzana y pera inoculado con *Listeria innocua* (Ortega Blázquez et al., 2017). Otro estudio mostró reducciones de entre 4 y 5 ciclos logarítmicos en tres de las principales bacterias alterantes en los alimentos (*E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*) en jugos de albaricoque, naranja y cereza (que tienen valores de pH comprendidos entre 3.30 y 3.80) después de la aplicación de tratamientos por APH a 250 MPa durante 5 minutos y almacenados a 30 °C (Bayindirli et al., 2006). Cuando los tratamientos se aplicaron a una presión más alta de 350 MPa se consiguieron reducciones superiores a 7 ciclos logarítmicos. El aumento en los recuentos de células viables observados en el presente estudio después del tratamiento por APH podría deberse a la recuperación de las células con daños

subletales. Estudios previos han demostrado que la proporción de células con daños subletales aumenta a medida que disminuye la intensidad del tratamiento por APH (Somolinos et al., 2008). Sin embargo, la recuperación celular también depende de factores ambientales, y se esperaría que el bajo pH del puré de fruta actúe como una barrera frente a la reparación de células dañadas, especialmente aquellas que no están adaptadas a ambientes ácidos.

El envasado con plásticos activos no fue efectivo para reducir los recuentos microbianos totales, y solo retrasó el crecimiento bacteriano durante el tiempo de almacenamiento. Mientras que las películas activadas pueden ser altamente efectivas en las superficies de los alimentos, pueden tener un efecto más limitado en alimentos líquidos o semisólidos debido a la dilución de los antimicrobianos por debajo de su concentración inhibitoria mínima y también al hecho de que las bacterias podrían distribuirse por toda la matriz del alimento en lugar de permanecer en la superficie del mismo.

Los estudios metagenómicos proporcionan nuevos conocimientos sobre las comunidades bacterianas de los alimentos. Este es el primer estudio de biodiversidad bacteriana sobre un puré de fruta. Los resultados obtenidos indican que la diversidad bacteriana del puré de fruta está representada por *Comamonadaceae* y *Methylobacterium* como grupos principales. *Comamonadaceae* es una familia bacteriana grande y diversa (Willems, 2014) que incluye el género *Acidovorax*, también detectado en el estudio. Cabría sugerir que las OTUs no asignadas al género pero incluidas en *Fam. Comamonadaceae* también podría pertenecer a *Acidovorax*. La especie *Acidovorax citrulli* es conocida como el agente causal de la enfermedad de mancha bacteriana en plantas curcubitáceas (Willems et al., 1992). Aunque no hemos encontrado estudios previos sobre la presencia de *Acidovorax* en el tipo de frutos utilizados en el presente trabajo, estudios metagenómicos previos demuestran que esta bacteria está presente en la microbiota de suelos infectados de fincas plataneras (Xue et al., 2015) y en el interior del pseudotallo de plantas de plátano (Rossmanna et al., 2012). Por lo tanto, podríamos especular que los plátanos podrían ser la principal fuente de *Acidovorax* en el puré.

Methylobacterium spp. es una bacteria que puede encontrarse en diferentes ambientes. Esta bacteria se ha descrito en asociación con más de 70 especies de plantas (Omer et al., 2004), colonizando activamente la raíz, ramas y hojas (Andreote et al., 2006; Omer et al., 2004). *Methylobacterium* se ha descrito como miembro de las comunidades bacterianas de la filosfera de la manzana (Yashiro and McManus, 2012) y de pseudotallos de plantas de plátanos (Suhaimi et al., 2017). También se detectó *Methylobacterium* en la fresa, donde además se ha postulado que contribuye al desarrollo de su sabor (Nasopoulou et al., 2014). Este es el primer estudio en el que *Methylobacterium* aparece como un grupo bacteriano relevante en el microbioma de un puré de fruta. En conjunto, los resultados del estudio de biodiversidad microbiana sugieren que los principales representantes en el microbioma del puré son bacterias asociadas a la planta. Los miembros de *Comamonadaceae* y *Methylobacterium* rara vez causan enfermedades en personas inmunocompetentes (Li et al., 2015; Osborne et al., 2014). Por lo tanto, el puré podría considerarse un producto seguro a menos que se contamine accidentalmente con bacterias patógenas humanas capaces de sobrevivir en los alimentos, como bacterias entéricas o *L. monocytogenes*.

Las abundancias relativas de los principales grupos bacterianos encontrados en el puré de frutas control no cambiaron notablemente durante el almacenamiento. Sin embargo, se observaron cambios en las muestras tratadas, dependiendo del tratamiento realizado. El hecho de que *Comamonadaceae*, *Methylobacterium*, *Acidovorax* y *Sphingomonas* tengan mayores abundancias relativas en las muestras envasadas en películas activadas en comparación con los controles para la mayoría de las muestras sugiere que estos grupos se vieron menos afectados por los antimicrobianos incluidos en los plásticos activados. El timol es efectivo en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Hyltdgaard et al., 2012), pero también un estudio previo demostró que, en general, las bacterias Gram-positivas eran más sensibles a la inhibición por aceites esenciales de las plantas que las bacterias Gram-negativas (Smith-Palmer et al., 1998). Como se ha comentado anteriormente, la enterocina AS-48 solo es activa en Gram-positivas, a menos que la permeabilidad bacteriana de la membrana externa esté alterada (Gálvez et al., 1991). Estas observaciones están de acuerdo con el bajo efecto de las películas activadas en los principales grupos bacterianos detectados en el estudio metagenómico.

El principal efecto observado después de la aplicación del tratamiento de APH al puré de frutas fue una reducción en la abundancia relativa de los grupos predominantes encontrados en los controles (principalmente *Comamonadaceae*, *Methylobacterium*, *Acidovorax* y *Sphingomonas*). Por el contrario, se observó un aumento en la abundancia relativa de *Lactobacillales* tras la aplicación del tratamiento por APH, aunque este grupo no fue relevante en las muestras tratadas durante el almacenamiento. Como se ha comentado con anterioridad, existen estudios previos que indican que los tratamientos por APH favorecen la selección de las bacterias del ácido láctico. La selección de bacterias lácticas por los tratamientos mediante APH podría estar relacionada con la idea general de que las bacterias Gram negativas son más sensibles que las Gram positivas a los tratamientos por APH (Smelt, 1998). Las mayores reducciones en las abundancias relativas de *Comamonadaceae*, *Methylobacterium*, *Acidovorax* se observaron en el tratamiento combinado por APH en las muestras envasadas en plásticos activados. Cabría pensar que, aunque el plástico activado no disminuyó la viabilidad de los principales grupos bacterianos cuando se aplicó de forma individual, sí que pudo tener un efecto sobre las células sensibilizadas previamente por el tratamiento por APH.

