



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

LOS ALIMENTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS Y SU ROL EN LA GENERACIÓN Y PROPAGACIÓN DE LAS RESISTENCIAS ANTIBIÓTICAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: María de los Ángeles Alcázar Contreras

TUTOR/A ACADEMICO: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Curso Académico:2019/2020

VALENCIA, 07 de julio de 2020

LOS ALIMENTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS Y SU ROL EN LA GENERACIÓN Y PROPAGACIÓN DE LAS RESISTENCIAS ANTIBIÓTICAS

María de los Ángeles Alcázar Contreras, Ana Isabel Jiménez Belenguer¹

RESUMEN

Las resistencias antibióticas son una de las mayores amenazas para la salud pública de nuestro tiempo. La comunidad científica coincide en que el principal factor de riesgo en la emergencia de microorganismos resistentes es la presión selectiva provocada por el uso masivo de los antibióticos en medicina humana y en producción animal. Pero no es el único. Cada vez son más las evidencias de que el sector alimentario contribuye de manera significativa al mantenimiento y a la diseminación de las resistencias a antibióticos y existe una preocupación creciente por la transmisión de patógenos resistentes a lo largo de la cadena alimentaria. El empleo de grandes cantidades de biocidas en la higiene y desinfección de las industrias, la lucha contra plagas y la conservación de alimentos y la exposición de los microorganismos que contaminan los alimentos a condiciones de estrés subletales durante su procesado y almacenamiento son algunos de los factores de riesgo en la emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos. En este sentido, preocupan especialmente los alimentos mínimamente procesados. Por un lado, al consumirse crudos o haber recibido únicamente tratamientos suaves encaminados a reducir en parte la carga microbiana y frenar el crecimiento de los microorganismos, pueden ser vehículo de bacterias, tanto comensales como patógenas, portadoras de genes de resistencia. Además, las bacterias que contaminan estos alimentos se ven expuestas a una combinación de condiciones ambientales estresantes y a tratamientos tecnológicos subletales que pueden desencadenar respuestas adaptativas y mecanismos de reparación que aumentan significativamente la probabilidad de adquirir resistencia a los antibióticos.

RESUM

Les resistències antibiòtiques són una de les majors amenaces per a la salut pública del nostre temps. La comunitat científica coincideix que el principal factor de risc en l'emergència de microorganismes resistents és la pressió selectiva provocada per l'ús massiu dels antibiòtics en medicina humana i en producció animal. Però no és l'únic. Cada vegada són més les evidències que el sector alimentari contribueix de manera significativa al manteniment i a la disseminació de les resistències a antibiòtics i existeix una preocupació creixent per la transmissió de patògens resistents al llarg de la cadena alimentària. L'ús de grans quantitats de biocides en la higiene i desinfecció de les indústries, la lluita contra plagues i la conservació d'aliments, i l'exposició dels microorganismes que contaminen els aliments a condicions d'estrès *subletales durant el seu processament i emmagatzematge són alguns dels factors de risc en l'emergència de bacteris

resistents als antibiòtics. En aquest sentit, preocupen especialment els aliments mínimament processats. D'una banda, en consumir-se crus o haver rebut únicament tractaments suaus encaminats a reduir en part la càrrega microbiana i frenar el creixement dels microorganismes, poden ser vehicle de bacteris, tant comensals com patògenes, portadores de gens de resistència. A més, els bacteris que contaminen aquests aliments es veuen exposades a una combinació de condicions ambientals estressants i a tractaments tecnològics *subletals que poden desencadenar respostes adaptatives i mecanismes de reparació que augmenten significativament la probabilitat d'adquirir resistència als antibiòtics.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is one of the biggest threats to public health of our time. Scientifics agree that the main driver responsible for the emergence of resistant microorganisms is the selective pressure exerted by the massive use of antibiotics in human medicine and livestock production. But it is not the only one. Increasing evidences support that the food industry contributes in a significant way to the maintenance and dissemination of antibiotic resistance and there is a serious growing concern about resistant pathogens being transmitted along the food chain. The application of huge quantities of biocides for the cleaning and disinfection of industries, pest control and food preservation, as well as the exposure of the microorganisms contaminating food to sublethal stress conditions during food processing and storage are considered risk factors for the emergence of antibiotic resistant bacteria. In this regard, minimally processed alimentary products are a source of concern. On the one hand, as they are eaten raw or after suffering mild preservation treatments aimed to reduce microbiological contamination to some extent or to prevent growing, these food products can act as vehicles for pathogens or commensal bacteria that harbor antibiotic resistance genes. In addition, bacteria on these food products are exposed to a combination of environmental stress and sublethal treatments which can induce adaptive responses and repair mechanisms that could significantly increase the odds of acquiring antibiotic resistance.

PALABRAS CLAVE: Resistencia antibiòtica, industria alimentaria, alimentos mínimamente procesados, tecnología de obstáculos, respuesta al estrés, patógenos de transmisión alimentaria, reservorio

INTRODUCCIÓN

Hace ya más de 80 años que comenzaron a usarse los primeros antibiòticos. Desde entonces la morbilidad y mortalidad de las enfermedades de origen bacteriano se ha reducido drásticamente y la esperanza de vida de las personas ha aumentado. La diseminación de las resistencias antibiòticas, y sobre todo la emergencia de patógenos multirresistentes, ponen en peligro la eficacia de estos medicamentos, considerados hasta ahora como la panacea de la medicina (Alanis, 2005).

La mayor parte de los mecanismos de resistencia a antibióticos que expresan las bacterias se remontan millones de años atrás y fueron seleccionados en ambientes donde los antibióticos estaban naturalmente presentes en concentraciones ínfimas, mucho antes de que el hombre los descubriese (Boerlin y White, 2013). Las mutaciones y el intercambio de material genético son la base de la evolución de las poblaciones bacterianas, a las que permiten generar una heterogeneidad suficiente para que una o varias de las líneas clonales resultantes sea capaz de adaptarse y sobrevivir en las condiciones impuestas por el medio (Alós, 2015). Al contrario de lo que se pensaba hasta hace unos años, estos cambios en el genoma bacteriano no suceden exclusivamente de forma aleatoria y son posteriormente seleccionados por el medio, sino que dicha inestabilidad genética se ve inducida por una gran diversidad de factores ambientales estresantes (Galhardo et al., 2007).

La presencia de antibióticos en el medio es en sí misma un factor de estrés para las bacterias que lo habitan y, por tanto, no solo selecciona aquellas bacterias que disponen de mecanismos para resistir su acción, sino que desencadena en las poblaciones expuestas mecanismos de variabilidad genética para adaptarse a la situación de estrés, acelerando así la aparición de bacterias resistentes (Foster, 2000). La comunidad científica coincide en que la amplia presencia de antibióticos en el medio, debido a su utilización masiva en medicina humana y su empleo en el tratamiento de animales destinados a la producción de alimentos o como promotores del crecimiento del ganado, es la causa principal del rápido incremento de la prevalencia de bacterias resistentes a los antibióticos (Campos y Baquero, 2002). Sin embargo, no debemos subestimar el efecto que otros factores de estrés pueden ejercer sobre la evolución de las bacterias y la adquisición de genes de resistencia antibiótica (Walsh y Fanning, 2008). Paralelamente al comienzo del uso de los antibióticos en la medicina, ha tenido lugar una revolución agrícola y en nuestra forma de producir alimentos, cuyo impacto sobre la variabilidad genética de las bacterias estamos comenzando a vislumbrar (McDowell, 2004). La interrelación entre el empleo de pesticidas y el desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos en el suelo (Rangasamy et al., 2018), y la interrelación entre las nuevas técnicas de procesado, mayoritariamente bacteriostáticas, que se emplean en la elaboración de los alimentos mínimamente procesados, y el desarrollo de resistencias antibióticas en las bacterias subletalmente dañadas (Verraes et al., 2013), son dos campos de investigación en los que merece la pena profundizar si queremos llevar a cabo medidas que limiten el desarrollo y diseminación de las resistencias antimicrobianas y la transmisión de patógenos resistentes a través de la cadena alimentaria (McDowell, 2004).

En este trabajo de revisión examinaremos los distintos factores implicados en la emergencia y diseminación de las resistencias antibióticas y profundizaremos en el papel de los alimentos mínimamente procesados como potenciales portadores de bacterias resistentes, bien debido a su contaminación en origen o a la adquisición de resistencia como resultado de los procesos a los que se someten para garantizar su estabilidad microbiológica.

LAS RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS

Origen y evolución

La resistencia a un antibiótico se define como la capacidad de un microorganismo de sobrevivir y multiplicarse en presencia de dicho antibiótico a dosis terapéuticas (Gómez J. et al., 2008). La resistencia a un antibiótico o grupo de antibióticos puede ser una cualidad intrínseca a un grupo taxonómico, como es el caso de *Mycoplasma spp.*, que al carecer de pared celular es resistente a la acción de los antibióticos beta-lactámicos, o puede ser una cualidad adquirida por bacterias que normalmente serían sensibles a dicho antibiótico (Daza Pérez R.M, 1998).

