



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

**Detección de la presencia de *Arcobacter* y *Helicobacter pylori* en vegetales orgánicos por métodos de cultivo y mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Trabajo de Fin de Grado de Biotecnología

Curso académico: 2020-2021

Alumno: Juan José Vázquez Cantó

Tutora académica: María Antonia Ferrús Pérez

Director Experimental: Miguel García Ferrús

En Valencia, a Julio de 2021.

# **Detección de la presencia de *Arcobacter* y *Helicobacter pylori* en vegetales orgánicos por métodos de cultivo y mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Alumno: Juan José Vázquez Cantó

Tutora académica: María Antonia Ferrús Pérez

Director Experimental: Miguel García Ferrús

En Valencia, a Julio de 2021

## **Resumen:**

En las últimas décadas se ha ido observando paulatinamente un incremento tanto en la aparición de nuevos riesgos alimentarios motivados por factores tan diversos como: el cambio climático, el crecimiento demográfico o los cambios en el estilo de vida de la mayoría de la sociedad como en la identificación de patógenos emergentes de origen zoonótico y con posibles capacidades patogénicas para los humanos. En un contexto actual en el que los alimentos ecológicos y la producción agraria sostenible de los mismos es un asunto prioritario, urge aumentar el conocimiento científico sobre la seguridad y la calidad microbiológica de este tipo de alimentos tratados con fertilizantes orgánicos y con menos químicos en la prevención de plagas.

Los consumidores suelen percibir estos alimentos orgánicos como más sanos y respetuosos con el medio ambiente si los comparamos con aquellos convencionales que suelen estar tratados con pesticidas sintéticos, fertilizantes minerales y antibióticos. Diversos estudios apuntan también en esa dirección, ya que en los orgánicos se han detectados menores niveles de metales pesados o compuestos fenólicos, pero más minerales, vitaminas o polifenoles. No obstante, tanto frutas como vegetales orgánicos están más expuestos microorganismos patogénicos como *Helicobacter pylori* o *Arcobacter*.

*H. pylori* es uno de los patógenos más prevalentes en todo el mundo, causando enfermedades gastrointestinales y cancerosas.

En la misma familia de las enterobacterias nos encontramos con *Arcobacter*, cuya infección en humanos y animales ha sido subestimada, pero es un potencial riesgo para la salud pública debido a que se ha detectado un crecimiento exponencial de *Arcobacter* en alimentos derivados de animales y en muestras tomadas durante el proceso de

producción de alimentos. Además, debemos tener en cuenta la escasa información disponible sobre el potencial patogénico de estas especies.

Si nos fijamos en su morfología las bacterias que pertenecen al género *Arcobacter* son bacilos Gram negativos curvos con un tamaño que oscila entre 0,2 y 0,9 micrómetros de ancho. Éstos pueden crecer en un rango de temperaturas que oscila entre los 15 y los 42 grados en condiciones tanto aerobias como anaerobias. No obstante, su crecimiento óptimo se da en condiciones de microaerofilia (3-10 % O<sub>2</sub>) y no requieren de hidrógeno para su crecimiento.

Actualmente, el género consta de unas 27 especies reconocidas entre las cuales figuran *Arcobacter butzleri* o *Arcobacter cryaerophilus* y pueden transmitirse tanto por vía hídrica como a través de los alimentos. Su transmisión se ve favorecida por características propias de la bacteria que la hacen resistente a ambientes adversos, incluyendo su tolerancia a altas concentraciones de hipoclorito de sodio, a metales pesados o a su capacidad de crecer a bajas temperaturas.

Uno de los protocolos más utilizados para el aislamiento de estas especies bacterianas incluye la utilización de un caldo de enriquecimiento suplementado con cefoperazona, anfotericina B y teicoplanina (caldo CAT) Este paso de enriquecimiento es seguido por un aislamiento selectivo, el cual puede realizarse por filtración pasiva en membrana de 0,45 micrómetros colocada sobre agar sangre.

**Palabras clave:**

Alimentos, orgánico, patógenos, microbiología, enterobacterias, *Arcobacter*, temperatura, aislamiento, *Helicobacter pylori*.

**Abstract:**

In the current context, in which organic food and sustainable agricultural production is a priority issue, it is urgent to increase our knowledge about the microbiological safety of this type of food, treated with organic fertilizers and with fewer pesticides. Organic food is generally considered to be healthy and respectful with the environment, since it contains lower levels of heavy metals or phenolic compounds, and more minerals, vitamins, or polyphenols. However, due to their mode of production, both organic fruits and vegetables are more exposed to pathogenic microorganisms, some of them emerging and with little characterized or underestimated risk. Among these emerging pathogens is *H. pylori*, one of the most prevalent agents worldwide, causing gastrointestinal and cancerous diseases. *Arcobacter* also poses a potential risk to public health. For both bacteria there is very little information available on their potential transmission by plant foods. Bacteria of the genus *Arcobacter* are curved Gram-negative rods that can grow between 15 and 42 degrees, under both aerobic and anaerobic conditions, although their optimal growth occurs under microaerophilic conditions (3-10% O<sub>2</sub>). Currently, the genus consists of about 27 recognized species, including *Arcobacter butzleri* or *Arcobacter cryaerophilus*. Its transmission, both by water and through food, is favored by characteristics of the bacteria that make it resistant to adverse environments, including its tolerance to high concentrations of sodium hypochlorite, heavy metals, or its ability to grow at low temperatures. *H. pylori* is a difficult-to-culture, Gram-negative microaerophilic microorganism that presents curved morphology under optimal culture conditions. Contamination of vegetables with *H. pylori* and the subsequent introduction of these raw vegetables into the food chain has been suggested as one of the routes of transmission of the bacteria to humans, and different authors have found sample rates of leafy vegetables and salads contaminated between 10-35%. The use of fecal irrigation water appears to be the main factor leading to *H. pylori* contamination of fruits and vegetables. One of the most widely used protocols for the isolation of these bacteria includes the use of an enrichment broth supplemented with antibiotics (CAT broth), followed by selective isolation, which can be performed by passive 0.45-micron membrane filtration placed on agar. blood. However, both microorganisms are difficult to cultivate, so it is necessary to apply molecular techniques, such as PCR, to avoid false negative results, which could underestimate the risk of their presence in food. In this work, samples of organically grown vegetables will be analyzed to evaluate the possible presence of *Arcobacter* sp. and *H. pylori*, both by culture methods and by molecular biology techniques. Genus and species-specific PCR primers will be used. The objective

is to determine the potential risk of transmission of *H. pylori* and *Arcobacter* sp. for the organic vegetable consumers.

**Key Words:**

Organic food, pathogens, microbiology, enterobacters, *Arcobacter*, temperature, isolation, *Helicobacter pylori*.

**Agradecimientos:**

Agradecer al equipo de investigación del departamento de Biotecnología por su acogida, paciencia y por las lecciones aprendidas. En especial a María Antonia por su orientación y a Miguel por introducirme en el mundo de la ciencia.

No quisiera olvidarme del apoyo que toda mi familia me ha brindado durante estos cuatro años. Sin su ayuda y comprensión durante estos años habría sido imposible llegar hasta aquí.

Y por último y no menos importante, no puedo estar más orgulloso de los que empezaron siendo mis compañeros de carrera. Hoy en día ya amigos y una parte importante de mi vida. Por todos los momentos vividos, tanto los buenos como los malos, infinitas gracias. Lo mejor de la carrera, sois, sin ninguna duda, vosotros.