CONCLUSIONES

1. Entre los compuestos antimicrobianos ensayados en la activación de plásticos, carvacrol y timol mostraron los mejores resultados frente a *Listeria*.
2. La actividad antilisteria de los plásticos activados incrementó cuando el carvacrol o el timol se utilizaron en combinación con enterocina AS-48.
3. Los plásticos de polietileno-poliamida activados con timol y enterocina AS-48 fueron los más eficaces frente a células planctónicas así como en la inhibición de la formación de biopelículas por las bacterias Gram-positivas ensayadas.
4. Los plásticos activados con timol y enterocina AS-48 inhibieron el desarrollo de *Listeria innocua* en los dos alimentos modelo ensayados, filete de dorada y puré de frutas.
5. La actividad antimicrobiana de los tratamientos moderados por alta presión hidrostática se vio potenciada en ambos alimentos por los plásticos activados con timol y enterocina AS-48.
6. La biodiversidad bacteriana de los filetes de dorada envasados a vacío incluye como grupos más relevantes a *Listeria*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium* y *Enterobacteriaceae*. Estos grupos son rápidamente desplazados por *Vibrio*, *Photobacterium* y *Shewanella* durante el almacenamiento.
7. El almacenamiento de los filetes de dorada en plásticos activados así como la aplicación de tratamientos moderados por altas presiones modifican la diversidad bacteriana y su evolución durante el almacenamiento. Los cambios más notables se detectan para los tratamientos combinados.
8. Los grupos bacterianos principales detectados en el puré de frutas fueron *Comamonadaceae* y *Methylobacterium*, seguido de *Acidovorax* y *Sphingomonas*.
9. La abundancia relativa de los principales grupos bacterianos de las muestras incrementó en el puré almacenado en los envases activos.
10. La abundancia relativa de los principales grupos bacterianos de las muestras control disminuyó en las muestras tratadas por altas presiones y en los tratamientos combinados.

11. El grupo de *Pseudomonas* incrementó en los controles y en las muestras tratadas por altas presiones hacia el final del periodo de almacenamiento.

12. Los resultados indican que existe una dinámica compleja de las poblaciones bacterianas en los alimentos estudiados durante su almacenamiento, y que esta se ve influenciada por los tratamientos aplicados.

REFERENCIAS

- Albado, E., Saez, G., Grabiell, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Medica Herediana*. 12:7-19.
- 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.
- Adzet, T., Granger, R., Passet, J., SanMartin, R. (1977). Le polymorphisme chimique dans le genre *Thymus*: sa signification taxonomique. *Biochem. Syst. Ecol.* 5:269–272.
- Alegre, I., Abadias, M., Anguera, M., Oliveira, M., Viñas, I. (2010). Factors affecting growth of foodborne pathogens on minimally processed apples. *Food Microbiol.* 27:70–76.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Ray, B. (2000). Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 60:33–42.
- Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M.A., Sinigaglia, M. (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *J. Appl. Microbiol.* 99:1294–1302.
- Álvarez-Parrilla, (2006). Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas. http://www.ciad.mx/dtaov/XI_22CYTED/images/files_pdf/brasil/olga.pdf,
- Amalaradjou, M.A.L., Venkitanarayanan, K. (2011). Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. *J. Food Prot.* 74:200-208.
- Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Valdivia, E. (2004). Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* 99:1364–1372.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 103:179–190.

- Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Valdivia, E. (2005b). Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Sci.* 71:549–576.
- Ananou, S., Baños, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Valdivia, E. (2009). Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. *Food Control.* 21:478–486.
- Ananou, S., Garriga, M., Jofré, A., Aymerich, T., Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E. (2010). Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages. *Meat Sci.* 84:594–600.
- Ananou, S., Zentar, H., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E. (2014). The impact of enterocin AS-48 on the shelf-life and safety of sardines (*Sardina pilchardus*) under different storage conditions. *Food Microbiol.* 44:185–195.
- Andreote, F.D., Lacava, P.T., Gai, C.S., Araujo, W.L., Maccheroni, W., van Overbeek, L.S., van Elsas, J.D., Azevedo, J.L. (2006). Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. *Canadian J. Microbiol.* 52:419–426.
- Aneja, K.R., Dhiman, R., Aggarwal, N.K., Aneja, A. (2014). Emerging Preservation Techniques for Controlling Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Fruit Juices. *Int. J. Microbiol.* 2014:758942.
- Atarés, L., Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* 48:51-62.
- Balasubramaniam, V.M., Martínez-Montegudo, S.I., Gupta, R. (2015). Principles and application of high pressure-based technologies in the food industry. *Ann. Rev. Food Sci. Technol.* 6:19.1-19.28.
- Baños, A., Ananou, S., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E. (2012). Prevention of spoilage by enterocin AS-48 combined with chemical preservatives, under vacuum, or modified atmosphere in a cooked ham model. *Food Control.* 24:15–22.

- Baños, A., García-López, J.D., Núñez, C., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Valdivia, E. (2016). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fish by enterocin AS-48 and *Listeria* lytic bacteriophage P100. *LWT - Food Sci. Technol.* 66:672–677.
- Bayindirli, A., Alpas, H., Bozoglu, F., Hızal, M. (2006). Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control.* 17:52–58.
- Bazaka, K., Jacob, M.V., Crawford, R.J., Ivanova, E.P. (2012). Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95:299–311.
- Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* 12:2385-2397.
- Beshkova, D., Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Eng. Life Sci.* 12:1–14.
- Beuchat, L.R., Brackett, R.E. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1367–1371.
- Blanchard, J. (2000). Los antimicrobianos naturales refuerzan la seguridad en los alimentos. Disponible en: <http://www.directoalpaladar.com/2006/10/28-los-antimicrobianos-naturales-refuerzan-la-seguridad-en-los-alimentos>.
- Bodini, R.B., Sobral, P.J.A., Favaro-Trindade, C.S., Carvalho, R.A. (2013). Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. *LWT - Food Sci. Technol.* 51:104-110.
- Bokulich, N.A., Mills, D.A. (2012). Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. *BMB Rep.* 45:377–389.
- Bolívar A, Costa, J.C.C.P., Posada-Izquierdo, G.D., Valero, A., Zurera, G., Pérez-Rodríguez, F. (2018). Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in Mediterranean fish species from aquaculture production. *Int. J. Food Microbiol.* 270:14-21.

