



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos  
(FoodUPV)

Efecto de plasma frío sobre la inactivación de *Bacillus  
cereus* en matrices alimentarias

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Gestión de la Seguridad y Calidad  
Alimentaria

AUTOR/A: Fortuny Garcia, Javier Lorenzo

Tutor/a: Martínez López, Antonio

Cotutor/a externo: RODRIGO ALIAGA, MARIA DOLORES

Director/a Experimental: VALDEZ NARVAEZ, MARIA INES

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

## **EFECTO DEL PLASMA FRÍO SOBRE LA INACTIVACIÓN DE *BACILLUS CEREUS* EN MATRICES ALIMENTARIAS.**

Javier Lorenzo Fortuny Garcia, Antonio Martínez López, Maria Dolores Rodrigo Aliaga, Maria Ines Valdez Narvaez.

### **RESUMEN**

El arroz es un alimento clave en la dieta mediterránea. *Bacillus cereus* es reconocido como un agente patógeno, puede formar esporas resistentes al calor y otros tratamientos convencionales, causante de intoxicaciones alimentarias que se han presentado en brotes asociados al consumo de arroz contaminado y productos derivados de este. Normalmente los tratamientos de cocción a los que se somete el arroz o los platos en los que el arroz es parte de su composición, no son suficientes para eliminar las esporas de *Bacillus cereus* que puede estar presente en la materia prima *Bacillus cereus* puede germinar y crecer hasta alcanzar dosis infectivas. Una solución es higienizar la materia prima para reducir la carga microbiana, en este caso de *Bacillus cereus*. En este contexto, el objetivo del trabajo es evaluar el efecto del plasma frío sobre la inactivación de formas esporuladas de *B. cereus* en arroz. Para ello se ha evaluado el efecto de distintos tratamientos de plasma frío en vacío, a potencias de 100 W, 200 W y 300 W para diferentes tiempos, usando como gas generador de plasma oxígeno, aplicados en láminas portaobjeto inoculadas con una dilución de esporas como línea base y arroz como matriz alimentaria. Los resultados obtenidos demostraron el potencial antimicrobiano del plasma frío, así como que los tratamientos de 300 W fueron los más efectivos produciendo una disminución de 1.5 ciclos logarítmicos sobre la población de esporas en el arroz, y 2 ciclos logarítmicos en la lámina portaobjetos.

**PALABRAS CLAVE:** Arroz, *Bacillus cereus*, esporas, plasma frío, inactivación.

### **RESUM**

L'arròs és un aliment clau en la dieta mediterrània. *Bacillus cereus* és reconegut com un agent patògen, que pot formar espores resistents a la calor i altres tractaments convencionals, causant d'intoxicacions alimentàries que s'han presentat en brots associats al consum d'arròs contaminat i productes derivats d'aquest. Normalment els tractaments de cocció als quals se sotmet l'arròs o els plats en els quals l'arròs és part de la seua composició, no són suficients per a eliminar les espores de *Bacillus cereus* que pot ser present en la matèria primera *Bacillus cereus* pot germinar i créixer fins a aconseguir dosis infectives. Una solució és higienitzar la matèria primera per a reduir la càrrega microbiana, en aquest cas de *Bacillus cereus*. En aquest context, l'objectiu del treball és avaluar l'efecte del plasma fred sobre la inactivació de espores de

*B. cereus* en arròs. Per a això s'ha avaluat l'efecte de diferents tractaments de plasma fred en buit, a potències de 100 W, 200 W i 300 W per a diferents temps, usant com a gas generador de plasma oxigen, aplicats en lamines portaobjectes inoculades amb una dilució d'espores, com a línia base i arròs, com a matriu alimentària. Els resultats obtinguts van demostrar el potencial antimicrobià del plasma fred, així com que els tractaments de 300 W van ser els més efectius produint una disminució d'1.5 cicles logarítmics sobre la població d'espores en l'arròs, i 2 cicles logarítmics en la làmina portaobjectes.

PARAULES CLAU: Arròs, *Bacillus cereus*, espores, plasma fred, inactivació.

## ABSTRACT

Rice is a key component of the Mediterranean diet. *Bacillus cereus* is recognized as a pathogenic agent capable of forming heat-resistant spores and causing food poisoning outbreaks associated with the consumption of contaminated rice and rice-based products. Typically, the cooking treatments applied to rice or dishes containing rice as an ingredient are not sufficient to eliminate *Bacillus cereus* spores that may be present in the raw material. *Bacillus cereus* can germinate and grow to infective doses. One solution is to sanitize the raw material to reduce the microbial load, in this case, of *Bacillus cereus*. In this context, the objective of this study is to evaluate the effect of cold plasma on the inactivation of spore-forming *B. cereus* in rice.

To achieve this, the effect of various cold plasma treatments under vacuum conditions, at power levels of 100 W, 200 W, and 300 W for different durations, using oxygen as the plasma-generating gas, was evaluated on microscope slides inoculated with a spore dilution as the baseline and rice as the food matrix. The results obtained demonstrated the antimicrobial potential of cold plasma, with the 300 W treatments being the most effective, resulting in a reduction of 1.5 logarithmic cycles in spore population in the rice and 2 logarithmic cycles on the microscope slides

KEYWORDS: Rice, *Bacillus cereus*, spores, cold plasma, inactivation.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El arroz

El arroz es el grano procedente de las plantas herbáceas del género “*Oryza sativa*” que se cultiva desde hace más de 8.000 años y del que se producen anualmente unos 750 millones de toneladas, principalmente para el consumo humano. El arroz es un alimento muy popular en todo el mundo y la base de la dieta de los ciudadanos de muchos países (Rodrigo et al., 2021).

España es el segundo país productor de arroz de la Unión Europea, con aproximadamente 105.000 hectáreas dedicadas a este cultivo. Las principales regiones productoras de arroz en España son Andalucía, Extremadura, Cataluña y Valencia, seguidas de Aragón y Navarra. La textura principal del suelo en las zonas arroceras españolas es franco-arcillosa limosa, con suelos alcalinos (pH > 7,5), excepto en la zona de Extremadura (pH = 5,5-6) y un bajo contenido en materia orgánica (De Barreda et al., 2021).

El arroz, con un pH cercano a 7, es rico en almidón, el cual está compuesto por amilosa y amilopectina. El grano de arroz constituye un 12% de agua, un 75-80% de almidón y sólo el 7% de proteína. Debido a su mayor concentración de lisina (alrededor del 4%), es altamente digestible (93%) con un alto valor biológico (74%) y una relación de eficacia proteica (2.02%-2.04%) (Verma & Srivastav, 2020). El arroz contiene minerales como el calcio (Ca), el magnesio (Mg) y el fósforo (P), junto con trazas de cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn) y zinc (Zn) (Verma & Srivastav, 2017). También es fuente de vitaminas de grupo B, como la niacina, riboflavina y tiamina (Fresco, 2005).

El arroz es utilizado como materia prima, para la preparación de alimentos listos para consumo o para la elaboración de platos más complejos que incluyen a este como ingrediente, productos como fideos de arroz cocidos, arroz chino, entre otros (Wang et al., 2023). Por lo tanto, debido a su alto contenido de almidón y como consecuencia de su cultivo, recolección y manipulación, el arroz suele estar contaminado con esporas de *Bacillus cereus*.

### 1.2 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* es un bacilo Grampositivo, esporulado, anerobio facultativo, que en su forma vegetativa es termosensible, pero al tener la capacidad de formar esporas, estas son muy resistentes al calor, a las radiaciones y desinfectantes. *B. cereus* está ampliamente distribuido en la naturaleza y es un patógeno oportunista que se transmite a través de los alimentos. El pH óptimo para el crecimiento de *B. cereus* es de 4.5 a 9.5 y puede crecer en rangos de temperatura de 4 a 48 °C, aunque su temperatura óptima sea de 30-39 °C (Rodrigo et al., 2021).

Como se mencionó anteriormente, *B. cereus* es un patógeno que se transmite por alimentos, especialmente en productos a base de arroz y alimentos farináceos, como la pasta y fideos. Todos ellos, productos ricos en carbohidratos, que son un medio ideal para el crecimiento de *B. cereus*, pues es capaz

de producir una gran cantidad de amilasas que le permiten desdoblar este carbohidrato (Rosenquist et al., 2005; Sánchez et al., 2016).