Las resistencias antibióticas son fruto de la evolución de las bacterias, cuya plasticidad genética y rápida replicación les permite adaptarse a una gran diversidad de agentes adversos, incluyendo la presencia de antibióticos en el medio. Gracias a esta plasticidad las bacterias sufren mutaciones aleatorias en su genoma y son capaces de intercambiar genes mediante mecanismos de transferencia horizontal con otras bacterias de su entorno (Munita y Arias, 2016). Cuando las mutaciones o el ADN foráneo dan lugar a variantes genéticas que no confieren ninguna ventaja adaptativa, estas se mantienen en una pequeña proporción dentro de la población bacteriana y tienden a desaparecer (Maiden, 1998). Por el contrario, cuando los genes adquiridos, ya sea por mutación o transferencia horizontal, resultan en un mecanismo bacteriano que impide la acción de un antibiótico presente en el medio, estas variantes genéticas son seleccionadas de forma natural para sobrevivir y proliferar, al tener una ventaja adaptativa sobre otras bacterias sensibles (Baquero et al., 2008). Además de actuar como agentes de selección, los antibióticos se comportan como factores de estrés ambiental para las bacterias, que incrementan la tasa de mutaciones y la transferencia horizontal de genes de resistencia como mecanismo de defensa (Foster, 2000).

Esta selección natural lleva ocurriendo desde mucho antes de que se descubriesen los antibióticos y comenzasen a usarse en la práctica clínica, ya que en su mayoría se trata de sustancias producidas durante el metabolismo de ciertos microorganismos y hongos naturalmente presentes en el medio (Munita y Arias, 2016). Sin embargo, desde la segunda mitad del siglo XX, la utilización masiva de los antibióticos, tanto en producción animal como medicina humana, ha incrementado la presencia de estas sustancias en el medio, acelerando la selección de las bacterias resistentes (Campos y Baquero, 2002).

El aumento en la prevalencia de bacterias multirresistentes (resistentes a varios antibióticos) se considera una de las mayores amenazas para la salud pública (Alanis, 2005). Se trata de un problema global, ajeno a fronteras, que se cobra la vida de más de 700000 personas al año (IACG, 2019), además de incrementar la morbilidad de las enfermedades y acarrear enormes costes económicos asociados a cuidados sanitarios, bajas laborales y pérdidas productivas (Alós, 2015). La previsión, si seguimos con la tendencia actual, es una crisis sanitaria y económica sin precedentes, que se cobrará más de 10

millones de vidas en 2050 y tendrá un coste económico acumulado de 100 trillones de dólares (O'Neill, 2014).

Las bacterias resistentes a los antibióticos suponen también una amenaza para la seguridad alimentaria, ya que pueden contaminar el agua y los alimentos y ocasionar graves enfermedades de transmisión alimentaria frente a las que no sean efectivas las terapias antibióticas (Mølbak, 2005) o, en caso de que se trate de bacterias comensales, contribuir a incrementar el *pool* de genes del que otros microorganismos patógenos adquieran determinantes de resistencia (Verraes et al., 2013). Además, la ineficacia de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades del ganado disminuye nuestra capacidad productiva y puede en un futuro cercano comprometer la disponibilidad de alimentos suficientes en un contexto de crecimiento global de la población y de incremento de la demanda de proteína animal (IACG, 2019).

Todavía existe una gran incertidumbre sobre los efectos secundarios que tendrá el avance de las resistencias antibióticas sobre nuestros sistemas de salud, que dependen fuertemente de los antibióticos, no solo para tratar enfermedades sino también como profilácticos, limitando el riesgo de infección en pacientes sometidos a quimioterapia o a procedimientos quirúrgicos. Para muchos, nos encontramos en el ocaso de la época dorada de la medicina (O'Neill, 2014) y lo que cabe preguntarse ahora es si seremos capaces de frenar este tsunami (The Parliament Magazine, 2017) y de recuperar la eficacia de los antibióticos.

Los datos no son halagüeños. Múltiples estudios señalan que cuando una resistencia está lo suficientemente extendida, y en este aspecto luchamos contra siglos de coevolución, la supresión del antibiótico no es suficiente para hacerla desaparecer (Aminov y Mackie, 2007). La causa de su perdurabilidad podría estar relacionada con diversos factores, como que los genes implicados en la resistencia a estos antibióticos conserven funciones necesarias para la supervivencia de la bacteria, con su asociación a otros determinantes genéticos muy eficientes (como genes de virulencia), con su localización en elementos genéticos móviles junto a otros genes de resistencia antibiótica que sí supongan una ventaja adaptativa para la bacteria (Alós, 2015) o con la existencia de otros factores de selección en el medio, distintos de los antibióticos (McDowell, 2004).

Mecanismos de resistencia

Las bacterias han desarrollado multitud de mecanismos para adaptarse y sobrevivir al ataque de los antibióticos (Munita y Arias, 2016). Algunos de estos mecanismos son altamente específicos, mientras que otros confieren a la bacteria la capacidad de resistir el ataque de diversos antimicrobianos y contaminantes (Poole, 2005) e incluso de sobrevivir a condiciones ambientales extremas (Beceiro et al., 2012). Normalmente no podemos hablar de bacterias totalmente sensibles o resistentes a un antibiótico, sino de microorganismos que expresan mayor o menor grado de resistencia dentro de un gradiente (American Academy of Microbiology, 2009). El grado de resistencia depende en ocasiones de la suma de varios mecanismos que involucran distintas rutas bioquímicas (Munita y Arias, 2016):

a) Modificación de la molécula de antibiótico: producción de enzimas que interactúan con la molécula de antibiótico, destruyéndola o adicionándole grupos funcionales, tales como adenilos o acetilos, que disminuyen su afinidad por el sitio blanco (Munita y Arias, 2016). Este es el mecanismo principal de resistencia que emplean las bacterias para inactivar antibióticos del grupo de los aminoglucósidos (Ramírez y Tolmasky, 2010) o para hidrolizar las moléculas de antibióticos beta-lactámicos (Tooke et al., 2019).

b) Reducción de la permeabilidad de las membranas celulares al antibiótico:

-Reducción de la permeabilidad de la membrana externa: este mecanismo de resistencia es especialmente importante en bacterias gram-negativas, donde la entrada de antibióticos hidrofílicos, como beta-lactámicos, tetraciclinas o fluoroquinolonas, a través de la membrana externa lipopolisacárida requiere de canales hidrofílicos o porinas (Opal y Pop-Vicas, 2014). Alteraciones en la síntesis de dichas porinas, reduciendo su número o cambiando el tipo de porinas, pasando por ejemplo a sintetizar canales hidrofílicos más pequeños, puede reducir la entrada de estos antibióticos y, por lo tanto, aumentar la resistencia de la bacteria (Munita y Arias, 2016).

-Reducción de la permeabilidad de la membrana interna: se ha descrito como uno de los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos en *E.coli*, *Salmonella spp.* y *S.aureus* (Opal y Pop-Vicas, 2014). Las moléculas de aminoglucósidos atraviesan la membrana citoplasmática mediante transporte activo, para lo que se requiere energía y una carga interna negativa (Bryan y Kwan, 1983). Alteraciones en el metabolismo celular o el gradiente de protones reducen el paso de las moléculas de aminoglucósido y aumentan la resistencia de las bacterias (Opal y Pop-Vicas, 2014).

c) Aumento de la salida del antibiótico: devolución del antibiótico al medio extracelular, reduciendo su concentración en el interior de la bacteria, mediante las llamadas bombas de eflujo (Munita y Arias, 2016). Estos sistemas de salida pueden ser inespecíficos, protegiendo a la bacteria frente a múltiples antibióticos y otros agentes biocidas, o específicos frente a un antibiótico concreto. Los sistemas de eflujo inespecíficos casi siempre están codificados por genes cromosómicos altamente conservados, mientras que los sistemas de eflujo específicos suelen estar codificados en elementos genéticos móviles. Estos mecanismos de resistencia han generado gran preocupación en los últimos años debido a su contribución a la emergencia de cepas multirresistentes (Poole, 2005).

d) Alteración del sitio blanco (lugar de unión del antibiótico): las bacterias han desarrollado diferentes estrategias para eludir la acción de los antibióticos actuando sobre el lugar de unión de estos, entre otras: la interposición de proteínas, normalmente codificadas por plásmidos, entre el antibiótico y su lugar de unión (Tran y Jacoby, 2002); la reducción de la afinidad del sitio blanco a través de mutaciones en los genes que lo codifican o adicionando al mismo grupos funcionales como metilos (Shangshang et al., 2014); la sustitución de la molécula que actúa como sitio blanco por otra de función equivalente o, en caso de que la unión del antibiótico inhiba una función del sitio blanco crucial para la bacteria, desarrollo de mecanismos alternativos a

la función inhibida o producción en exceso del sitio blanco, sobrepasando la capacidad de unión del antibiótico (Munita y Arias, 2016).

El nivel de resistencia de las bacterias no depende solo del arsenal de mecanismos de que disponen, sino también de la frecuencia con que se expresan (Depardieu et al., 2007). La expresión de muchos de estos mecanismos está regulada por pequeñas secuencias de ARN (sRNA) que se activan en respuesta a condiciones ambientales estresantes, como el calor, el frío, el pH, cambios en la homeostasis o en la estabilidad de las membranas o la propia presencia de antibióticos en el medio (Felden y Cattoira, 2018).