- Bolocan, A.S., Pennone, V., O'Connor, P.M., Coffey, A., Nicolau, A.I., McAuliffe, O., Jordan, K. (2017). Inhibition of *Listeria monocytogenes* biofilms by bacteriocin-producing bacteria isolated from mushroom substrate. *J. Appl. Microbiol.* 122: 279–293.
- Boutin, S., Sauvage, C., Bernatchez, L., Audet, C., Derome, N. (2014). Inter individual variations of the fish skin microbiota: host genetics basis of mutualism? *PLoS One.* 9:e102649.
- Braga, P.C., Dal Sasso, M., Culici, M., Bianchi, T., Bordoni, L., Marabini, L. (2006). Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacology* 77:130–136.
- Brody, A.L., Strupinsky, E.R., Kline, L.R. (2001). Active packaging for food applications. Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC.
- Bruna, J.E., Espinoza, L., Rodríguez, F., Guarda, A., Galotto, M.J. (2014b). Nuevos nanocompositos antimicrobianos basados en políácido láctico y montmorillonitas modificadas con cobre obtenidos mediante extrusión en fundido. En Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA 9. 1:405-412.
- Bruschi, C., Komora, N., Castro, S. M., Saraiva, J., Ferreira, V.B., Teixeira, P. (2017). High hydrostatic pressure effects on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*: Evidence for variability in inactivation behaviour and in resistance to pediocin bachA-6111-2. *Food Microbiol.* 64:226-231.
- Bullerman, L., Lieu, F., Seiser, S. (1997) Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.* 42:1107-1009.
- Burt, S.A., Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 36:162-167.
- Burt, S.A., Ojo-Fakunle, V.T.A., Woertman, J., Veldhuizen, E.J.A. (2014). The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations. *PLOS one.* 9:e93414.

- 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 Microbiol.* 30:51–58.
- Caballero Gómez, N., Grande, M.J., Pérez Pulido, R., Abriouel, H., Gálvez, A. (2013). Effect of enterocin AS-48 singly or in combination with biocides on planktonic and sessile *Bacillus cereus*. *Food Control* 34:743-751.
- Califano, G., Castanho, S., Soares, F., Ribeiro, L., Cox, C. J., Mata, L., Costa, R. (2017). Molecular Taxonomic Profiling of Bacterial Communities in a Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Hatchery. *Front Microbiol.* 8:204.
- Camargo, A.C., de Paula, O.A., Todorov, S.D., Nero, L.A. (2016). In Vitro Evaluation of Bacteriocins Activity Against *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 178:1239–1251.
- Campus, M. (2010). High pressure processing of meat, meat products and seafood. *Food Eng. Revs.* 2:256-273.
- Cantas, L., Sorby, J.R., Aleström, P., Sorum, H. (2012). Culturable gut microbiota diversity in zebrafish. *Zebrafish.* 9:26–37.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M.A., Cristinzio, G. (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Microbiol.* 79:4.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruíz, P., Hernández-Méndez, J. (2005). Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr. A.* 1089:1–17.
- Carbone, M., Donia, D.T., Sabbatella, G., Antiochia, R. (2016). Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. *J. King Saud Univ. Sci.* 28:273-279.
- Carlin, F. (2013). Fruits and vegetables. In M. P. Doyle & R. L. Buchanan (Eds.), *Food microbiology. Fundamentals and frontiers* (4th edition). (pp. 187-201). Washington, D. C.: ASM Press.
- Cerisuelo, J.P., Bermudez, J.M., Aucejo, S., Catala, R., Gavara, R., Hernandez- Munoz, P. (2013). Describing and modeling the release of an antimicrobial agent from an active PP/EVOH/PP package for salmon. *J. Food Eng.* 116:352–361.

- Chaibi, A., Ababouch, L.H., Belasri, K., Boucetta, S., Busta, F.F. (1997). Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiol.* 14:161-174
- Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C., Desmonts, M.H., Dousset, X., Feurer, C., Hamon, E., Joffraud, J.J., La Carbona, S., Leroi, F., Leroy, S., Lorre, S., Macé, S., Pilet, M.F., Prévost, H., Rivollier, M., Roux, D., Talon, R., Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.C. (2014). Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *Int. Soc. Microb. Ecol.* 1:1751-7362.
- Chen, C.P., Wang, B.J., Weng, Y.M. (2010). Physiochemical and antimicrobial properties of edible aloe/gelatin composite films. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45:1050-1055.
- Chiralt, A. (2014). Materiales biodegradables para el envasado activo de alimentos a base de almidón. En Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA 9. 1:27-36.
- Chung, D.H., Chikindas, M.L., Yam, K.L. (2001). Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by slow of propyl paraben from polymer coating. *J. Food Prot.* 64: 1420-1424.
- Claesson, M.J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P., O'Toole, P.W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res.* 38:e200.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71:1–20.
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Valdivia, E., Lucas, R., Maqueda, M., Martínez Cañamero, M., Gálvez, A. (2005). Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7781–7787.
- 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. *J. Food Prot.* 71:2460–2467.

- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Valdivia, E., Gálvez, A. (2008). Inhibition of *Bacillus cereus* and *B. weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing solutions containing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. *Food Microbiol.* 25:762–770.
- 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 Chem. Toxicol.* 46:2912–2921.
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., Gálvez, A. (2009). 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. (2009). Inhibition of *Salmonella enterica* cells in deli-type salad by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. *Probiot. Antimicrob. Prot.* 1:85–90.
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Lucas López, R., Ben Omar, N., Valdivia, A., Gálvez, A. (2009). 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 salad. *Food Chem. Toxicol.* 47:2216–2223.
- Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K. (2011). Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Sci.* 89:296–302.
- Coles, R., McDowell, D., Kirvan, M.J. (2003). *Food packaging technology*. CRC press
Bca Tatton EEUU 282p
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci.* 78:90–103.
- Considine, K.M., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Sleator, R.D. (2008). *FEMS Microbiol. Lett.* 281:1-9.

- Conway, W.S., Leverentz, B., Saftner, R.A., Janisiewicz, W.J., Sams, C.E., Leblanc, E. (2000). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. *Plant Dis.* 84:177–181.
- Corbo, M.R., Speranza, B., Filippone, A., Granatiero, S., Conte, A., Sinigaglia, M. (2008). Study on the synergic effect of natural compounds on the microbial quality decay of packed fish hamburger. *Int. J. Food Microbiol.* 127:261–267.
- Corbo, M.R., Di Giulio, S., Conte, A., Speranza, B., Sinigaglia, M., Del Nobile, M.A. (2009). Thymol and modified atmosphere packaging to control microbiological spoilage in packed fresh cod hamburgers. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44:1553–1560.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:777–788.
- Cutter, C.N., Willet, J.L., Siragusa, G.R. (2001). Improved antimicrobial activity of nisin incorporated polymer films by formulation change and addition of food grade chaletor. *Food Microbiol.* 33:325-328
- Daferera, D., Ziogas, B., Polissiou, M. (2000). GC–MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48:2576–2581.
- Dalgaard, P., Gram, L., Huss, H.H. (1993). Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* 9:283–294.
- Dalgaard, P. (1995) Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *Int. J. Food Microbiol.* 26:305–317.
- Dalgaard, P. (2000). Fresh and lightly preserved seafood. C.M.D. Man, A.A. Jones (Eds.), *Shelf-Life Evaluation of Foods* (2 edn), Aspen Publishers, Inc, London (2000), pp. 110-139.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, R., Ross P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16 :1058–1071.
- Del Nobile, M.A, Corbo, M.R., Speranza, B., Sinigaglia, M., Conte, A., Caroprese, M. (2009). Combined effect of MAP and active compounds on fresh blue fish burger. *Int. J. Food Microbiol.* 135:281–287.

- Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R., Pandian, S.K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacol.* 130:107-115.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Bockstal, A., Debevere, J. (2000). Study on antimicrobial activity of a food packaging material containing potassium sorbate. *Acta alimentaria* 29:137-146.
- Diez, A.M., Jaime, I., Rovira, J. (2009). The influence of different preservation methods on spoilage bacteria populations inoculated in morcilla de Burgos during anaerobic cold storage. *Int. J. Food Microbiol.* 132:91-99.
- Doyle M.P., Erickson M.C. (2008). Summer meeting 2007—The problems with fresh produce: An overview. *J. Appl. Microbiol.* 05:317–330.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M., Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:564–582.
- EFSA-ECDC. (2016). European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* 14:4634.
- EFSA-ECDC. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* 15:5077
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* 56:297–314.
- Ercolini, D., Cocolin, L. (2008). Introduction. In Cocolin L, Ercolini D (ed), *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*. Springer, New York, NY.
- Ercolini, D., Ferrocino, I., Nasi, A., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., La Stora, A., Laghi, L., Mauriello, G., Guerzoni, M.E., Villani, F. (2011). Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored in different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:7372–7381.

- Ercolini, D., De Filippis, F., La Storia, A., Iacono, M. (2012). “Remake” by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:8142– 8145.
- Ercolini, D. (2013). High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:3148–3155.
- Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M.A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. (2005). A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. *J. Food Prot.* 68:1664-1670.
- Fasseas, M., Mountzouris, K.C., Tarantilis, P.A., Polissiou, M., Zervas, G. (2008). Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemis.* 106:1188-1194.
- FDA. (2016). Food Facts From the U.S. Food and Drug Administration, (<https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/BuyStoreServeSafeFood/UCM440123.pdf>)
- Ferley, J., Poutignat, N., Azzopard, Y., Balducci, F. (1988). Aromathérapie préventive des surinfections chez les bronchiteux chroniques: evaluation statistique en milieu institutionnel: contre placebo. *Phytothérapie* 24:8.
- 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. *J. Peptide Sci.* 11:688–696.
- 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 Microbiol. Rev.* 31:293–310.
- Fuller, C.W., Middendorf, L.R., Benner, S.A., Church, G.M., Harris, T., Huang, X., Jovanovich, S.B., Nelson, J.R., Schloss, J.A., Schwartz, D.C., Vezenov, D.V. (2009). The challenges of sequencing by synthesis. *Nat. Biotechnol.* 27:1013–1023.
- Galotto, M.J., Guarda, Abel. (2014). Nuevas tendencias en envases de alimentos. En *Libro de Actas del Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA 9*. 1:46-53.

- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E. (1989). Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms. *Res. Microbiol.* 140:57–68.
- 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 lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* 173: 886–892.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120:51–70.
- Gálvez, A., Lucas-López, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben-Omar, N. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Rev. Biotechnol.* 28 :125–152.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R. (2010). Microbial antagonists to foodborne pathogens and biocontrol. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21:142–148.
- Gálvez, A., Lucas, R., Pérez-Pulido, R., Grande-Burgos, M.J. (2014). *Food Biopreservation*. New York: Springer.
- Gandhi, M., Chikindas, M.L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113:1–15.
- García-Graells, C., Hauben, K.J.A., Michiels, C.W. (1998). High pressure inactivation and sublethal injury of pressure-resistant *Escherichia coli* mutants in fruit juices. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1566–1568.
- García-Risco, M.R., Vicente, G., Reglero, G., Fornari, T. (2011). Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography. *J. Supercrit. Fluids.* 55:949–954.
- Garner, D., Kathariou, S. (2016). Fresh produce-associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, and insights. *J. Food Prot.* 79:337–344.
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M., Hugas, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* 19:509–518.

- Garriga, M., Grebol, N., Aymerich, M.T., Monfort, J.M., Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf-life. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5:451-457.
- Ghanbari, M., Kneifel, W., Domig, J.K. (2015). A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture* 448:464–475.
- Giraffa, G., Neviani, E. (2001). DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 67:19–34.
- Glenn, T.C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol. Ecol. Resour.* 11:759–769.
- Glinel, K., Thebault, P., Humblot, V., Pradier, C.M., Jouenne, T. (2012). Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomater.* 8:1670–1684.
- Glynn, B., Lahiff, S., Wernecke, M., Barry, T., Smith, T., Maher, M. (2006). Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. *Int. J. Dairy Technol.* 59:126-139.
- González, T., Rojas, R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública México.* 47:388-90.
- González-Muñoz, Y., Palomino-Camargo, C. (2012). Acciones para la gestión de la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos en un restaurante con ser vicio bufet. *Rev. Gerenc. Polit. Salud.* 11:23-40.
- Golmakani, M.T., Mendiola, J.A., Rezaei, K., Ibáñez, E. (2012). Expanded ethanol with CO₂ and pressurized ethyl lactate to obtain fractions enriched in γ -linolenic acid from *Arthrospira platensis* (Spirulina). *J. Supercrit. Fluids.* 62:109–115.
- Gram, L, Huss, H.H. (2000). Fresh and processed fish and shellfish. B.M. Lund, A.C. Baird-Parker, G.W. Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Foods* (1 edn), Chapman & Hall, London (2000), pp. 472-506.
- Gram, L., Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:262–266.

- Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valdivia, E., Gálvez, A. (2005). Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* 104:289–297.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 106:185–194.
- 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*. *J. Food Prot.* 70:405–411
- 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. *Int. J. Molec. Sci.* 15:22706–22727.
- Grande Burgos, M.J., López Aguayo, M.C., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., Lucas, R. (2017a). Analysis of the bacterial biodiversity of peaches under refrigerated storage after treatment by high hydrostatic pressure. *Foods and Bioprod. Process.* 102:55-61.
- Grande Burgos, M.J., López Aguayo, M.C., Pérez Pulido, R., Galvez, A., Lucas, R. (2017b). Analysis of the microbiota of refrigerated chopped parsley after treatments with a coating containing enterocin AS-48 or by High-Hydrostatic Pressure. *Food Res. Int.* 99:91-97.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J., Galotto, M.J. (2011). The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *Int. J. Food Microbiol.* 146:144–150.
- Gui, J., Patel, I.R. (2011). Recent advances in molecular technologies and their application in pathogen detection in foods with particular reference to yersinia. *J. Pathog.* 2011:310135.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol.* 26:142–150.