*Bacillus cereus* es responsable de dos síndromes gastrointestinales diferentes, el síndrome emético y el diarreico (Grande et al., 2006). La forma emética, que se manifiesta con vómitos y náuseas, está causada por una toxina inductora de emesis, un dodecadepsipeptido cíclico termoestable denominado cereulida. Al ser ingerida, puede causar náuseas y vómitos al unirse a receptores estomacales 5-HT<sub>3</sub>; además, puede afectar la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hepatocitos, así como a los gradientes de concentración de iones potasio transmembrana para el normal funcionamiento de la célula (Bhunia, 2018a; Messelhäuser et al., 2014).

La enfermedad diarreica, está causada por una o más enterotoxinas proteicas, que se cree que provocan la diarrea al alterar la integridad de la membrana plasmática de las células epiteliales del intestino delgado, provocando un desequilibrio osmótico (Bhunia, 2018b; Stenfors Arnesen et al., 2008).

Se han relacionado tres enterotoxinas con la forma diarreica de la enfermedad, pero al contrario de la toxina emética, las enterotoxinas responsables de la forma diarreica son lábiles al calor, a la proteasa y al ácido. La toxina emética y la diarreica se diferencian, en que la toxina emética presenta más resistencia, pues es resistente a la digestión de las enzimas proteolíticas del tracto intestinal y a los ácidos presentes en el estómago humano, y esta preformada en el alimento, mientras que las enterotoxinas de la forma diarreica dan lugar a un proceso toxi-infeccioso gracias a las toxinas formadas en el intestino delgado (Clavel et al., 2004; Granum & Lund, 2006; Sánchez et al., 2016).

Los brotes relacionados con el síndrome emético suelen estar asociados a alimentos a base de cereales, pudding, sopas, carne de vacuno, aves de corral, pudin de leche, sirope de vainilla y fórmulas infantiles (Gilbert et al., 1974). Mientras que, el síndrome diarreico se asocia principalmente a la carne, el pescado, las sopas, las verduras como el maíz, la maicena, el puré de patatas, y los productos lácteos (Bhunia, 2018a; Bhunia, 2018b).

En la TABLA 1, se muestra el tipo de toxinas, la dosis infectiva, periodo de incubación, duración de la enfermedad y síntomas para las dos síndromes que pueden derivar de una intoxicación con *B. cereus*.

No se ha descrito una relación dosis-respuesta humana ni para la toxina emética ni para la diarreica producidas por *B. cereus*. Los datos epidemiológicos indican que la mayoría de los brotes mundiales debidos a *B. cereus* se han asociado a concentraciones superiores a 10<sup>5</sup> UFC/g en los alimentos implicados (Schoeni & Wong, 2005).

En 2021, *B. cereus* estuvo relacionado con 87 brotes transmitidos por alimentos entre los países miembros de la Unión Europea, lo que representa un 2.2% de los brotes ocurridos durante este periodo (EFSA, 2022), como se puede apreciar en la TABLA 2.

**TABLA 1:** Características de las toxinas de *Bacillus cereus*

(Fuente: (Bhunias, 2018b; Stenfors Arnesen et al., 2008))

Características	Síndrome Diarreico	Síndrome Emético
Tipo de toxinas y localización	Crecimiento del microorganismo en el intestino delgado del huésped / enterotoxinas.	Cereulida, preformada en el alimento.
Dosis infectiva	10 <sup>5</sup> -10 <sup>8</sup> UFC (total) El número total necesario es menor para las esporas que para las células vegetativas	10 <sup>5</sup> -10 <sup>8</sup> UFC (total) No es necesario que las células vivas para que produzcan la infección Cereulida: 8–10 µg kg <sup>-1</sup> peso corporal
Periodo de incubación y duración de la enfermedad	8–16 h (Ocasionalmente 4-24 h) Duración: 0.5–6 h	12–24 h (Ocasionalmente varios días) 6–24 h
Síntomas	Dolor abdominal, diarrea profusa y acuosa y tenesmo rectal.	Náuseas, vómitos y malestar general. Unos pocos casos letales (posiblemente debidos al daño hepático)

**TABLA 2:** Reporte EFSA / Datos sobre brotes producidos por toxinas de *Bacillus cereus* (Fuente: EFSA)

Número de casos (Evidencia fuerte)	% del total	Tasa de notificación por 100000			Casos humanos		Hospitalización		Muertes	
		2021	2020	2019/2017	N	% del total	N	% del total	N	% del total
87(15)	2.2	0.02	0.02	0.04	679	2.1	9	1.3	1	0.15

La problemática en el caso de los brotes o intoxicaciones producidas por *B. cereus*, es debida a su capacidad de formar esporas. Las esporas representan una forma metabólicamente latente del organismo derivada de las células vegetativas. La formación de esporas suele ser inducida por una restricción en la disponibilidad de uno o más nutrientes o bien por una ralentización del crecimiento de las células. También parece que la producción de esporas comprende parte de la población de un cultivo en crecimiento (Setlow & Johnson, 2019). Las esporas son termorresistentes, es decir, sobreviven a las tempera-

turas normales de cocción que suele generalmente temperaturas superiores a 90 °C. Las esporas son resistentes a condiciones de humedad baja y al ácido clorhídrico presente en el estómago, lo que constituye un potencial peligro para la salud humana. Las esporas germinan y crecen dependiendo de la temperatura de almacenamiento; las temperaturas óptimas de crecimiento en arroz son 30-36 °C (Sánchez et al., 2016; Schoeni & Wong, 2005). El problema entre el arroz y el *B. cereus*, radica en que una vez el arroz ha sido cocido, alcanza valores de agua adecuados para el crecimiento del microorganismo, las esporas se activan y al ser resistentes a los tratamientos de cocción tradicional, germinan pudiendo provocar una intoxicación alimentaria (Gilbert et al., 1974). Se han encontrado niveles de *B. cereus* superiores a 10<sup>3</sup> UFC/g tanto en arroz cocido como crudo y en productos de cereales de todo el mundo (Rosenquist et al., 2005).

Durante el procesamiento del alimento, se usan tratamientos de conservación en la cadena de producción, capaces de destruir las células vegetativas, pero no de sus esporas, esto es debido a que las esporas poseen estructuras externas multicapa, como una primera barrera para impedir la acción de sustancias químicas extrañas o la invasión física; estas estructuras externas son la razón principal de la resistencia de las esporas. Por lo general, las estructuras externas de las esporas, desde el interior hacia el exterior, se componen de membranas internas, corteza, membranas externas y cubiertas. La estructura de las esporas latentes de las especies de *Bacillus* es muy diferente de la de las células en crecimiento (Liao et al., 2018a; Setlow, 2007).

Para enfrentar esta problemática, las empresas que procesan los productos alimentarios tienen que seguir una serie de pautas y tratamientos antes, durante y después del procesamiento, desde un tratamiento adecuado de las materias primas, hasta un almacenamiento adecuado del producto final. A la hora de cumplir esta tarea, se pueden combinar varios tratamientos, como almacenamiento a temperaturas inferiores (4 a 8 °C) o en combinación con un envasado en atmósfera modificada con una concentración de dióxido de carbono superior al 40% (Bennik et al., 1995; Choma et al., 1999). Algunos aditivos alimentarios pueden utilizarse solos o combinados con otras medidas de control contra *B. cereus* en derivados del arroz para complementar esta tarea, como la Nisina a 500 IU/g (Gharsallaoui et al., 2021), Enterocina AS-48 20–35 µg/mL (Grande et al., 2006), el quitosano (Fernandes et al., 2009) o tratamientos que combinen el uso de la aceituna en polvo (Ferrer et al., 2009).

Por otra parte, en los últimos años, debido a la problemática ambiental que existe a nivel mundial, las empresas están enfocadas en el uso de nuevas tecnologías de conservación que sean más eficientes, no tan invasivas con los alimentos y que, además, sean respetuosas con el medioambiente.

### 1.3 Plasma frío

El plasma frío, también llamado plasma no térmico, se perfila como una prometedora tecnología de higienización en la industria alimentaria. A menudo se hace referencia al plasma como el cuarto estado de la materia, según un esquema que expresa un aumento del nivel de energía de sólido a líquido, de

líquido a gas y, en última instancia, a un estado ionizado del plasma gaseoso, que presenta propiedades únicas. Se produce a partir de gases ionizados o parcialmente ionizados, y como consecuencia de esta ionización, está formado por átomos, electrones, partículas cargadas, radicales, fotones ultravioletas (UV), etc. En el plasma frío, la temperatura de los electrones es muy superior a la de las demás partículas, lo que mantiene el plasma en un estado de no equilibrio termodinámico. Por lo tanto, la temperatura global del plasma frío se mantiene relativamente baja (<60 °C) y se entiende que las abundantes especies reactivas del plasma frío son responsables de la inactivación eficaz de los microorganismos (Misra et al., 2016a).