Adquisición de la resistencia a antibióticos

Las bacterias pueden adquirir resistencia a un antibiótico mediante dos estrategias fundamentales: la aparición de mutaciones en genes asociados con el mecanismo de acción del compuesto o la adquisición de genes que codifican mecanismos de resistencia frente a dicho compuesto procedentes de otras bacterias (Munita y Arias, 2016).

La frecuencia con la que se producen mutaciones y dan lugar a resistencia a antibióticos depende de la bacteria y del antibiótico (Alós, 2015). En las bacterias denominadas hipermutadoras, con mecanismos de reparación del ADN deficientes, las mutaciones se dan con mayor frecuencia y juegan un papel importante en la adquisición de resistencias antibióticas (Perron et al., 2010).

Aunque las mutaciones pueden ser el origen de importantes resistencias, sobre todo frente a antibióticos de síntesis, como las fluoroquinolonas, para los que no existe un reservorio natural de bacterias resistentes que puedan transferir su material genético a bacterias susceptibles (Baylay et al., 2019), en condiciones normales, y con la excepción de bacterias hipermutadoras, suceden a una frecuencia baja (una por cada billón de divisiones celulares). La transferencia horizontal de material genético, por otro lado, permite una rápida difusión de genes de resistencia ya formados entre bacterias del mismo o distinto grupo taxonómico (Aminov y Mackie, 2007). Este intercambio genético se da con frecuencia y sobre todo en ambientes con alta densidad de bacterias (Baquero et al., 2008).

Los genes de resistencia a antibióticos, localizados en elementos genéticos móviles, se transfieren entre bacterias mediante fenómenos de conjugación, transducción o transformación (Alekshun y Levy, 2007). La conjugación es el mecanismo de transferencia más habitual y requiere de un contacto estrecho entre la bacteria donante y receptora (Alanis, 2005). La transformación, por el contrario, no requiere de contacto, ya que la bacteria receptora adquiere un fragmento de ADN libre, que puede haber sido liberado al medio durante la lisis de la bacteria donante. Por último, la transducción, está mediada por bacteriófagos (virus que infectan bacterias), que pueden secuestrar fragmentos de ADN de la bacteria en el interior de la cápside durante su replicación y posteriormente inyectarlos junto a su propio material genético en el siguiente huésped (Opal y Pop-Vicas, 2014).

Los elementos genéticos móviles implicados en la transferencia horizontal de genes son los plásmidos R, los transposones y los integrones (Munita y Arias, 2016).

- Los plásmidos R son hebras dobles de ADN extracromosómico, normalmente circular, capaces de replicarse de forma autónoma, sin necesidad de integrarse en el cromosoma bacteriano (Alekhun y Levy, 2007). Pueden contener uno o más genes de resistencia y están ampliamente extendidos en las bacterias, lo que parece indicar que son los principales responsables de la propagación de los genes de resistencia a antibióticos y de la aparición de cepas multirresistentes (P. M. Bennett, 2008).

- Los transposones, o “genes saltarines”, son capaces de integrarse en el ADN de la bacteria receptora, moverse entre diferentes localizaciones del cromosoma y pasar del cromosoma a plásmidos y bacteriófagos (Errecalde, 2004). Los transposones pueden transferirse entre bacterias por conjugación, si se trata de transposones conjugativos, o formando parte de plásmidos y bacteriófagos. La posibilidad de portar varios genes de resistencia a antibióticos en una unidad transponible y de que varios transposones se transfieran juntos en el mismo plásmido favorecen la aparición de cepas multirresistentes (Opal y Pop-Vicas, 2014).

- Los integrones son regiones del genoma bacteriano que permiten la integración de genes adquiridos en el cromosoma bacteriano y promueven su expresión (Munita y Arias, 2016). El centro del integrón es una región variable, en la que se adicionan uno o varios genes adquiridos, llamados genes casetes, que pueden ser genes de resistencia a antibióticos. Los extremos son regiones invariables compuestas por un gen que codifica la enzima integrasa (necesaria para la integración y escisión de genes), un lugar de adhesión y un promotor que permite la expresión de los genes incorporados (Baylay et al., 2019). No son elementos genéticos móviles *per se*, pero pueden estar localizados en plásmidos o flanqueados por transposones, lo que permitiría su transferencia horizontal entre bacterias (Opal y Pop-Vicas, 2014).

Factores contribuyentes a la generación y diseminación de las resistencias a antibióticos

USO DE ANTIBIÓTICOS

El principal factor que ha determinado el incremento exponencial de las resistencias a antibióticos es la producción y consumo de antibióticos, tanto para el tratamiento de enfermedades humanas y animales, como para la promoción del crecimiento del ganado (Aminov y Mackie, 2007), que han dado lugar a la introducción y progresiva acumulación de los antibióticos en ambientes con alta densidad de bacterias, como el aparato intestinal de humanos y animales o las aguas residuales procedentes de hospitales o explotaciones ganaderas. Las bacterias seleccionadas en estos ambientes, a los que se denomina “reactores genéticos”, y los propios residuos antibióticos acaban llegando al suelo y a las aguas superficiales, donde continúa produciéndose el intercambio de material genético con bacterias ambientales y la selección de estirpes resistentes, contribuyendo así a crear reservorios de

una gran diversidad de genes de resistencia a antibióticos (Baquero et al., 2008). Las bacterias, tanto comensales como patógenas, que habitan el intestino de los animales de producción, así como las bacterias presentes en el suelo, el estiércol o en el agua con que regamos los cultivos pueden finalmente contaminar los alimentos y llegar al ser humano a través de la cadena alimentaria (Verraes et al., 2013).

USO DE AGENTES BIOCIDAS

El uso intensivo de los agentes biocidas a lo largo de la cadena de producción de alimentos y su descarga continua al suelo y a las aguas se considera otro de los factores clave en la diseminación de las resistencias a antibióticos (SCENIHR, 2009). Los biocidas están muy presentes en el ambiente (American Academy of Microbiology, 2009). A nivel de industria alimentaria, la preocupación creciente de los consumidores por la salubridad de los alimentos ha traído consigo un incremento sustancial del uso de biocidas para la limpieza y desinfección de las instalaciones (Walsh y Fanning, 2008). La agricultura moderna, por otro lado, ingresa en el medio más de 4 millones de toneladas de pesticidas anualmente con el propósito de luchar contra las plagas y maximizar la productividad de los cultivos, contribuyendo a la selección y diseminación de resistencias antibióticas entre las bacterias presentes en el suelo (Rangasamy et al., 2018). Aunque el modo de acción de los biocidas, a diferencia de los antibióticos, suele ser inespecífico, los mecanismos desarrollados por las bacterias para defenderse de ellos, entre los que se encuentra la formación de *biofilm* o la síntesis de bombas de eflujo inespecíficas, pueden conferir resistencia cruzada a múltiples antibióticos (Walsh y Fanning, 2008; Condell et al., 2012). Además, los genes que codifican la resistencia a pesticidas con frecuencia se localizan en los mismos plásmidos y transposones que los genes de resistencia a antibióticos, transfiriéndose de forma conjunta y favoreciendo la co-selección de cepas resistentes a diversos antibióticos (Rangasamy et al., 2018).

EXPOSICIÓN A CONDICIONES DE ESTRÉS

Existen evidencias científicas crecientes de que los ambientes estresantes incrementan la inestabilidad del genoma bacteriano, promoviendo las mutaciones aleatorias, la expresión o silenciamiento de determinados genes y la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles, acelerando así la adquisición de características beneficiosas para la supervivencia de las bacterias, como los mecanismos de resistencia a antibióticos (Galhardo et al., 2007). Durante el procesado de los alimentos se llevan a cabo una serie de tratamientos cuyo propósito es inhibir o retrasar el crecimiento de los microorganismos para prolongar la vida útil del producto y garantizar su seguridad (Gould, 2009). La exposición de los microorganismos a estas condiciones de estrés puede contribuir a la diseminación de las resistencias a antibióticos y, en los casos más extremos, a la entrada de patógenos multirresistentes en la cadena alimentaria (Verraes et al., 2013). Son objeto de especial preocupación en este sentido los alimentos mínimamente

procesados, ya que normalmente son sometidos a tratamientos suaves, que exponen a condiciones de estrés (osmótico, térmico o de otra clase) a las bacterias, sin llegar a destruir a la totalidad de la microbiota contaminante (Walsh y Fanning, 2008).

LOS ALIMENTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS

Origen

Los consumidores de hoy en día están cada vez más concienciados sobre la necesidad de mantener una dieta sana para prevenir enfermedades crónicas como la diabetes o el cáncer y buscan alimentos saludables, que mantengan su frescura y propiedades nutricionales. Por este motivo el consumo de frutas y verduras, ingredientes básicos de la dieta mediterránea, se ha incrementado en los últimos años (AECOSAN, 2012). Pero, además, tanto los consumidores como los establecimientos de restauración demandan productos que sean convenientes, con una vida útil larga y que no requieran invertir tiempo y esfuerzo en su preparación (Allende et al., 2006). Los alimentos mínimamente procesados surgen en respuesta a las exigencias de estos nichos de mercado (Rodrigo et al., 2010).

