IDI/2018/000089

ASINCAR

centro tecnológico agroalimentario

# Proyecto TRADEALMA

**“Caracterización y trazabilidad de los procesos de degradación biótica de los alimentos mediante secuenciación masiva”.**

**Referencia**
**IDI/2018/000089**

# ÍNDICE:

**INFORME TÉCNICO FINAL.....3**

# INFORME TÉCNICO FINAL

**HITO 1: Caracterización y evaluación de la vida útil en matrices alimentarias**

**Tarea 1.1. Estudio bibliográfico de microorganismos alterantes *vs* matriz alimentaria.**

En base a la bibliografía consultada se estableció el siguiente esquema para determinación de vida útil:

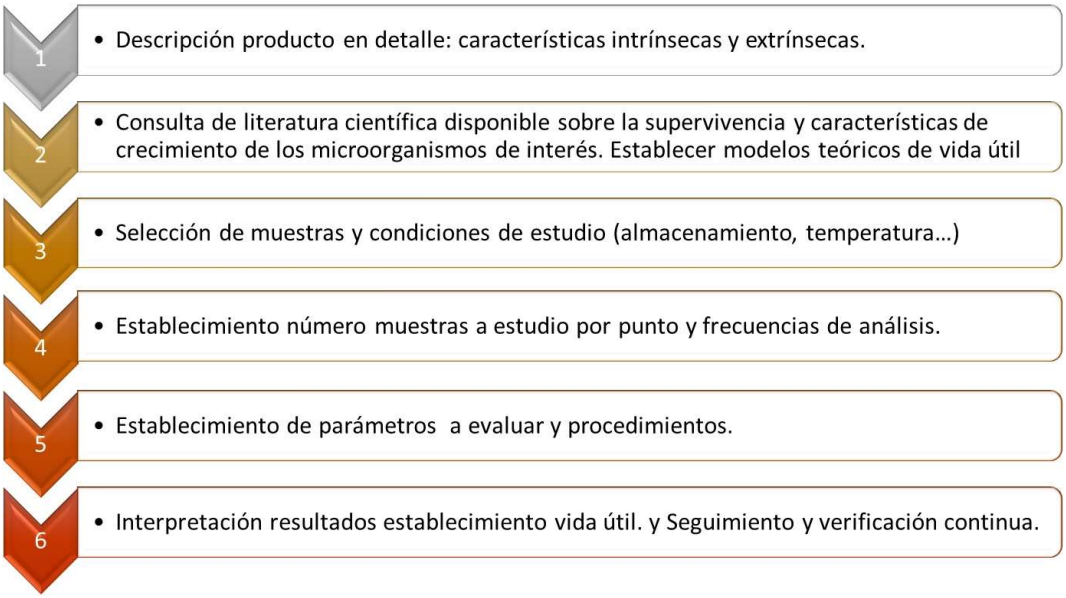


*Figura 1.- Procedimiento del diseño experimental de la vida útil.*

Con la información recopilada, se establecieron los procesos implicados en el deterioro de los alimentos y los diseños experimentales apropiados para cada tipo de matriz a estudiar.

**Tarea 1.2: Monitorización vida útil en matrices alimentarias. Determinación cuantitativa de comunidades bacterianas.**

En los estudios de durabilidad se evaluaron parámetros microbiológicos, físico-químicos y/o sensoriales, en base a la búsqueda bibliográfica realizara en la tarea 1.1.

Las matrices a evaluar se clasificaron en grupos de interés según el mercado regional asturiano, destacando productos cárnicos, pescados frescos, platos preparados y productos lácteos y derivados.

De los estudios realizados, se obtuvieron resultados cuantitativos para establecer:

- Tiempo estimado de vida útil de cada uno de los productos evaluados.

- Curvas de crecimiento microbiano.

- Evolución sensorial de los productos.

- Alteración propiedades físico-químicas.

**Tarea 1.3: Evaluación de la vida útil mediante empleo de técnicas de secuenciación masiva.**

El objetivo es conocer los microorganismos diana responsables del deterioro de cada una de las matrices estudiadas, de manera que las poblaciones microbianas son identificadas a nivel de familia e incluso llegando a género y especie. De esta forma se adquiere información acerca de los grupos predominantes, en qué concentraciones se encuentran, cuál es su evolución a lo largo de la vida útil y qué efecto tiene su presencia en las características finales del producto.

La Metagenómica es una herramienta de biología molecular para la secuenciación masiva que permite la secuenciación simultánea de todo el DNA bacteriano de una muestra, caracterizando así de forma global todos los microorganismos que están presentes. El uso de esta metodología ha permitido conocer los grupos microbianos implicados en los procesos de degradación de los alimentos.

Se seleccionaron al menos 3 puntos de análisis por producto para su análisis mediante secuenciación masiva. Estos puntos de análisis se definieron en función del tiempo estimado de vida útil, la velocidad de crecimiento y el comienzo de la fase exponencial en la curva de crecimiento microbiano.

Una vez seleccionadas las muestras, se pasó a realizar la extracción del DNA bacteriano. En este punto del proyecto se han presentado ciertas dificultades técnicas a la hora de extraer el DNA. La gran diversidad de muestras utilizadas con características intrínsecas variables (elevado contenido de grasa, ingredientes de la formulación, DNA propio presente en la muestra más allá del DNA bacteriano, sustancias interferentes con los reactivos…) hace que el protocolo de extracción de DNA tenga que ser optimizado para algunos de los productos analizados.

Para la extracción de DNA se utilizó el E.Z.N.A Food DNA kit, que permite el aislamiento de DNA a partir de matrices alimentarias. No obstante, el protocolo de análisis para este kit es bastante genérico, con lo que no es totalmente efectivo para algunas matrices alimentarias complejas. Por ello se realizaron ajustes en el protocolo de análisis en función del producto a analizar.

El método de secuenciación que se emplea es el Ion Torrent, esta herramienta se basa en la detección de protones liberados durante el proceso de polimerización del DNA. Tras el análisis mediante Metagenómica, se obtuvieron datos de los microorganismos presentes desde filo taxonómico hasta especie.

Los datos obtenidos vienen expresados en % abundancia relativa para cada uno de los taxones identificados. Esta complejidad de resultados implica un efectivo y exhaustivo análisis estadístico para lograr conclusiones veraces y precisas.

Se seleccionaron los siguientes productos para realizar los estudios de Metagenómica:

- Productos cárnicos frescos.
    - Filete de ternera envasado en atmósfera modificada.
    - Magro de potro envasado en skin.
- Preparados cárnicos.
    - Burguer meat de ternera envasado en atmósfera modificada.
    - Burguer meat de ternera envasado en skin.
    - Burguer meat mixta de ternera y cerdo en atmósfera modificada.

Para cada una de las referencias seleccionadas, se analizaron al menos 3 lotes diferentes para evaluar el efecto interlote y la variabilidad propia de los procesos productivos y se seleccionaron 3 puntos de muestreo a lo largo de la vida útil (inicial, intermedio y final).

**Productos cárnicos frescos**

Para el producto de vacuno, se seleccionaron muestras de **filete de ternera** envasadas en atmósfera modificada. Se establecieron 3 puntos de análisis, al inicio de la vida útil, punto intermedio y un punto de análisis posterior a la vida útil estimada.

Los resultados muestran gran variabilidad a nivel de familias en la matriz evaluada. Cabe destacar el porcentaje elevado de los microorganismos pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae,* por lo tanto, este grupo desempeña un papel importante en la degradación del producto.

Se evaluaron los datos a nivel de género y especie. Se ha encontrado una gran variabilidad de especies y géneros presentes. Como resumen, en la tabla 1 se representa la biodiversidad en número de especies a lo largo de la vida útil.

| | Nº Identificaciones vida útil | | |
|---|---|---|---|
| Nivel taxonómico | 1 día | 7 días | 14 días |
| Filo | 7 | 6 | 2 |
| Clase | 13 | 8 | 4 |
| Orden | 24 | 13 | 9 |
| Familia | 52 | 26 | 15 |
| Género | 151 | 34 | 18 |
| Especie | 153 | 71 | 28 |

*Tabla 1.- Biodiversidad microbiana durante la vida útil de filete de ternera en atmósfera modificada.*

Tras el análisis retrospectivo de todos los datos se concluye que los microrganismos detectados mediante técnicas de secuenciación masiva o Metagenómica podrían no ser cultivables en todos los casos mediante las técnicas de cultivo convencionales.

Por otra parte, se realizó un estudio para **magro de potro**. En este caso se seleccionó producto envasado en skin (vacío), para determinar así la influencia del tipo de envasado sobre el desarrollo de la microbiota presente.

Para el diseño experimental se escogieron 3 puntos de la vida útil (inicio, intermedio y final) y se analizaron 3 lotes de producto. Para establecer los porcentajes finales de abundancia relativa se utilizaron los valores medios en cada tiempo de análisis establecido.

Se determinaron los filos y familias más representativas a lo largo de la vida útil de magro de potro, obteniéndose los siguientes porcentajes medios.

La diversidad encontrada en este estudio para familias supera los 50 grupos. Como familias más características destacan *Carnobacteriaceae, Lactobacillaceae, Listeriaceae, Streptococcaceae* y *Vibrionaceae*.

Se realizó evaluación estadística a nivel de género y especie, siendo la diversidad encontrada muy elevada. A continuación, se resumen los resultados en la Tabla 4:

| | Nº identificaciones vida útil | | |
|---|---|---|---|
| Nivel taxonómico | 1 día | 14 días | 28 días |
| Filo | 6 | 4 | 2 |
| Clase | 12 | 8 | 2 |
| Orden | 27 | 15 | 8 |
| Familia | 57 | 21 | 14 |
| Género | 90 | 88 | 18 |
| Especie | 131 | 50 | 27 |

*Tabla 2.- Biodiversidad microbiana durante la vida útil de magro de potro en skin.*

La biodiversidad en este tipo de producto es muy elevada a tiempo inicial (hasta 131 especies encontradas), viéndose muy reducida a lo largo de la vida útil (27 especies representadas). Al inicio del estudio no destaca ningún grupo microbiano como predominante, pero al final de la vida útil el género con mayor relevancia es *Carnobacterium*, con un 41% de representación. También hay un gran incremento de porcentaje relativo del género *Lactobacillus* a lo largo del tiempo (inicialmente se parte de niveles del 10%, aumentado su crecimiento hasta el 30%). Dentro de la familia *Vibrionaceae*, el género *Photobacterium* también está representado a lo largo de la vida útil, principalmente en el punto final de análisis (10,7%).