- Hakovirta, J. (2008). Modern techniques in detection, identification and quantification of bacteria and peptides from foods. University of Helsinki. Yliopistopaino.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86:985–890.
- Han, J.H. (2000). Antimicrobial food packaging. *Food Technol.* 54:56–65.
- Han, Y., Jiang, Y., Xu, X., Sun, X., Xu, B., Zhou, G. (2011). Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Sci.* 88:682–688.
- Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garret, E.H., Busta, F.F. (2003). Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2:78–141.
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala K. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agr. Food Chem.* 46:3590-3595.
- Hernández, E.J., Luna, P., Stateva, R.P., Najdanovic-Visak, V., Reglero, G., Fornari, T. (2011). Liquid–liquid phase transition of mixtures comprising squalene, olive oil, and ethyl lactate: application to recover squalene from oil deodorizer distillates. *J. Chem. Eng. Data* 56:2148–2152.
- Höferl, M., Buchbauer, G., Jirovetz, L., Schmidt, E., Stoyanova, A., Denkova, Z. (2009). Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. *J. Essent. Oil Res.* 21:459–463.
- Holley, R.A., Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22:273–292.
- Hotchkiss, J. (1997). Food packaging interactions influencing quality and safety. *Food Addit. Contam.* 14:601–607.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol.* 3:12.
- Irkin, R., Esmer, O.K. (2015). Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *J. Food Sci. Technol.* 52:6095–6111.

- Ishida, B.K., Chapman, M.H. (2009). Carotenoid extraction from plants using a novel, environmentally friendly solvent. *J. Agric. Food Chem.* 57:1051–1059.
- Ivanovic, J., Zizovic, I., Ristic, M., Stamenic Mand Skala, D. (2012). In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. *Food Control.* 25:110–116.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Bay, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59:171–200.
- Johnson, E.M., Jung, D.Y., Jin, D.Y., Jayabalan, D.R., Yang, D.S.H., Suh, J.W. (2017). Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7:1–25.
- Jokar, M., Rahman, R.A., Ibrahim, N.A., Abdulah, L.C., Tan, C.P. (2009). Melt production and antimicrobial efficiency of low-density polyethylene (LDPE)-silver nanocomposite film. *Food Bio. Technol.* 10:329-338
- Jorgensen, B.R., Gibson, D.M., Huss, H.H. (1988). Microbiological quality and shelf life prediction of chilled fish. *Int. J. Food Microbiol.* 6:295–307.
- Jorgensen, L.V., Huss, H.H., Dalgaard, P. (2000). The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 89:920–934.
- Juven, B., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76:626-631.
- Karpanen, T.J., Worthington, T., Hendry, E.R., Conway, B.R., Lambert, P.A. (2008). Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62:1031–1036.
- Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G., Champomier Vergès, M.C. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *Int. J. Food Microbiol.* 213:31–39.
- Khan H., Flint S., Yu P.L. (2010). Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 141:1–10.

- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:797–803.
- 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 J. Microbiol. Biotechnol.* 25:527–531.
- Kuorwel, K.K., Cran, M.J., Sonneveld, K., Miltz, J., Bigger, S.W. (2011a). Essential Oils and Their Principal Constituents as Antimicrobial Agents for Synthetic Packaging Films. *J. Food Sci.* 76:R164–R177.
- Kuorwel, K.K., Cran, M.J., Sonneveld, K., Miltz, J., Bigger, S.W. (2011b). Antimicrobial Activity of Natural Agents Coated on Starch-Based Films against *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.* 75:E126–E133.
- Lanciotti R., Gianotti, A., Patrignani F., Belletti N., Guerzoni M.E., Gardini, F. (2004) Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends Food Sci. Technol.* 15:201-208.
- Lebert, I., Leroy, S., Talon, R. (2007). Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Food Microbiol.* 24:281–287.
- Leff, J.W., Fierer, N. (2013). Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. *PLoS ONE.* 8:e59310.
- Leistner, L., Gorris, L.G.M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* 6:2–46.
- Leroi, F., Joffraud, J.J., Chevalier, F., Cardinal, M. (1998). Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *Int. J. Food Microbiol.* 39:111–121.
- Leroi, F., Cornet, J. Chevalier, F., Cardinal, M., Coeuret, G., Chaillou, S., Joffraud, J. (2015). Selection of bioprotective cultures for preventing cold-smoked salmon spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* 213:79-87.
- Li, L., Tarrand, J.J., Han, X.Y. (2015). Microbiological and clinical features of four cases of catheter-related infection by *Methylobacterium radiotolerans*. *J. Clinic. Microbiol.* 53:1375-1379.

- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:251364.
- Liu, X., Zhang, Y., Li, D., Luo, Y. (2017). Characterization of the microbiota in lightly salted bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at 4 °C. *Food Microbiol.* 62:106-111.
- 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. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 35:177-183.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., Nerín, C. (2007a). Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, and oregano essential oils and key constituents against foodborne microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 55:4348–56.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R., Nerín, C. (2007b). Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *J. Agric. Food Chem.* 55:8814–8824.
- Lucas, R., Grande, M.J., Abriouel, H., Maqueda, M., Ben Omar, N., Valdivia, E., Martínez-Cañamero, M., Gálvez, A. (2006). Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in low-pH canned fruit and vegetable foods. *Food Chem. Toxicol.* 44:1774–1781.
- Loman, N.J., Misra, R.V., Dallman, T.J., Constantinidou, C., Gharbia, S.E., Wain, J., Pallen, M.J. (2012). Performance comparison of benchtop highthroughput sequencing platforms. *Nat. Biotechnol.* 30:434–439.
- Lu, F., Ding, Y., Ye, X., Liu, D. (2010). Cinnamon and nisin in alginate–calcium coating maintain quality of fresh northern snakehead fish fillets. *LWT - Food Sci. Technol.* 43:1331-1335.
- Lund, B.M. (2014). Microbiological Food Safety and a Low-Microbial Diet to Protect Vulnerable People. *Foodborne Pathog. Dis.* 11:413-424.
- Malhotra, B., Keshwani, A., Kharkwal, H. (2015). Antimicrobial food packaging: Potential and pitfalls. *Front. Microbiol.* 6:611.

- 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. *Curr. Prot. Pep. Sci.* 5:399–416.
- Martínez Tenorio, Y., López Malo, A. (2001). Envases activos con agentes antimicrobianos y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de los alimentos.* 5:1-12.
- Martínez-Viedma, P., Abriouel, H., Ben Omar, N., Valdivia, E., Lucas López, R., Gálvez, A. (2008). Inactivation of exopolysaccharide and 3-hydroxypropionaldehyde-producing lactic acid bacteria in apple juice and apple cider by enterocin AS-48. *Food Chem. Toxicol.* 46:1143–1151.
- Martínez-Viedma, P., Sobrino, A., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas López, R., Valdivia, E., Martín Belloso, O., Gálvez, A. (2008). Enhanced bactericidal effect of high-intensity pulsed-electric field treatment in combination with enterocin AS-48 against *Salmonella enterica* in apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 128:244–249.
- Martínez Viedma, P., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., Gálvez, A. (2009). AS-48 for inhibition of foodborne pathogens in desserts. *J. Food Prot.* 72:1654-1659.
- 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 Microbiol.* 26:289–293.
- Martínez-Viedma, P., Abriouel, H., Sobrino, A., Ben Omar, N., Lucas López, R., Valdivia, E., Martín Belloso, O., Gálvez, A. (2009). Effect of enterocin AS-48 in combination with High-Intensity Pulsed-Electric Field treatment against the spoilage bacterium *Lactobacillus diolivorans* in apple juice. *Food Microbiol.* 26:491–496.
- Martínez-Viedma, P., Sobrino, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas López, R., Martín Belloso, O., Gálvez, A. (2009). Increased inactivation of exopolysaccharide-producing *Pediococcus parvulus* in apple juice by combined treatment with enterocin AS-48 and high-intensity pulsed-electric field. *J. Food Prot.* 73:39–43.