El plasma frío ataca a las estructuras de las esporas, dañando las propiedades de permeabilidad de estas, debido a la oxidación y acumulación de iones en las estructuras celulares, se producen perturbaciones y rupturas en las envolturas, provocando fugas del citoplasma de la célula. También otros componentes como el ADN de la spora son dañados por la inducción del plasma frío, pues este es el principal blanco de los fotones UV producidos durante el tratamiento, causando la generación de fotoproductos, aductos timinil-timina, letales para la célula. La penetración de los radicales generados durante el tratamiento también afecta a los receptores o enzimas germinantes produciendo daños en las vías metabólicas (Liao et al., 2018a; Setlow, 2007).

Para apreciar las bondades que presenta esta tecnología para la industria alimentaria, se puede comparar las limitaciones de las tecnologías no térmicas y las ventajas del plasma frío. El plasma frío ofrece una alta eficacia de inactivación microbiana a bajas temperaturas (generalmente <60 °C). Esto le permite prolongar la vida útil, mejorando así la eficiencia de la cadena de suministro. Casi todas las fuentes de plasma disponibles hasta ahora permiten la producción *in situ* de los agentes actuantes, justo a demanda, y con una gama variada de gases. Las especies químicas activas del plasma se caracterizan por su alta difusividad, actúan rápidamente y acceden a toda la superficie del alimento en la mayoría de los casos, aunque se observó que las células en un medio líquido eran más resistentes a la inactivación con plasma que las que se encuentran en superficies sólidas, debido a la necesidad de que las especies reactivas se difundan en el líquido. (Bourke et al., 2018; Misra et al., 2016a; Misra et al., 2016b).

El plasma frío es aparentemente benigno para muchos productos alimentarios y generalmente tiene un impacto insignificante en la matriz del producto, lo que podría reducir el uso de conservantes químicos. La aplicación de esta tecnología no hace uso de agua ni disolventes orgánicos, por lo que se considera respetuosa con el medio ambiente; además, no se necesitan fuentes de energía muy elevadas, por lo que se consideran energéticamente eficientes; sin embargo, es necesario tener en cuenta la estructura de los alimentos a la hora de diseñar los tratamientos con plasma, para garantizar su eficacia y seguridad (Bourke et al., 2018; Misra et al., 2016b).

Los factores intrínsecos de los alimentos, como la osmolaridad y el pH también afectan a la eficacia del tratamiento con plasma, ya que pueden provocar que las bacterias se vuelvan más resistentes al tratamiento; además, el conte-

nido en lípidos, proteínas y antioxidantes también pueden disminuir la actividad de las especies reactivas del plasma (Smet et al., 2016).

En cuanto a la aceptabilidad organoléptica de los productos alimenticios tratados con plasma, se centran en el impacto del plasma sobre el aspecto visual. Se suele concluir que el tratamiento con plasma frío no produce cambios en los atributos sensoriales, gusto, olfato, apariencia, color o textura, aunque en algunas investigaciones se pueden observar pérdidas de color, por ejemplo, en frutas, o empeoramiento de la textura el caso de leguminosas (Kim et al., 2015; Pankaj et al., 2018).

Este trabajo de fin de máster tiene como objetivo investigar y comprender el comportamiento de las esporas de *B. cereus* en respuesta a diferentes tratamientos con plasma frío, analizando cómo la resistencia de las esporas de *B. cereus* varía en función de la intensidad del tratamiento y en función de la matriz alimentaria en la que se encuentran; además, determinar las condiciones óptimas de tratamiento con plasma frío para lograr la mayor reducción de la resistencia de las esporas de *B. cereus* cuando se encuentran en una matriz alimentaria sólida (granos de arroz), de tal manera que se pueda proporcionar recomendaciones prácticas para la aplicación del plasma frío como una estrategia efectiva de descontaminación en la industria alimentaria.

Este trabajo tiene relación con el ODS 3. Salud y bienestar, garantizando que los alimentos que llegan a la cadena alimentaria son microbiológicamente seguros, con el ODS 9. Industria, innovación e infraestructura, mediante el desarrollo de nuevas tecnologías y estrategias que permitan a la industria alimentaria reducir el uso de aditivos y aplicar nuevos tratamientos a nivel industrial para higienizar matrices alimentarias y con los ODS 12. Producción y consumo responsable y ODS 13. Acción por el clima, por la búsqueda de alternativas a tratamientos térmicos, buscando nuevas tecnologías que puedan minimizar el uso de recursos energéticos y que en ocasiones no son compatibles con el empleo de envases biodegradables o reutilizables.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

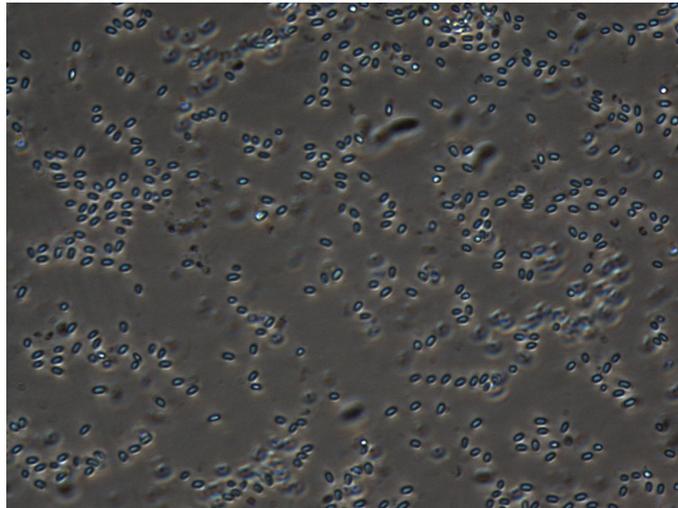
### **2.1 Microorganismo y procesos de esporulación**

La cepa *Bacillus cereus* CECT 148 utilizada en este estudio, se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). La cepa se reactivó en caldo nutritivo Nutrient Broth (NB) agitando durante 24 horas a 32 °C.

Para la esporulación, se prepararon 11 frascos Roux (Fisher Scientific SL) con Agar Nutritivo Fortificado (Scharlab), en cada frasco se inoculó 0,5 ml del cultivo de *B. cereus* y con un asa acodada se distribuyó de manera homogénea el cultivo, dejándose los frascos (sin invertir) en incubación a 30 °C durante 24 h para fijar el cultivo en el medio. Transcurrido este tiempo, se voltearon los frascos y se dejaron incubar en la estufa; a partir de las 48 h de la siembra, se controló la tasa de esporulación gracias a un microscopio de contraste de fases y cuando el nivel de esporulación alcanzó aproximadamente el 90%, se

recogieron las esporas.

Las esporas se recolectaron con un asa metálica barriendo suavemente la superficie del agar y lavándola con agua bidestilada. La solución recogida se centrifugó a 2500 g durante 15 min a 5 °C, el sobrenadante extraído se suspendió de nuevo en 5ml de agua bidestilada y se centrifugo en las mismas condiciones anteriormente descritas. Este proceso fue repetido 4 veces. Finalmente, las esporas se almacenaron a 4 °C en agua destilada.



**FIGURA 1:** Formas esporuladas de *Bacillus cereus*

## 2.2 Preparación de los materiales y sustrato

Antes de dar los tratamientos con plasma, se preparó la muestra, el material de laboratorio y los medios de cultivo para las siembras. El medio de cultivo utilizado fue Nutrient Broth Agar ISO (Scharlaw); para su preparación, se pesó en una balanza (Kern PCB 430-33) 14 gramos de NBA y se enriqueció el medio con 1 gramo de almidón soluble (Panreac), se añadió 500 ml de agua destilada y se agitó manualmente para homogenizar, cada medio preparado se autoclavó a 120 °C por 20 min en un autoclave (Selecta Presoclave 30). Antes de utilizar cada medio, se mantuvieron en un baño de agua (Selecta Precistern Bourgeat) para que el medio no se enfríe y gelifique.

Previo a la preparación de las muestras, se realiza la preparación de solución de esporas, colocando el frasco con la solución en agitación a 200 rpm durante 45 minutos en un Rotamax 120 (Heidolph) y luego se agita 10 minutos más en un Vortex (VWR International).

Para la preparación de las muestras, en capsulas de cristal se pesa 5 gramos de arroz en grano y se inocula 100 µL de la solución previamente preparada de esporas. Se dejan secar las muestras en una estufa (Memmert 854 Schwabach) durante 20 horas a 50 °C para reducir la humedad del arroz pero evitando que las esporas se activen.