La realización de este TFG se enmarca dentro del Proyecto “Análisis integrado de la diversidad, calidad y seguridad microbiológica de alimentos vegetales ecológicos mediante cultivo, técnicas moleculares y secuenciación masiva (ECOFOOD)” financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, con Ref. PID2019-105691RB-I00

## ÍNDICE

<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Los alimentos vegetales orgánicos.....	1
1.2 <i>Arcobacter</i> sp. ....	2
1.3 <i>Helicobacter pylori</i> .....	6
1.4 PCR para la detección e identificación de <i>Arcobacter</i> sp. y <i>H. pylori</i> .....	7
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	8
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	9
3.1. Toma de muestras y procesamiento de las mismas .....	9
3.2. Aislamiento y cultivo de <i>Arcobacter</i> sp. ....	9
3.3 Aislamiento y cultivo de <i>H. pylori</i> .....	12
3.4. Identificación de <i>Arcobacter</i> sp. y <i>H. pylori</i> mediante PCR .....	13
3.4.1. Extracción de DNA.....	14
3.4.2. Detección mediante PCR de <i>Arcobacter</i> sp. ....	14
3.4.3. Detección mediante PCR de <i>H. pylori</i> .....	15
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	16
4.1. Detección de <i>Arcobacter</i> sp. mediante PCR convencional .....	16
4.2. Detección de <i>Arcobacter</i> sp. mediante cultivo .....	19
4.3. Detección de <i>H. pylori</i> mediante PCR convencional .....	20
4.2. Detección de <i>H. pylori</i> mediante cultivo .....	22
<b>5. CONCLUSIONES:</b> .....	23
<b>6. BIBLIOGRAFÍA:</b> .....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS:

<b>Figura 1:</b> Clasificación taxonómica del género <i>Arcobacter</i> .....	3
<b>Figura 2:</b> Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de <i>A. butzleri</i> .....	5
<b>Figura 3:</b> Esquema del protocolo de cultivo de <i>Arcobacter</i> sp.....	10
<b>Figura 4:</b> Esquema del protocolo de cultivo y aislamiento de <i>H. pylori</i> .....	13
<b>Figura 5:</b> Representación esquemática de la posición de los primers usados para la identificación por PCR de las diversas especies del género <i>Arcobacter</i> .....	14
<b>Figura 6:</b> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR específica para <i>Arcobacter</i> sp.....	16
<b>Figura 7:</b> Colonia aislada de <i>Arcobacter</i> sp.....	19
<b>Figura 8:</b> Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR específica para <i>H.pylori</i> .....	21



**ÍNDICE DE TABLAS:**

**Tabla 1:** Detección de *Arcobacter* sp. mediante PCR convencional.....16

**Tabla 2:** Detección de *H. pylori* mediante PCR convencional.....21

## 1.INTRODUCCIÓN

### 1.1 Los alimentos vegetales orgánicos

El crecimiento en el consumo de productos vegetales orgánicos ha ido al alza en los últimos años (Wier & Calverley, 2002) debido a la creciente preocupación entre los ciudadanos por adoptar hábitos de vida más saludables, más sostenibles y que dañen menos al medio ambiente.

La producción de este tipo de alimentos se engloba dentro del término “agricultura orgánica “ y hace referencia a todos aquellos métodos agrícolas cuyo objetivo es la producción de alimentos mediante el uso de sustancias y procesos naturales, tales como fertilizantes orgánicos o la utilización de métodos no químicos en la prevención y el control de plagas (Reganold & Wachter, 2016; Tao *et al.*, 2020). Es cierto que la adopción de sistemas agrícolas basados en los principios ecológicos mencionados anteriormente conlleva potenciales beneficios. Es destacable que la agricultura orgánica tiende a tener un impacto ambiental limitado, ya que fomenta el uso responsable de la energía y los recursos naturales, el mantenimiento de la biodiversidad, la preservación de los equilibrios ecológicos regionales, la mejora de la fertilidad del suelo y el mantenimiento de la calidad del agua (Fließbach *et al.*, 2007; Gomiero *et al.*, 2011).

Por otra parte, los vegetales orgánicos parecen contener un mayor número de polifenoles, vitaminas y minerales, aunque su posible efecto beneficioso para la salud humana no ha sido aclarado todavía y los resultados de diversos estudios sobre el tema son aún insuficientes para formular conclusiones sólidas (Huber *et al.*, 2011; Hurtado-Barroso *et al.*, 2019).

Existe cierta tendencia por parte de los consumidores a concebir a los mismos de una forma subjetiva como alimentos más sanos y con una mayor calidad nutricional en comparación con los alimentos convencionales. No obstante, los consumidores parecen no tener en cuenta que los alimentos orgánicos tienen, en realidad, riesgos microbiológicos similares a los que se consumen comúnmente y deben ser manejados en condiciones adecuadas que eviten la aparición de enfermedades transmitidas por patógenos (González *et al.*, 2019; Hurtado-Barroso *et al.*, 2019).

Entre los patógenos que actualmente se consideran riesgos microbiológicos emergentes transmitidos por alimentos de origen vegetal, destacan algunas especies del género *Arcobacter*, así como *Helicobacter pylori*.

## 1.2 Arcobacter sp.

Las especies del género *Arcobacter* son bacilos gramnegativos, delgados, móviles, en forma de espiral, miembros de la subdivisión  $\epsilon$ -Proteobacteria y pertenecientes a la familia *Campylobacteraceae*.

La subdivisión de las  $\epsilon$ -Proteobacteria es una de las cinco clases dentro del filo de las proteobacterias (Lau *et al.* 1987).

Las bacterias pertenecientes a esta subdivisión habitan en una gran variedad de nichos ecológicos. Además, algunas de las especies pertenecientes al filo, tales como *Wolinella*, *Campylobacter* y *Helicobacter* pueden ser patógenos causantes de zoonosis en animales y humanos (Campbell *et al.*, 2006; Eppinger *et al.*, 2004; Gupta, 2006; Nakagawa *et al.*, 2005).

Actualmente no se ha encontrado ninguna característica molecular o bioquímica compartida entre todas las bacterias que forman la subdivisión de las  $\epsilon$ -Proteobacteria y sus consiguientes ramificaciones taxonómicas, más allá de la homología en la región 16S rRNA. Atendiendo a esta característica, se han establecido 2 órdenes principales, *Campylobacterales* y *Nautiliales*. *Campylobacteraceae*, *Helicobacteraceae* y *Hydrogenimonaceae* son las familias que componen el orden de los *Campylobacterales*.

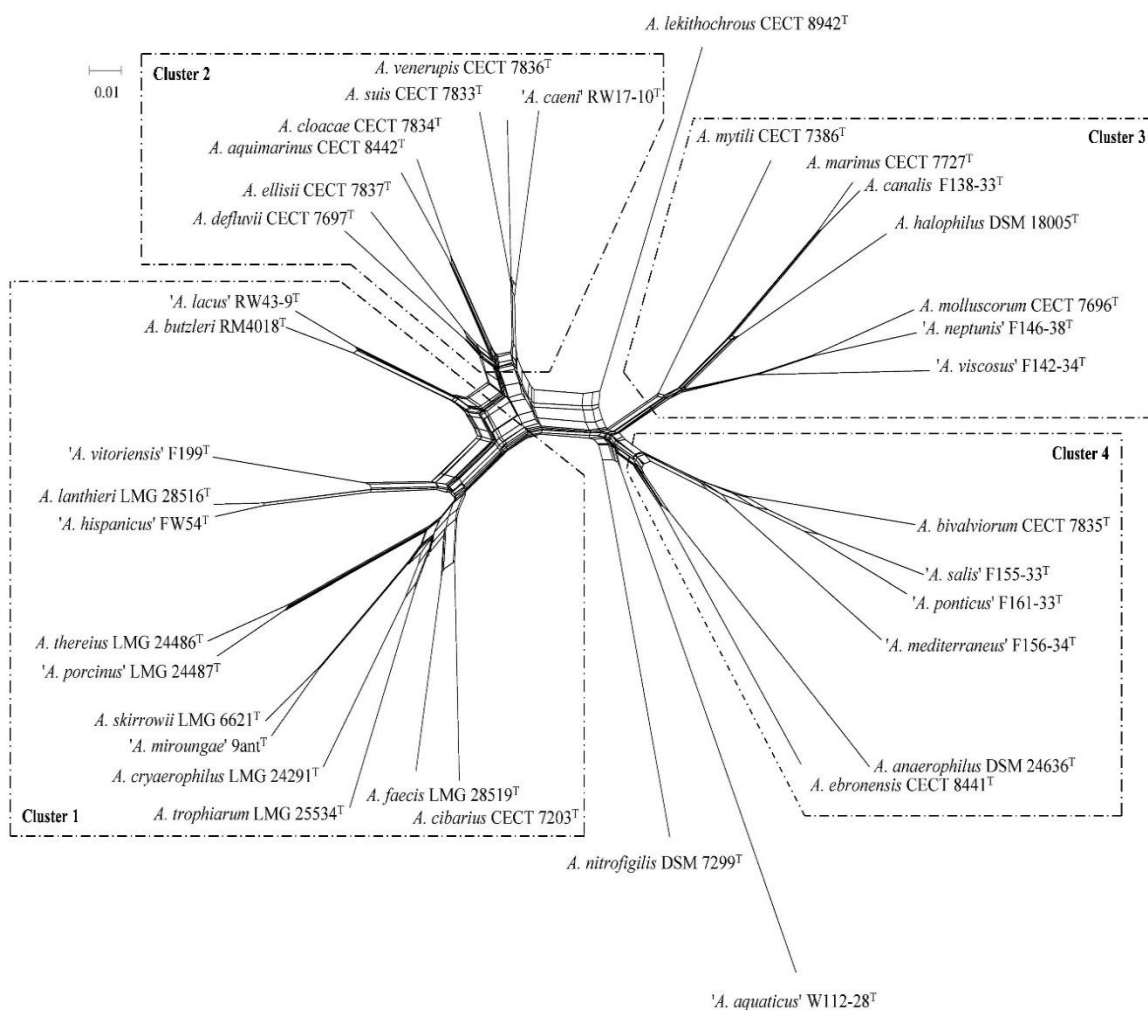
Dentro de la familia *Campylobacteraceae* se encuentra el género *Arcobacter*. Este fue descrito por primera vez por Vandamme *et al.* (1991), para incluir a determinadas especies de *Campylobacter*, *Campylobacter cryaerophila* y *Campylobacter nitrofigilis*, capaces de crecer a 15 °C- 30 °C sin necesidad de microaerofilia.