- Martínez-Viedma, P., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Gálvez, A. (2011). Inhibition of spoilage and toxinogenic *Bacillus* species in dough from wheat flour by the cyclic peptide enterocin AS-48. *Food Cont.* 22:756–761.
- Masoud, W., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Al-Soud, W.A., Sørensen, S.J., Jakobsen M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 153:192–202.
- Masschalck, B., Deckers, D., Michiels, C.W. (2003). Sensitization of outer-membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobial peptides under high pressure. *J. Food Prot.* 66:1360–1367.
- Mathur, H., Field, D., Rea, M.C., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2017). Bacteriocin-antimicrobial synergy: A medical and food perspective. *Front. Microbiol.* 8:1205.
- Mauriello, G., de Luca, E., la Storia, A., Villani, F., Ercoloni, D. (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Lett. Appl. Microbiol.* 41:464–469.
- McCollum, J.T., Cronquist, A.B., Silk, B.J., Jackson, K.A., O'Connor, K.A., Cosgrove, S., Gossack, J.P., Parachini, S.S., Jain, N.S., Etestad, P. (2013). Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *N. Engl. J. Med.* 369:944-953.
- McCoy, E., Morrison, J., Cook, V., Johnston, J., Eblen, D., Guo, C. (2001). Foodborne agents associated with the consumption of aquaculture catfish. *J. Food Prot.* 74:500-516.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* 92:1533.
- Medina, E., Romero, C., Brenes, M., De Castro, A. (2007). Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, and various beverages against foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 70:1194-1199.

- 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*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:618–625.
- Ming, X., Weber, G.H., Ayres, J.W., Sandine, W.E., (1997). Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *J. Food Sci.* 62:413-415.
- Mittal, G.S., Griffiths, M.W. (2005). Pulsed electric field processing of liquid foods and beverages. In: Sun DW, editor. *Emerging technologies for food processing*. Boston: Academic Press; pp. 99–139.
- Moldao-Martins, M., Palavra, A., Beirao da Costa, M.L., Bernardo-Gil, M.G. (2000). Supercritical CO₂ extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *Sylvestris* aroma. *J. Supercrit. Fluids* 18:25–34.
- Molinos, A.C., Abriouel, H., Omar, N.B., Valdivia, E., Lucas, R., Maqueda, M., Cañamero, M.M., Gálvez, A. (2005). Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7781–7787.
- Molinos, A.C., Abriouel, H., Omar, N.B., Lucas, R., Valdivia, E., Gálvez, A. (2008). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. *J. Food Prot.* 71:2460–2467.
- Molinos, A.C., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N.B., Valdivia, A., Gálvez, A. (2009). 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 salad. *Food Chem. Toxicol.* 47:2216–2223.
- Montaña, S., Schramm, S.T., Traglia, G.M., Chiem, K., Parmeciano Di Noto, G., Almuzara, M., Barberis, C., Vay, C. (2016). The Genetic Analysis of an *Acinetobacter johnsonii* Clinical Strain Evidenced the Presence of Horizontal Genetic Transfer. *PLoS One.* 11:e0161528.
- Mookherjee, B.D., Wilson, R.A., Trenkle, R.W., Zampino, M.J., Sands, K.P. (1989). New dimensions in flavor research. *ACS Symp Ser* 388:176–187.

- 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. *J. Food Prot.* 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. *Int. Dairy J.* 17:760–769.
- Muñoz-Bonilla, A., Fernández-García, M. (2012). Polymeric materials with antimicrobial activity. *Prog. Polym. Sci.* 37:281-339.
- Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J.P., López-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2012a). Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *Int. J. Food Microbiol.* 157:195-201.
- Muriel-Galet, V., López-Carballo, G., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2012b). Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *Int. J. Food Microbiol.* 157:239-244.
- Murchie, L.W., Cruz-Romero, M., Kerry, J.P., Linton, M., Patterson, M.F., Smiddy, M., Kelly, A.K. (2005). High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6:257 – 270.
- Nasopoulou, C., Pohjanen, J., Koskimäki, J.J., Zabetakis, I., Pirttilä, A.M. (2014). Localization of strawberry (*Fragaria x ananassa*) and *Methylobacterium extorquens* genes of strawberry flavor biosynthesis in strawberry tissue by *in situ* hybridization. *J. Plant Physiol.* 171:1099-1105.
- Nam, Y.D., Lee, S.Y., Lim, S.I. (2012). Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* 155:36–42.
- Natrajan, N., Sheldon, B.W. (2000). Efficacy of nisin coated polymerfilms to inactivate *Salmonella typhimurium* on fresh broiler skin. *J. Food Prot.* 63:1189–1196.

- Neetoo, H., Ye, M., Chen, H.Q. (2007). Effectiveness and stability of plastic films coated with nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 70:1267–1271.
- Neetoo, H., Ye, M., Chen, H., Joerger, R.D., Hicks, D.T., Hoover, D.G. (2008). Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.* 122:8–15.
- Nielsen, P.V., Rios R. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. Food Microbiol.* 60:219-229.
- Niu, C., Afre, S., Gilbert, E.S. (2006). Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 489–494.
- Nostro, A., Sudano Roccaro, A., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F., Blanco, A.R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 56:519–523.
- Nostro, A., Scaffaro, R., D'Arrigo, M., Botta, L., Filocamo, A., Marino, A., Bisignani, G. (2012). Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96:1029–1038.
- Nya, E.J., Austin, B. (2009). Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 32:963–970.
- Nya, E.J., Dawood, Z., Austin, B. (2010). The garlic component, allicin, prevents disease caused by *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 33:293–300.
- Nychas, G.J.E. (1995). Natural Antimicrobials from plants. En: *New Methods of food preservation*. G.W. Gould (Ed.). Blakie Academia y Professional. Glasgow. p. 1-21.
- O'Flaherty, S., Klaenhammer, T.R. (2011). The impact of omic technologies on the study of food microbes. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2:353–371.

