

Uso de la cepa *Pseudomonas graminis* CPA-7 para el control de patógenos de transmisión alimentaria en frutas mínimamente procesadas

Immaculada Viñas, Isabel Alegre, M. Belén Iglesias y Cyrellys Collazo (Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida, XaRTA-Poscosecha, Centro Agrotecnio, Lleida. E-mail: ivinas@tecal.udl.cat).

Maribel Abadías y Neus Teixidó (IRTA, XaRTA-Poscosecha, Edifici Fruitcentre, Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida, Lleida. E-mail: isabel.abadías@irta.cat).

El consumo de frutas y hortalizas mínimamente procesadas se ha incrementado espectacularmente los últimos años en la UE, y especialmente en nuestro país, donde esta tecnología se ha introducido con diez años de retraso respecto a otros países como Francia o el Reino Unido. Este tipo de producto está listo para su consumo y no sufre ningún tratamiento que garantice la total eliminación de los patógenos de transmisión alimentaria. El uso del microorganismo antagonista *Pseudomonas graminis* CPA-7 puede contribuir a mejorar la seguridad microbiológica de la fruta mínimamente procesada.

INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas mínimamente procesadas o de IV gama son aquellas que se obtienen mediante el pelado, lavado y cortado de las mismas y que se convierten en un producto 100% comestible, el cual es posteriormente envasado y almacenado en frío, ofreciendo a los consumidores un producto fresco con un alto valor nutricional, comodidad de consumo y sabor, manteniendo al mismo tiempo las características del producto inicial (IFPA, 2002). Este tipo de alimentos no han sido sometidos a ningún proceso térmico ni de congelado. Sin embargo, pueden presentar recubrimientos y haber sido tratados con algún producto químico durante su lavado (FDA, 2016). Los consumidores están interesados en estos productos debido a la comodidad que presentan, a su disponibilidad en diferentes tamaños, a que se reduce el trabajo de preparación antes de su consumo y a que mantienen los nutrientes y las características de la materia prima (Bansal y col., 2015). Por otra parte, estos productos, que tienen que conservarse en refrigeración (0-5°C), son bastante perecederos y, por tanto, presentan una vida útil corta (7-11 días), lo cual limita su vida comercial.

Las operaciones del procesamiento de los productos vegetales mínimamente procesados no aseguran la esterilidad o estabilidad microbiológica del producto. El riesgo de proliferación de microorganismos, por tanto, se ve incrementado, aunque el crecimiento microbiano también se va a ver influido por el metabolismo del tejido vegetal y la atmósfera modificada creada dentro del envase, por el efecto combinado de la respiración y la permeabilidad de éste.

En este trabajo se pretende dar una visión general del uso de una técnica saludable y respetuosa con el medioambiente para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria, como son los cultivos bioconservantes o antagonistas entre los cuales se encuentra el agente de biocontrol *Pseudomonas graminis* CPA-7, desarrollado por nuestro grupo.

Microbiología de la fruta mínimamente procesada

Las frutas poseen mecanismos naturales contra los patógenos como pueden ser la piel o sustancias antimicrobianas como aceites esenciales, fenoles y polifenoles. Sin embargo, la barrera natural que les proporciona la cutícula se elimina durante el procesado, haciéndolas más susceptibles a la contaminación por microorganismos. El hecho de que

la fruta contenga ácidos orgánicos hace posible que tenga un pH ácido (valores de 4,6 o menores), a excepción de algunas frutas como el melón o algunas frutas tropicales que tienen un pH más cercano a la neutralidad. Los valores bajos de pH, junto con la naturaleza de los ácidos, es lo que va a determinar la microbiota predominante en ellas. De esta manera, dentro de la microbiota nativa de la fruta, que suele ser diversa, predominan mohos y levaduras, aunque también pueden encontrarse

algunas bacterias, la mayoría inofensivas, aunque también podrían encontrarse bacterias patógenas (ICMSF, 1980). La presencia de microorganismos se puede traducir tanto en un riesgo para la salud pública, debido a la presencia de patógenos, como en una disminución de la vida útil del producto, debido a la presencia de alterantes (García y Barrett, 2005).