**Preparados cárnicos**

En esta categoría se incluyó el estudio de burguer meat de vacuno. Para comprobar el efecto del tipo de envasado en la evolución de la carga microbiana, se evaluó este producto en 2 tipos formatos: envase en atmósfera modificada y envase en skin.

Para **burguer meat de ternera en atmósfera modificada**, se seleccionaron 3 puntos de análisis en 3 lotes de producción.

Se ha encontrado gran variabilidad de familias (hasta 70 familias diferentes). Uno de los grupos predominantes es *Vibrionaceae*, esto indica que puede ser una de las principales causas de degradación de este producto. Otra familia representativa es *Lactobacillaceae,* que representa. Se analizaron los datos a nivel de género y especie, obteniéndose los siguientes resultados en relación a la biodiversidad:

| | Nº identificaciones vida útil | | |
|---|---|---|---|
| Nivel taxonómico | 1 día | 8 días | 13 días |
| Filo | 7 | 3 | 4 |
| Clase | 16 | 4 | 6 |
| Orden | 31 | 7 | 12 |
| Familia | 70 | 14 | 20 |
| Género | 99 | 26 | 27 |
| Especie | 142 | 41 | 37 |

*Tabla 3.- Biodiversidad de especies microbianas en la vida útil de burguer meat de vacuno en atmósfera modificada.*

La especie más representativa a lo largo de la vida útil es *Photobacterium phosphoreum*

Por otra parte, se realizó estudio de **burguer meat de ternera envasado en skin.** Se seleccionaron muestras al inicio, punto intermedio y final de la vida útil en 3 lotes distintos de producción.

En relación a las familias, existen diferencias entre el punto inicial y los puntos intermedio y final. Las familias repreentativas son *Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae* y *Lactobacillaceae*.

Posteriormente se realizó análisis estadístico a nivel de género y especie.

En la tabla se resumen los datos de biodiversidad encontrados en el estudio de vida útil:

| Nivel taxonómico | Nº identificaciones vida útil | | |
|---|---|---|---|
| | 1 día | 15 días | 22 días |
| Filo | 7 | 4 | 4 |
| Clase | 24 | 5 | 5 |
| Orden | 44 | 11 | 11 |
| Familia | 126 | 18 | 21 |
| Género | 231 | 19 | 30 |
| Especie | 442 | 24 | 38 |

*Tabla 4.- Biodiversidad de las especies microbianas en la vida útil de burguer meat de vacuno en skin.*

En este caso, destaca la gran variabilidad de especies y géneros encontrados en el tiempo inicial, ya que superan las 440 especies.

Por otra parte, se analizó **burguer meat mixta de ternera y cerdo envasado en atmósfera modificada**.

Se seleccionaron 3 puntos de análisis, a los 3 días, a los 9 y a los 12 días desde la elaboración.

En relación a las familias, la más destacada es *Pseudomonadaceae* siendo la más abundante a lo largo de toda la vida útil. Posteriormente se analizaron los resultados a nivel de género y especie. Los datos de biodiversidad encontrados se resumen en la siguiente tabla:

| Nivel taxonómico | Nº identificaciones vida útil | | |
|---|---|---|---|
| | 3 días | 9 días | 12 días |
| Filo | 5 | 5 | 3 |
| Clase | 11 | 9 | 7 |
| Orden | 17 | 16 | 12 |
| Familia | 28 | 22 | 17 |
| Género | 30 | 23 | 18 |
| Especie | 51 | 45 | 31 |

*Tabla 5.- Biodiversidad de las especies microbianas en la vida útil de burguer meat mixta en atmósfera modificada.*

El género mayoritario en este producto a lo largo de toda la vida útil es *Pseudomonas.* Por otra parte, se ha detectado un incremento significativo de los géneros *Brochothix* y *Lactococcus* al final de la vida útil.

**HITO 2: Determinación y trazabilidad de la contaminación con microorganismos alterantes**

**Tarea 2.1. Búsqueda de focos de contaminación en materias primas y canales mediante técnicas de secuenciación masiva.**

Tras evaluar materias primas y determinar su estado su estado higiénico, las conclusiones de estos ensayos fueron:

- Las materias primas de porcino presentan elevada carga microbiológica inicial.

- Las materias primas de vacuno que se evaluaron presentan menor carga microbiológica.

- La carga microbiológica de las materias primas influye en los procesos tecnológicos aplicados.

También, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de canales para conocer el estado inicial de las mismas y su carga microbiana. El muestreo realizado fue aleatorio simple mediante microbiología clásica. Para conocer las condiciones higiénicas del trabajo en el matadero, la toma de muestras se realizó justo después del faenado, antes del enfriamiento en las cámaras de oreado.

En base al Reglamento CE 20173/2005 relativo a los Criterios Microbiológicos en alimentos, donde se especifican los criterios de higiene de los procesos para canales de vacuno y porcino, las muestras evaluadas se encontraban dentro de los límites establecidos como aceptables para cada tipo de canal.

Posteriormente se probaron diferentes métodos de muestreo para la selección de muestras y su posterior análisis por Metagenómica: Método destructivo, hisopo y esponja abrasiva, siendo este último la alternativa escogida. Una vez recogidas las muestras, se almacenaron a -80ºC hasta la extracción del DNA.

EL protocolo de análisis E.Z.N.A food DNA kit se ajustó para este tipo de muestras. Durante las primeras extracciones realizadas, se encontraron dificultades técnicas en el análisis, ya que no se alcanzaban los niveles mínimos de DNA necesarios para la secuenciación masiva. Tras varios ajustes de protocolo, se modificaron los volúmenes tampón y tiempos de centrifugación hasta conseguir la cantidad suficiente estimada de DNA.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los datos. En cada caso, se evaluaron al menos cinco muestras de cada tipo de materia prima y/o canal. Los datos se evaluaron de manera conjunta y se expresan como porcentajes medios de microorganismos para cada matriz.

Para las **materias primas cárnicas y canales de origen bovino**, se obtuvieron los siguientes resultados en relación a filos y familias:

Los filos más representativos a nivel inicial son *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes.* Las familias características en materia prima cárnica de ternera destacan: *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae, Flavobacteriaceae* y *Corynebacteriaceae*.

Por otra parte, se realizó un análisis de **materias primas y canales de potro.** El diseño experimental planteado incluye diferentes piezas de magro de varios lotes y estacionalidad, para abarcar toda la variabilidad posible.

Los 2 filos predominantes según la abundancia relativa media calculada son *Firmicutes* y *Proteobacteria.*

De los resultados medios obtenidos, se concluye que las familias más representativas de las materias primas cárnicas de potro son: *Psedomonadaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Listeriaceae* y *Streptococcaceae.*

Para tener una visión global de la influencia de las materias primas en el producto final y vida útil del mismo se analizaron los **aditivos y preparados** que se añaden a los productos cárnicos elaborados. Se escogieron varios proveedores y formulaciones y se analizaron los datos obtenidos de manera conjunta.

Los filos más representativos son *Proteobacteria* y *Firmicutes.*

La biodiversidad de especies encontrada en este tipo de materia prima es de más de 300 variedades.

**Tarea 2.2. Búsqueda de focos de contaminación en superficies de contacto con los alimentos mediante técnicas de secuenciación masiva.**

En los últimos años se ha comprobado que las bacterias no se encuentran en el ambiente en forma libres, sino que la gran mayoría se encuentran formando biofilms o biopelículas.

Los biofilms se definen como comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una en una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a una superficie. Su presencia y persistencia en la industria agroalimentaria es muy elevada y suponen un importante riesgo de contaminación en el producto final.

Se realizó una búsqueda de los focos de contaminación en las superficies de trabajo, se determinó el método de recogida de muestras y se evaluaron las muestras mediante secuenciación masiva. El trabajo realizado en esta tarea se llevó a cabo en 4 fases:

**1. Establecimiento puntos críticos de contaminación**: Se buscaron focos en empresas del sector agroalimentario atendiendo al estado higiénico de las instalaciones. Los puntos críticos se detectaron en partes no desmontables de maquinaria, áreas de difícil acceso para la limpieza, superficies rugosas, superficies porosas y soldaduras no continuas de equipos y maquinaria.

**2. Detección macroscópica**: Una vez establecidos los puntos más críticos, fue necesario comprobar la presencia de biofilms en los mismos. Para ello se utilizaron kits comerciales y métodos de microbiología clásica. La conclusión obtenida fue que la mayor presencia de biofilms se encuentra en: sumideros, paredes y techos de obrador y cámaras de refrigeración, zonas de engranaje maquinarias, juntas de equipos y maquinaria y utensilios de trabajo porosos.

**3. Toma de muestras de biofilms para secuenciación masiva**: El reto de esta tarea fue encontrar una metodología de muestreo óptima para asegurar la recogida de todos los microorganismos presentes embebidos en la matriz del biofilm.

Tras una consulta bibliográfica se desarrolló un método de muestreo mediante recuperación mecánica. Se realizaron varias pruebas hasta determinar la mejor forma de recogida de muestras, asegurando la recuperación total de los microorganismos presentes.

**4. Extracción de DNA y Análisis Metagenómica**. Las muestras que se obtuvieron presentaban gran cantidad de residuos y materia orgánica, lo que supone una barrera para la correcta extracción de DNA. Además, el exopolisacárido presente en los biofilms interfiere en el proceso de extracción. Estos inconvenientes llevaron a que el protocolo general de extracción de DNA del kit extracción E.Z.N.A. Food DNA no fuese efectivo. Se realizaron varias pruebas de ajustes en las cuales se introdujeron fases previas de lavado de muestra para eliminar parte de los restos orgánicos presentes. Una vez optimizados los pasos iniciales, se consiguió aislar el DNA en concentración suficiente para realizar la amplificación posterior.