- Olasupo, N.A., Fitzgerald, D.J., Narbad, A., Gasson, M.J. (2004). Inhibition of *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua* by nisin in combination with some naturally occurring organic compounds. *J. Food Prot.* 67:596-600.
- Omer, Z.S., Tombolini, R., Gerhardson, B. (2004). Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). *FEMS Microbiol. Ecol.* 47:319–326.
- Orsborne, C., Hardy, A., Isalska, B., Williams, S.G., Muldoon, E.G. (2014). *Acidovorax oryzae* catheter-associated bloodstream infection. *J. Clin. Microbiol.* 52:4421-4424.
- Orsi, R.H, Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:5273–5287.
- Ortega Blázquez, I., Grande Burgos, M.J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Lucas, R. (2017). Inactivation of *Listeria* in foods packed in films activated with enterocin AS-48 plus thymol singly or in combination with high-hydrostatic pressure treatment. *Coatings.* 7:204.
- Ortega Blázquez, I., Grande Burgos, M.J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Lucas, R. (2018). Treatment with high-hydrostatic pressure, activated film packaging with thymol plus enterocin AS-48 and its combination modify the bacterial communities of refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets. *Front. Microbiol.* 9:314.
- Otero, V., Becerril, R., Santos, J.A., Rodríguez-Calleja, J.M., Nerin, C., García-López, M.L. (2014). Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control.* 42:296-302.
- Pandey, A.K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N.N., Bajpai, V.K. (2017). Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Front Microbiol.* 7:2161.
- Pao, S., Brown, G.E., Schneider, K.R. (1998). Challenge studies with selected pathogenic bacteria on freshly peeled Hamlin orange. *J. Food Sci.* 63:359–362.
- Parlapani, F.F., Meziti, A., Kormas, K.A., Boziaris, I.S. (2013). Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiol.* 33:85-89.

- Patel, S. (2015). Plant essential oils and allied volatile fractions as multifunctional additives in meat and fish-based food products: a review. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal.* 32:1049–1064.
- Penteado, A.L., Leitao, M.F.F. (2004). Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *Int. J. Food Microbiol.* 92:89–94.
- Pereira de Abreu, D.A., Cruz, J.M., Paseiro-Losada, P. (2012). Active and intelligent packaging for the food industry. *Food Rev. Int.* 28:146-187.
- Perez Espitia, P.J., Soares, N.F.F., Coimbra, J.S.R., Andrade, N.J., Cruz, R.S. (2012). Medeiros, E.A.A. Bioactive peptides: synthesis, properties and applications in the packaging and preservation of food. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11:187–204.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 196:62-69.
- Pérez Pulido, R., Grande Burgos, M.J., Gálvez, A., Lucas, R. (2017). Changes in bacterial diversity of refrigerated mango pulp before and after treatment by high hydrostatic pressure. *LWT- Food Sci. Technol.* 78:289-295.
- Pérez-Conesa, D., McLandsborough, L., Weiss, J. (2006). Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. *J. Food Prot.* 69:2947–2954.
- Persico, P., Ambrogi, V., Carfagna, C., Cerruti, P., Ferrocino, I., Mauriello, G. (2009). Nanocomposite polymer films containing carvacrol for antimicrobial active packaging. *Polym. Eng. Sci.* 49:1447–1455.
- Ponce, A., Roura, S., del Valle, C., Moreira, M. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biol. Technol.* 49:294–300.
- Pourmortazavi, S.M., Hajimirsadeghi, S.S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A.* 1163:2–24.

- Prakash, V. (1990). *Leafy Spices*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp.114.
- Prasad, D., Sharan, A. (2009). DNA based methods used for characterization and detection of food borne bacterial pathogens with special consideration to recent rapid methods. *Afr. J. Biotechnol.* 8:1768-1775.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 150:81–94.
- Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., Garrigós, M.C. (2012). Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *J. Food Eng.* 109:513-519.
- Rastogi, K., Raghavarao, S.M.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjana, K., Knorr, D. (2007). Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods. *Crit. Rev Food Sci. Nutr.* 47:69-112.
- Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. (2010). Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *J. Biosci. Bioeng.* 110:614–619.
- Raybaudi–Massilia, R., Mosqueda–Melgar, J., Martín–Belloso, O. (2008). Edible alginate–based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf–life and safety of fresh–cut melon. *Int. J. Food Microbiol.* 121:313–327.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R. (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview Aromatic plants. *Forsch Komplementmed.* 16:79–90.
- Rendueles, E., Omer, M.K., Alvseike, O., Alonso Calleja, C., Capita, R., Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing. *LWT Food Sci. Technol.* 44:1251-1260.
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M. (2006). Molecular methodology in food microbiology diagnostics: trends and current challenges. *IUFoST.* 1085-1099.
- Rojas–Graü, M., Raybaudi–Massilia, R., Soliva–Fortuny, R., Avena–Bustillos, R., McHugh, T., Martín– Belloso, O. (2007a). Apple puree–alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf–life of fresh–cut apples. *Postharvest Biol. Technol.* 45:254–264.

- Rossmanna, B., Müllera, H., Smallab, K., Mpiirac, S., Tumuhairwed, J.B., Stavere, C., Berga, G. (2012). Banana-Associated Microbial Communities in Uganda Are Highly Diverse but Dominated by Enterobacteriaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4933-4941.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91:621–632.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, M.P. (2003). Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high-pressurized orange juice during refrigerated storage. *J. Agric. Food Chem.* 51:647-653.
- Santiago-Silva, P., Soares, N.F.F., Nobrega, J.E., Junior, M.A.W., Barbosa, K.B.F., Volp, A.C.P., Zerdas, E.R.M.A., Würllitzer, N.J. (2009). Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control.* 20:85–89.
- Santoro, G., das Graças Cardoso, M., Guimarães, L.G., Salgado, A.P., Menna-Barreto, R.F., Soares, M.J. (2007). Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol. Res.* 100:783-790.
- Scanell, A.G.M., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W., Arendt, K. (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins lactacin and nisaplin. *Int. Food Microbiol.* 60:241-249.
- Shendure, J., Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26:1135–1145.
- Silbande, A., Adenet, S., Smith-Ravin, J., Joffraud, J.J., Rochefort, K., Leroi, F. (2016). Quality assessment of ice-stored tropical yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and influence of vacuum and modified atmosphere packaging. *Food Microbiol.* 60:62-72.

- Silbande, A., Adenet, S., Chopin, C., Cornet, J., Smith-Ravin, J., Rochefort, K., Leroi, F. (2018). Effect of vacuum and modified atmosphere packaging on the microbiological, chemical and sensory properties of tropical red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets stored at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* 266:31-41.
- Smelt, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.* 9:152–158.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26:118–122.
- Soliman, K.M., Badeaa, R.I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* 40:1669–1675.
- Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M.G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotech.* 23:136–141.
- Somolinos, M., García, D., Pagán, R., Mackey, B. (2008). Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7570-7577.
- Song, W., Li, L., Huang, H., Jiang, K., Zhang, F., Chen, X., Zhao, M., Ma, L. (2016). The gut microbial community of antarctic fish detected by 16S rRNA gene sequence analysis. *Biomed Res. Int.* 2016:3241529.
- Soni, K.A., Oladunjoye, A., Nannapneni, R., Schilling, M.W., Silva, J.L. (2013). Inhibition and inactivation of *Salmonella* Typhimurium biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. *J. Food Protect.* 67:205–212.
- Sospedra, I., Rubert, J., Soriano, J.M., Mañes, J. (2012). Incidence of microorganisms from fresh orange juice processed by squeezing machines. *Food Control.* 23:282-285.
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control.* 31:572–585.