El concepto de alimento mínimamente procesado ha evolucionado en las últimas décadas y abarca actualmente una gran diversidad de productos que tienen en común el haber sido sometidos a técnicas de preservación diferentes de las altas temperaturas que se aplican a niveles subletales con el propósito de garantizar la seguridad del alimento a lo largo de su vida útil, al tiempo que se preservan sus cualidades sensoriales y nutricionales (Alzamora et al., 2015). Dentro de esta definición encontramos desde productos crudos, como la fruta cortada y las ensaladas de IV gama, hasta productos conservados mediante procesos tradicionales de ahumado, fermentación o desecado y productos tratados mediante nuevas tecnologías de inactivación, como la irradiación, la luz UV o las altas presiones (Snyder Jr., 2003).

Tecnología de obstáculos

En los alimentos mínimamente procesados se establece un balance entre el nivel de seguridad microbiológica y la calidad del producto deseado. Generalmente, los procesos más seguros, como la esterilización a altas temperaturas, tienen un impacto importante sobre el sabor, la textura y la retención de nutrientes (Heldman, 2013). La Industria alimentaria ha desarrollado todo un arsenal de procesos y sistemas de almacenamiento para equilibrar en lo posible esta balanza, optimizando las técnicas de preservación tradicionales (como el frío, la fermentación o el secado), innovando en sistemas de envasado activo y atmósferas modificadas que retrasan el crecimiento microbiano y poniendo a punto nuevas tecnologías de procesamiento dirigidas a inactivar los microorganismos y conseguir niveles de contaminación microbiológicos equiparables a la pasteurización (Mukhopadhyay y Gorris, 2014).

Todas estas tecnologías tienen sus ventajas y limitaciones, lo que hace que por sí solas difícilmente puedan satisfacer las expectativas de los consumidores respecto a los alimentos mínimamente procesados (Leistner, 2000). Esto ha conducido al redescubrimiento de un concepto antiguo, al que Leistner en 1978 denominó “tecnología de obstáculos”, también conocida en castellano como teoría de vallas (Capita González, 2013; Mukhopadhyay y Gorris, 2014).

La tecnología de obstáculos consiste en someter a los alimentos a una combinación de tratamientos de preservación aplicados a baja intensidad, de forma que conjuntamente permitan garantizar la seguridad del alimento, igualando la eficacia de tratamientos de alta intensidad pero reduciendo los efectos indeseados sobre la calidad (Mukhopadhyay y Gorris, 2014). Esta combinación de factores puede resultar en un efecto sinérgico cuando afectan a distintos mecanismos de homeostasis de los microorganismos, al dificultarse la reparación de los daños a nivel celular (Leistner, 2000).

Como se ha comentado, no se trata de un concepto nuevo. Desde hace siglos se han desarrollado de forma empírica tratamientos para preservar alimentos que combinan varias barreras u obstáculos al crecimiento microbiano (Mukhopadhyay y Gorris, 2014). Es el caso por ejemplo de los productos fermentados como el queso, donde se producen un descenso de la actividad de agua, una acidificación del medio y la colonización del mismo por bacterias lácticas que frenan el crecimiento de microorganismos patógenos, como por ejemplo *Listeria monocytogenes* (FAO/WHO, 2004).

Dependiendo del tipo, la combinación y la intensidad de los tratamientos aplicados a los alimentos podemos reducir significativamente la tasa de crecimiento de los microorganismos e incluso reducir en varias unidades logarítmicas la carga microbiana (Verraes et al., 2013). El principal inconveniente de estos procesos, aplicados a dosis bajas para evitar la degradación del producto, es que parte de la población microbiana presente en el alimento sobrevive y resulta estresada o dañada de forma subletal, pudiendo desarrollar una mayor resistencia al estrés (Capita González, 2013).

Papel de los alimentos mínimamente procesados en la propagación de resistencias antibióticas

Los alimentos mínimamente procesados reúnen una serie de características que los hacen especialmente susceptibles de favorecer la selección y propagación de resistencias antibióticas. Por un lado, al igual que sucede con los productos crudos, que no han recibido ningún tratamiento de esterilización, los alimentos mínimamente procesados presentan cierta carga microbiológica y pueden estar contaminados por bacterias resistentes (Verraes et al., 2013). Por otro lado, las bacterias presentes en alimentos mínimamente procesados que sobreviven a la aplicación de una o varias tecnologías a dosis subletales, pueden desarrollar mecanismos para reparar los daños sufridos e incrementar su resistencia a diversos factores de estrés, entre los que se incluye la exposición a antimicrobianos (McDowell, 2004).

En los apartados siguientes analizaremos en mayor detalle estos dos factores de riesgo en la generación y propagación de resistencias antibióticas en los alimentos mínimamente procesados.

Contaminación microbiológica de los alimentos mínimamente procesados

Dentro de los alimentos mínimamente procesados podemos distinguir alimentos de origen vegetal y alimentos de origen animal (Bansal et al., 2015). La contaminación con bacterias resistentes de los alimentos mínimamente procesados de origen vegetal, donde encontramos sobre todo frutas y verduras cortadas y envasadas para su consumo directo sin tratamiento térmico (Bansal et al., 2015), se produce principalmente durante la producción agrícola (Verraes et al., 2013). Durante esta primera etapa el cultivo entra en contacto con bacterias del suelo, que se consideran un importante reservorio de genes de resistencia (D'Costa et al., 2006), en parte debido al empleo de abundantes pesticidas (Rangasamy et al., 2018), así como con bacterias de origen fecal presentes en el estiércol utilizado como fertilizante (Marti et al., 2013) y bacterias presentes en el agua de riego (Baquero et al., 2008).

En cuanto a la contaminación de los alimentos mínimamente procesados de origen animal, el principal problema reside en el empleo de antibióticos en los animales vivos y la selección de bacterias resistentes a nivel intestinal. Durante el procesamiento de las canales en el matadero, la evisceración de los peces o la extracción de la leche, el alimento puede contaminarse con bacterias de origen fecal portadoras de genes de resistencia (CDC, 2020).

La contaminación con bacterias resistentes de los alimentos mínimamente procesados puede producirse también en fases posteriores, durante su procesamiento, almacenamiento, distribución y manipulación final por parte del consumidor (Capozzi et al., 2009). Procedimientos de limpieza y desinfección inadecuados, que no retiran el exceso de materia orgánica, emplean productos almacenados de manera incorrecta o no son eficaces en la eliminación de *biofilms*, pueden resultar en la exposición de las bacterias presentes en las superficies tratadas a concentraciones subletales de biocidas y, por tanto, aumentan considerablemente el riesgo de contaminación de los alimentos mínimamente procesados con bacterias que han desarrollado mecanismos de resistencia frente a diferentes antimicrobianos, incluyendo diversos antibióticos (Walsh y Fanning, 2008).

Desde el punto de vista de la propagación de las resistencias preocupa tanto la contaminación con bacterias patógenas, que suponen un riesgo directo para la salud de los consumidores, como la contaminación con bacterias comensales (Verraes et al., 2013).

Las bacterias comensales resistentes constituyen un riesgo indirecto para la salud pública, que no debe ser minusvalorado, y es que con frecuencia son portadoras de genes de resistencia que pueden transferir a otras bacterias potencialmente patógenas con las que cohabiten en el alimento durante las distintas fases del procesamiento o a bacterias patógenas presentes en el intestino, una vez ingeridas con el alimento (Verraes et al., 2013; Liu et al., 2016). Se sabe, por ejemplo, que *E.coli*, presente en muchos alimentos y uno

de los habitantes mayoritarios de la microbiota intestinal, puede portar genes productores de β -lactamasas de espectro extendido en elementos genéticos móviles transferibles (Thomson y Smith Moland, 2000).

Las bacterias responsables de enfermedades de transmisión alimentaria que son resistentes a uno o más antibióticos se asocian a un mayor riesgo de infecciones invasivas, mayor número de hospitalizaciones y mayor mortalidad (Mølbak, 2005). Esto se debe, en primer lugar, a la dificultad de encontrar tratamientos eficaces frente a estos microorganismos, pudiendo incluso dar una ventaja competitiva a estas bacterias al aplicar de forma empírica antibióticos frente a los que son resistentes (Verraes et al., 2013). Además, existen evidencias crecientes de que la resistencia a antibióticos se asocia en algunos casos a una mayor virulencia, probablemente debida a fenómenos de co-selección de genes de resistencia y de virulencia localizados en los mismos plásmidos (Boerlin y White, 2013) o a que la expresión de ciertos genes de virulencia y de resistencia en las bacterias dependa de las mismas regiones reguladoras del ADN (Fluit, 2005).

Los alimentos mínimamente procesados se ven fácilmente contaminados por patógenos de transmisión alimentaria a lo largo de su producción y procesado (Capozzi et al., 2009). A pesar de que los patógenos para el hombre generalmente están adaptados a vivir en el intestino de animales vertebrados, se ha observado que bacterias patógenas como *Salmonella* o *E.coli* O157:H7 son capaces de sobrevivir y proliferar con facilidad en vegetales (Shaw et al., 2008; Lynch et al., 2009). También se han identificado las ensaladas de frutas y verduras como uno de los principales vehículos de transmisión de *Campylobacter spp.* (Hussain et al., 2007). Dentro de los alimentos mínimamente procesados, las frutas, verduras y hortalizas se ven frecuentemente implicadas en brotes alimentarios por diversos motivos, entre los que cabe destacar: el aumento de su consumo a nivel mundial, la aplicación de tratamientos físicos como el pelado y troceado, que eliminan la protección de la cubierta vegetal y provocan la salida de nutrientes al exterior, facilitando el crecimiento microbiano, y la distancia cada vez mayor que recorren estos productos desde el lugar de producción al punto de distribución, aumentando la probabilidad de contaminación y proliferación de microorganismos patógenos (AECOSAN, 2012). *Salmonella spp.* es el patógeno responsable de la mayoría de brotes asociados a frutas y verduras. Cepas de *E.coli* O157:H7, tradicionalmente asociado a la carne de vacuno, y otros *E.coli* enterohemorrágicos, han ocasionado en las últimas décadas varios brotes importantes donde los alimentos implicados eran vegetales mínimamente procesados, como bolsas de hojas de espinaca, lechuga y semillas germinadas (Capozzi et al., 2009).