Actualmente, el género *Arcobacter* se caracteriza por agrupar a bacterias no esporuladas, con un tamaño que oscila entre 0,2 y 0,9  $\mu\text{m}$  de diámetro y un largo entre 1,0 y 3,0  $\mu\text{m}$ , móviles por flagelos polares simples. Son organismos quimiorganotrofos, caracterizados por utilizar una gran variedad de fuentes de carbono como ácidos orgánicos y aminoácidos, pero que no utilizan carbohidratos. La presencia de cloruro de sodio en el medio es crucial para su correcto crecimiento y de forma habitual reducen el nitrato a nitrito (Pérez-Cataluña *et al.* 2018).

Las especies del género *Arcobacter* crecen en el intervalo de temperaturas que va desde 10 °C hasta 35 °C. La composición de su DNA es de un 28.1-28.4 % de guanina+citosina (Pérez-Cataluña *et al.* 2018).

Actualmente, el género se encuentra compuesto por 27 especies diferentes de microorganismos que han sido aislados de humanos y animales, así como de recursos ambientales tales como el agua y los alimentos (Pérez-Cataluña *et al.* 2018).

Todos los microorganismos del género *Arcobacter* presentan una similitud media del 94 % en la secuencia del gen que codifica para la región 16S rRNA. Dicha similitud ha sido el criterio predominante para establecer la taxonomía del género, aunque presenta algunas limitaciones (Pérez-Cataluña *et al.* 2018). Análisis filogenéticos basados en la comparación de 13 genes “housekeeping” además de las secuencias concatenadas de 284 genes de los genomas de las cepas más representativas del género han permitido subclasificarlas en 4 “clusters”, tal como se observa en la figura 1 (Pérez-Cataluña *et al.* 2018).



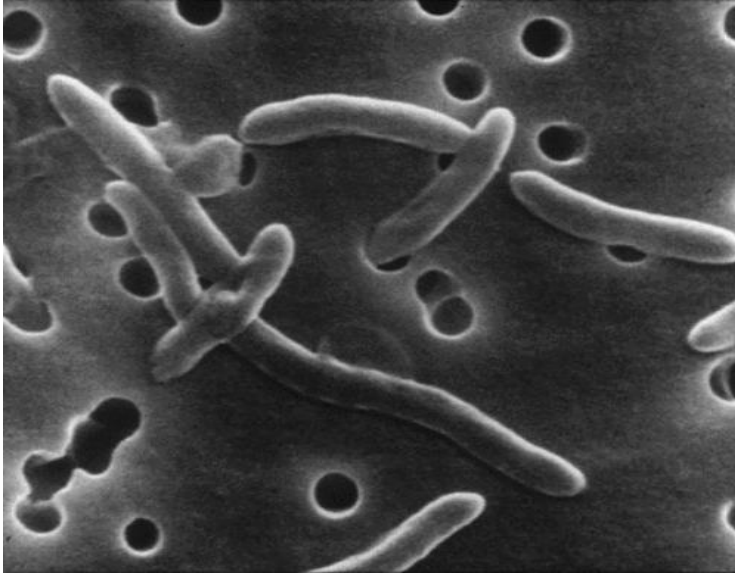
**Figura 1:** Clasificación taxonómica del género *Arcobacter* según lo propuesto en (Pérez-Cataluña *et al.* 2018).

Muchas de las especies del género reciben la consideración de enteropatógenos emergentes transmitidos por vía alimentaria e hídrica. Especies como *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowi* y *Arcobacter cibarius* producen infecciones tanto en animales como en humanos (Kayman *et al.*, 2012.; Wesley & Miller, 2010). De hecho, algunas de estas especies se hallan incluidas en la lista de microorganismos considerados como un serio peligro para la salud humana por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (Buchanan *et al.*, 2018).

Diferentes estudios han demostrado la presencia de *Arcobacter* en ambientes acuáticos tan variados como aguas residuales, lagos, ríos, playas e incluso en el agua potable, lo que confirma la importancia del agua como un factor crucial en la transmisión de estos patógenos (Collado *et al.*, 2010; Hsu & Lee, 2015; Lee *et al.*, 2012; Šilha *et al.*, 2019).

También se han realizado una gran cantidad de estudios sobre la contaminación de alimentos de origen animal por *Arcobacter* sp. con unas prevalencias medias en ganado del 54,3 %, de un 35,9 % en aves de corral y de un 13,7 % en ovejas (Hsu & Lee, 2015). La exposición de animales de ganado a patógenos transmitidos por vía hídrica supone un riesgo para la salud humana y puede servir como puente en la transmisión de bacterias (Lewerin *et al.* 2019). En este sentido, la presencia de *Arcobacter* sp. en alimentos provenientes de animales o en las heces de los mismos supone un importante riesgo en la transmisión de estos microorganismos a otros recursos naturales, como el agua utilizada con fines agrícolas para el cultivo de vegetales. Autores como Mottola *et al.* (2016) sugieren que la contaminación de vegetales está relacionada con la contaminación de fertilizantes orgánicos obtenidos a partir de desechos animales o lodos procedentes de depuradoras.

*Arcobacter* sp. ha sido detectado ocasionalmente en lechugas frescas en España (González & Ferrús, 2011) y en plantas de procesamiento de zanahorias (Hausdorf *et al.*, 2011), probablemente contaminados a través del agua de riego o directamente de las descargas fecales de animales infectados (Collado *et al.*, 2008; Hsu & Lee, 2015). En general, la especie más prevalente en alimentos es *A. butzleri* (Figura 2).



**Figura 2:** Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de *A. butzleri* en un filtro compuesto por poros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Snelling et al., 2006).

En la actualidad, no existe ningún protocolo estandarizado para la detección e identificación por cultivo de las especies patógenas de *Arcobacter*. En muestras clínicas, suelen utilizarse los medios de cultivo destinados al aislamiento de *Campylobacter*. En muestras ambientales, aunque existen diversos medios selectivos, como “*Arcobacter* Broth” o “*Brucella* Broth” y varios protocolos diferentes (Johnson & Murano; 1999; Kim et al., 2019; Merga et al., 2011), no existe consenso entre los investigadores sobre el método más adecuado.

Por otra parte, las bacterias pertenecientes a este género pueden ser identificadas por la carencia de pigmentos y la reacción negativa con los reactivos rojo de metilo y con el Voges-Proskauer. Son catalasa, oxidasa, ureasa y nitrogenasa positiva. Además, presentan la capacidad de hidrolizar el acetato de indoxilo y no producen Poli- $\beta$ -hidroxibutirato (Vandamme et al. 1991). No obstante, su identificación es muy problemática, debido a las irregulares reacciones bioquímicas que presentan en ocasiones, así como su baja actividad metabólica. Además, la morfología del género *Arcobacter* presenta una gran similitud con el género *Campylobacter*.

Por todo ello, la identificación a nivel molecular es la vía óptima para confirmar de forma correcta su presencia en muestras, tanto clínicas como ambientales. En este sentido,

se han propuesto diversas técnicas para la identificación de especies de *Arcobacter*, como la PCR convencional, la PCR múltiple (Brightwell *et al.*, 2007) o la secuenciación de la región 16S rRNA (Lau *et al.*, 2002).