Los muestreos se realizaron en varias empresas agroalimentarias asturianas. Se seleccionaron los puntos críticos en cada caso y se realizaron varias visitas para la recogida de muestras. Dichas visitas se planificaron en función de los flujos de trabajo, para recoger tanto superficies antes de las tareas de limpieza y desinfección (superficies “sucias”) como después (superficies “limpias”). Así, se evalúa la efectividad de los procesos de limpieza y desinfección y su influencia en la biodiversidad microbiana. Las muestras se recogieron mediante recuperación mecánica que asegura la completa extracción del biofilm.

Ante la gran diversidad de superficies muestreadas, se realizó una subdivisión de las mismas en varias categorías, en función del material, uso, contacto con el alimento… Así, se establecieron 11 categorías diferentes de superficies. Las superficies que se han analizado son:

- Superficies de contacto directo: formadora de hamburguesas, moldes, loncheadoras, picadoras, cuchillos de corte, embutidoras, marmitas térmicas de cocción, tablas de plástico de corte, mesas de acero, cubas de cuajado…
- Superficies no contacto directo: paredes, techos, cortinas plásticas, sumideros, manillas de puertas, ruedas de carros, cintas de transporte, ropa de trabajo…

Los filos mayoritarios son similares en todos los casos, destacando *Firmicutes*, *Proteobacteria y Actinobacteria* (principalmente en superficies plásticas). Aunque existe variabilidad en los resultados de porcentajes relativos de cada familia, los grupos predominantes son: *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Listeriaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Nostocaceae*, *Xanthomonadaceae* y *Vibrionaceae.*

La familia *Micrococcaceae* se tiene una representación elevada en los equipos de higienización, pero no aparece como grupo característico en el resto de superficies.

Posteriormente, se hizo un análisis estadístico para determinar biodiversidad a nivel de género y especie en superficies y equipos se obtuvieron los siguientes resultados:

| Nivel taxonómico | Nº identificaciones |
|---|---|
| Filo | 13 |
| Clase | 34 |
| Orden | 61 |
| Familia | 135 |
| Género | 226 |
| Especie | 705 |

*Tabla 6.- Biodiversidad de las especies microbianas en las superficies de trabajo.*

La biodiversidad encontrada en el caso de las superficies es muy elevada, con 705 especies diferentes detectadas. Esto indica que la naturaleza de los biofilms en la industria agroalimentaria es muy compleja, y que en ellos están representados gran variedad de microorganismos de distintos orígenes.

No se ha podido establecer un patrón de los grupos microbianos en relación a las superficies, ya que existen mucha variabilidad entre ellas, pero los géneros que se encuentran más representados son: *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Brochothrix*.

Los resultados obtenidos concuerdan con la bibliografía científica consultada, ya que estos grupos microbianos presentan una capacidad superior a otros microorganismos para generar biofilms.

**HITO 3: Evaluación de los procesos productivos**

**Tarea 3.1: Evaluación de las interacciones de microorganismos en el proceso productivo.**

En esta tarea se evalúa la evolución de la microbiota en los diferentes procesos según el alimento seleccionado, desde el origen hasta la obtención de producto final.

Se diseñaron los diagramas de flujo para cada una de las categorías, según el enfoque de Objetivos de Seguridad Alimentaria (FSO). Así, se puede evaluar cómo afectan las fases del flujo de trabajo a la carga microbiológica total y la interacción de estas fases con la calidad de la materia prima y el estado higiénico de las superficies de trabajo.

Para el cálculo de objetivos de seguridad alimentaria se utiliza la siguiente ecuación:

$H_0 - \sum R + \sum I \leq FSO$

Donde:

FSO = Objetivo de Seguridad Alimentaria

$H_0$ = Nivel inicial del peligro

$\sum R$ = Reducción total (acumulada) del peligro

$\sum I$ =Incremento total (acumulado) del peligro

La expresión es en unidades logarítmicas. En base a los flujos de trabajo establecidos se realizó una evaluación del riesgo en el alimento, identificando y caracterizando los peligros en cada caso. Para el diseño, se evaluaron los procesos *in situ,* identificando en las etapas el nivel inicial ($H_0$), la reducción total ($\sum R$) y el incremento total ($\sum I$) del peligro. En los diagramas se recogen las etapas más características de los procesos tecnológicos planteados

Una vez evaluados los resultados obtenidos mediante microbiología clásica y Metagenómica se pasó a establecer la correlación con los procesos productivos.

Con esto se conseguirá establecer a su vez estrategias encaminadas a mejorar la vida útil, optimizando los procesos y sus parámetros en función de la microbiota implicada en el deterioro de los alimentos en cada etapa y en cada caso en concreto.

Para ello, se realizó una evaluación estadística de los resultados obtenidos a nivel de familia en cada uno de los estudios realizados, promediando en cada caso los porcentajes de abundancia relativa. Este estudio se realizó tanto en las vidas útiles como en materias primas y superficies de trabajo. El objetivo es establecer en cada caso los grupos microbianos que producen la alteración en cada tipo de producto y su relación con los procesos productivos.

**Materias primas**

En base a los resultados obtenidos mediante Metagenómica para materias primas y canales, se realizó una evaluación conjunta de resultados, teniendo en cuenta las familias más representativas. El objetivo de este análisis es determinar los grupos microbianos comunes a las materias primas que puedan influir en el producto final y su vida útil.

El tratamiento estadístico de los resultados ha supuesto un gran reto en esta tarea, ya que la elección de un modelo matemático que se ajuste a la gran biodiversidad encontrada ha resultado compleja.

En las materias primas de vacuno las familias más representativas son *Pseudomonadaceae, Micrococcaceae, Flavobacteriaceae* y *Corynebacteriaceae.* En las materias primas de potro, el grupo más característico es *Moraxellaceae*, aunque también es importante la presencia de *Pseudomonadaceae, Streptococcaceae*, *Listeriaceae* y *Carnobacteriaceae*. En los aditivos evaluados, las familias de microorganismos encontradas difieren de las más representadas en las materias primas cárnicas, siendo las más abundantes en porcentajes relativos *Enterobacteriaceae*, *Nostocaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Bacillaceae* y *Pseudomonadaceae.*

En el gráfico a continuación se muestran los resultados obtenidos.

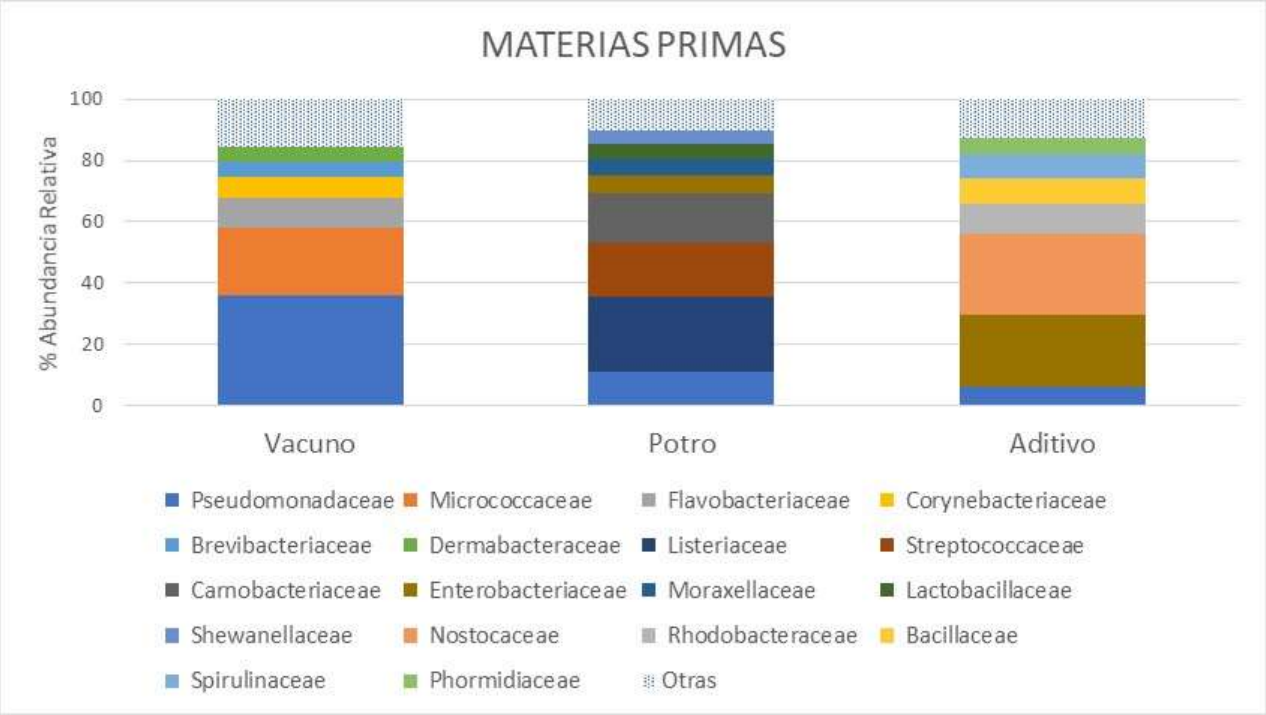


*Figura 2.- Resultados en % abundancia relativa para familias en materias primas.*

**Superficies de trabajo**

La evaluación de las superficies de trabajo y utensilios resulta de especial interés para conocer el estado higiénico global de las empresas agroalimentarias. Para facilitar la interpretación de resultados, los tipos de muestra se subdividieron en 2 grandes grupos:

- Superficies de contacto directo.
- Superficies no contacto directo.

La elección de las superficies se basa en la naturaleza de los materiales, el uso de las superficies y el riesgo potencial de contaminación del producto a lo largo del proceso productivo.