- Standen, B.T., Rodiles, A., Peggs, D.L., Davies, S.J., Santos, G.A., Merrifield, D.L. (2015). Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:8403-8417.
- Stewart, C.M., Jewett, F.F., Dunne, C.P., Hoover, G.H. (1997). Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Saf.* 17:23–36.
- Strati, I.F., Oreopoulou, V. (2011). Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46:23–29.
- Sudagidan, M., Yemenicioğlu, A. (2012). Effects of Nisin and Lysozyme on Growth Inhibition and Biofilm Formation Capacity of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Raw Milk and Cheese Samples. *J. Food Prot.* 75:1627–1633.
- Suhaimi, N.S.M., Goh, S.Y., Ajam, N., Othman, R.Y., Chan, K.G., Thong, K.L. (2017). Diversity of microbiota associated with symptomatic and non-symptomatic bacterial wilt-diseased banana plants determined using 16S rRNA metagenome sequencing. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33:168.
- Sung, S.Y., Sin, L.T., Bee, S.T., Rahmat, A.R. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends Food Sci. Technol.* 33:110–123.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., Bigger, S.W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J. Food Sci.* 68:408-420.
- Suzuki, S., Ono, N., Furusawa, C., Ying, B.W., Yomo, T. (2011). Comparison of sequence reads obtained from three next-generation sequencing platforms. *PLoS One* 6:e19534.
- Tauscher, B. (1995). Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung*, 200:3–13.
- Theinsathid, P., Visessanguan, W., Krueate, J., Kingcha, Y., Keeratipibul, S. (2012). Antimicrobial activity of lauric arginate-coated polylactic acid films against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on cooked sliced ham. *J. Food Sci.* 77:M142–M149.

- Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B., Ehlers, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J. Chem. Ecol.* 29:859–880.
- Tian, H., Lai, D.M. (2006). Analysis on the volatile oil in *Origanum vulgare*. *J. Chin. Med. Mater.* 29:920–921.
- 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 Res. Int.* 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. *Int. J. Food Microbiol.* 216:1–8.
- Tribst, A.A., Sant'Ana A.S., de Massaguer, P.R. (2009). Review: Microbiological quality and safety of fruit juices--past, present and future perspectives. *Critical Rev. Microbiol.* 35:310-339.
- Truelstrup, H.L., Gill, T., Huss, H.H. (1995). Effects of salt and storage-temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon. *Food Res. Int.* 28:123–130.
- Tschiggerl, F., Bucar, R. (2011). Influence of saponin plants on the volatile fraction of thyme in herbal teas. *Fitoterapia* 82:903–910.
- 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. *J. Food Prot.* 65:924–930.
- Upadhyay, I., Upadhyay, A., Kollanoor-Johny, A., Baskaran, S.A., Mooyottu, S., Darre, M.J., Venkitanarayanan, K. (2013). Rapid inactivation of *Salmonella* Enteritidis on shell eggs by plant-derived antimicrobials. *Poult. Sci.* 92:3228–3235.
- Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, J., Gonzalez-Martínez, C. (2008). Recent Advances in Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 486:496–511.

- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J. (2002). Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Add. Cont.* 19:163-171.
- Vicente, G., Paiva, A., Fornari, T., Najdanovic-Visak, V. (2011). Liquid–liquid equilibria for separation of tocopherol from olive oil using ethyl lactate. *Chem. Eng. J.* 172:879–884.
- Viedma, P.M., Ercolini, D., Ferrocino, I., Abriouel, H., Omar, N.B., Lopez, R.L., Galvez, A. (2010). Effect of polyethylene film activated with enterocin EJ97 in combination with EDTA against *Bacillus coagulans*. *LWT Food Sci. Technol.* 43:514–518.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A. (2009). Effect of orange dietary fibre, oregano essential oil and packaging conditions on shelf-life of bologna sausages. *Food Control.* 21:436-43.
- Villanueva Bermejo, D., Luna, P., Manic, M.S., Najdanovic-Visak, V., Fornari, T. (2013). Extraction of caffeine from natural matter using a biorenewable agrochemical solvent. *Food Bioprod. Process* 91:303–309.
- Vurma, M., Chung, Y.K., Shellhammer, T.H., Turek, E.J., Yousef, A.E. (2006). Use of phenolic compounds for sensitizing *Listeria monocytogenes* to high-pressure processing. *Int. J. Food Microbiol.* 106:263–269.
- Wallace, D.J., Van Gilder, T., Shallow, S., Fiorentino, T., Segler, S.D., Smith, K.E. (2000). Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)-1997. FoodNet Working Group. *J. Food Prot.* 63:807-809.
- Wang, C.Y., Huang, H.W., Hsu, C.P., Yang, B.B. (2016). Recent Advances in Food Processing Using High Hydrostatic Pressure Technology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition.* 56:527-540.
- Wang, H., Luo, Y., Huang, H., Xu, Q. (2014). Microbial succession of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) filets during storage at 4°C and its contribution to biogenic amines formation. *Int. J. Food Microbiol.* 190:66-71.
- Wieczorek, K., Osek, J. (2017). Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. *Food Microbiol.* 64:64–171.

- Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K., de Ley, J. (1992). Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:107-119.
- Willems, A. (2014). The Family Comamonadaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) The Prokaryotes, Springer, Berlin, Heidelberg. pp 777-851.
- 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.
- Xue, C., Penton, C.R., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q., Li, R., Ruan, Y., Shen, Q. (2015). Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. Sci. Rep. 5:11124.
- Yashiro, E., McManus, P.S. (2012). Effect of streptomycin treatment on bacterial community structure in the apple phyllosphere. PLoS One. 7:e37131.
- Yeni, F., Yavaş, S., Alpas, H., Soyer, Y. (2016). Most Common Foodborne Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce: A Review of Recent Outbreaks. Crit. Rev. Food Sci. Nutrit. 56:1532-1544.
- Yuste, J., Fung, D.Y.C. (2004). Inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in Apple Juice by a Combination of Nisin and Cinnamon J. Food Prot. 67:371-377.
- 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. Microbiol. Immunol. 57:746–755.
- 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. 31:499–507.
- Zhang, Y., Li, Q., Li, D., Liu, X., Luo, Y. (2015). Changes in the microbial communities of air-packaged and vacuum-packaged common carp (*Cyprinus carpio*) stored at 4 °C. Food Microbiol. 52:197-204.

- Zhang, Y., Li, D., Lv, J., Li, Q., Kong, C., Luo, Y. (2017). Effect of cinnamon essential oil on bacterial diversity and shelf-life in vacuum-packaged common carp (*Cyprinus carpio*) during refrigerated storage. *Int. J. Food Microbiol.* 249:1-8.
- Zhou, X.X., Li, W.F., Ma, G.X., Pan, Y.J. (2006). The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements. *Biotechnol. Adv.* 24:285–295.