### 1.3 *Helicobacter pylori*

Dentro de género *Helicobacter* se encuentran 30 especies diferentes que se caracterizan morfológicamente por ser bacilos gran-negativos, con forma de espiral, helicoidales, de 0,3 -1.0  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.5-5  $\mu\text{m}$  de largo. Son bacterias microaerófilas, productoras de catalasa y oxidasa. Las colonias que originan tras 2-5 días de incubación a 37 °C son no pigmentadas, translúcidas y de 1-2 mm de diámetro (Dunn *et al.*, 1997).

Dentro de este género destaca *H. pylori* debido a su importancia clínica, por su asociación con la úlcera péptica y el cáncer gástrico (Fashner & Gitu, 2015). Este patógeno tiene su nicho en la mucosa gástrica humana, a la que se asocia específicamente. En muchos casos, su presencia en dicha mucosa resulta asintomática. Sin embargo, en otras ocasiones aparecen síntomas como son náuseas, dolor abdominal, gastritis o úlceras.

La importancia de esta especie es aún mayor si se considera que se encuentra estrechamente relacionado con la aparición de cáncer gástrico. De hecho, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud ha clasificado a *H. pylori* como carcinógeno humano de Clase 1 e incluso estableció como una de sus prioridades el desarrollo de estrategias para la erradicación de *H. pylori* como medida de prevención de dicho tipo de cáncer (Herrero *et al.*, 2014).

Aún se desconocen muchos datos sobre la epidemiología de este patógeno, y el riesgo de su transmisión por alimentos. Aunque su principal vía de transmisión es persona-persona, se admite que sus transmisión por vía hídrica es importante en regiones del planeta cuyos sistemas de tratamiento de este recurso natural son deficientes (Bunn *et al.*, 2002). El patógeno también puede ser encontrado en el agua utilizada para el riego de hortalizas y vegetales y varios estudios han establecido la posibilidad de que ciertos alimentos, como verduras o leche, puedan actuar como vehículos de transmisión de *H. pylori* (Quaglia & Dambrosio, 2018).

La presencia de *H. pylori* en vegetales sin lavar descrita por autores como Atapoor *et al.* (2014) o Yahaghi *et al.* (2014) se encontraría asociada con la alta prevalencia de *H. pylori* en ambientes acuáticos. Diversos estudios han mostrado información acerca de la identificación de *H. pylori* en aguas residuales, aguas de riego o aguas no convenientemente tratadas (Lu *et al.* 2002; Mazari-Hiriart *et al.* 2008; Twing *et al.* 2011).

El uso de aguas contaminadas con el patógeno para fines agrícolas supone un importante riesgo en la contaminación de alimentos vegetales. Por otra parte, la presencia de *H. pylori* tanto en alimentos como en el agua supone el punto de entrada en la transmisión del mismo hacia los humanos. (Fujimura *et al.* 2008.; Quaglia & Dambrosio, 2018). Por ejemplo, Hemmatinezhad *et al.* (2016) identificaron la presencia de *H. pylori* en muestras procedentes de ensaladas (30 %,15/50) y de ensalada de aceitunas (36 %,18/50) servidas en restaurantes.

Por otra parte, Moreno-Mesonero *et al.* (2020) y Ng *et al.* (2017) han demostrado la persistencia de *H. pylori* en biopelículas. La superficie de los vegetales es un ambiente atractivo para la colonización y la formación de agregados de bacterias como *H. pylori*, disminuyendo la eficacia de los protocolos de desinfección y aumenta la supervivencia de dicha bacteria en este tipo de alimentos.

La identificación de *H. pylori* por cultivo presentan numerosos inconvenientes, tales como sus largos intervalos de tiempo de crecimiento, los exigentes requerimientos gaseosos, la inexistencia de un medio selectivo adecuado para su uso en muestras ambientales o la entrada de las células en estado Viable No Cultivable (VNC) al ser sometidas a estrés.

Una de las principales causas de la dificultad del aislamiento *in vitro* de esta bacteria radica en su capacidad de adquirir el estado de células viables, pero no cultivables. Las células que presentan este estado han demostrado ser metabólicamente activas, aunque no son capaces de realizar divisiones celulares, por lo que su crecimiento en placa se vuelve muy difícil de conseguir (Velázquez & Feirtag, 1999). La prevalencia de VNC aumenta cuando las condiciones para el crecimiento del microorganismo no son propicias, como las encontradas de manera habitual en alimentos, dificultando así su aislamiento por cultivo (Bode *et al.*, 1993; James., 2005; Velázquez & Feirtag, 1999).

#### 1.4 PCR para la detección e identificación de *Arcobacter* sp. y *H. pylori*

La técnica de la PCR permite la amplificación de regiones específicas de cualquier genoma, pudiendo obtener una gran cantidad de copias de dicha región. La aparición de esta técnica ha supuesto una revolución en los laboratorios de microbiología, por su sencillez, rapidez y sensibilidad.

Por ello, la utilización de la técnica de la PCR para la detección e identificación de *H. pylori* o *Arcobacter* sp. es fundamental tanto para su diagnóstico clínico como para investigar la epidemiología de estos microorganismos. No obstante, la PCR también presenta algunos inconvenientes, entre los que se encuentran la posibilidad de que se arrojen falsos negativo o bajos ratios de detección. La contaminación también supone



un problema, ya que en las muestras a analizar hay moléculas inhibitorias, como los polifenoles. Además, esta técnica no es capaz de discriminar entre células que son viables y DNA de aquellas que ya no lo son (Santiago *et al.*, 2015; Vesga *et al.*, 2018).

Diversos autores han utilizado la PCR como técnica de elección en la detección de *H. pylori* (Song, *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2007; Rahimi & Kheirabadi, 2012). La PCR convencional ha demostrado una gran sensibilidad en la detección de *H. pylori* (Atapoor *et al.*, 2014; Hemmatinezhad *et al.*, 2016; Yahaghi *et al.*, 2014), siendo capaz de detectar las células en estado VNC.

De forma análoga, se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios que utilizan la PCR como técnica de identificación de *Arcobacter* sp. en muestras vegetales (González & Ferrús, 2011; Mottola *et al.*, 2016, 2021) en ambientes acuáticos (Collado *et al.*, 2010; Hsu & Lee, 2015; Lee *et al.*, 2012; Šilha *et al.*, 2019) y en muestras de alimentos con procedencia animal (Morejón *et al.*, 2017; Shah *et al.*, 2012).

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo fundamental de este trabajo es determinar la presencia, tanto de microorganismos pertenecientes al género *Arcobacter* como de *H. pylori* en vegetales orgánicos, más concretamente, en lechugas y espinacas procedentes de la agricultura ecológica y destinados al consumo humano.

Para ello, se proponen los siguientes objetivos:

1. Utilizar la técnica molecular PCR para la detección de *Arcobacter* y *Helicobacter pylori* en muestras de lechugas y espinacas orgánicas compradas en comercios ecológicos locales y comparar su eficacia con el método tradicional de cultivo en placa.
2. Comparar los resultados obtenidos sobre niveles de contaminación en vegetales orgánicos con los disponibles en la literatura para productos cultivados convencionalmente, a fin de determinar si existe mayor riesgo para el consumidor.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Toma de muestras y procesamiento de las mismas