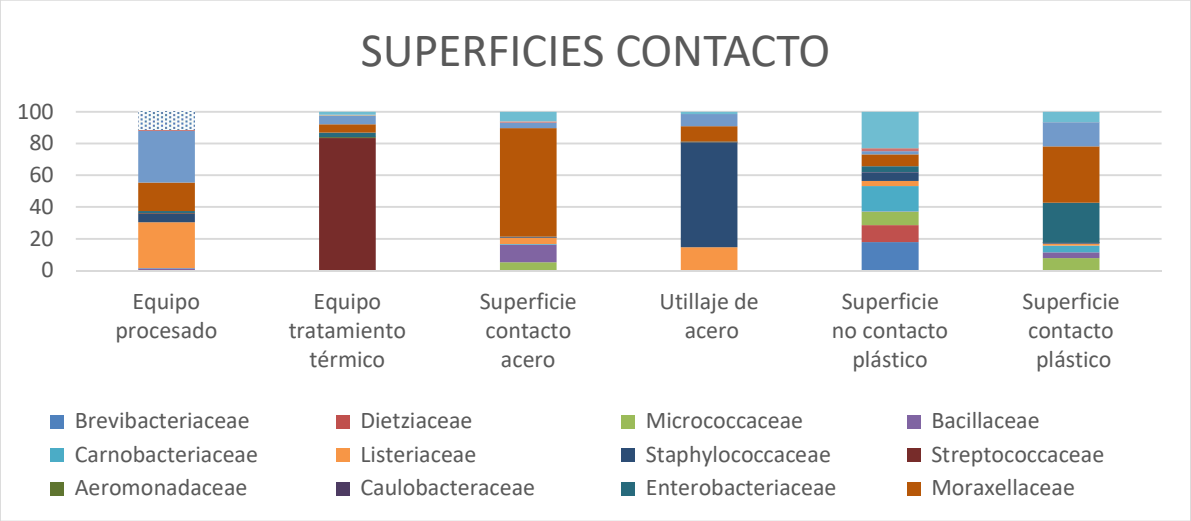


*Figura 3.- Resultados en % abundancia relativa para familias en superficies de contacto directo.*

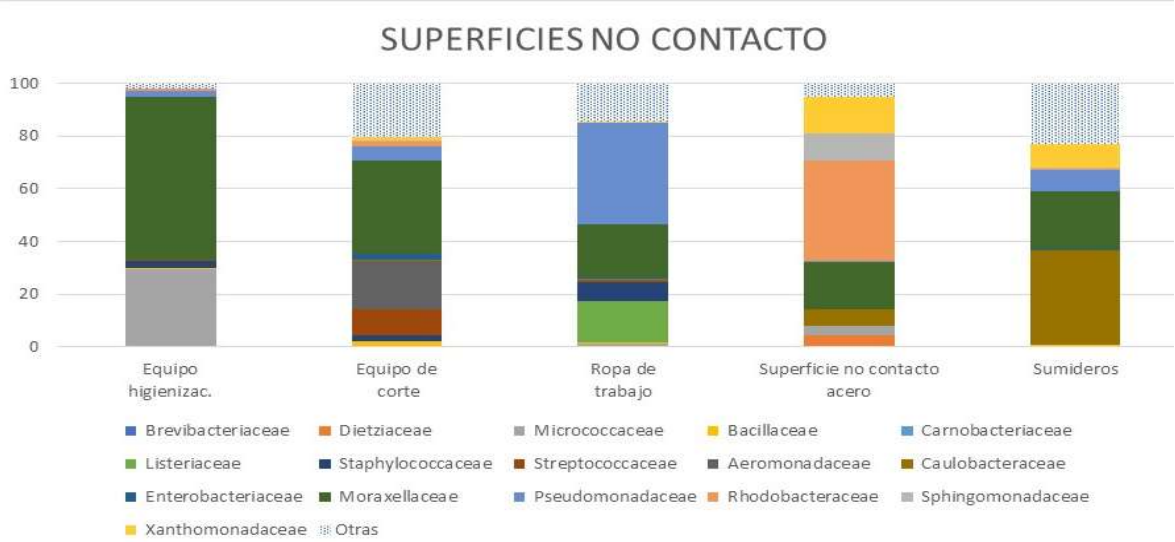


*Figura 4.- Resultados en % abundancia relativa para familias en superficies de no contacto directo.*

**Vida útil**

Para cada tipo de producto analizado, se realizó un estudio detallado de los grupos implicados en la degradación y alteración a lo largo de la vida útil.

**Vida útil filete de ternera**

Se establecieron modelos matemáticos para definir las familias microbianas implicadas en la degradación de filete de ternera envasado en atmósfera modificada.

Los resultados obtenidos se expresan a continuación:

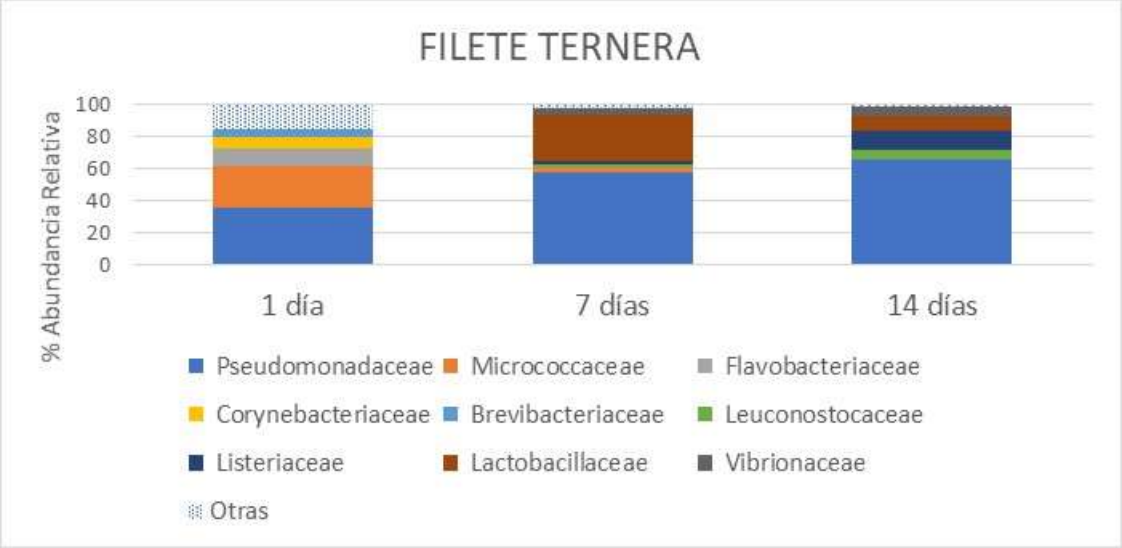


*Figura 5.- Resultados en % de abundancia relativa para el taxon Familia en filete de ternera.*

La familia que condiciona la vida útil de este tipo de producto es *Peudomonadaceae.* Este grupo está representado al inicio de la vida útil, aumentando considerablemente en porcentaje relativo a medida que avanza el estado de degradación. Otra familia importante en la degradación del filete de ternera envasado en atmósfera modificada es *Lactobacillaceae.*

**Vida útil magro de potro**

Se obtuvieron los siguientes resultados:

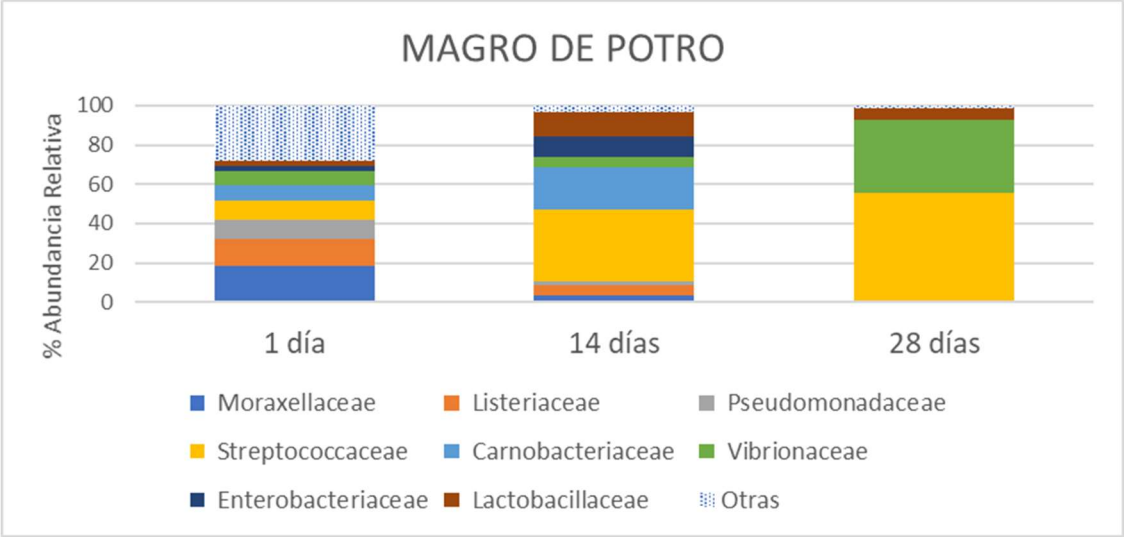


*Figura 6.- Resultados en % de abundancia relativa para el taxon Familia en magro de potro en SKIN.*

En este caso la variabilidad de familias encontradas a tiempo inicial es muy elevada, siendo los grupos más abundantes en % relativo *Moraxellaceae, Listeriaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Spreptococcaceae.*

Sin embargo, a medida que avanza la vida útil aparecen otras familias poco representadas a tiempo inicial como grandes grupos predominates*: Vibrionaceae y Carnobacteriaceae.*

**Vida útil burguer meat de vacuno en MAP**

Tras el análisis matemático de los resultados obtenidos mediante metagenómica, en el estudio de burguer meat de vacuno envasado en atmósfera modificada se encontraron los siguientes resultados:

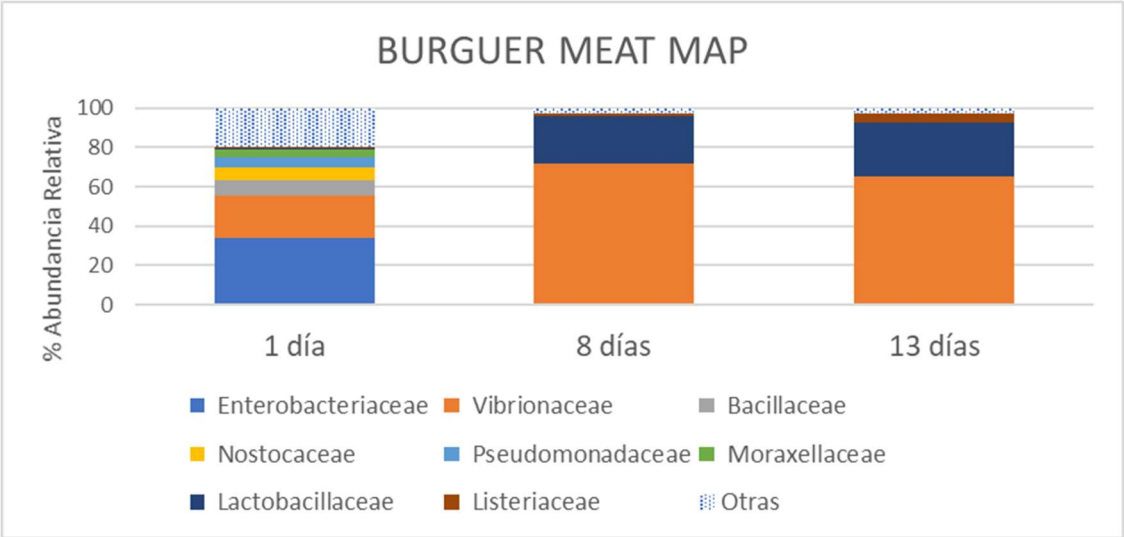


*Figura 7.- Resultados en % de abundancia relativa para el taxon Familia en burguer meat de vacuno en MAP.*

En este caso, a tiempo inicial se encontró gran diversidad microbiana, siendo los grupos mayoritarios *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*. A medida que avanza el estado de alteración del producto, se presentan como grupos mayoritarios *Vibrionaceae* y *Lactobacillaceae*.

**Vida útil burguer meat vacuno SKIN**

Tras el análisis matemático de los resultados obtenidos mediante metagenómica, en el estudio de burguer meat de vacuno envasado en skin se encontraron los siguientes resultados:

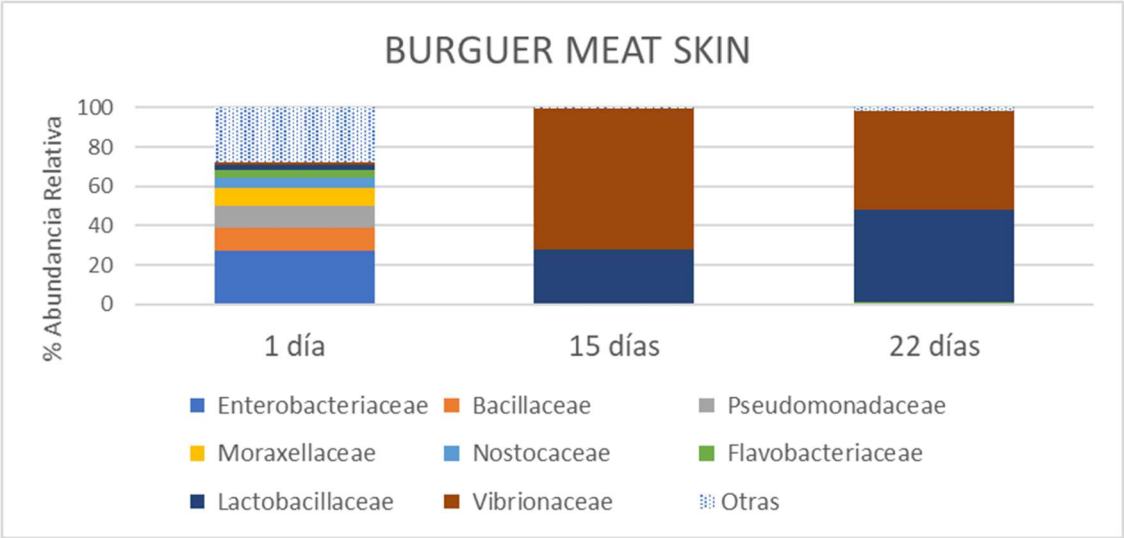


*Figura 8.- Resultados en % de abundancia relativa para el taxon Familia en burguer meat de vacuno en SKIN.*

Al igual que en el estudio realizado en burguer meat de vacuno envasado en atmósfera modificada, la variabilidad de familias encontradas en tiempo inicial es muy elevada, siendo los grupos mayoritarios *Enterobacteriaceae* y *Bacillaceae*. Sin embargo, a medida que avanza la vida útil, los grupos mayoritarios son *Vibrionaceae* y *Lactobacillaceae*, al igual que en estudio del producto en atmósfera modificada (MAP).

**Vida útil burguer meat mixta vacuno-cerdo envasada en MAP**

Tras el análisis de datos en burguer meat mixto de vacuno-cerdo se obtuvieron los resultados reflejados en el siguiente gráfico:

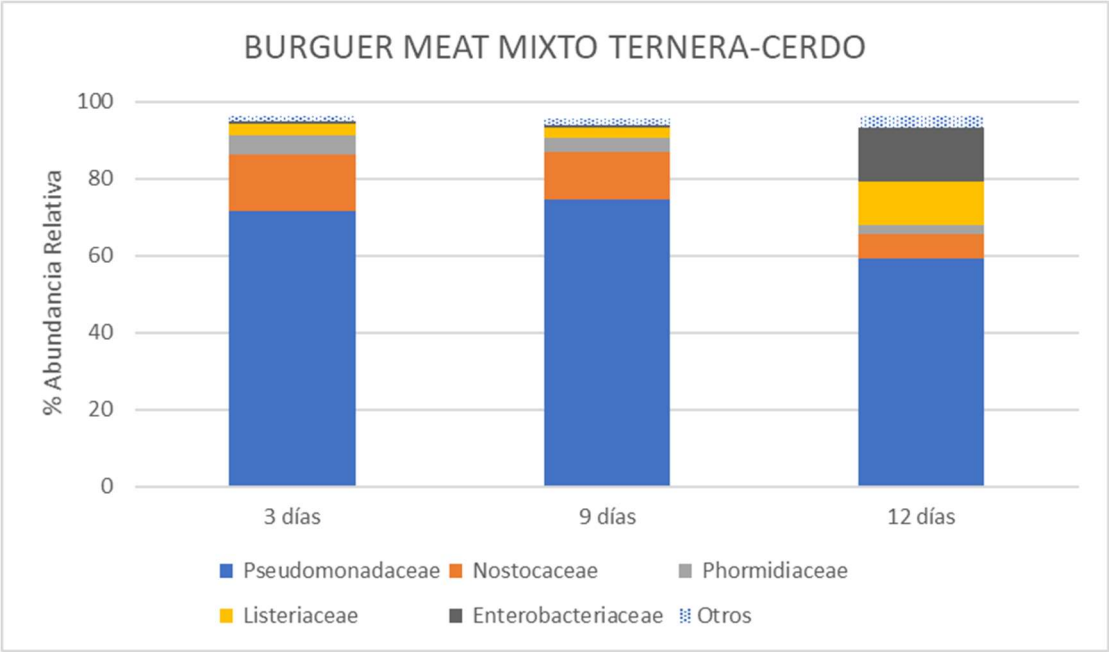


*Figura 9.- Resultados en % de abundancia relativa del taxon Familia en burguer meat mixta envasada en atmósfera modificada*

En este el grupo predominante a lo largo de toda la vida útil es *Pseudomonadaceae.*

**INTERACCIONES MATERIA PRIMA- SUPERFICIES- VIDA ÚTIL:**

Para poder extraer conclusiones sobre la interacción de los microorganismos con materias primas, proceso productivo, instalaciones y vida útil se realizó una reagrupación de todos los resultados obtenidos: se agruparon todas las materias primas, las superficies y los productos cárnicos se dividieron en 2 grandes grupos (productos frescos y preparados cárnicos).

Una vez reorganizados todos los datos, se trataron estadísticamente para ver la evolución de los grandes grupos microbianos a lo largo del proceso productivo y la vida útil.

En una etapa inicial, se evaluó la evolución de filos microbianos.

Para los **productos cárnicos frescos**, los resultados obtenidos se muestras en el gráfico:

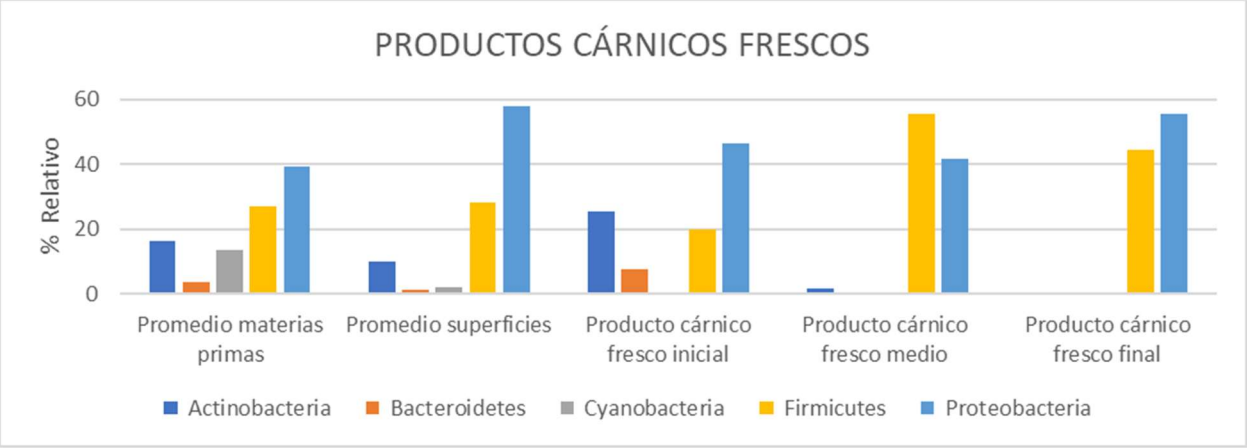


*Figura 10.- Evolución en materias primas, superficies y vida útil en productos cárnicos frescos.*

Para **preparados cárnicos,** los resultados obtenidos en evaluación conjunta se muestran a continuación:

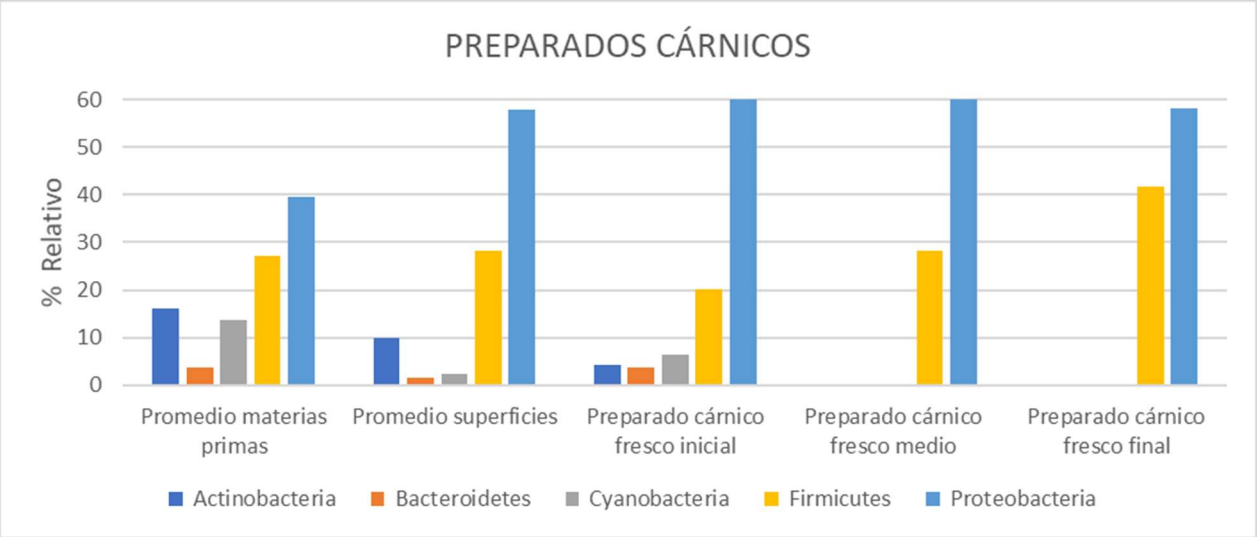


*Figura 11.- Evolución filos en materiar primas, superficies y vida útil en preparado cárnicos*

Los resultados obtenidos en preparados cárnicos en relación a los filos más representativos, son muy similares a los obtenidos en productos cárnicos frescos

Para productos **cárnicos frescos**, el resultado obtenido tras tratamiento estadístico se resume en el gráfico:

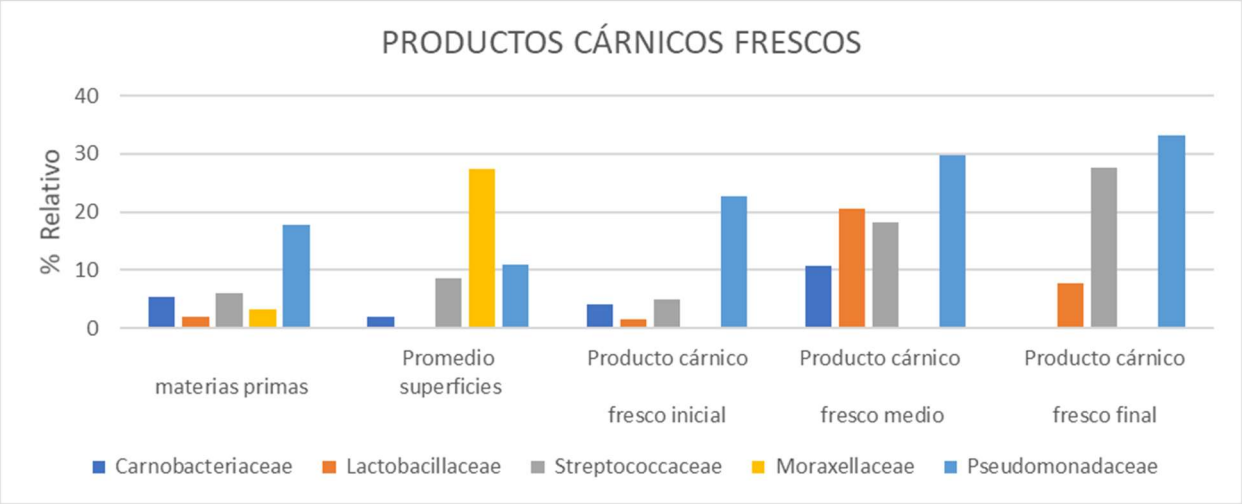


*Figura 12.- Evolución familias en materias primas, superficies y vida útil en productos cárnicos frescos.*

El mismo estudio estadístico se realizó para **preparados cárnicos** y el resultado obtenido se resume en el gráfico:

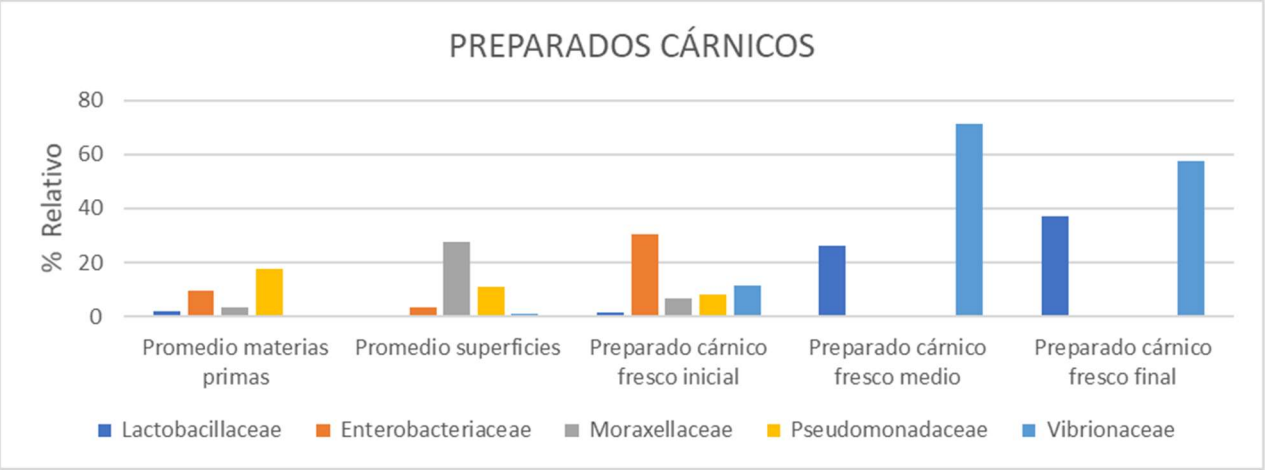


*Figura 13.- Evolución de amias en materias primas, superficies y vida útil en preparados cárnicos.*

De los estudios realizados se puede concluir que:

- El estudio pormenorizado de los resultados obtenidos por análisis metagenómico indica que existen grupos bacterianos presentes en todos los puntos de muestreo a lo largo de los procesos productivos estudiados.

- Existe gran diversidad microbiana en las materias primas analizadas, siendo los grupos mayoritarios encontrados: *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae y Carnobacteriaceae.*

- Existe gran diversidad microbiana en las superficies analizadas y es difícil establecer un patrón de comportamiento superficie-biodiversidad microbiana. Sin embargo, los grupos microbianos encontrados tienen capacidad para formar biofilms. Por tanto, podrían estar de forma persistente a lo largo de todo el proceso productivo en forma de biofilms y favorecer, además, la adhesión a este biofilm del resto de géneros bacterianos identificados o incluso de bacterias patógenas y/o alterantes procedentes de la materia prima o del ambiente, dando lugar a biofilms multiespecie.

Los grupos mayoritarios encontrados en superficies son: *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae* y *Lactobacillaceae.*

- A medida que avanza la vida útil la biodiversidad disminuye considerablemente, aumentando la abundancia relativa de algunos grupos específicos que son los que causan degradación de los productos.

- Existe correlación en los grupos mayoritarios en materia prima y en producto y vida útil. Esto implica que las condiciones higiénico- sanitarias de las materias primas son un factor clave de control para diseñar estrategias de mejora de la vida útil.

- Existe correlación menos intensa entre los microorganismos presentes en las superficies y los encontrados a lo largo de la vida útil. Sin embargo, existe presencia significativa de microorganismos patógenos en las superficies analizadas, las cuales pueden contaminar los alimentos y suponer un riesgo en relación a la seguridad alimentaria. Por tanto, el control de superficies, su higiene y desinfección son de interés primordial para el aseguramiento de la calidad higiénico-sanitaria de los productos a lo largo de todo el periodo comercial de los mismos.

**FLUJOS DE PROCESO ASOCIADOS A LA BIODIVERSIDAD MICROBIANA:**

Una vez definidas las familias microbianas más importantes en cada tipo de producto y su interacción con el proceso productivo, se pasó al desarrollo de los flujos de trabajo en procesos tipo en base a los Objetivos de Seguridad Alimentaria (FSO). El cálculo de objetivos de seguridad alimentaria se basa en la ecuación antes descrita ($H_0 - \sum R + \sum I \leq FSO$).

**PREPARADOS CÁRNICOS:**

Son productos perecederos en los que la manipulación es muy elevada a lo largo de todo el proceso productivo. Además, la carga microbiológica inicial suele ser también muy alta ($H_o$).

En relación al proceso productivo, las materias primas se recepcionan, se almacenan y preparan para ser picadas, amasadas y maceradas. Posteriormente se pasa a dar forma al producto y a su envasado. En este flujo de trabajo, existen varias etapas que contribuyen a su vez al incremento del peligro inicial ($\sum I$) como son el picado de la materia prima cárnica, el amasado, maceración de la masa y formación del producto. En este caso no se ha descrito ninguna fase que contribuya a la reducción del riesgo ($\sum R$), por lo tanto, es importante que los niveles de $H_o$ sean lo más bajos posibles.

Tras la realización del tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en Metagenómica se conoce en profundidad la biodiversidad existente en cada parte del proceso productivo. Esta información se integró en los flujos de proceso para determinar qué grupos microbianos participan en la carga microbiológica inicial ($H_o$) y en el incremento del peligro inicial ($\sum I$).