Las frutas mínimamente procesadas se han asociado con enfermedades transmitidas por ali-

mentos causadas por microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas* spp., Virus (Norovirus, hepatitis A) y parásitos (*Cryptosporidium*, *Cyclospora*). Durante el período 2011-2014, en EEUU se produjeron 65 toxiinfecciones alimentarias que se relacionaron con el consumo de fruta, destacando un brote causado por el consumo de melón contaminado con *L. monocytogenes*, que tuvo lugar en 2011 y que causó 34 muertes. En la UE, durante el período de 2011-2015, se han relacionado 43 brotes de intoxicaciones alimentarias con el consumo de fruta y derivados.

La contaminación por microorganismos, que puede proceder de distintos orígenes (ambiental, animal o humano), se puede producir en cualquier etapa desde que la fruta se produce hasta que llega al consumidor (producción, cosecha, poscosecha, almacenamiento y manipulación en casa) (Olaimat y Holley, 2012). El primer punto de contaminación se puede dar durante la producción, debido, entre otros, a la presencia en la zona de cultivo de animales que constituyen un reservorio de patógenos; al uso de fertilizantes orgánicos, como pueden ser abonos naturales, que pueden contaminar los productos con patógenos de origen animal si no han sido procesados correctamente; y al agua de riego. Durante la cosecha, al igual que en la poscosecha, el principal punto de contaminación son los trabajadores, que, junto con los utensilios de trabajo y los envases, pueden ser portadores de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria. En las operaciones de procesamiento y de envasado también se puede producir la contaminación a través de los empleados y los utensilios empleados. Se ha observado que el número de microorganismos mesófilos puede aumentar de 2 hasta 5 log ufc/g desde la fruta fresca hasta la fruta mínimamente procesada dependiendo del producto, la estación del año y la región de cultivo. Por otra parte, se ha observado que los microorganismos presentes en la piel de la fruta pueden transmitirse a la pulpa en el proceso de cortado.

Por todo ello, para evitar y minimizar los riesgos de contaminación de la fruta, es necesario llevar a cabo unas Buenas Prácticas de Producción y de Fabricación, además de aplicar un sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC). Existen distintas guías como la "Guía de buenas prácticas de producción de IV gama" (2010) a nivel español, la "Guía de prácticas correctas de higiene para vegetales y derivados, frescos, pelados, troceados o envasados" en Cataluña (2015), o en Estados Unidos "Guidance for Industry: Guide to

Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables" (2008).

En cuanto a la legislación, los criterios microbiológicos aplicados a los alimentos están regulados por el Reglamento (CE) nº 2073/2005 y sus posteriores modificaciones. En el caso de frutas y hortalizas procesadas listas para el consumo, se regula la presencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* como criterios de seguridad alimentaria y *E. coli* como criterio de higiene del proceso.

Estrategias de intervención para minimizar los riesgos microbiológicos en frutas mínimamente procesadas

Actualmente, en la obtención de frutas mínimamente procesadas, la etapa de lavado es la única que puede reducir la contaminación microbiana de la fruta procesada. Esta etapa, junto con el uso de temperaturas de refrigeración y atmósferas modificadas, son las estrategias más utilizadas para reducir los riesgos microbiológicos.

El lavado de los productos, que se lleva a cabo por inmersión, elimina suciedad, residuos de pesticidas, exudados y microorganismos. La calidad del agua de lavado es esencial y para ello se suelen emplear desinfectantes químicos. El uso de desinfectantes elimina carga microbiana y mantiene el agua del proceso libre de contaminación microbiana, evitando así posibles contaminaciones cruzadas. Entre los desinfectantes más utilizados se encuentra el hipoclorito sódico, aunque actualmente se están estudiando otras alternativas más seguras y más respetuosas con el medioambiente, como el ácido peracético, ácidos orgánicos, ozono, etc., o métodos físicos como la luz UV o los ultrasonidos. En general, el uso de los desinfectantes y métodos físicos es inmediato y no persiste durante la conservación, por lo que si algún microorganismo patógeno sobrevive a esta etapa, podría llegar al consumidor.