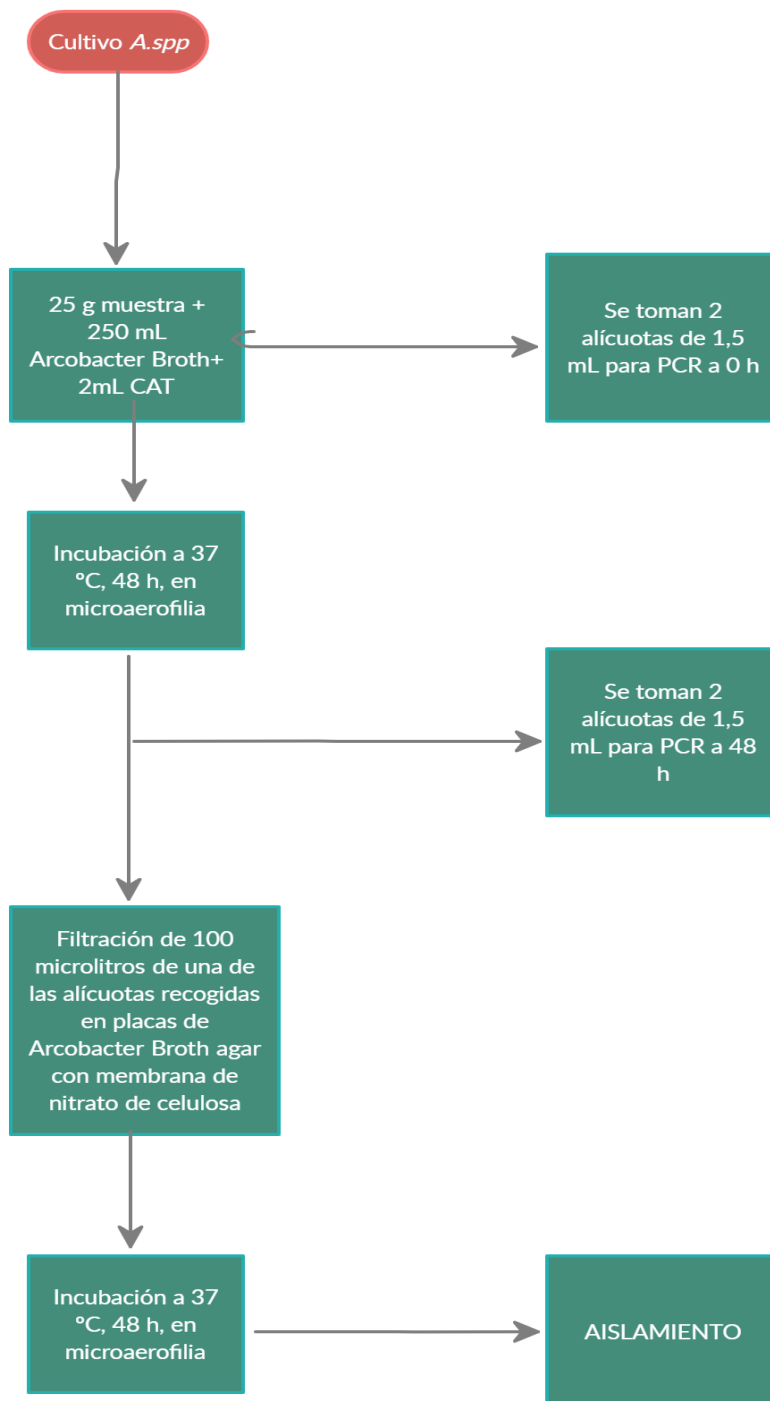
Los alimentos utilizados para este estudio fueron adquiridos en diferentes supermercados ecológicos de la ciudad de Valencia durante los meses de febrero, marzo y abril de 2021. Fueron analizadas un total de 50 muestras, 25 de ellas provenientes de lechugas y las 25 restantes de espinacas. Los vegetales fueron comprados en el mostrador o en bolsas ya empaquetadas y pesadas previamente. Todas las muestras fueron transportaron refrigeradas al laboratorio y fueron procesadas dentro de las 24 a 48 horas posteriores a su recepción.

Cada una de las muestras procesadas fue obtenida a partir de un “pool” de vegetales procedentes del mismo lote o envasados en la misma bolsa. Pare ello, se trocearon 5 piezas completas, mezclando adecuadamente el contenido de las mismas. Posteriormente, de cada muestra se obtuvieron 25 gramos. Este proceso fue realizado en el entorno estéril que proporciona una cabina de flujo laminar.

#### 3.2. Aislamiento y cultivo de *Arcobacter* sp.

El protocolo contempló como siguiente paso la adicción a los 25 gramos de muestra del medio “Arcobacter Broth”(Oxoid, CM0965B,UK) (Atabay & Corry, 1998). Este medio está compuesto por 18 mg/L de peptona, 1 mg/L de extracto de levadura y 5 mg/L de cloruro de sodio y está indicado para el enriquecimiento de las bacterias de la especie *Arcobacter*. El caldo se suplementó con 2 mL de la mezcla de antibióticos CAT compuesto por Cefoperazona, Teicoplanina y Anfotericina B (Oxoid, SR0174, UK), indicado para el aislamiento de especies del género *Arcobacter* y *Campylobacter* (Kim *et al.*, 2019; Salas-Massó *et al.*, 2019).

El protocolo que fue seguido se muestra en la Figura 3.



**Figura 3:** Esquema del protocolo de cultivo de *Arcobacter* sp.

La muestra se homogeneizó en un “Stomacher”, durante un tiempo igual o superior a 5 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, las muestras (“muestra directa”, procesada a 0 horas) fueron llevadas de vuelta a la cabina de flujo y se procedió a su inoculación en placas de agar, tal como se describe posteriormente. También se tomaron 2 alícuotas

de 1,5 mL de cada una de ellas, una para su posterior extracción de ADN y otra para almacenar en congelación.

El resto del caldo homogeneizado se introdujo en una jarra de anaerobiosis AnaeroJar™ (Oxoid, AG0025A, UK) junto a un sobre CampyGen™ (Oxoid, N0025A, UK) para mantener el ambiente microaerófilo necesario para el crecimiento de *Arcobacter* sp. La jarra de anaerobiosis se incubó a 37 °C durante 48 horas.

Finalizada la incubación, se tomaron 3 alícuotas de 1,5 mL de la muestra a 48 horas (muestra “enriquecida”): 1 alícuota para realizar extracción de DNA y la consiguiente PCR, otra para inocular en placas de cultivo y una última alícuota para almacenar en congelación.

Para el aislamiento por cultivo se utilizó el medio “*Arcobacter* Broth agar” suplementado con 15 g/l de agar, 25 ml de sangre desfibrilada de caballo (Oxoid, SR0035C, UK) y suplemento CAT.

Sobre las placas se colocó una membrana de nitrato de celulosa (Sartorius, 11406-47-ACN, Alemania) que permitió que tan sólo aquellos microorganismos móviles con un tamaño igual o inferior a 45 micras pudieran alcanzar y crecer sobre el medio.

Una vez el filtro se encontró sobre la placa de “*Arcobacter* Broth agar”, se depositaron sobre él 100 microlitros de la alícuota de la muestra. Tras 15 minutos, se retiró el filtro y las placas estaban listas para su incubación en la estufa durante 48 horas, dentro de una jarra de anaerobiosis con un ambiente microaerófilo, tal como se describe previamente.

Pasadas 48 horas, las placas se examinaron mediante microscopia óptica con el objetivo de identificar y aislar posibles colonias de *Arcobacter* sp. Dichas colonias tienen que seguir unas características morfológicas concretas: tamaño pequeño o puntiformes y aspecto traslúcido.

Una vez seleccionadas las colonias presuntivas, se procedió a subcultivarlas en placas de Columbia-agar sangre (Oxoid, CM0331B, UK). El uso de este medio permitió una máxima recuperación de microorganismos de aislamiento comprometido sin interferir con sus reacciones hemolíticas (Atabay & Corry, 1998).

Las placas fueron incubadas durante 48 horas. Si tras ese intervalo de tiempo se recuperaron colonias con la morfología característica de *Arcobacter* sp. se les realiza una tinción Gram. En el caso de que mediante observación directa con el microscopio se observara el aspecto típico de las células de *Arcobacter* (bacilos Gram-negativos de