Evaluando el flujo de proceso de este tipo de producto, las fases críticas a controlar en relación al crecimiento microbiano son:

-**Recepción de materias primas**: el control de la calidad de las materias primas es primordial para la mejora de vida útil en los preparados cárnicos. Para ello, es importante controlar la temperatura de recepción de las mismas y la calidad microbiológica. Como se ha determinado

según los estudios de Metagenómica, las materias primas utilizadas en este tipo de elaboraciones presentan carga microbiológica elevada ($H_o$) representada principalmente por 5 familias: *Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Vibrionaceae, Moraxellaceae y Pseudomonadaceae.*

-**Picado, amasado de materias primas y formado del producto cárnico:** estas fases incrementan en peligro inicial (∑I) de contaminación microbiológica, ya que es un proceso crítico que implica alta manipulación del producto. En este caso, las superficies de contacto directo con el producto suponen la mayor fuente de contaminación. Por tanto, se debe controlar exhaustivamente los procesos de limpieza y desinfección en estos puntos del proceso, principalmente encaminados a la reducción de la familia *Moraxellaceae.*

- **Maceración**: algunos productos cárnicos necesitan una fase de reposo y enfriamiento en la que se producen una serie de reacciones y cambios bioquímicos y fermentativos que se designan con el nombre de maceración. Generalmente este proceso se lleva a cabo en refrigeración durante 24 horas. Durante este periodo los microorganismos presentes (familias *Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Vibrionaceae, Moraxellaceae y Pseudomonadaceae*) pueden desarrollarse si las condiciones de maceración no están controladas.

- **Vida útil producto y almacenamiento:** las condiciones de almacenamiento de los preparados cárnicos marcarán la vida útil de los mismos. Como se ha comprobado en la tarea 1.3, evaluación de la vida útil mediante empleo de técnicas de secuenciación masiva, los grupos microbianos que condicionan el deterioro son *Lactobacillaceae* y *Vibrionaceae.*

**PRODUCTOS CÁRNICOS FRESCOS:**

Los productos cárnicos frescos son alimentos perecederos en con corta vida útil, ya que no se utilizan aditivos y/o conservantes durante su elaboración.

El proceso productivo para este tipo de productos es relativamente sencillo, aunque existen fases críticas de manipulación que influirán en la calidad final del producto.

Las materias primas se recepcionan, se almacenan y se despiezan. Posteriormente se envasan para su conservación. Las etapas que contribuyen a su vez al incremento del peligro inicial (∑I) son el despiece y envasado del producto. No se ha descrito ninguna fase que contribuya a la reducción del riesgo (∑R), por lo tanto, es importante que los niveles de $H_o$ sean lo más bajos posibles.

Tras la realización del tratamiento estadístico de los resultados obtenidos en Metagenómica se integró en los flujos de proceso la interacción microbiana existente. Así, se determina qué grupos microbianos participan en la carga microbiológica inicial ($H_o$) y en el incremento del peligro inicial (∑I).

Tras la evaluación del flujo de proceso, las fases críticas a controlar en relación al crecimiento microbiano son:

**-Recepción de materias primas**: al igual que en los preparados cárnicos, el control de la calidad de las materias primas es primordial para la mejora de vida útil. El control de temperatura en la recepción y el control microbiológico inicial define el nivel inicial del peligro ($H_o$), en este caso representado por los siguientes grupos microbianos: *Carnobacteriaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Moraxellaceae y Pseudomonadaceae.*

-**Despiece y envasado**: estas fases incrementan el riesgo inicial de peligro (∑I), con lo que es importante el control de las mismas, extremando las condiciones higiénicas durante la manipulación, la limpieza de instalaciones y las condiciones de manipulación por parte de los operarios. El grupo microbiano a controlar en esta fase es *Moraxellaceae* durante la fase de despiece y *Carnobacteriaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Moraxellaceae y Pseudomonadaceae* durante el envasado, tal y como se ha comprobado mediante los estudios metagenómicos.

**-Vida útil producto y almacenamiento:** las condiciones de almacenamiento (temperatura, envasado, transporte…) de los productos cárnicos frescos marcarán la vida útil de los mismos. Como se ha comprobado en la tarea 1.3, evaluación de la vida útil mediante empleo de técnicas de secuenciación masiva, los grupos microbianos que condicionan el deterioro son *Lactobacillaceae, Streptococcaceae y Pseudomonadaceae.*

Una vez definidos los flujos de trabajo por tipo de producto y la interacción existente entre los procesos y los microorganismos responsables de la alteración del alimento se pueden buscar estrategias de mejora de la vida útil específicas, enfocadas a la mejora en todos los pasos del proceso productivo (materias primas, instalaciones y producto).

**HITO 4: Establecimiento de estrategias para la mejora de la vida útil**

El objetivo es la búsqueda específica de estrategias de mejora de vida útil aplicadas en distintas fases del proceso productivo: materias primas, superficies de trabajo y producto final. La aplicación de estas metodologías se basa en los resultados obtenidos a lo largo de la ejecución del proyecto, donde se han podido determinar los grupos microbianos implicados en los procesos de alteración de los productos.

En base a estos resultados, se ha realizado una búsqueda bibliográfica para poder establecer cuáles son las mejoras más adecuadas a introducir en cada punto del flujo productivo en función de la biodiversidad existente en cada momento. La búsqueda de estrategias alternativas se basó en las siguientes premisas:

- Los métodos de mejora serán naturales y respetuosos con el medio ambiente.

- Serán estrategias avaladas por los organismos de control europeos (EFSA), cumplirán la legislación vigente y serán seguros para el consumidor.

- Se estudiará el uso de recursos biológicos disponibles limitando el uso de compuestos químicos.

- Se seguirá el etiquetado limpio ("clean label") en el desarrollo de estrategias en productos con el fin de incorporar la menor cantidad posible de aditivos y conservantes.

Las estrategias se aplicaron a cada nivel del proceso productivo, con el fin de conseguir un "efecto barrera" global que inhiba o ralentice el crecimiento de los microorganismos responsables de la alteración de los productos.

**Tarea 4.1. Estrategias desarrolladas para la maduración de canales.**

Los resultados obtenidos indican que los grupos microbianos más importantes que están presentes en materias primas y canales son: *Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Vibrionaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae, Carnobacteriaceae y Streptococcaceae.*

Teniendo en cuenta los flujos de trabajo y las interacciones establecidas materia prima-flujo de trabajo-vida útil, la búsqueda se centró principalmente en el control específico de los siguientes grupos microbianos: *Pseudomonasdaceae, Vibrionaceae, Lactobacillaceae,* y *Streptococcaceae.*

Se concluyó que el mejor tratamiento aplicable para la inhibición del crecimiento de estos microorganismos es el uso de ácidos orgánicos en canales. Los estudios científicos consultados, demuestran la eficacia del uso de ácido cítrico, láctico y acético favorecen la descontaminación de canales de bovino y porcino, tanto de microorganismos alterantes como patógenos. Esta eficacia depende directamente de la concentración del ácido, el tiempo, la temperatura y

método de aplicación, así como la concentración inicial de microorganismos presente en la canal.

Se realizó una prueba preliminar en 5 canales de bovino en las que se aplicaron 3 tratamientos de higienización:

- Tratamiento por pulverización de solución de ácido cítrico al 3%.
- Tratamiento por pulverización de solución de ácido acético al 3%.
- Tratamiento por pulverización de solución de ácido láctico al 3%.

Para cada canal, se seleccionó una superficie de aproximadamente 100 $cm^2$ en la que se aplicó cada uno de los tratamientos tras las tareas de sacrificio y faenado y previo a entrada en cámara de maduración. Tras la aplicación por pulverización de las soluciones ácidas, se hizo un seguimiento de la evolución físico-química y organoléptica de las canales, monitorizando el pH y características sensoriales de olor y color durante 48 horas. Las pruebas iniciales demostraron que el uso de ácido acético y ácido cítrico alteran las características sensoriales (olor y color no característico) en 3 de las 5 canales evaluadas, con lo cual se descartó su uso en ensayos posteriores. Por el contrario, con el uso de ácido láctico se obtuvieron resultados satisfactorios, tanto a nivel organoléptico como físico-químico.

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenidos:

| Desinfectante | Aplicación | Dosificación | Ventaja uso | Desventaja uso | Resultado |
|---|---|---|---|---|---|
| **Ácido cítrico** | Aspersión 20 ±5 segundos | 3% | Uso concentraciones bajas<br>Económico | Se inactiva en presencia de materia orgánica | Alteración sensorial:<br>-Olor no característico canal<br>-Color no característico canal<br>No alteración físico-química |
| **Ácido acético** | Aspersión 30 ±5 segundos | 3% | Económico | Olor irritante<br>Difícil manejo | Alteración sensorial:<br>-Olor no característico canal<br>-Color no característico canal<br>No alteración físico-química |
| **Ácido láctico** | Aspersión 20 ±5 segundos | 3% | Fácil manejo<br>Económico | No eficaz en bacterias ácido-resistentes | No alteración sensorial<br>No alteración físico-química |

*Tabla 7.- Resultados de la mejora higiénica de canales.*

La siguiente fase se centró en la aplicación de ácido láctico a distintas concentraciones y temperaturas para determinar el tratamiento más preciso. Para ello, se utilizó ácido láctico al 80% diluido en agua potable a 50ºC. El modo de aplicación seleccionado fue aspersión mediante pulverizador. Las concentraciones seleccionadas de ácido láctico fueron:

- Prueba 1: Dosificación de 5%: 0,5 litro de ácido láctico al 80% en 7,5 litros de agua potable a 50ºC.
- Prueba 2: Dosificación de 4%: 0,4 litros de ácido láctico al 80% en 7,6 litros de agua potable a 50ºC.
- Prueba 3: Dosificación de 3,0%: 0,33 litros de ácido láctico al 80% en 7,68 litros de agua potable a 50ºC.

La aplicación de tratamientos se realizó en 5 canales. En cada una de ellas, se aplicó el tratamiento en una superficie de unos 100 $cm^2$. Se seleccionó un área en el que no se aplicó tratamiento como superficie de control. Tras la pulverización de los tratamientos, se monitorizó durante las siguientes 48 horas el pH y la evolución a nivel sensorial.