Otro de los métodos que se empiezan a proponer como estrategias de intervención es el control biológico o bioconservación. Este concepto implica la utilización de organismos vivos (antagonistas o cultivos bioconservantes) o compuestos que producen para la eliminación de patógenos, de manera que es un método que prolonga la vida útil y mantiene la seguridad microbiológica (Stiles, 1996).

Para ser buenos antagonistas, los microorganismos tienen que cumplir una serie de características, entre las que están: no ser tóxicos (no ser un riesgo para la salud humana), ser estables durante

el almacenamiento (que mantengan la actividad inhibitoria durante la vida útil del alimento), ser efectivos frente a un amplio espectro de microorganismos, ser compatibles con las características fisiológicas y químicas de la matriz alimentaria, ser microorganismos aceptados dentro del marco normativo y no producir modificaciones en la calidad del alimento tales como mal olor o mal sabor (Jones y col., 2011).

Respecto a los métodos estándares actuales, la tecnología presenta las siguientes ventajas:

- El efecto del microorganismo bioconservante se mantiene a lo largo de la vida comercial del producto (transporte, distribución y venta).
- No afecta la calidad del producto final: textura, pH, color, acidez, sólidos solubles.
- Su aplicación es compatible con la tecnología actual de procesamiento de fruta de IV gama y no requiere inversión adicional.
- Puede frenar el crecimiento de patógenos de origen alimentario si se produce una ruptura de la cadena de frío, ya sea durante el transporte y almacenamiento o en el punto de venta, puesto que actúa en un rango más amplio de temperatura (5-20°C) que la refrigeración (1-5°C), siendo un complemento a éste.

Cabe destacar que las estrategias de bioconservación no sustituyen las buenas prácticas de higiene, de forma que siempre se deben considerar como un parámetro adicional para mejorar la seguridad y la calidad del producto (Holzapfel y col., 1995).

Diversos estudios han demostrado que los microorganismos propios de la fruta juegan un papel importante en la inhibición de patógenos mediante la competencia durante el almacenamiento.

Control biológico mediante la aplicación de la bacteria *Pseudomonas graminis* CPA-7

Pseudomonas graminis es una bacteria Gram-negativa aerobia estricta que se describió por primera vez en 1999 (Behrendt y col., 1999). Es un bacilo no formador de esporas, móvil a temperaturas de entre 15-20 C. Crece en un rango de temperatura de 4 a 40°C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 25°C. En medio de cultivo forma colonias de aspecto amarillento. La cepa *P. graminis* CPA-7 fue



Figura 1. Aplicación de CPA-7 en melón cortado.

aislada de la superficie de manzanas (Alegre y col., 2013b). Se encuentra depositada en el "Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)" de Utrecht (Holanda). Tiene concedida la patente a nivel europeo y la estadounidense.

Los estudios realizados por nuestro grupo de investigación se iniciaron en 2004 con el aislamiento y realización de los primeros ensayos en manzana cortada. Durante este tiempo, los estudios se han focalizado en estudiar su efecto sobre los principales patógenos de transmisión alimentaria (*Salmonella*, *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7) en distintas frutas, así como su efecto en la calidad. También se ha estudiado su modo de acción, y se han realizado algunos estudios toxicológicos.

Los primeros estudios de efectividad se realizaron en manzana Golden y en melocotón (Alegre y col. 2013b). Esta cepa fue la que mostró mejo-

res resultados entre aproximadamente cien cepas ensayadas. Fue efectiva frente a *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *L. innocua* en cilindros de manzana y melocotón envasados en aire (21,0% O₂ y 0,0% CO₂) durante dos días a 20°C. La cepa redujo el crecimiento de estos patógenos entre 4,5 y 5,9 unidades logarítmicas en manzana Golden y en varias variedades de melocotón, la reducción fue menor, entre 0,9 y 1,8 unidades logarítmicas. En manzana cortada conservada a 5°C durante diez días, su aplicación redujo el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en 3,5 unidades logarítmicas.