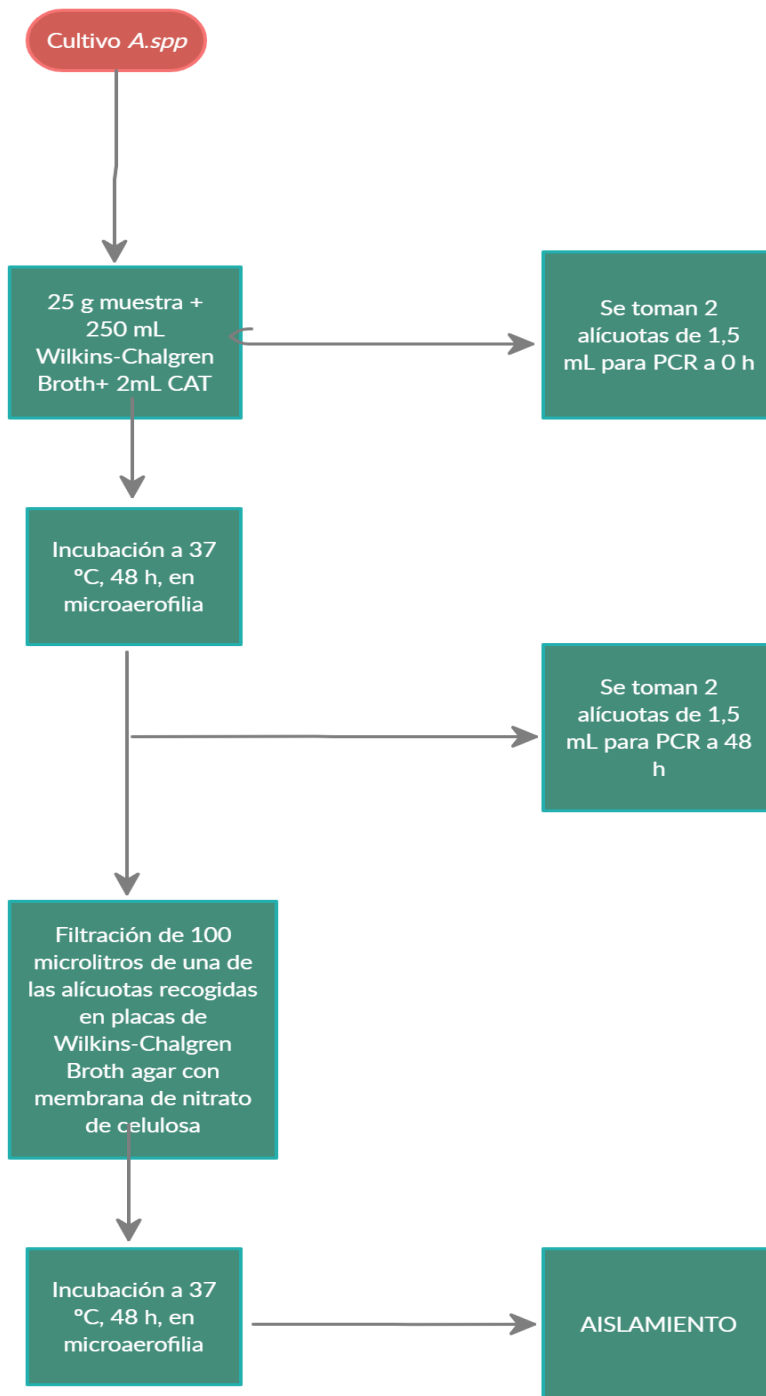
tamaño medio, con forma helicoidal o curvada), el cultivo puro se recoge en un tubo Eppendorf para confirmar la identificación mediante PCR.

### 3.3 Aislamiento y cultivo de *H. pylori*

El protocolo a seguir para el cultivo y aislamiento del patógeno *H. pylori* es similar al utilizado en el cultivo de *Arcobacter* sp. (Figura 4).

Una vez pesada la muestra de 25 gramos contenida en las bolsas de stomacher, se añadieron 250 ml del medio “Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth” (Oxoid, CM0619,UK). Este medio de cultivo, compuesto por 10 mg/L de triptona, 10 mg/L de gelatina de peptona, 5 mg/L de extracto de levadura, 5 mg/L de cloruro de sodio, 1 mg/L de glucosa, 1 mg/L de L-arginina , 1 mg/L de piruvato sódico , 0.0005 mg/L de menadiona y 0,005 mg/L de hemina, se utilizó para el crecimiento general de organismos anaerobios. El medio se suplementó con sangre de caballo al 10 % y para aumentar su selectividad, por cada 250 ml de medio se añadió 1 ml del suplemento selectivo Dent (Oxoid, SR0147E, UK), usado para el aislamiento de *H. pylori* (Dent & McNulty, 1988).

El resto del procedimiento de aislamiento es idéntico al seguido para la detección de *Arcobacter* sp. En este caso, las colonias presuntivas de pertenecer a *H. pylori* también son pequeñas, transparentes y poco elevadas.



**Figura 4:** Esquema del protocolo de cultivo y aislamiento de *H. pylori*.

### 3.4. Identificación de *Arcobacter* sp. y *H. pylori* mediante PCR

Se realizó PCR, tanto a las colonias presuntivas aisladas previamente, para confirmar la identificación, como a las muestras de alimentos correspondientes a las muestras a 0 horas y a 48 horas, para la detección de los microorganismos objeto de este estudio.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

### 3.4.1. Extracción de DNA

En todos los casos, se extrajo el DNA bacteriano usando el kit comercial GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma- Aldrich, NA2110, USA).

### 3.4.2. Detección mediante PCR de *Arcobacter* sp.

Para la detección de *Arcobacter* sp. se usaron primers específicos para una región de 331 pares de bases del gen 23S rDNA. Los primers **ARCO 1** (5'-GTCGTGCCAAGAAAAGCCA-3') y **ARCO 2** (5'-TTCGCTTGCGCTGACAT-3') fueron descritos por Bastyns *et al.* (1995) (Figura 5).

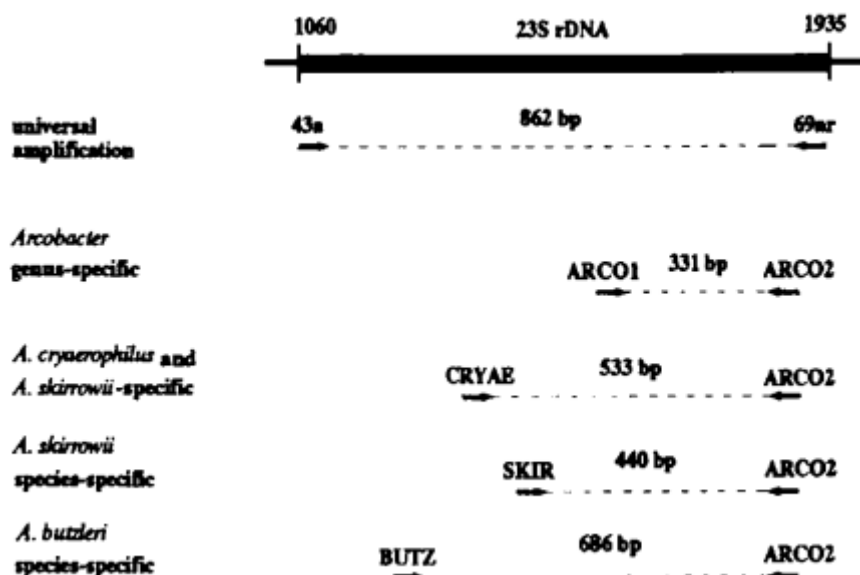


Figura 5: Representación esquemática de la posición de los primers usados para la identificación por PCR de las diversas especies del género *Arcobacter* usando como referencia la secuencia del gen que codifica para el 23S rDNA (Bastyns *et al.* 1995).

Para preparar la mezcla de PCR se añadieron 0,2 µl de deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), 0,5 µl de cada uno de los primers, 0,75 µl de cloruro de magnesio, 2,5 µl de tampón, 0,5 U de la enzima Taq polimerasa y 15,05 µl de agua miliq.

La reacción de amplificación consistió en: una primera etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 27 ciclos de amplificación de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 61 °C y 1 minuto a 72 °C y una última etapa de extensión a 72 °C durante 5 minutos (Bastyns *et al.*, 1995).

En todos los ensayos de PCR se incluyó DNA de la cepa *A. butzleri* de la colección DSM 8739 (Alemania) como control positivo. También se incluyó un control negativo, en el que el DNA se sustituyó por agua ultrapura estéril.

Los productos resultantes de la PCR fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, al que se adicionaron 5 µL de Red Safe (Ecogen, 21141, España). Un marcador de peso molecular de 100 pares de bases fue utilizado para la correcta identificación del peso molecular de las bandas obtenidas (Thermo Fisher Scientific, SM0331, Alemania). La electroforesis se realizó a 100 V durante 45 minutos y los amplicones fueron visualizados con un transiluminador con luz UV.

#### 3.4.3. Detección mediante PCR de *H. pylori*

La PCR se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Nilsson *et al.*, 2002) mediante el uso de unos primers que amplifican específicamente un fragmento de 372 pares de bases del gen de la citotoxina vacuolizante de *H. pylori*, (*VacA*):

**Vac1:** 5'-GGCACACTGGATTTGTGGCA-3'

**Vac2:** 5'-CGCTCGCTTGATTGGACAGA-3'

Para la preparación de la mezcla de PCR se utilizaron 0,2 µl de deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), 0,63 µl de cada primer, 0,75 µl de cloruro de magnesio, 2,5 µl de tampón, 1 U de Taq polimerasa y 16,79 µl de agua.

La reacción de amplificación consistió en un primer paso de desnaturalización inicial a 94 °C durante 30 segundos. Acto seguido, se sucedieron 45 ciclos de desnaturalización (95 °C, 30 segundos), alineamiento (47 °C para 5 segundos) y extensión (72 °C para 15 segundos) (Nilsson *et al.*, 2002).