Tanto en productos vegetales como en productos animales listos para el consumo, incluyendo aquellos alimentos conservados mediante técnicas tradicionales como la fermentación, la adición de sal, el secado o el ahumado, un patógeno que encontramos con relativa frecuencia es *Listeria monocytogenes* (FAO/WHO, 2004; Capozzi et al., 2009). Su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración, que son el elemento más importante en la conservación de muchos alimentos mínimamente procesados (Mukhopadhyay y Gorris, 2014), su elevada osmotolerancia y la capacidad de

adaptarse y proliferar en condiciones ambientales adversas (pH ácido, alta concentración de sal, microaerofilia, altas concentraciones de CO₂, etc.)(Bucur et al., 2018), la convierten en uno de los peligros microbiológicos más importantes en este grupo de alimentos (Verraes et al., 2013).

Cualquier alimento puede contaminarse a lo largo de la cadena alimentaria con bacterias potencialmente portadoras de genes de resistencia, pero en los alimentos mínimamente procesados, a diferencia de los alimentos esterilizados a altas temperaturas, persiste una parte importante de la microbiota contaminante en el producto final (Mukhopadhyay y Gorris, 2014). Además, las bacterias sometidas a tratamientos subletales incrementan su resistencia a otros factores de estrés, fenómeno que se conoce como protección cruzada, disminuyendo la eficacia bactericida o bacteriostática de los sucesivos tratamientos que se apliquen al alimento como parte de la tecnología de obstáculos y aumentando la probabilidad de que las bacterias lleguen viables al consumidor final (Johnson, 2002). Esta protección cruzada se ha observado en numerosas experiencias con patógenos de transmisión alimentaria. *Listeria monocytogenes*, por ejemplo, demostró ser más resistente a las altas temperaturas tras exponerse a altas concentraciones de sal (Skandamis et al., 2008) y *E.coli* inoculado en lechuga cortada aumentó la expresión de genes de tolerancia a los ambientes ácidos, como el gástrico, al combinarse el efecto de un abuso térmico durante su almacenamiento (temperaturas iguales o superiores a 15°C) con el envasado en atmósfera modificada (Chua et al., 2008).

Tratamientos tecnológicos subletales en la preservación de alimentos mínimamente procesados

En la preservación de los alimentos mínimamente procesados se combinan varios tratamientos barrera (Mukhopadhyay y Gorris, 2014), cuyo propósito puede ser: impedir físicamente el acceso de los microorganismos (por ejemplo mediante un envase), generar un ambiente inadecuado para su crecimiento (por ejemplo mediante la refrigeración, las atmósferas modificadas o técnicas tradicionales de conservación de alimentos como el salado o el ahumado) o inactivarlos (por ejemplo mediante la descontaminación con biocidas o mediante tecnologías emergentes de inactivación sin calor como los pulsos de luz) (Alzamora et al., 2015).

Como ya se ha comentado, todas estas tecnologías tienen sus limitaciones y, aunque la combinación de varias de ellas puede tener un efecto sinérgico sobre la estabilidad microbiológica de los alimentos (Leistner, 2000), preocupa su capacidad para promover respuestas adaptativas en las bacterias supervivientes, sobre todo cuando se aplican a dosis bajas (Rajkovic et al., 2010). Estas respuestas adaptativas pueden producirse a nivel fenotípico o genotípico (McMahon, Xu, et al., 2007) y con frecuencia están mediadas por la activación del mecanismo de respuesta SOS (Poole, 2012).

A nivel fenotípico, la exposición a condiciones de estrés puede inducir cambios en la expresión genética, promoviendo la expresión de secuencias normalmente silenciadas y previniendo la expresión de otras (Felden y Cattoira, 2018). Algunos de los cambios fenotípicos en las bacterias

estresadas que pueden aumentar su resistencia a diversos factores de estrés (Lado y Yousef, 2002), incluyendo los antibióticos, son: la producción de proteínas de choque, que protegen estructuras vulnerables de la bacteria (McMahon, Xu, et al., 2007), el aumento en la expresión de bombas de eflujo de amplio espectro (Felden y Cattoira, 2018), o la detención del crecimiento, que a pesar de ser el objetivo perseguido por las tecnologías de preservación de alimentos, permite a las bacterias resistir la acción de aquellos antibióticos como los beta-lactámicos que solo actúan sobre células en crecimiento (Miller et al., 2004). A aquellas subpoblaciones de crecimiento más lento o prácticamente inexistente dentro de una población se les llama “persistentes” y se les ha atribuido la gran resistencia que presentan las bacterias sésiles de los *biofilms* a los antimicrobianos (Poole, 2012). Estos cambios a nivel fenotípico, que son tan importantes para la supervivencia de las poblaciones microbianas y que ponen en riesgo la eficacia de los tratamientos aplicados a los alimentos mínimamente procesados, no tienen, sin embargo, una gran importancia en la emergencia y diseminación de cepas resistentes a los antibióticos, ya que se trata de modificaciones temporales, que revierten una vez desaparece el factor estresante (McDowell, 2004).

Además de inducir cambios fenotípicos, las condiciones de estrés que concurren en el procesado de alimentos pueden aumentar la plasticidad genética de las bacterias y con ello la probabilidad de que adquieran determinantes de resistencia a antibióticos (Galhardo et al., 2007). En condiciones ambientales adversas se produce en las bacterias un incremento importante en la tasa de mutaciones, al tiempo que se suprimen los mecanismos de revisión y reparación del ADN, aumenta el número de copias de plásmidos (McMahon, Xu, et al., 2007), la tasa de transferencia horizontal de estos y otros elementos genéticos móviles (McMahon, Blair, et al., 2007) y la captación de genes y recombinación genética mediada por la activación de los integrones (Guerin et al., 2009). Estos cambios a nivel genético perduran una vez desaparecen las condiciones de estrés y contribuyen de manera significativa al desarrollo y la diseminación de las resistencias antibióticas en patógenos de transmisión alimentaria (McDowell, 2004).

El propósito de este trabajo no es hacer un análisis exhaustivo de los efectos de todos y cada uno de los tratamientos que se aplican a los alimentos mínimamente procesados sobre la susceptibilidad a los antibióticos de las bacterias, sino que nos centraremos en algunas de las tecnologías más habituales y analizaremos los posibles mecanismos de adquisición de resistencia desencadenados por estas a través de algunos estudios en la materia.

TÉCNICAS TRADICIONALES DE PRESERVACIÓN DE ALIMENTOS

La base de muchas de las tecnologías barrera que se emplean hoy en día en la conservación de los alimentos mínimamente procesados siguen siendo agentes de preservación tradicionales como el frío, el calor, el estrés osmótico, la reducción de la actividad de agua, la acidificación del medio o la competencia microbiana (Alzamora et al., 2015). La combinación de varios de estos factores de estrés ambiental, fuera de los rangos de crecimiento óptimo

de las bacterias presentes en el alimento, tiene el propósito de reducir o prevenir su crecimiento, prolongando la fase de latencia de los microorganismos (McMahon, Xu, et al., 2007). La industria alimentaria junto con la comunidad científica han conseguido optimizar estas técnicas de conservación tradicionales para proveer alimentos seguros, al tiempo que se mantiene su calidad sensorial y nutricional (Alzamora et al., 2015). El principal problema de estas técnicas, en su mayoría bacteriostáticas, reside en que la falta de crecimiento no implica ausencia de actividad metabólica y genética en las bacterias (Poole, 2012). Hemos asumido que el crecimiento exponencial es el estado natural de las bacterias cuando en realidad, la mayor parte del tiempo, existen en condiciones ambientales adversas, realizando cambios fenotípicos y genéticos para que todas o algunas de las líneas clonales fruto de esta divergencia adquiera las herramientas que les permitan crecer o sobrevivir mejor (McDowell, 2004).

La adquisición de resistencia a diversos antibióticos en patógenos de transmisión alimentaria expuestos a condiciones de estrés subletales habituales en los tratamientos de preservación tradicionales de los alimentos, se ha demostrado en numerosas ocasiones (Al-Nabulsi et al., 2011; Ganjian et al., 2012). En un estudio realizado con cepas de *E.coli*, *Salmonella enterica* y *S.aureus*, se observó que al exponerlas medios ácidos o altas concentraciones de sal su resistencia a varios antibióticos se multiplicaba por cuatro. Este incremento en la resistencia en *S.enterica* desaparecía al retirar el factor de estrés, indicando que se trataba de cambios fenotípicos transitorios, mientras que en *E.coli* y *S.aureus* se mantenía (McMahon, Xu, et al., 2007). En cuanto a los mecanismos subyacentes a este incremento en la resistencia, un estudio posterior del mismo grupo de investigación demostró que bajo las condiciones de estrés anteriormente mencionadas aumentaba la transferencia horizontal de plásmidos portadores de diversos genes de resistencia entre cepas de *E.coli* y entre *E.coli* y *Salmonella* Typhimurium (McMahon, Blair, et al., 2007).