En el caso de la preparación de la muestra en la lámina portaobjetos, se inocularon 100 µL de la solución de esporas y se dejaron secar en la cámara de flujo laminar con la ventilación de la cámara encendida, durante 20 horas.

### 2.3 Tratamiento con plasma frío

Una vez se tienen las muestras preparadas con el inóculo, se procedió a la aplicación del tratamiento con plasma frío. Este tratamiento se realizó en el equipo de plasma (Electronic Diener Plasma Surface Technology PCCE), usando oxígeno 100% puro (Alphagaz) como gas de ionización.

Para cada tratamiento, se utilizaron diferentes potencias: 100, 200 y 300 W, en cada uno de los casos se aplicaron diferentes tiempos de tratamiento entre 5 y 60 min dependiendo de la potencia utilizada y si el tratamiento se realiza en la matriz alimentaria o en el portaobjetos.

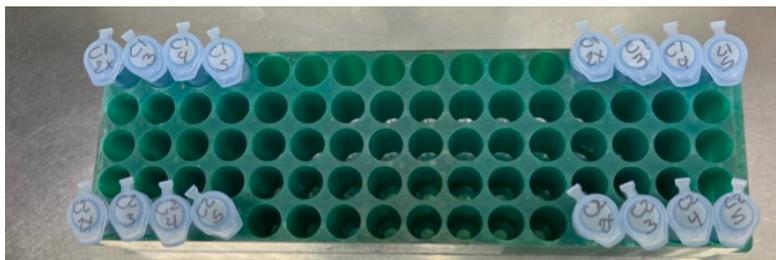
**TABLA 3:** Tratamientos aplicados en el equipo de plasma frío en vacío

Potencia del tratamiento	Muestra / Duración del tratamiento	
	Portaobjetos	Arroz
100 W	10 min, 20 min, 30 min, 40 min	30 min, 40 min, 50 min, 60 min
200 W	10 min, 20 min, 30 min, 40 min	30 min, 40 min, 50 min, 60 min
300 W	5 min, 10 min, 15 min, 20 min	20 min, 30 min, 40 min, 50 min

Para los tratamientos con plasma, se colocaron las muestras en el interior de la cámara y se controló la temperatura inicial antes de cada tratamiento, teniendo que estar en un rango de 22 a 25 °C. Al ser un equipo que trabaja en condiciones de vacío, se accionaba la válvula y el controlador de presión, despresurizando hasta 0.25 mbar con una bomba de vacío (Leybold trivac D16T), cuando la presión alcanzaba este valor, se abría la válvula de oxígeno hasta llegar a una presión de 0,35 mbar, dependiendo de la potencia de trabajo, se controlaba el tiempo de tratamiento, a mayor potencia menores tiempos de tratamiento. Una vez el tratamiento finalizaba, se abría la cámara del equipo, se volvía a controlar la temperatura y se pesa la muestra para controlar la humedad final.

### 2.4 Siembra

Las siembras de cada muestra tratada se realizaron en una cámara de flujo laminar (Telstar BV-100). Las muestras se diluyeron con 10 ml de agua destilada y se dejaron 10 minutos en un agitador magnético (IKA) para garantizar una extracción homogénea de las esporas residuales en la muestra. A partir de esta primera dilución, se realizaron diluciones seriadas para la obtención de los datos experimentales, homogenizando las diluciones con un Vortex (VWR International) antes de cada siembra.



**FIGURA 2:** Diluciones control en microtubos Eppendorf

Al tratarse de un microorganismo anaerobio facultativo, las siembras se realizaron en profundidad con NBA, se dejaron solidificar las placas y se dejó en incubación a 30 °C durante 15-18 horas en una estufa (Selecta Incudigit).

Al cabo de este tiempo, se hizo un conteo en placa manual, obteniendo datos entre 30 y 300 colonias y se descartó aquellas que tenían más de 300 colonias.

## 2.5 Análisis de datos

Los resultados experimentales se procesaron en Microsoft Excel 365, donde se calculó la resistencia del microorganismo al tratamiento por plasma, en función del tiempo de tratamiento, como podemos ver en la siguiente ecuación:

$$\log(S) = \log_{10} \left( \frac{n}{n_0} \right) \quad (1)$$

- S representa la fracción de supervivencia o probabilidad de que un evento no ocurra antes de un tiempo t.
- log es el logaritmo en base 10.
- $n_0$  es la cantidad o la población iniciales.
- $n$  es la cantidad o la población finales en un momento dado.

Esta ecuación es útil en contextos donde se está analizando una disminución exponencial o una disminución proporcional de una cantidad de microorganismo a lo largo del tiempo. El logaritmo en base 10 se usa comúnmente para hacer que los cálculos sean más manejables, especialmente cuando se trata de magnitudes que pueden variar en varios órdenes de magnitud.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

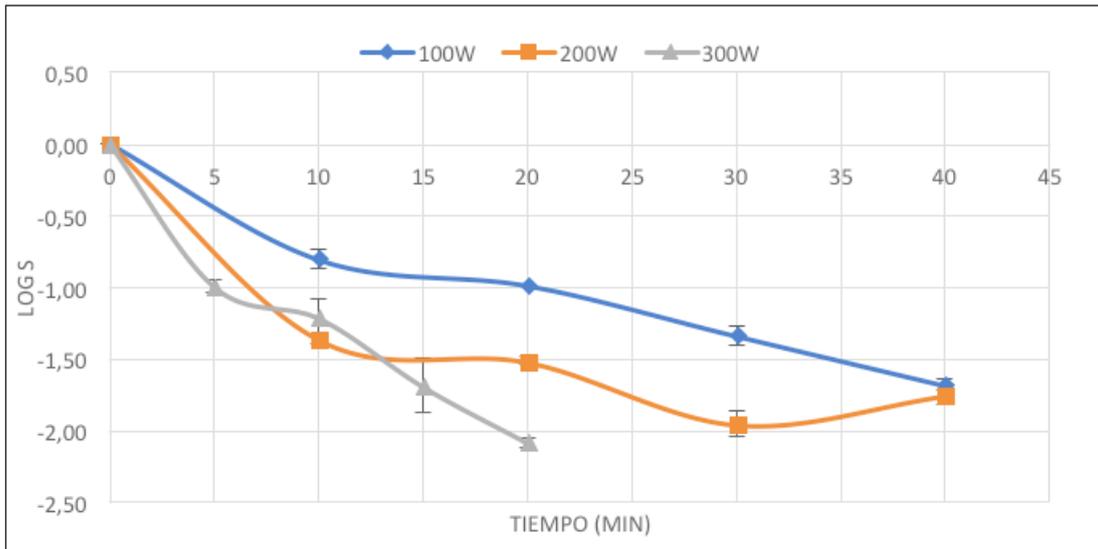
### 3.1 Efecto del plasma frío sobre la inactivación de las esporas de *B. cereus* en una superficie inerte (portaobjetos)

En el presente trabajo, se ha estudiado el efecto del plasma frío frente a las esporas de *B. cereus* cuando se encuentran en un medio de referencia y sobre una superficie inerte (portaobjetos) después de dar varios tratamientos a 100,

200 y 300 W durante diferentes tiempos, que varían en función de la potencia.

Partimos con los datos de los tratamientos en portaobjetos, ya que esto nos ayuda comprender el comportamiento de las esporas de *B. cereus* cuando reciben un tratamiento directo; es decir, sin que haya un efecto matriz de por medio, que afecte de manera directa o indirecta a la resistencia del microorganismo.

Las muestras se compararon entre muestras control y muestras tratadas, representando el logaritmo de la fracción de supervivencia en función del tiempo de tratamiento para cada potencia, como podemos observar en las siguientes graficas.