A continuación, se realizó una electroforesis para detectar los productos resultantes de la PCR de la misma manera que se ha descrito anteriormente.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

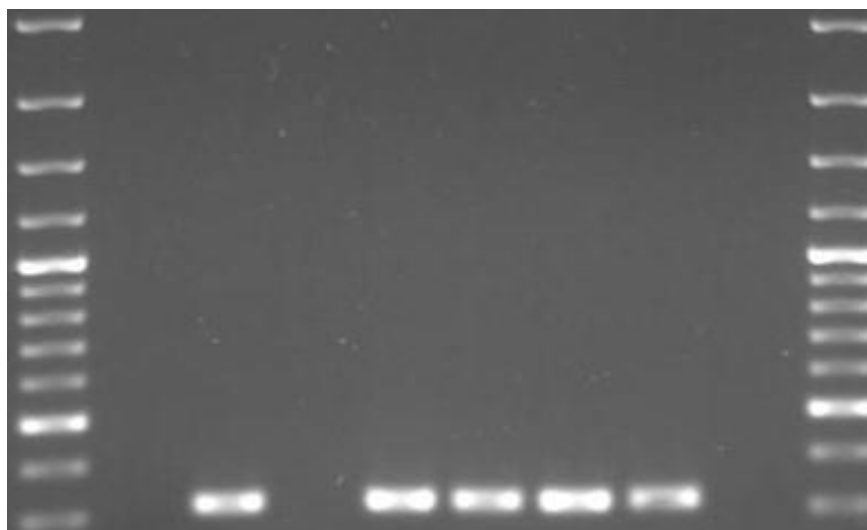
### 4.1. Detección de *Arcobacter* sp. mediante PCR convencional

En total, se analizó la presencia de *Arcobacter* sp. en 25 muestras de lechuga y 25 muestras de espinacas tanto a 0 horas como después de la incubación a 48 horas, tras enriquecimiento en un caldo de cultivo selectivo (Tabla 1)(Figura 6).

Tipo de muestra	N.º de muestras	N.º(%) de muestras positivas	
		PCR a 0 h	PCR a 48 h
Lechugas	25	-	1(4)
Espinacas	25	1(4)	3(12)
Total	50	1(2)	4(8)

**Tabla 1:** Detección de *Arcobacter* sp. mediante PCR convencional.

1      2      3      4      5      6      7      8      9      10



**Figura 6:** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR específica para *Arcobacter* sp. obtenidos para diversas muestras: Calle 1: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Calle 2: Muestra 3 de espinaca a 0 horas. Calle 3: Control positivo (*A. butzleri* DSM 8739). Calle 4: Muestra 4 de lechuga a 0 horas. Calles 5, 6, 7 y 8: Muestras 12, 13 y 14 de espinaca a 48 h y muestra 3 de lechuga a 48 respectivamente. Calle 9: Control negativo. Calle 10: Marcador de peso molecular.

De las 50 muestras analizadas, *Arcobacter* sp. fue detectado en 5 de ellas (10 %). Aunque la evidencia es limitada, diversos autores han afirmado que los alimentos vegetales no parecen actuar como reservorios de *Arcobacter* sp. Sin embargo, esto no implica que dichos alimentos no puedan actuar como vehículos de transmisión del patógeno, ya que pueden encontrarse contaminados por el agua de riego utilizada en su cultivo o por condiciones higiénicas deficientes en el procesamiento por parte de los agricultores o trabajadores asociados al sector agrícola (González *et al.*, 2017). Se han reportado algunos ejemplos representativos de dicha afirmación. Entre ellos, el hallazgo de *Arcobacter* sp. en una planta de procesamiento de espinacas en Alemania. La contaminación se demostró provocada durante el proceso de lavado de los vegetales (Hausdorf *et al.*, 2013).

No existen demasiados estudios respecto a la prevalencia de *Arcobacter* sp. en alimentos vegetales, en comparación con la información disponible para alimentos provenientes de animales o para la prevalencia de *Arcobacter* en diferentes tipos de agua. En general, las ratios de detección de *Arcobacter* sp. (10 %) por PCR que obtuvimos en este trabajo fueron ligeramente inferiores a los obtenidos en otros estudios previos:

En el estudio realizado por González & Ferrús. (2011), mediante PCR convencional en muestras de lechuga, se observaron niveles de contaminación del 14 %. Los resultados del estudio llevado a cabo por Mottola *et al.* (2021) muestran unos niveles de detección de *Arcobacter* sp. (14,5 %) similares a los registrados por González & Ferrús (2011). En un estudio previo, Mottola *et al.* (2016) obtuvieron niveles de detección de *Arcobacter* sp. del 27,5 % en muestras vegetales precortadas de distintos tipos (lechuga, espinaca, rúcula y valeriana) mientras que Kim *et al.* (2019) encontraron ratios de 4,4 % en muestras de vegetales de hoja verde.

Todos los estudios anteriores se realizaron sobre alimentos cultivados en forma convencional. No existe aún suficiente información acerca de las variaciones respecto a la presencia de *Arcobacter* sp. en alimentos vegetales ecológicos respecto a alimentos vegetales no ecológicos. En ese sentido, este trabajo parece proporcionar resultados novedosos. Nuestra tasa de detección (10 %) en verduras orgánicas parece ser similar al del resto de autores, aproximándose al valor promedio establecido, por lo que no parece que el cultivo orgánico incremente el riesgo de contaminación por *Arcobacter* sp. de los vegetales que llegan al consumidor. Sin embargo, deberían ampliarse estos estudios con más muestras, antes de obtener conclusiones definitivas.

Respecto a las diferencias en la contaminación entre los dos tipos de vegetales empleados, se encontró un porcentaje de detección de *Arcobacter* sp. mayor en aquellas muestras que provenían de espinacas (16 %, 4/25) que en las muestras procedentes de lechugas (4 %, 1/25). Estudios realizados por otros autores ya han reportado diferencias en los niveles de contaminación por *Arcobacter* entre ambos vegetales. La investigación realizada por Mottola *et al.* (2016) evidenció un mayor número de muestras positivas en lechugas (20 %, 13/65) que en espinacas (3,24 %, 9/37). De forma análoga, otro estudio realizado por Mottola *et al.* (2021) en una planta de procesamiento de vegetales en la región de Apulia (Italia) demostró también un mayor número de positivos en lechugas (20 %, 11/56) que en otro tipo de vegetales de hoja verde, como la rúcula (9 %, 5/54).

No obstante, en el estudio publicado por González *et al.* (2017) se muestra una mayor detección de *Arcobacter* sp. en muestras procedentes de espinacas (38,10 %, 8/21) que en muestras procedentes de lechugas (9,76 %, 4/41). Hay que destacar que las muestras usadas para la realización de su estudio fueron adquiridas de la misma ciudad y región (Valencia) que las muestras usadas en este trabajo. Esta misma procedencia de las muestras podría explicar la concordancia entre ambas investigaciones en cuanto a una mayor tasa de detección de *Arcobacter* sp. en espinacas, aunque se necesitaría llevar a cabo más investigaciones en este campo para poder afirmarlo con rotundidad.

Respecto a la influencia del enriquecimiento en la efectividad de la técnica, se observó que la mayor parte de los resultados positivos correspondían a muestras que se analizaron por PCR tras 48 horas (80 %, 4/5), mientras que de entre las muestras analizadas a 0 horas sólo fue posible la detección de *Arcobacter* sp. en una de ellas (20 %, 1/5) (Tabla 1). Estos resultados coinciden con los encontrados en la bibliografía para el género *Arcobacter*, ya que en la mayoría de estudios el enriquecimiento de las muestras ha demostrado aumentar la tasa de detección de este tipo de bacterias en muestras de alimentos.

En este sentido, Denis *et al.* (2001) detectaron mayor cantidad de bacterias pertenecientes al género *Campylobacter* tras el enriquecimiento en muestras de pollo (66,3 %, 201/303). En muestras de vegetales, el artículo publicado por González *et al.*, (2017) también muestra unos mayores niveles de detección de *Arcobacter* sp tras el enriquecimiento de las muestras (83,33 % frente a 16,67 %).