Los resultados de pH fueron satisfactorios en todos los casos, no observándose diferencias significativas entre las zonas con tratamiento y el control. Sin embargo, a nivel organoléptico se detectaron alteraciones importantes en los tratamientos con ácido láctico al 5% (Prueba 1) y al 4% (Prueba 2), ya que las canales presentaban un color marrón-pardo intenso no característico.

El último paso para la selección de un tratamiento efectivo, fue la validación de la aplicación de ácido láctico al 3%. Para ello, se seleccionaron 5 canales de bovino y 5 de porcino, tras las tareas de sacrificio y faenado. Posteriormente, se aplicó mediante pulverización la solución ácida al 3% durante 20 segundos. El tratamiento se aplicó en media canal, dejando la otra media como control.

Tras 24 horas, de la aplicación, se realizó un análisis microbiológico para determinar la eficacia del tratamiento. La toma de muestras se realizó mediante método no destructivo, utilizando una esponja abrasiva en una superficie total de 400 $cm^2$ en cada media canal (media canal control y media canal con tratamiento). Los análisis microbiológicos se realizaron en base al Reglamento CE 20173/2005 relativo a los Criterios Microbiológicos en Alimentos, donde se especifican los criterios de higiene de los procesos para canales de vacuno y porcino. Por ello, los parámetros evaluados han sido Aerobios mesófilos (AM) y Enterobacterias (EB).

El nivel de reducción medio entre las muestras control y las muestras tratadas es de aproximadamente de 0.5 unidades logarítmicas, con lo que se puede considerar que el tratamiento es significativamente eficaz. Si se evalúan las muestras de manera individual, se aprecia que el tratamiento es más efectivo en aquellas canales con carga microbiológica inicial media-baja. Sin embargo, en las muestras que presentaban una carga inicial elevada de microorganismos, el tratamiento no es tan eficiente.

Por ello, es importante extremar las condiciones higiénicas durante las tareas de sacrificio y faenado. Debe realizarse aplicando las buenas prácticas de higiene y los sistemas basados en los

principios de APPCC para reducir al máximo la contaminación microbiana y asegurar así la eficacia en la descontaminación.

Por otra parte, se realizó un control de patógenos en las canales evaluadas, con el fin de determinar si el tratamiento con ácido láctico inhibe el crecimiento de los mismos. Siguiendo el Reglamento CE 20173/2005 relativo a los Criterios Microbiológicos en Alimentos, se evaluó la presencia /ausencia de *Salmonella* spp. en las canales. En ninguno de los casos se encontró el patógeno.

También se realizó una evaluación sensorial para determinar posibles alteraciones en las canales con tratamiento respecto al control. Los aspectos monitorizados fueron color y olor. Se realizó un seguimiento de las canales durante 48 horas tras tratamiento, realizando evaluación sensorial cada 8-10 horas. La escala de análisis se representa de 0 a 5, donde 5 es el estado óptimo del producto y 0 se corresponde con la degradación del mismo.

A nivel sensorial no se han encontrado diferencias significativas entre la media canal control y la media canal sometida a tratamiento. Se ha comprobado que el color y olor de las muestras no sufre modificaciones por el uso de ácido láctico al 3%.

La implementación de esta metodología en mataderos puede ser una estrategia segura, económica y de fácil aplicación para mejorar el estado higiénico de las canales. Su uso está aprobado para canales de vacuno en el Reglamento (UE) Nº101/2013 y se ha demostrado durante la ejecución de esta tarea que en concentraciones adecuadas no altera las características organolépticas de la carne (olor, sabor, color).

**Tarea 4.2. Estrategias desarrolladas para matrices alimentarias.**

En esta tarea se han estudiado vías de mejora en la vida útil aplicadas a nivel de producto atendiendo a los resultados obtenidos previamente.

**PRODUCTOS Y PREPARADOS CÁRNICOS FRESCOS:**

Los grupos microbianos que se determinaron como alterantes en los productos cárnicos frescos evaluados fueron: *Lactobacillaceae*, *Streptococcaeae* y *Pseudomonaceae*.

En el momento de plantear las estrategias para tratar los productos y preparados cárnicos frescos se tuvo en cuenta la naturaleza de los microorganismos detectados como responsables del deterioro, de manera que las estrategias deberían ser diferentes.

En el caso de que la diana sean microorganismos pertenecientes a las familias *Pseudomonaceae* y *Vibrionaceae,* hay que tener en cuenta que se trata de microorganismos Gram -. Es por ello que estos microorganismos son más sensibles a condiciones ambientales extremas que pueden darse tanto en la matriz alimentaria como en las condiciones de conservación. Como estrategia

en este caso y en paralelo al desarrollo llevado a cabo en canales, se empleó ácido láctico, ya que los Gram – serían previsiblemente más sensibles a ambientes ácidos en el alimento. En el uso de ácido láctico y tal como ocurrió en el tratamiento de canales, no se detectaron alteraciones a nivel sensorial, de manera que lo convertía en una alternativa viable para la conservación. Tras los ensayos sobre producto en carne fresca de bovino y burguer meat se comprobó que no era una alternativa viable ya que no mejoraba la vida útil, si no que por el contrario y durante el periodo de conservación se aceleraba el deterioro del producto por aparición temprana de colores pardos y oscuros.

Los microorganismos pertenecientes a las familias *Lactobacillaceae* y *Streptococcaeae* son bacterias Gram +, más resistentes por tanto a condiciones ambientales adversas. Pero son sensibles a conservantes naturales tales como bacteriocinas. Las bacteriocinas son moléculas con capacidad antimicrobiana, sintetizadas a su vez por microorganismos y capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos filogenéticamente cercanos. En este caso se empleó como conservante la nisina. Este bioconservante natural es sintetizado por una bacteria ácido láctica, *Lactococcus lactis* y está autorizado su uso en la industria alimentaria. Se aplicó en preparados cárnicos en 5 mg/kg de masa y posteriormente se evaluó la vida útil de los productos. Los resultados no fueron satisfactorios en cuanto al incremento de días de vida útil del producto envasado en MAP.

**Tarea 4.3 Estrategias desarrolladas sobre superficies de biofilms.**

Se ha determinado que los biofilms detectados de la industria agroalimentaria están compuestos por una amplia diversidad de microorganismos, los cuales varían en función del tipo de superficie, el material y el uso de la misma.

Se realizaron pruebas para eliminación de biofilms seleccionando 3 métodos que en los estudios científicos consultados se demostró su eficacia:

- Limpieza de superficies mediante acción mecánica: cepillado.
- Uso de agente desinfectante en espuma con capacidad biocida, a base de compuestos tensioactivos catiónicos, con agentes secuestrantes y oxidantes.
- Uso de agente limpiador con enzimas al 5%, agentes tensioactivos y phenoxyethanol.

Tras determinar los métodos a ensayar, el diseño experimental llevado a cabo fue:

- Selección de focos con contaminación: Con el fin de obtener resultados aplicables en las condiciones habituales de trabajo, se seleccionaron superficies, búsqueda de focos de contaminación en superficies en contacto con alimentos. En esta tarea se determinó que las zonas en las que se encontraron mayor presencia de biofilms fueron: sumideros, paredes y techos de obrador y cámaras de refrigeración, zonas de engranaje maquinarias, juntas de equipos y maquinaria y utensilios de trabajo porosos.

- Aplicación métodos de eliminación: de las muestras positivas, se escogieron 2 superficies para ensayar las pruebas preliminares: mesa de acero y tabla plástica de corte. Así se pudo determinar la eficacia de los tratamientos en función del material. Se aplicaron los 3 métodos seleccionados en cada superficie a evaluar en un área aproximada de unos 100 $cm^2$. Para la aplicación de los métodos se siguieron las indicaciones del fabricante en cada uno de los protocolos.
- Verificación eliminación biofilms: Tras los tratamientos, se realizó una comprobación de la efectividad de los mismos.
- Evaluación de resultados: La determinación macroscópica de biofilms evidenció que la limpieza mediante acción mecánica sin uso de agentes limpiadores no tiene una clara efectividad. Este método habría que combinarlo con el uso de agentes limpiadores y/o desinfectantes.

Con el uso del producto limpiador con enzimas se obtuvieron resultados satisfactorios en la superficie de acero. Sin embargo, en la superficie plástica no se consiguió eliminar el biofilm.

La aplicación del agente desinfectante con capacidad biocida eliminó la presencia de biofilms en ambas superficies (acero y plástico).

Una vez comprobada la efectividad de las estrategias de limpieza, se realizó una validación de la metodología con la que se obtuvieron mejores resultados.

Para la validación de la metodología se escogieron 10 superficies en las que previamente se comprobó la presencia de biofilm. Posteriormente se aplicó el producto en espuma, en concentración al 5%. Se dejó actuar 15 minutos y posteriormente se aclaró con abundante agua.

Con la ejecución de esta tarea se comprobó la eficacia de los productos en espuma con capacidad biocida y compuestos oxidantes. Estos productos actúan directamente sobre la matriz del biofilm, degradándola y permitiendo así su eliminación. Para una verdadera eficacia, los tratamientos se deberán aplicar en la industria agroalimentaria de manera prolongada y continua.

**HITO 5: Coordinación del proyecto y evaluación de resultados**

**Tarea 5.1 Coordinación del proyecto**

SE ha revisado de manera periódica la evolución del proyecto durante su ejecución. Para ello se establecen reuniones mensuales-bimensuales en las que ha participado el personal implicado en el proyecto, donde se revisaron los objetivos planteados en cada tarea, el cumplimiento de los mismos, las dificultades y retos que surgen en la ejecución y las necesidades de material y recursos para cada tarea.

**Tarea 5.2. Evaluación final de los resultados obtenidos**

La evaluación de resultados ha supuesto el reto más complicado de resolver del proyecto. La gran cantidad de muestras analizadas, la elevada biodiversidad microbiana encontrada y el gran número de datos generado ha supuesto la búsqueda de tratamientos bioestadísticos específicos que enlacen con el comportamiento de crecimiento de los microorganismos.

Se han ajustado varios modelos matemáticos para encontrar el adecuado al tipo de muestras que se estudiaban en cada tarea del proyecto. Tras el cribado y selección de datos, se realizó un estudio pormenorizado hasta llegar a la selección de los grupos microbianos más importantes y establecer su patrón de comportamiento a lo largo de todo el proceso productivo y vida útil.