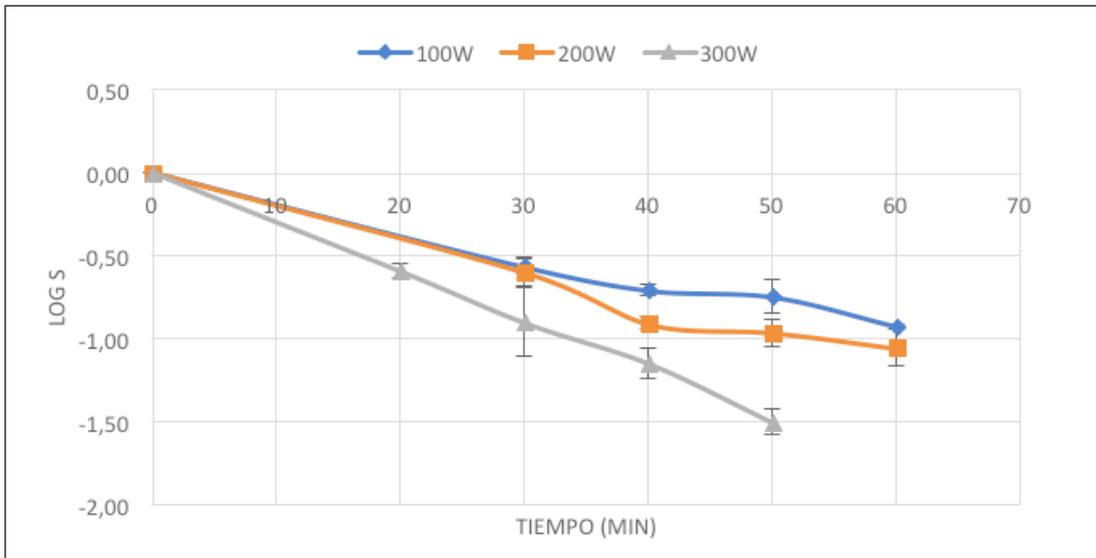
**FIGURA 3:** Curvas de inactivación de *B. cereus* en portaobjetos

En la FIGURA 3, se puede observar que, a medida que aumenta la potencia y el tiempo de tratamiento, disminuye la resistencia de las esporas de *B. cereus*. Es así como, se puede ver que con un tratamiento de 20 min a 300 W ya se ha podido reducir casi dos ciclos logarítmicos; mientras que, con potencias de 100 y 200 W, esto no fue posible, ya que se necesitó tiempos de hasta 40 min para alcanzar una reducción mayor a 1.5 ciclos logarítmicos.

Por otra parte, en la FIGURA 3, también se puede ver que hay diferencias significativas entre las potencias utilizadas cuando aumenta el tiempo de tratamiento. A tiempos cortos (10 min), solo se observa diferencias significativas con la potencia de 100 W, ya que entre las potencias de 200 y 300 W no se observa diferencias, pero a tiempos largos, esta diferencia entre potencias es más notoria, especialmente en el tiempo de 20 min, donde la potencia de 300 W es la que mayor efecto tuvo. Sin embargo, en el tiempo de 40 min, la curva de 200 W experimenta una disminución de la población mucho más lenta, lo que se traduce en la formación de una cola o tailing-off en la curva (Gyürék y Finch, 1998), dando lugar a que para el tiempo 40, las diferencias entre estos dos tratamientos no sean significativas.

### 3.2 Efecto del plasma frío sobre la inactivación de las esporas de *B. cereus* en arroz

Una vez analizado el efecto del plasma frío sobre las esporas de *B. cereus* contenidas en un medio de referencia y en una superficie inerte (portaobjetos), se analizaron los datos obtenidos en la matriz alimentaria (granos de arroz seco). Se dieron tratamientos de 100, 200 y 300 W, variando el tiempo de tratamiento en función de la potencia utilizada (20, 30, 40, 50 min).



**FIGURA 4:** Curvas de inactivación de *B. cereus* en arroz

En la FIGURA 4, se puede observar que estas curvas siguen una dinámica parecida a las curvas obtenidas en la FIGURA 3. A medida que aumenta el tiempo de tratamiento, hay diferencias significativas entre las potencias utilizadas; observándose que, para un tiempo de 50 min, con una potencia de 300 W se alcanza una reducción de hasta 1.5 ciclos logarítmicos.

Por otro lado, se puede decir que para las potencias de 100 y 200 W no hay diferencias significativas a tiempos cortos. Se empiezan a observar ligeras diferencias en los tiempos de 40 y 50 min, pero ya en el tiempo de 60 min, no se observa esta diferencia.

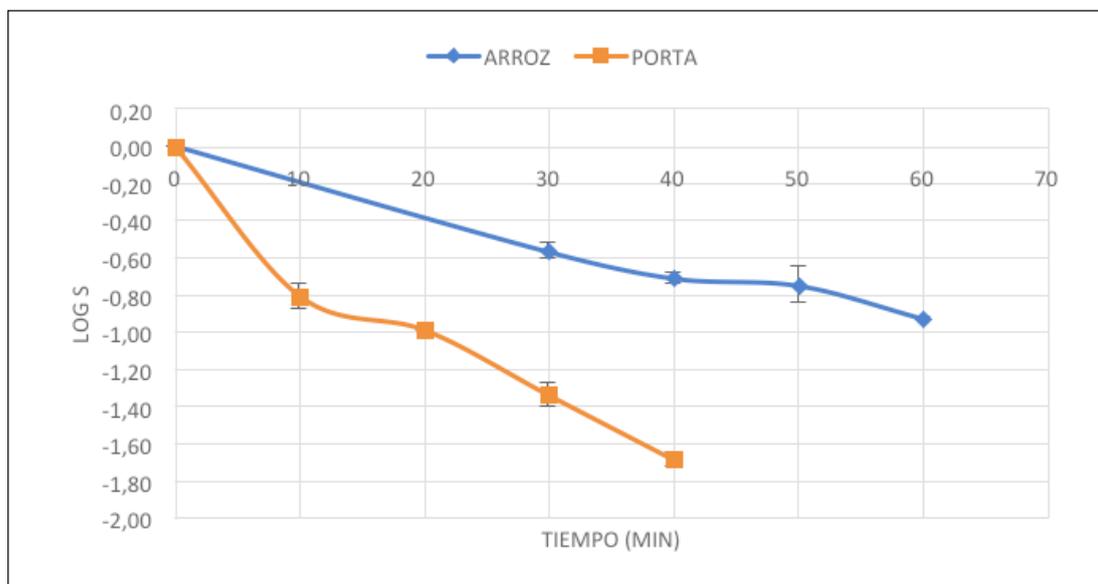
En consecuencia, es a 300 W durante un tiempo de 50 min donde mayor inactivación se produce.

### 3.3 Comparación del efecto del plasma frío sobre la inactivación de las esporas de *B. cereus* en superficie portaobjetos y arroz

Para observar el efecto que tiene la matriz sobre la resistencia de las esporas de *B. cereus* a los tratamientos con plasma frío, se analizaron los datos en función de cada potencia, relacionando la resistencia del microorganismo en función del tiempo de tratamiento.

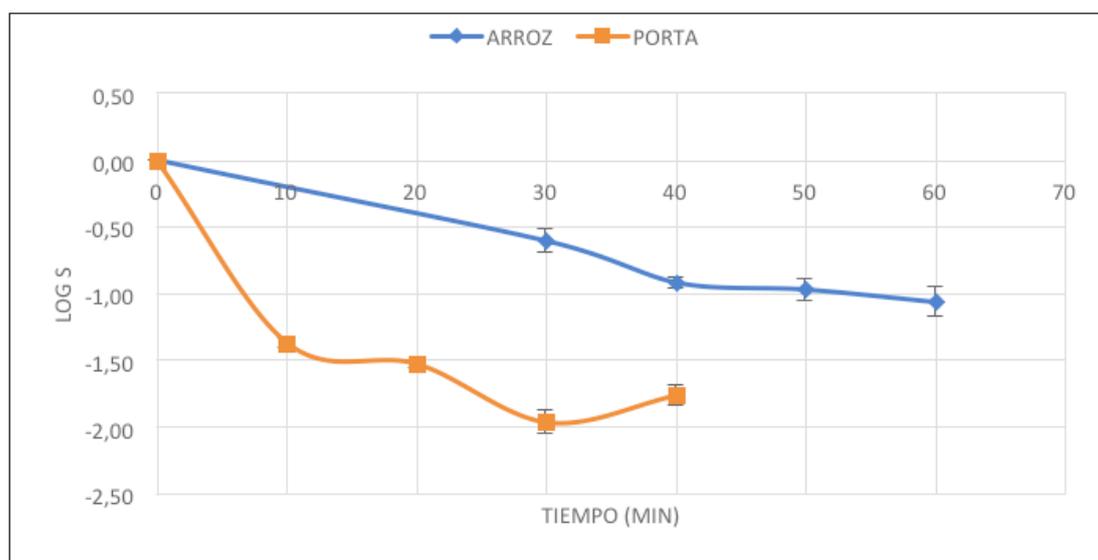
En la FIGURA 5, se observa que hay diferencias significativas entre las

muestras tratadas en el medio de referencia (portaobjetos) y la matriz alimentaria (arroz en grano seco) ya que a con un tiempo de 40 min se puede reducir más de 1.5 ciclos logarítmicos cuando las esporas están en la superficie inerte y a este mismo tiempo solo 0.6 ciclos logarítmicos cuando están en una matriz alimentaria. La máxima reducción en la matriz de arroz es de cerca de 1 ciclo logarítmicos después de 60 minutos de tratamiento.