Posteriormente, se estudió su efectividad en manzana 'Golden' mínimamente procesada simulando condiciones comerciales, que incluían el uso de antioxidante y atmósfera modificada a 5 y 10°C (Alegre y col. 2013a). La cepa fue efectiva cuando se aplicó a una concentración de 10⁷ ufc/mL, redu-

ciendo el crecimiento de *Salmonella* con respecto el control en aproximadamente 2 unidades logarítmicas a 10°C. La población de *L. monocytogenes* se vio reducida significativamente en presencia del antagonista al final del ensayo a ambas temperaturas. La población de *P. graminis* CPA-7 aumentó a ambas temperaturas. La calidad de la fruta mínimamente procesada no se vio afectada.

La efectividad de la cepa también se ha evaluado en melón 'Piel de sapo' mínimamente procesado tratado con una solución antioxidante y envasado en atmósfera modificada, comparándolo con un envasado en aire (Abadias y col. 2014). En este estudio se vio que la atmósfera de envasado puede ser un factor crítico en la efectividad, ya que no se observó efecto antagonista en ninguno de los dos patógenos tras ocho días de almacenamiento en atmósfera modificada a 5°C, aunque sí se observó una

reducción de aproximadamente 1 unidad logarítmica en la población de *L. monocytogenes* en presencia de *P. graminis* CPA-7 cuando la fruta se conservó en aire. A 10°C, la cepa no fue efectiva frente a ninguno de los patógenos en la fruta envasada bajo atmósfera modificada. Sin embargo, cuando la fruta se envasó en aire, se observaron valores de reducción mayores de 4 unidades logarítmicas tanto en *Salmonella* como en *L. monocytogenes*. La población de *P. graminis* CPA-7 creció en todas las condiciones evaluadas. Además, la aplicación de CPA-7 en melón 'Piel de sapo' no afectó a la calidad físico-química del melón cortado ni a la actividad antioxidante, y las propiedades nutricionales se mantuvieron durante la vida útil de la fruta (Plaza y col., 2016).

Posteriormente, Iglesias y col., (2017) validaron la efectividad de la cepa en pera 'Conference' mínimamente procesada, observando también un efecto de la atmósfera de envasado y del antioxidante utilizado, por lo que se estudió el efecto de ambos factores. Se ha visto que algunos antioxidantes son incompatibles con el uso de la cepa, ya que reducen significativamente su población, mientras que otros antioxidantes no afectan ni a la viabilidad ni a la efectividad. En el mismo estudio, también se observó que la efectividad se redujo cuando durante la conservación se alcanzan valores de O₂ cercanos al 0% y valores elevados de CO₂ (>20%). En cuanto a la calidad físico-química de la pera (color, acidez, sólidos solubles), no se vio afectada por el uso de CPA-7. También se estudió su efecto sobre el perfil de compuestos volátiles y se demostró que algunos compuestos típicos del 'aroma a pera' se ven incluso incrementados (Iglesias, 2017).

La bacteria también ha mostrado efectividad en otras variedades de manzana (Fuji y Pink Lady), en melón Galia, nectarina 'Big Top', sandía y mandarina peladas y cortadas y conservadas a 10 °C. En el caso de otras frutas como kiwi, mango, fresa, naranja y piña, la presencia de CPA-7 no influyó en la población de *Salmonella* ni *L. monocytogenes* (Iglesias, 2017).