APLICACIÓN DE PRODUCTOS ANTIMICROBIANOS

Estas sustancias se emplean sobre los alimentos mínimamente procesados, complementariamente a otras técnicas, para contribuir a la inactivación de los microorganismos presentes en el alimento o a controlar su crecimiento (Alzamora et al., 2015). Pueden utilizarse en la descontaminación superficial de productos frescos, tanto vegetales como animales; incorporarse al alimento como aditivos (Capita González, 2013) o formar parte del material del envase, permitiendo una liberación controlada y sostenida en el tiempo del antimicrobiano hacia la superficie del alimento (Quintavalla y Vicini, 2002). Estos agentes antimicrobianos, sobre todo cuando se aplican a dosis sub-inhedoras, incrementan el riesgo de expresión y diseminación de resistencias antibióticas (SCENIHR, 2009) a través de los siguientes mecanismos: la selección de bacterias que expresan mecanismos de resistencia a biocidas, tales como bombas de eflujo o cambios en la permeabilidad de la membrana celular, que también confieren resistencia a algunos antibióticos (Potenski et al., 2003; Tkachenko et al., 2007); el aumento de la tasa de mutagénesis,

el intercambio genético y la activación de integrones en respuesta al estrés que sufren las bacterias en presencia de biocidas (Guerin et al., 2009; Wales y Davies, 2015); la co-selección de genes de resistencia a antibióticos por encontrarse físicamente ligados a genes de resistencia a biocidas en los mismos elementos genéticos móviles y transferirse y expresarse conjuntamente (Sidhu et al., 2002) y la selección de bacterias naturalmente resistentes a determinados biocidas y antibióticos por sus características estructurales (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Numerosos estudios han puesto de manifiesto el efecto de los antimicrobianos de uso alimentario sobre la resistencia *in vitro* de las bacterias a los antibióticos. Un estudio realizado con *E.coli* demostró que su exposición a concentraciones subinhibitorias de fosfato trisódico, un biocida de uso habitual en la descontaminación superficial de carnes y vegetales, y nitrito sódico, utilizado como aditivo alimentario para controlar el crecimiento microbiano, disminuyó significativamente la susceptibilidad *in vitro* a varios antibióticos aminoglucósidos, cefalosporinas y quinolonas (Capita et al., 2014). Un estudio similar realizado con *Salmonella entérica* demostró que una sola exposición a concentraciones sub-inhibitorias de nitrito sódico y otros aditivos alimentarios como el benzoato o el ácido acético aumentaban la resistencia de esta bacteria a múltiples antibióticos del grupo de las tetraciclinas y las quinolonas (Potenski et al., 2003). Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para la seguridad alimentaria y enfatizan la necesidad de monitorizar que los agentes antimicrobianos se utilicen en concentraciones adecuadas para inactivar los microorganismos patógenos y evitar la selección de cepas resistentes a antibióticos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Esta preocupación se hace extensible al empleo de antimicrobianos como la nisina o las lisozimas en los envases de los alimentos mínimamente procesados. Si bien los envases liberadores de antimicrobianos han demostrado tener efectos muy positivos en el control del crecimiento microbiano en diversos productos (Kim et al., 2002; Duan et al., 2007), cabe la posibilidad de que estos antimicrobianos actúen también como agentes de selección de bacterias resistentes al interaccionar con el alimento (Quintavalla y Vicini, 2002). Los envases liberadores de antimicrobianos incorporan un factor de incertidumbre importante con respecto al uso de antimicrobianos directamente sobre el alimento y es la dificultad de predecir, en las condiciones reales de almacenamiento y transporte y para el alimento en cuestión, la concentración de antimicrobiano presente en el producto a lo largo de toda su vida comercial, pudiendo encontrarse en determinados momentos a concentraciones sub-inhibitorias (Han, 2003).

ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA

El envasado en atmósferas modificadas es, junto con la refrigeración, una de las tecnologías de preservación más empleadas en los alimentos mínimamente procesados (Mukhopadhyay y Gorris, 2014), donde, además de servir al propósito de inhibir el crecimiento microbiano mediante concentraciones elevadas de CO₂ y baja disponibilidad de oxígeno, permite disminuir la tasa respiratoria de los productos vegetales y retrasar la

senescencia (Rico et al., 2007). El CO₂ inhibe el crecimiento de los microorganismos a través de cuatro mecanismos: inactivación de enzimas implicadas en el metabolismo celular, represión de carboxilasas y descarboxilasas, alteración de la membrana celular y acidificación del pH intracelular (Dixon y Kell, 1989). El grado de inhibición depende de la concentración de CO₂ en la atmósfera de envasado, de la sensibilidad del microorganismo en cuestión, del tipo de alimento y de su aplicación conjunta con otras tecnologías barrera (Capozzi et al., 2009).

La exposición a CO₂, al igual que otros factores de estrés ambiental aplicados a dosis subletales, puede inducir cambios fenotípicos y genotípicos en las bacterias, contribuyendo a la emergencia y diseminación de las resistencias antibióticas (McDowell, 2004). Un estudio reciente demostró que la exposición a altas concentraciones de CO₂ inducía en *E.coli* la activación de la respuesta SOS y aumentaba la transferencia horizontal mediante transformación de un plásmido portador de genes de resistencia a ampicilina. Este incremento en la transformación se debería a un aumento en los canales disponibles para la captación de ADN libre del medio debido a los daños ocasionados por el CO₂ en la membrana celular (Liao, Chen, et al., 2019). Otro estudio reveló que la exposición a altas concentraciones de CO₂ aumentaba la transferencia horizontal de genes de resistencia entre bacterias mediante conjugación plasmídica al facilitar el contacto estrecho entre células por un aumento de la hidrofobicidad y un descenso de la carga de la membrana celular (Liao, Huang, et al., 2019). A pesar de estas experiencias *in vitro*, aún no se dispone de datos concluyentes sobre el papel de las atmósferas modificadas en la transferencia de genes de resistencia en los alimentos. En un estudio reciente con *Listeria monocytogenes* cultivada sobre jamón cocido se observó que el ratio de transferencia plasmídica entre bacterias era superior en una atmósfera modificada con 50-100% de CO₂ que en presencia de aire, si bien la diferencia no resultó estadísticamente significativa (Van Meerven et al., 2015).

NUEVAS TECNOLOGÍAS DE INACTIVACIÓN NO TÉRMICAS

Las tecnologías tradicionales de preservación de alimentos, anteriormente comentadas, tienen la ventaja de contar con años de perfeccionamiento que hacen que su funcionamiento esté bien establecido, sean económicamente rentables y nos garanticen un nivel de seguridad microbiológica satisfactorio (Rodrigo et al., 2010). Sin embargo, y a pesar de no emplear altas temperaturas que alteren sustancialmente la calidad del producto, sí modifican el sabor, la textura y otras características propias de los productos frescos (Niakousari et al., 2018). En este contexto emergen nuevas tecnologías de procesado cuyo objetivo es garantizar la seguridad microbiológica pero manteniendo en gran medida las propiedades del producto fresco (Rodrigo et al., 2010).

Estas tecnologías emergentes en el procesado mínimo de alimentos son: la irradiación, las altas presiones hidrostáticas, los campos eléctricos pulsados, la luz UV, la luz blanca pulsada, las microondas, los campos magnéticos oscilantes y los ultrasonidos de alta intensidad. Todas estas

tecnologías han probado tener buenos resultados en la inactivación de microorganismos y enzimas (Allende et al., 2006; Bansal et al., 2015). Destacan, por la gran cantidad de estudios científicos publicados y las posibles aplicaciones industriales, las altas presiones hidrostáticas y los campos eléctricos pulsados (Rodrigo et al., 2010).

Los mecanismos de inactivación bacteriana de las diferentes tecnologías no se conocen completamente (Rajkovic et al., 2010). En el caso de las altas presiones, cuyo uso se ha extendido en la descontaminación de productos listos para el consumo, como embutidos loncheados, productos vegetales y mariscos, parece estar relacionado con la alteración de la membrana celular, que resultaría en cambios en la permeabilidad y el intercambio iónico, y la inactivación de enzimas vitales para la supervivencia y replicación celular (Rodrigo et al., 2010). En cuanto a los campos eléctricos pulsados, su mecanismo principal de inactivación parece ser también la distorsión de la membrana celular, con formación de poros, alteración de la permeabilidad y eventual rotura (Rajkovic et al., 2010). La luz ultravioleta, los pulsos de luz o la radiación gamma, que han demostrado reducir significativamente la carga microbiana de frutas y vegetales mínimamente procesados sin afectar a su calidad sensorial cuando se aplican a dosis bajas, ejercen sobre las bacterias un efecto fotoquímico, provocando daños directos e indirectos sobre el ADN, desnaturalización de las proteínas y alteración de estructuras celulares (Allende et al., 2006).