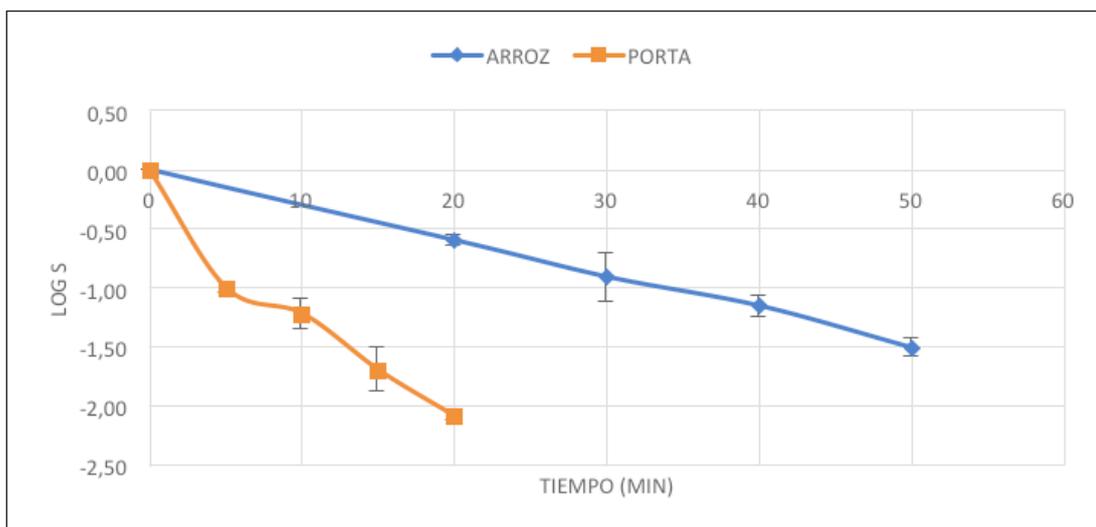
**FIGURA 5:** Comparativa de curvas de tratamiento a 100 W para arroz y portaobjetos

En la FIGURA 6, la curva del arroz sigue la misma dinámica que la curva del tratamiento de 100 W, se observa una diferencia significativa entre las muestras tratadas en un medio refencia y en una matriz de arroz. Como se puede observar, a los 30 min, se puede alcanzar una reducción de casi 2 ciclos logarítmicos cuando la muestra se encuentra en el portaobjetos y solo 0.5 ciclos logarítmicos cuando se tratan los granos de arroz seco.



**FIGURA 6:** Comparativa de curvas tratamiento de 200 W para arroz y portaobjetos

En la FIGURA 7, se puede observar el efecto de 300 W sobre las esporas tratadas en el medio de referencia y en arroz. El resultado es similar a lo ocurrido en los casos de 100 y 200 W. Cuando las esporas son tratadas directamente hay una mayor inactivación (2 ciclos logarítmicos) a los 20 minutos de tratamiento mientras que en el caso de las esporas en el arroz solo se consiguen 0,5 ciclos logarítmicos. El mayor nivel de inactivación en arroz se consigue después de 50 minutos, reduciéndose 1.5 ciclos logarítmicos.



**FIGURA 7:** Comparativa de curvas tratamiento de 300 W para arroz y portaobjetos.

### 3.4 Discusión de los resultados

Según los resultados obtenidos, el tratamiento con plasma frío logra disminuir la concentración de esporas de *B. cereus*, viéndose que, en todos los resultados obtenidos, las curvas de inactivación presentan la misma dinámica, a mayor potencia y tiempo de tratamiento, la disminución de la población microbiana es mayor. Esta dinámica concuerda con algunos estudios sobre tratamientos con plasma frío.

En relación con el efecto que tiene la potencia del tratamiento sobre la inactivación de microorganismos, existen distintos estudios como el realizado por Liao, et al. (2018b), en el que los resultados muestran que, a mayor potencia de tratamiento, se produjo una inactivación más rápida de *E. coli* en el zumo de manzana. Con una potencia para el tratamiento de 50 W, en sólo 30 s produjo una inactivación de 4,34 log UFC/mL sin embargo, cuando las potencias del tratamiento fueron de 30 W y 40 W, se necesitaron 40 s de tratamiento para lograr reducciones de 4,0 y 4,2 log UFC/mL, respectivamente. En otro estudio realizado por Pina-Pérez et al. (2020), corrobora estos resultados también, pues después de variar la potencia de descarga entre 0,6 y 2,2 W (densidad de potencia del plasma de 5-15 mW/cm<sup>2</sup>), se vio que la potencia de descarga está positivamente relacionada con el efecto esporicida, pues con 5 mW/cm<sup>2</sup> a 5 min de tratamiento se logró una reducción de 3 ciclos logarítmicos, mientras que con 10 mW/cm<sup>2</sup> a 5 min de tratamiento se logró una reducción de 4 ciclos

logarítmicos, asociando este efecto a que, el aumento de la potencia del tratamiento, aumenta la densidad del plasma y que un aumento de la densidad del plasma, produce una mayor alteración de la estructura de la cubierta de las esporas basada en la concentración de especies reactivas del nitrógeno y generación de ozono y óxidos de nitrógeno.

En relación con el tiempo de tratamiento, en dos estudios diferentes de Lee et al. (2016) para arroz integral, y Lee et al. (2017) tanto para arroz integral como para arroz blanco, se vio que después del tratamiento durante 5, 10 y 20 min a una potencia de 250 W, *B. cereus* en el arroz integral y blanco cocido disminuyó significativamente de 5,68 a 3,39 log UFC/g y de 5,67 a 3,05 log UFC/g respectivamente, reduciéndose aproximadamente 2 ciclos logarítmicos (Lee et al., 2017).

Por otra parte, un estudio realizado por Kim et al. (2020), en el que analizaron las características de calidad de los fideos de arroz tratados con plasma frío, a una potencia de 250 W y utilizando aire, consiguieron una reducción de 4.1 ciclos logarítmicos de la población de *B. cereus* para un tiempo de 20 minutos.

Woo et al. (2017), por su parte, estudiaron los cambios en las propiedades microbianas y químicas del arroz con cáscara cuando es sometido a un tratamiento de plasma frío durante 10 y 20 min a una potencia de 250 W, consiguiendo una reducción aproximada de 1,5 ciclos logarítmicos a los 20 min.

Estos resultados obtenidos en distintas investigaciones se aproximan a los resultados obtenidos en este estudio cuando se da un tratamiento sobre un medio de referencia como es el portaobjetos, sin embargo, es importante destacar que la reducción logarítmica cuando se encuentra el microorganismo contenido en una matriz alimentaria como arroz es menor con respecto a los resultados obtenidos por Lee et al. (2016), Lee et al. (2017) y Woo et al. (2017), pues para un tratamiento de 200 W durante 30 min cuando se trata una matriz de arroz, se alcanzó una reducción de 0,60 ciclos logarítmicos y aproximadamente 1,5 ciclos logarítmicos a tiempo 20 minutos para lamina portaobjetos, mientras que para la curva de 300 W, a tiempo 20, las reducciones de ciclos obtenidas para arroz y portaobjetos son de 0,59 y 2.08 ciclos logarítmicos respectivamente, lo cual se podría asociar a distintos factores como el equipo utilizado, el tipo y tamaño de matriz o por la diferencia de ratio entre cantidad de matriz y superficie abarcable del tratamiento aplicado.

En relación con el tipo de equipo utilizado, en los estudios de Lee et al. (2016), Lee et al. (2017) y Woo et al. (2017), se hace uso de un equipo de plasma atmosférico y las reducciones alcanzadas son sobre una población de células vegetativas de *B. cereus*. Esto puede explicar también las diferencias entre resultados pues nuestro estudio se centra en la inactivación de las formas esporuladas de *B. cereus* y el equipo usado para el tratamiento trabaja al vacío y no con plasma atmosférico.