Para su uso a nivel comercial, es importante conocer cómo actúa o cual es el modo de acción del antagonista, y realizar estudios de toxicidad. Collazo y col. (2017a) estudiaron los posibles mecanismos de acción de esta cepa. Si bien en este estudio no se consiguió determinar el modo de acción, sí se reveló que CPA no produce compuestos antimicrobianos ni tiene actividad proteolítica ni hemolítica en medio sólido, así como tampoco actividad biosurfactante en superficies hidrofóbicas en condiciones in vitro. Esto es positivo en caso de solicitar su inclusión en

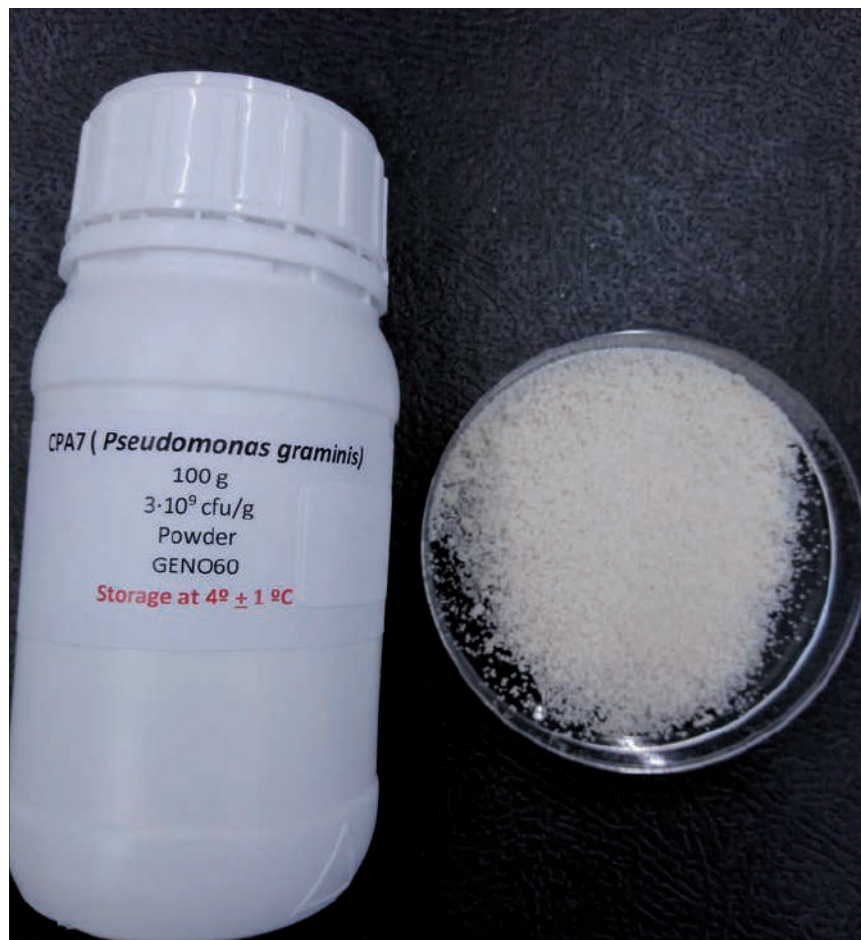


Figura 2. Aspecto del producto formulado.

la lista QPS (Qualified Presumption of Safety) de la EFSA. No se ha detectado ninguna patología asociada a la ingesta aguda de la cepa *P. graminis* CPA-7 ni en animales sanos ni inmunodeprimidos. Además, la aplicación de CPA-7 en pera cortada redujo los índices de adhesión e invasión de *L. monocytogenes* y *Salmonella* a la línea celular Caco2, que reproduce las propiedades morfológicas y funcionales del intestino humano. Esto significa que, en presencia de CPA-7, no solo se reduce el crecimiento *Salmonella* y *L. monocytogenes* sino que también actúa reduciendo su virulencia (Collazo y col., 2017b).

Finalmente, para que el bioconservante pueda aplicarse de forma comercial, es necesario optimizar la producción y formulación de la cepa con el fin de poderla comercializar en los canales habituales. En el caso de CPA-7, se han realizado estudios de producción utilizando fuentes de nitrógeno y carbono más económicas que los medios de cultivo sintéticos, y se han determinado las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, aireación, entre otros) más óptimas, validando los resultados en

bioreactor de 90 L. Se ha definido un sistema de secado y posterior envasado que ha de conservarse en refrigeración.