Si bien las nuevas tecnologías de procesado tienen grandes ventajas desde el punto de vista nutricional y organoléptico, no están exentas de riesgos para la seguridad alimentaria, que derivan del amplio rango en que se mueve la respuesta individual de las bacterias a los tratamientos (Rodrigo et al., 2010). Mientras que muchas de las bacterias mueren, otras bacterias sobreviven y una proporción de las que sobreviven resultan dañadas de forma subletal (Davidson y Harrison, 2002). Estas últimas pueden pasar desapercibidas en los análisis microbiológicos que se realizan durante la producción del alimento, al ser incapaces de crecer en los medios de cultivo empleados para su detección, y posteriormente reactivar su crecimiento gracias a mecanismos de reparación celular (Wesche et al., 2009). Estos microorganismos, a los que se denomina microorganismos viables no cultivables, requieren de técnicas moleculares para su detección (Li et al., 2014).

Los daños a nivel del ADN y la detención del crecimiento en las bacterias dañadas subletalmente inducen la activación del mecanismo de respuesta SOS, cuyo detonante es la presencia de ADN monocatenario (van der Veen y Abee, 2011). El mecanismo de respuesta SOS, además de ser clave en la reparación del ADN, permite a las bacterias adaptarse a factores de estrés ambiental a través de la reorganización y regulación de la expresión génica, el aumento de la mutagénesis y del intercambio horizontal de elementos genéticos móviles, que pueden portar varios genes de resistencia (Baharoglu y Mazel, 2014). Además de promover la emergencia de bacterias resistentes a múltiples factores adversos, incluyendo los antibióticos, el mecanismo de respuesta SOS se ha asociado a un incremento de la virulencia, puesto que regula la expresión de determinados genes de virulencia (Kimsey y Waldor,

2009) y puede favorecer la transferencia horizontal de aquellos genes de virulencia localizados en elementos genéticos móviles (Úbeda et al., 2005).

Por otro lado, los daños a nivel de la membrana celular, que resultan de la aplicación de algunas de estas tecnologías de procesado (Rajkovic et al., 2010), pueden favorecer la transferencia horizontal de genes mediante transformación, al aumentar la capacidad de las bacterias para captar ADN libre del medio (Rodrigo et al., 2010). Así se observó, por ejemplo, en una experiencia con células de *E.coli*, que tras la aplicación de un campo eléctrico pulsado, adquirieron mediante transformación un plásmido con genes de resistencia a ampicilina (Rivas et al., 2013).

CONCLUSIONES

El rápido incremento de la prevalencia de bacterias resistentes a los antibióticos, y sobre todo de bacterias multirresistentes, es una amenaza a la salud pública de escala global. La cadena alimentaria desempeña un papel importante en la selección y diseminación de las resistencias antibióticas. Se sabe desde hace décadas que el empleo de antibióticos en el tratamiento de las enfermedades del ganado y como promotores del crecimiento ha acelerado la selección de bacterias resistentes a estos y facilitado su transmisión al ser humano a través del consumo de alimentos contaminados. Más recientemente, la comunidad científica ha comenzado a alertar del riesgo de selección de bacterias resistentes asociado a la utilización en la producción de alimentos de grandes cantidades de biocidas, capaces de inducir resistencia a otros antimicrobianos, y al creciente empleo de técnicas de procesado más suaves, normalmente bacteriostáticas, en respuesta a la demanda de los consumidores de alimentos sanos, convenientes y con una calidad equiparable al producto fresco.

Los alimentos mínimamente procesados pueden ser portadores de bacterias resistentes a los antibióticos con capacidad de producir enfermedad en el consumidor o de transferir determinantes de resistencia a patógenos que habitan en nuestro intestino. Al examinar el impacto de las tecnologías de procesado que se emplean en estos alimentos sobre la actividad metabólica y genética de las bacterias resulta evidente que, si bien estas técnicas consiguen reducir y mantener la carga microbiana presente en el alimento a niveles satisfactorios, también contribuyen a crear un ambiente idóneo para el desarrollo y diseminación de las resistencias antibióticas.

Si queremos seguir disponiendo de antibióticos eficaces en un futuro, es imperativo que tomemos medidas para evitar la propagación de las resistencias antibióticas. El uso de los antibióticos ya está cambiando de forma radical y cada vez son más los países que prohíben su administración al ganado como promotores de crecimiento. Se hace necesario implementar cambios igualmente radicales en la forma de procesar y conservar los alimentos, de forma que no solo se garantice su estabilidad microbiológica y la ausencia de patógenos, sino que también se prevenga la selección y propagación de las resistencias antibióticas y la transmisión de bacterias resistentes a través de la cadena alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

- AECOSAN. 2012. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos/productores de toxinas Shiga/enterohemorrágicos (VTEC/STEC/EHEC). *Revista del Comité Científico* nº16, 71-100.
- Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., Elabedeen, N. A. Z., Jaradat, Z. W., Shaker, R. R., Kheirallah, K. A., Tarazi, Y. H., & Holley, R. A. 2011. Impact of environmental stress desiccation, acidity, alkalinity, heat or cold on antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii*. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 137-143.
- Alanis, A. J. 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research*, 36(6), 697-705.
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050.
- Allende, A., Tomás-Barberán, F. A., & Gil, M. I. 2006. Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17(9), 513-519.
- Alós, J. I. 2015. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699.
- Alzamora, S. M., López-Malo, A., Tapia, M. S., & Welti-Chanes, J. 2015. Minimally Processed Foods. En: B. Caballero, P. Finglas, & F. Toldra (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford, 767-771.
- American Academy of Microbiology. 2009. Antibiotic Resistance : An Ecological Perspective on an Old Problem. Colloquium held in the Fondation Mérieux Conference Center in Annecy, France, 12 to 14 October 2008.
- Aminov, R. I., & Mackie, R. I. 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 271(2), 147-161.
- Baharoglu, Z., & Mazel, D. 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(6), 1126-1145.
- Bansal, V., Siddiqui, M. W., & Rahman, M. S. 2015. Minimally processed foods: Overview. En: M. Siddiqui & M. Rahman (Eds.), *Technologies for Safety, quality and Convenience*. Food Engineering Series. Springer International Publishing, Cham, 1-15.
- Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260-265.
- Baylay, A. J., Piddock, L. J. V., & Webber, M. A. 2019. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance – Part I. En: B. B. Bonev & N. M. Brown (Eds.), *Bacterial Resistance to Antibiotics – From Molecules to Man*. John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, 1-26.
- Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. 2012. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), 492-499.
- Bennett, P. M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153(SUPPL. 1).
- Boerlin, P., & White, D. G. 2013. Antimicrobial Resistance and its Epidemiology. En: S. Giguère, J. F. Prescott, & P. M. Dowling (Eds.), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5ª ed.). John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 21-40.
- Bryan, L. E., & Kwan, S. 1983. Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23(6), 835-845.
- Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U., & Nicolau, A. I. 2018. Resistance of *Listeria monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food and food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV).
- Campos, J., & Baquero, F. 2002. Resistencia a antibióticos: ¿qué hacer ahora? *Medicina Clínica*, 119(17), 656-658.
- Capita González, R. 2013. Papel de la Industria Alimentaria en el control de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Discurso leído en el solemne acto de recepción pública como Académica Correspondiente de la Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León.
- Capita, R., & Alonso-Calleja, C. 2013. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(1), 11-48.

- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., & Alonso-Calleja, C. 2014. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1268-1280.
- Capozzi, V., Fiocco, D., Amodio, M. L., Gallone, A., & Spano, G. 2009. Bacterial stressors in minimally processed food. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(7), 3076-3105.
- CDC. 2020. Antibiotic Resistance, Food, and Food-Producing Animals, [en línea]. Dirección URL: <<https://www.cdc.gov/features/antibiotic-resistance-food/index.html>>. [Consulta: 25 Jun. 2020]
- Chua, D., Goh, K., Saftner, R. A., & Bhagwat, A. A. 2008. Fresh-cut lettuce in modified atmosphere packages stored at improper temperatures supports enterohemorrhagic *E. coli* isolates to survive gastric acid challenge. *Journal of Food Science*, 73(3).
- Condell, O., Iversen, C., Cooney, S., Power, K. A., Walsh, C., Burgess, C., & Fanning, S. 2012. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3087-3097.
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., & Wright, G. D. 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311(5759), 374-377.
- Davidson, P. M., & Harrison, M. A. 2002. Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. *Food Technology*, 56(11), 69-78.
- Daza Pérez R.M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22(3), 57-67.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E., & Courvalin, P. 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1),
- Dixon, N. M., & Kell, D. B. 1989. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 67(2), 109-136.
- Duan, J., Park, S. I., Daeschel, M. A., & Zhao, Y. 2007. Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, 72(9).
- Errecalde, J. . 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. *FAO Producción y Sanidad Animal*, 162.
- FAO/WHO. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods : technical report.
- Felden, B., & Cattoira, V. 2018. Bacterial Adaptation to Antibiotics through Regulatory RNAs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(5).
- Fluit, A. C. 2005. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43(1), 1-11.
- Foster, P. L. 2000. Adaptive mutation: implications for evolution. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(12), 1067-1074.
- Galhardo, R. S., Hastings, P. J., & Rosenberg, S. M. 2007. Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(5), 399-435.
- Ganjan, H., Nikokar, I., Tieshayar, A., Mostafaei, A., Amirmozafari, N., & Kiani, S. 2012. Effects of salt stress on the antimicrobial drug resistance and protein profile of *staphylococcus aureus*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5(1), 328-331.
- Gómez J., García Vázquez E., & Ruiz Gómez J. 2008. Significación clínica de las resistencias bacterianas: una perspectiva histórica (1982-2007). *Rev Esp Quimioter*, 21(2), 115-122.
- Gould, G. 2009. Basis of food preservation, safety and the extension of shelf life. En: C. de W. Blackburn & P. J. McClure (Eds.), *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control*. Woodhead Publishing Limited & CRC Press LLC., Boca Ratón, 548-549
- Guerin, É., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Re, S. Da, Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M. C., & Mazel, D. 2009. The SOS response controls integron recombination. *Science*, 324(5930), 1034.
- Han, J. H. 2003. Antimicrobial food packaging. En: R. Ahvenainen (Ed.), *Novel Food Packaging Techniques*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 50-70.
- Heldman, D. R. 2013. Food Preservation Process Design . En: S. Yanniotis, P. Taoukis, N. G.