En relación con el tamaño de la matriz y la superficie que abarca el tratamiento, en el estudio realizado por Kim et al. (2017) en el que analizaron los efectos de los parámetros de procesado en la inactivación de esporas de *Bacillus cereus* en copos de pimiento rojo (*Capsicum annum L.*) mediante tra-

tamiento combinado de microondas y plasma frío, encontraron diferencias significativas sobre la eficacia del tratamiento en relación al tamaño de los copos de pimiento rojo (muestra en copos  $1.5 \times 1.5$  cm frente a muestra en partículas  $0.5 \times 0.5$  cm). La inactivación de las esporas de *B. cereus* mediante tratamiento con plasma frío a potencia de microondas de baja densidad y potencia de microondas de alta densidad (LMCPT y HMCPT, respectivamente) fue de 1,4 ciclos para las muestras en copos y 0,8 ciclos para la muestra en partículas en LMCPT y de más de 2,5 ciclos en la muestra de copos y 1,2 ciclos en la muestra de partículas en HMCPT. De acuerdo a los resultados de estos estudios es importante el efecto matriz y la superficie expuesta cuando la matriz es de mayor tamaño, hay mayor inactivación. Otro factor importante es la cantidad de muestra, como en el estudio realizado por Pina-Pérez et al. (2020). En este estudio se investiga la aplicación de plasma atmosférico frío de corta duración y baja energía en la inactivación de esporas de *Bacillus subtilis* en maicena con una carga de  $5 \text{ mg/cm}^2$  consiguiéndose una reducción de 2,6 ciclos logarítmicos frente a 1,6 ciclos para una carga de  $25 \text{ mg/cm}^2$  en un tratamiento con una potencia aplicada de  $7 \text{ mW/cm}^2$  y tiempo 300 segundos.

En relación con las propiedades de la matriz, en un estudio realizado por Beyrer et al. (2020) sobre la inactivación de diferentes especies microbianas con el uso de plasma frío atmosférico, los resultados obtenidos para las distintas matrices difieren según su rugosidad, cuanto mayor rugosidad tenía la matriz, los efectos de la inactivación eran menores, pues las esporas quedan ocultas a los efectos de erosión y radiación en el interior de los poros de la superficie de la matriz, lo cual puede explicar la menor reducción cuando se trata una matriz de arroz, pues el microorganismo puede quedar oculto en las grietas o poros de los granos de arroz.

La humedad también es un factor importante que puede hacer que el tratamiento aplicado tenga mayor o menor eficacia. En el estudio de Kim et al. (2017) hay diferencias en los resultados obtenidos dependiendo del tipo de secado usado para reducir la humedad de la matriz para el posterior tratamiento con plasma, El número de esporas de *B. cereus* en copos de pimiento rojo secados con infrarrojo lejano se redujo en  $0,6 \pm 0,2 \text{ log esporas/cm}^2$  mientras que la reducción fue de  $1,6 \pm 0,2 \text{ log esporas/cm}^2$  en los copos secados al vacío.

Los cambios de humedad en el aire influyen directamente en la eficacia del tratamiento, pues pequeños cambios de la cantidad de agua en el aire, implica la aparición en mayor o menor medida de otras especies reactivas en el plasma que facilitarán en menor o mayor grado la descontaminación biológica. Hay una clara influencia de este parámetro tanto en la producción de plasma como en la inactivación de bacterias y de ahí su importancia en procesos de descontaminación biológica (Patil et al., 2014).

Por otra parte, otro fenómeno que se observó en el presente estudio fue la aparición de colas en las curvas de inactivación. La formación de las colas en las curvas de inactivación puede tener varias explicaciones, pudiendo ser vitalistas y mecánicas debido a la presencia de una subpoblación microbiana resistente al tratamiento dado. Estas explicaciones interpretativas son, bien que la cola es una característica normal, ligada al mecanismo de inactivación

o al mecanismo de resistencia de las esporas; así mismo, pueden deberse a que son un artefacto independiente del mecanismo de inactivación cuando las poblaciones microbianas son mixtas o a aglomeraciones de microorganismos; a la presencia de subpoblaciones con una resistencia variable al tratamiento, bien de carácter innato o como respuesta a una adaptación al medio; a la falta de homogenización en la aplicación del tratamiento; en un fallo en el recuento de colonias supervivientes o cuando no existe más carga microbiana por eliminar (Najm, 2006; Geeraerd et al., 2000; Cerf, 1977).

Resultados similares se observaron en el estudio realizado por Beyrer et al. (2020), en el cual se estudiaron varias especies bacterianas como *P. nalgiovense*, *G. stearothermophilus*, *B. coagulans* y *B. subtilis*. Cuando se aplicaban tratamientos con tiempos más largos a una misma potencia (350 W), la reducción de los ciclos fue mayor y se observó la aparición de hombros y colas para algunos tiempos de estos tratamientos. Además, se vio que la especie *B. subtilis* es la que menos reducción de población bacteriana tiene, siendo una especie bacteriana que presenta ciertas similitudes con *B. cereus*, ambas especies, tienen una gruesa estructura de peptidoglicano en el exterior de la célula que es resistente a los cambios químicos. Lee et al. (2012) explica esto porque bacterias Gram negativas presentan daños estructurales en la membrana externa tras la exposición al plasma frío, mientras estas especies de *Bacillus* Gram positivas no muestran el mismo grado de cambios morfológicos.

Por lo tanto, se puede decir que las diferencias obtenidas en este estudio, en relación a la inactivación de las esporas de *B. cereus* cuando se encuentra en un medio de referencia (portaobjetos) o en una matriz de arroz, son esperadas, observándose una mayor inactivación de esporas de *B. cereus* cuando se encuentran en un medio de referencia (portaobjetos) debido a que el tratamiento sobre el portaobjetos se da directamente sobre el inóculo mientras que en el tratamiento en la matriz de arroz, intervienen muchos factores ya indicados (la humedad, la presencia de poros en el arroz y por el tipo de equipo utilizado) que pueden afectar a la eficacia de los tratamientos

#### 4. CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados expuestos en el presente trabajo se concluye que:

- Existe un efecto significativo de la potencia y el tiempo de tratamiento, de modo que, la reducción de la población bacteriana aumenta con la intensidad del tratamiento.
- Existe un efecto significativo de la matriz en la que se aplica el tratamiento, siendo mayor la inactivación alcanzada en un medio neutro e interte que en la matriz alimentaria.

En el presente trabajo se ha confirmado la viabilidad del tratamiento de plasma frío como método de higienización en la reducción de la población de formas esporuladas de *B. cereus*. Sin embargo, son necesarios más estudios para escalar estos tratamientos a nivel industrial.