Actualmente, *P. graminis* no se encuentra en la lista de microorganismos QPS y, por tanto, su uso en alimentos aún no está permitido. Destacar también que el uso de este bioconservante no implica la eliminación de la etapa de desinfección, ya que su efecto no es bactericida ni inmediato, la cepa reduce el crecimiento de los patógenos durante la vida útil del producto y en caso de rotura de la cadena de frío.

Agradecimientos: Los autores agradecen al MINECO (proyectos AGL-2004-06027, AGL-2009-08506, AGL-2012-38671 y FECYT CC/2013105 y la beca AP2006-03711), a la Generalitat de Catalunya (beca FI-DGR-2015-0004 and 2015-FIB100156) y a la Unión Europea (proyecto ISA-FRUIT, FEDER) por la financiación recibida.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadías, M., Altisent, R., Usall, J., Torres, R., Oliveira, M., Viñas, I. 2014. Biopreservation of fresh-cut melon using the strain *Pseudomonas graminis* CPA-7. *Postharvest Biol. Technol.* 96, 69-77.
- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., Altisent, R., Abadías, M., 2013a. Antagonistic effect of *Pseudomonas graminis* CPA-7 against foodborne pathogens in fresh-cut apples under simulated commercial conditions. *Food Microbiol.* 33, 139-148.
- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Figge, M.J., Abadías, M., 2013b. Control of foodborne pathogens on fresh-cut fruit by a novel strain of *Pseudomonas graminis*. *Food Microbiol.* 34, 390-399.
- Bansal, V., Siddiqui, M.W., Rahman, M.S. 2015. Minimally processed foods: Overview. En: Siddiqui, M.W., Rahman, M.S. (Eds.), *Minimally processed foods: technologies for safety, quality, and convenience*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 1-16.
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Erler, W., Burghardt, J., Seyfarth, W. 1999. A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 297-308.
- Collazo, C., Abadías, M., Aguiló-Aguayo, I., Alegre, I., Chenoll, Viñas, I. 2017a. Studies on the biocontrol mechanisms of *Pseudomonas graminis* strain CPA-7 against foodborne pathogens *in vitro* and on fresh-cut melón. *LWT-Food Sci. Technol.* 85:301-308.
- Collazo, C., Abadías, M., Colás-Medà, P., Iglesias, M.B., Granado-Serrano, A.B., Serrano, J., Viñas, I. 2017b. Effect of *Pseudomonas graminis* strain CPA-7 on the ability of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* to colonize Caco-2 cells after pre-incubation on fresh-cut pear. *Int. J. Food Microbiol.*, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.003.
- FDA (U.S. Food and Drugs Administration). 2016. CFR Code of Federal Regulations Title 21. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?r=101.95>. Acceso: 24/01/2017
- García, E., Barrett, D.M. 2005. Fresh-cut fruits. En: Barrett, D.M., Somogyi, L., Ramaswamy, H. (Eds.), *Processing fruits-science and technology*, 2ª ed. CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL, USA pp. 53-72.
- Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 343-362.
- IFPA (International Fresh cut Produce Association). 2002. <http://www.creativev.com/sites/ifpa/about.html>. Acceso: 23/01/2017.
- Iglesias, B. 2017. Bioconservación de pera mínimamente procesada mediante el uso de *Pseudomonas graminis* CPA-7 y *Lactobacillus rhamnosus* GG y su efecto en la calidad de la fruta y en la modificación del potencial patogénico de *Listeria monocytogenes*. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida.
- Jones, R.J., Wescombe, P.A., Tagg, J.R. 2011. Identifying new protective cultures and culture components for food biopreservation. En: Lacroix, C. (Ed), *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 3-26.
- Olaimat, A.N., Holley, R.A. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiol.* 32, 1-19.
- Plaza, L., Altisent, R., Alegre, I., Viñas, I., Abadías, M. 2016. Changes in the quality and antioxidant properties of fresh-cut melon treated with the biopreservative culture *Pseudomonas graminis* CPA-7 during refrigerated storage. *Postharvest Biol. Technol.* 111, 25-30.
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331-345.