- Stoforos, & V. T. Karathanos (Eds.), *Advances in Food Process Engineering Research and Applications*. Springer, New York, 489-498
- Hussain, I., Shahid Mahmood, M., Akhtar, M., & Khan, A. 2007. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. *Food Microbiology*, 24(3), 219-222.
- IACG. 2019. No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections. Report to the Secretary-General of the United Nations.
- Johnson, E. A. 2002. Microbial Adaptation and Survival in Foods. En: A. E. Yousef & V. K. Juneja (Eds.), *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. CRC PRESS, Boca Ratón, 75-105.
- Kim, Y.-M., Paik, H.-D., & Lee, D.-S. 2002. Shelf-life characteristics of fresh oysters and ground beef as affected by bacteriocin-coated plastic packaging film. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(9), 998-1002.
- Kimsey, H. H., & Waldor, M. K. 2009. *Vibrio cholerae* LexA coordinates CTX prophage gene expression. *Journal of Bacteriology*, 191(22), 6788-6795.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. 2002. Alternative food-preservation technologies: Efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4(4), 433-440.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 181-186.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN), 1-1.
- Liao, J., Chen, Y., & Huang, H. 2019. Effects of CO₂ on the transformation of antibiotic resistance genes via increasing cell membrane channels. *Environmental Pollution*, 254(Pt B).
- Liao, J., Huang, H., & Chen, Y. 2019. CO₂ promotes the conjugative transfer of multiresistance genes by facilitating cellular contact and plasmid transfer. *Environment International*, 129, 333-342.
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161-168.
- Lynch, M. F., Tauxe, R. V., & Hedberg, C. W. 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: Risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*, 137(3), 307-315.
- Maiden, M. C. 1998. Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 27(Suppl 1), S12-20.
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y. C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., & Topp, E. 2013. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5701-5709.
- McDowell, D. A. 2004. Food processing stresses in the spread of antibiotic resistance. En: F. J. M. Smulders & J. D. Collins (Eds.), *Safety assurance during food processing (Vol. 2)*, pp. 243-265). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 243-265.
- McMahon, M. A. S., Blair, I. S., Moore, J. E., & Mc Dowell, D. A. 2007. The rate of horizontal transmission of antibiotic resistance plasmids is increased in food preservation-stressed bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1883-1888.
- McMahon, M. A. S., Xu, J., Moore, J. E., Blair, I. S., & McDowell, D. A. 2007. Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 211-217.
- Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., & Cohen, S. N. 2004. SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305(5690), 1629-1631.
- Mølbak, K. 2005. Human Health Consequences of Antimicrobial Drug-Resistant *Salmonella* and Other Foodborne Pathogens. *Clin. Infect. Dis.*, 41, 1613-1620.
- Mukhopadhyay, S., & Gorris, L. G. M. 2014. Hurdle Technology. En: C. A. Batt & M. Lou

- Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed.). Academic Press, London, 221-227.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Niakousari, M., Gahrue, H. H., Razmjooei, M., Roohinejad, S., & Greiner, R. 2018. Effects of Innovative Processing Technologies on Microbial Targets Based on Food Categories: Comparing Traditional and Emerging Technologies for Food Preservation. En: F. J. Barba, A. S. Sant'Ana, V. Orlien, & M. Koubaa (Eds.), *Innovative Technologies for Food Preservation: Inactivation of Spoilage and Pathogenic Microorganisms*. Elsevier Inc., London, 133-186
- O'Neill, J. 2014. Review on Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations*.
- Opal, S. M., & Pop-Vicas, A. 2014. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. En: J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (8.^a ed.). Elsevier Saunders, Philadelphia, 235-251.
- Perron, G. G., Hall, A. R., & Buckling, A. 2010. Hypermutability and compensatory adaptation in antibiotic-resistant bacteria. *American Naturalist*, 176(3), 303-311.
- Poole, K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 20-51.
- Poole, K. 2012. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(9), 2069-2089.
- Potenski, C. J., Gandhi, M., & Matthews, K. R. 2003. Exposure of *Salmonella* Enteritidis to chlorine or food preservatives increases susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 220(2), 181-186.
- Quintavalla, S., & Vicini, L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62(3), 373-380.
- Rajkovic, A., Smigic, N., & Devlieghere, F. 2010. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 141(SUPPL.1), 29-42.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151-171.
- Rangasamy, K., Samykannu, G., Athiappan, M., Devarajan, N., Parray, J. A., Aruljothi, K. N., Shameem, N., Alqarawi, A. A., Hashem, A., & Abd_Allah, F. 2018. Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora. *Micorbial Pathogens*, 114, 304-310.
- Rico, D., Martín-Diana, A. B., Barat, J. M., & Barry-Ryan, C. 2007. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 18(7), 373-386.
- Rivas, A., Pina-Pérez, M. C., Rodríguez-Vargas, S., Zuñiga, M., Martínez, A., & Rodrigo, D. 2013. Sublethally damaged cells of *Escherichia coli* by Pulsed Electric Fields: The chance of transformation and proteomic assays. *Food Research International*, 54(1), 1120-1127.
- Rodrigo, D., Sampedro, F., Silva, A., Palop, A., & Martínez, A. 2010. New food processing technologies as a paradigm of safety and quality. *British Food Journal*, 112(5), 467-475.
- SCENIHR. 2009. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 19 January 2009.
- Shangshang, Q., Yang, W., Qijing, Z., Maojun, Z., Fengru, D., Zhangqi, S., Congming, W., Shaolin, W., Jianzhong, Z., & Jianzhong, S. 2014. Report of ribosomal RNA methylase gene *erm(B)* in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(4), 964-968.
- Shaw, R. K., Berger, C. N., Feys, B., Knutton, S., Pallen, M. J., & Frankel, G. 2008. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits EspA filaments for attachment to salad leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2908-2914.
- Sidhu, M. S., Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K., & Holck, A. 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 2797-2803.
- Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology*, 25(2), 294-303.

- Snyder Jr., O. P. (2003). HACCP and Regulations Applied to Minimally Processed Foods. En: J. S. Novak, G. M. Sapers, & V. K. Juneja (Eds.), *Microbial Safety of Minimally Processed Foods*. CRC Press LLC, Boca Ratón, 127-151.
- The Parliament Magazine. 2017. Antibiotic resistance: A silent tsunami, [en línea]. Dirección URL: <<https://www.theparliamentmagazine.eu/articles/news/antibiotic-resistance-silent-tsunami>>. [Consulta: 15 Jun. 2020]
- Thomson, K. S., & Smith Moland, E. 2000. Version 2000: The new β -lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes and Infection*, 2(10), 1225-1235.
- Tkachenko, O., Shepard, J., Aris, V. M., Joy, A., Bello, A., Londono, I., Marku, J., Soteropoulos, P., & Peteroy-Kelly, M. A. 2007. A triclosan-ciprofloxacin cross-resistant mutant strain of *Staphylococcus aureus* displays an alteration in the expression of several cell membrane structural and functional genes. *Research in Microbiology*, 158(8-9), 651-658.
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. 2019. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472-3500.
- Tran, J. H., & Jacoby, G. A. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8), 5638-5642.
- Úbeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, Í., Novick, R. P., & Penadés, J. R. 2005. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Molecular Microbiology*, 56(3), 836-844.
- van der Veen, S., & Abee, T. 2011. Bacterial SOS response: A food safety perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 136-142.
- Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Van Weyenberg, S., Boon, N., Herman, L., & Devlieghere, F. 2015. Low temperature and modified atmosphere: Hurdles for antibiotic resistance transfer? *Journal of Food Protection*, 78(12), 2191-2199.
- Verraes, C., Van Boxstael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M. A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., & Herman, L. 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(7), 2643-2669.
- Wales, A. D., & Davies, R. H. 2015. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, 4(4), 567-604.
- Walsh, C., & Fanning, S. 2008. Antimicrobial Resistance in Foodborne Pathogens - A Cause for Concern? *Current Drug Targets*, 9(9), 808-815.
- Wesche, A. M., Gurtler, J. B., Marks, B. P., & Ryser, E. T. 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 72(5), 1121-1138.