## 5. REFERENCIAS

- Bennik, M. H. J., Smid, E. J., Rombouts, F. M., & Gorris, L. G. (1995). Growth of psychrotrophic foodborne pathogens in a solid surface model system under the influence of carbon dioxide and oxygen. *Food Microbiology*, 12, 509-519. [https://doi.org/10.1016/s0740-0020\(95\)80135-9](https://doi.org/10.1016/s0740-0020(95)80135-9)
- Bhunia, A. K. (2018). *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* (pp. 193-207). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1_11)
- Beyrer, M., Smeu, I., Martinet, D., Howling, A., Pina-Pérez, M., & Ellert, C. (2020). Cold atmospheric plasma inactivation of microbial spores compared on reference surfaces and powder particles. *Food and Bioprocess Technology*, 13(5), 827-837. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02438-5>
- Bhunia, A. K. (2018a). Foodborne Microbial Pathogens. En *Food science text series*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1>
- Bhunia, A. K. (2018b). *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. En *Food science text series* (pp. 193-207). Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1_11)
- Bourke, P., Ziuzina, D., Boehm, D., Cullen, P. J., & Keener, K. M. (2018). The Potential of Cold Plasma for Safe and Sustainable Food Production. *Trends in Biotechnology*, 36(6), 615-626. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.001>
- Cerf, O. (1977). A REVIEW Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores. *Journal of applied bacteriology*, 42(1), 1-19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1977.tb00665.x>
- Choma, C., Guinebrete Á Re, M. H., Carlin, F., Schmitt, P., Velge, P., Granum, P. E., & Nguyen-The, C. (1999). Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables.
- Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., & Schmitt, P. (2004). Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), 214-219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02292.x>
- De Barreda, D. G., Pardo, G., Osca, J. M., Catala-Forner, M., Consola, S., Garnica, I., López-Martínez, N., Palmerín, J. A., & Osuna, M. D. (2021). An overview of rice cultivation in Spain and the management of herbicide-resistant weeds. *Agronomy*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/agronomy11061095>
- Fernandes, J. B., Eaton, P., Gomes, A. M. P., Gomes, A., & Malcata, F. X. (2009). Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. *Ultramicroscopy*, 109(8), 854-860. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2009.03.015>
- Ferrer, C. M. S., Ramón, D., Muguera, B., Marco, A., & Martínez, A. (2009). Effect of Olive Powder on the Growth and Inhibition of *Bacillus cereus*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(1), 33-37. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0133>
- Fresco, L. O. (2005). "Rice is life". *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(4), 249-253. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.09.006>
- Geeraerd, A., Herremans, C., & Van Impe, J. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185-209. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00362-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00362-7)
- Grande, M. A., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N. B., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., & Gálvez, A. (2006). Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.003>
- Granum, P. E., & Lund, T. (2006). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiology Letters*, 157(2), 223-228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x>
- Gharsallaoui, A., Chihib, N., & Gharsallaoui, A. (2020). Conditions of nisin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis* and its main uses as a food preservative. *Archives of Microbiology*, 203(2), 465-480. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02054-z>
- Gyürék, L. L., & Finch, G. R. (1998). Modeling water treatment chemical disinfection kinetics. *Journal of Environmental Engineering*, 124(9), 783-793. [https://doi.org/10.1061/\(asce0733-9372\(1998\)124:9\(783](https://doi.org/10.1061/(asce0733-9372(1998)124:9(783)
- Kim, H., Lee, B. W., Baek, K. H., Jo, C., Kim, J., Lee, J. Y., Lee, Y., Kim, M. Y., Kim, M. H., & Lee, B. (2020). Quality characteristics of rice noodles treated with cold plasma. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 560-563. <https://doi.org/10.9721/kjfst.2020.52.5.560>
- Kim, J. E., Choi, H., Lee, D., & Min, S. C. (2017). Effects of processing parameters on the inactivation of *Bacillus cereus* spores on red pepper (*Capsicum annum* L.) flakes by microwave-combined cold plasma treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 263, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.014>
- Kim, J., Puligundla, P., & Mok, C. (2015). Microbial decontamination of dried laver using corona discharge plasma jet (CDPJ). *Journal of Food Engineering*, 161, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.03.034>
- Lee, K. H., Kim, H. J., Woo, K. S., Jo, C., Kim, J. K., Kim, S. H., Park, H. Y., Oh, S. K., & Kim, W. H. (2016). Evaluation of cold plasma treatments for improved microbial and physicochemical qualities of brown rice. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 73, 442-447. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.055>
- Lee, K. H., Woo, K. S., Yong, H. I., Jo, C., Lee, S. K., Lee, B. W., Oh, S., Lee, Y., Lee, B., & Kim, H. (2017). As-

- assessment of microbial safety and quality changes of brown and white cooked rice treated with atmospheric pressure plasma. *Food Science and Biotechnology*, 27(3), 661-667. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0297-6>
- Liao, X., Bai, Y., Muhammad, A. I., Liu, D., Hu, Y., & Ding, T. (2019). The application of plasma-activated water combined with mild heat for the decontamination of *Bacillus cereus* spores in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Journal of Physics D*, 53(6), 064003. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab573a>
- Liao, X., Muhammad, A., Liu, D., Hu, Y., & Ye, X. (2018a). Bacterial spore inactivation induced by cold plasma. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(16), 2562-2572. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1460797>
- Liao, X., Li, J., Muhammad, A. I., Suo, Y., Chen, S., Ye, X., Liu, D., & Ding, T. (2018b). Application of a dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma (DBD-ACP) for *Eshcherichia Coli* Inactivation in apple juice. *Journal of Food Science*, 83(2), 401-408. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14045>
- Messelh usser, U., Frenzel, E., Bl ochinger, C., Zucker, R., K ampf, P., & Ehling-Schulz, M. (2014). Emetic *Bacillus cereus* Are More Volatile Than Thought: Recent Foodborne Outbreaks and Prevalence Studies in Bavaria (2007–2013). *BioMed Research International*, 2014, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2014/465603>
- Misra, N., Schlüter, O., & Cullen, P. J. (2016a). Plasma in Food and Agriculture. En Elsevier eBooks (pp. 1-16). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801365-6.00001-9>
- Misra, N., Schlüter, O., & Cullen (2016b). Cold Plasma in Food and Agriculture. En Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/c2014-0-00009-3>
- Najm, I. (2006). An alternative interpretation of disinfection kinetics. *Journal American Water Works Association*, 98(10), 93-101. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2006.tb07781.x>
- Pankaj, S., Wan, Z., & Keener, K. M. (2018). Effects of Cold Plasma on Food Quality: A Review. *Foods*, 7(1), 4. <https://doi.org/10.3390/foods7010004>
- Patil, S., Moiseev, T., Misra, N., Cullen, P. J., Mosnier, J., Keener, K. M., & Bourke, P. (2014). Influence of high voltage atmospheric cold plasma process parameters and role of relative humidity on inactivation of *bacillus atrophaeus* spores inside a sealed package. *Journal of Hospital Infection*, 88(3), 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.08.009>
- Pina-Pérez, M., Martinet, D., Palacios-Gorba, C., Ellert, C., & Beyrer, M. (2020). Low-energy short-term cold atmospheric plasma: controlling the inactivation efficacy of bacterial spores in powders. *Food Research International*, 130, 108921. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108921>
- Rodrigo, D., Rosell, C. M., & Martinez, A. L. (2021). Risk of *Bacillus cereus* in Relation to Rice and Derivatives. *Foods*, 10(2), 302. <https://doi.org/10.3390/foods10020302>
- Rosenquist, H., Smidt, L., Andersen, S. R., Jensen, G., & Wilcks, A. (2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *Fems Microbiology Letters*, 250(1), 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.054>
- Sánchez, J., Correa, M. M., & Castafieda-Sandoval, L. M. (2016). *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2). <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12>
- Schoeni, J. L., & Wong, A. E. (2005). *Bacillus cereus* Food Poisoning and Its Toxins. *Journal of Food Protection*, 68(3), 636-648. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.3.636>
- Setlow, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*, 15(4), 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.004>
- Setlow, P., & Johnson, E. (2019). Spores and Their Significance. En ASM Press eBooks (pp. 23-63). <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch2>
- Smet, C., Noriega, E., Rosier, F., Walsh, J. L., Valdramidis, V. P., & Van Impe, J. (2016). Influence of food intrinsic factors on the inactivation efficacy of cold atmospheric plasma: Impact of osmotic stress, suboptimal pH and food structure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, 393-406. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.028>
- Arnesen, L. P. S., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 579-606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
- The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. (2022). *EFSA Journal*, 20(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- Verma, D. K., & Srivastav, P. P. (2017). Proximate Composition, Mineral Content and Fatty Acids Analyses of Aromatic and Non-Aromatic Indian Rice. *Rice Science*, 24(1), 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.05.005>
- Verma, D. K., & Srivastav, P. P. (2020). Bioactive compounds of rice (*Oryza sativa* L.): Review on paradigm and its potential benefit in human health. *Trends in Food Science and Technology*, 97, 355-365. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.007>
- Wang, X., Huang, Q., & Huang, R. (2023). Quantitative risk assessment of *Bacillus cereus* in wet rice noodles from raw material to marketing phase. *Heliyon*, 9(3), e14354. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14354>
- Woo, K. S., Yong, H. I., Jo, C., Lee, S. K., Lee, B. W., Lee, B., Lee, Y., Oh, S., & Kim, H. (2017). Changes in microbial and chemical properties of rough rice treated with cold plasma by storage temperatures and periods. *Han-guksikpumjeojang-yutonghakoeji*, 24(7), 908-914. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2017.24.7.908>

## ANEXOS

### ANEXO I

#### Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030.

##### Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

Objetivos de desarrollo sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				
ODS 12. Producción y consumo responsables.	X			
ODS 13. Acción por el clima.	X			
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

**ODS 3. Salud y Bienestar.** Garantizando que los alimentos que llegan a la cadena alimentaria presentan un valor nutricional óptimo y son microbiológicamente seguros.

**ODS 9. Industria, innovación e infraestructura.** Mediante el desarrollo de nuevas tecnologías y estrategias que permitan a la industria alimentaria reducir el uso de aditivos y realizar un uso más eficiente de los recursos.

**ODS 12. Producción y consumo responsable y ODS 13. Acción por el clima.** El empleo de nuevas estrategias de saneamiento concebidas como un método sostenible que minimice el uso de los recursos energéticos sin la necesidad de emplear otros métodos menos respetuosos con el medio ambiente como la esterilización o pasteurización. También por la necesidad de buscar alternativas a los tratamientos térmicos, los cuales son incompatibles en algunas ocasiones con el empleo de envases biodegradables o reutilizables.