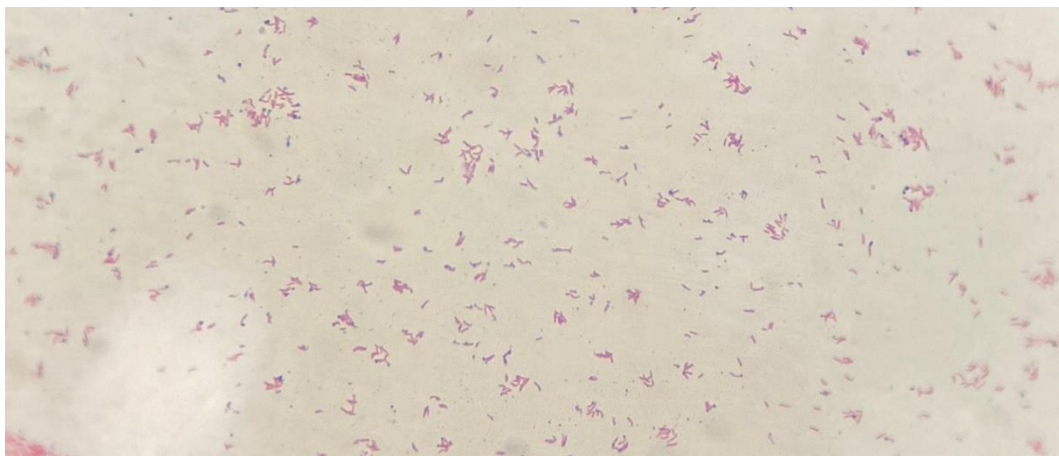
Por otra parte, Kim *et al.* (2019) encontraron que las muestras de vegetales enriquecidas con CAT mostraron una mayor tasa de detección de *Arcobacter* (37,8 %) que aquellas muestras que fueron enriquecidas con otros protocolos (30,7 %). Otros estudios,

realizados en otros tipos de muestras, confirman que el uso combinado del suplemento CAT junto con medios de crecimiento específicos alcanza una sensibilidad cercana al 70,7 % y una especificidad del 63,9 % en el aislamiento de *Arcobacter* (Kim *et al.*, 2019; Merga *et al.*, 2011; Morejón *et al.*, 2017).

Entre las ventajas que ofrece incluir un paso de enriquecimiento en un protocolo de detección de microorganismos por PCR destaca la capacidad de diluir de forma notable la presencia de inhibidores de la PCR como polifenoles o carbohidratos (Schrader *et al.*, 2012). Además, los protocolos de enriquecimiento son capaces de diluir la concentración de bacterias sin función vital, reduciendo así la probabilidad de detectarlas mediante PCR. Por último, para los microorganismos con bajas tasas de crecimiento o que se encuentran en bajas concentraciones, este paso permite que aumente su concentración en el caldo, elevando así la probabilidad de su detección posterior (Atabay & Corry, 1997; Denis *et al.*, 2001; González *et al.*, 2017; Merga *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2003; Waage *et al.*, 1999).

#### 4.2. Detección de *Arcobacter* sp. mediante cultivo

Tras el procedimiento de aislamiento por cultivo llevado a cabo para *Arcobacter* sp se consiguieron aislar 2 colonias de *Arcobacter* sp. procedentes de una única muestra de espinaca (1/50, 2%) (Figura 7).



**Figura 7:** Colonia aislada de *Arcobacter* sp. a partir de la muestra 6 de espinaca después de completar el protocolo estandarizado con dicho objetivo. Observación con microscopio óptico a un aumento de 100X.

Los resultados de detección por cultivo pueden ser comparados con otros estudios, como el llevado a cabo por González *et al.*, (2017). En él se consiguieron aislar 25 colonias de *Arcobacter* sp de 17 muestras positivas (17 %, 17/100). Trece de esas colonias pertenecían a lechugas y 6 a espinacas.

De forma análoga a lo observado por otras investigaciones, los ratios de detección de *Arcobacter* sp. mediante cultivo obtenidos en nuestro estudio son menores respecto a los ratios obtenidos al utilizar la PCR. González *et al.* (2017) detectaron la presencia de *Arcobacter* sp. por PCR en un 20 % de las muestras, frente al 17% por cultivo. También estudios como el llevado a cabo por Rahimi (2014) con muestras procedentes de aves de corral muestran diferencias en la cantidad de *Arcobacter* sp. detectado mediante métodos de cultivo (13,1 %) y mediante PCR (15,7 %).

Esta menor detección de *Arcobacter* sp. por cultivo era esperable. Aunque la PCR puede detectar DNA de microorganismos no viables, y por tanto no puede descartarse la existencia de falsos positivos, esta posibilidad disminuye considerablemente con el uso del enriquecimiento, que diluye el DNA libre y hace que solo los microorganismos viables puedan crecer y detectarse. Así pues, parece que la mayor efectividad de la PCR es debida a las dificultades intrínsecas para el crecimiento de estas bacterias, muy exigentes nutricionalmente, y que se encuentran en desventaja competitiva frente a la microbiota acompañante en muestras muy contaminadas, como pueden ser los alimentos.

De esta manera, tanto nuestros resultados como la información disponible confirman la mayor sensibilidad de la técnica de PCR frente al cultivo para la detección de *Arcobacter* sp. en alimentos.

#### 4.3. Detección de *H. pylori* mediante PCR convencional

De forma análoga a lo realizado en *Arcobacter* sp., se analizó la presencia de *H. pylori* en las mismas muestras de espinacas y de lechugas ecológicas, tanto a 0 horas como tras enriquecimiento de 48 horas (Figura 8).

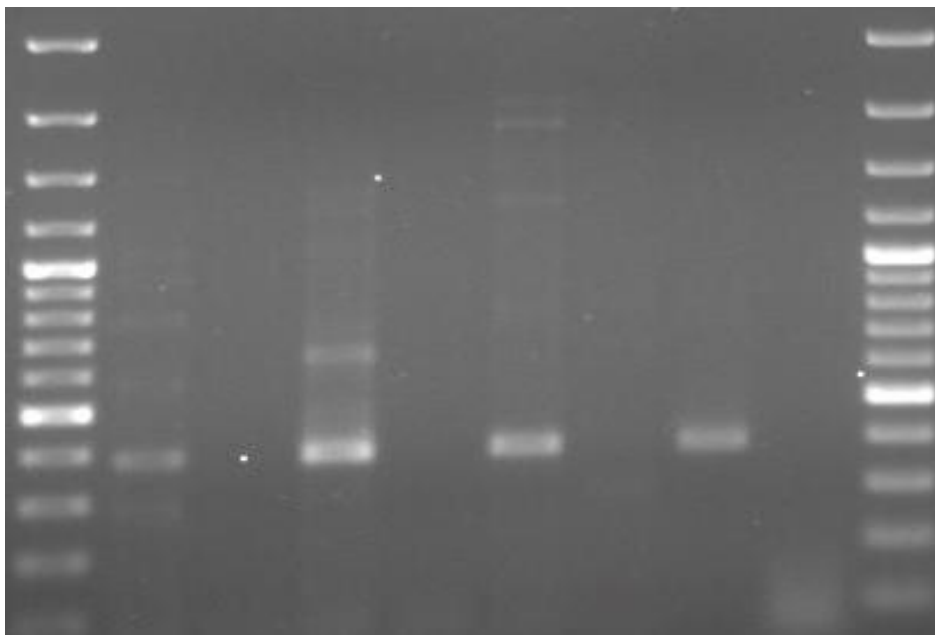
De las 50 muestras analizadas, se detectó la presencia del patógeno en 12 (24 %, 12/50) de ellas (Tabla 2).

Otros investigadores han analizado la presencia de *H. pylori* en muestras de vegetales, siempre cultivados de forma convencional. Yahaghi *et al.* (2014) detectaron la presencia de *H. pylori* en 52 muestras de un total de 380 vegetales (13,68 %, 52/380) en Irán. Aunque los datos recopilados en la investigación llevada a cabo por Yahaghi *et al.* (2014) parecen indicar una prevalencia de *H. pylori* menor que la detectada en nuestro estudio, los ratios de detección de *H. pylori* en lechugas (30%, 6/20) y espinacas (25 %, 5/20) son acordes con los datos recopilados en este estudio.

Tipo de muestra	N.º de muestras	N.º (%) de muestras positivas	
		PCR a 0 h	PCR a 48 h
Lechugas	25	9 (36)	3 (12)
Espinacas	25	2 (8)	1 (4)
Total	50	11 (22)	4 (8)

**Tabla 2:** Detección de *H. pylori* mediante PCR convencional.

1      2      3      4      5      6      7      8      9      10



**Figura 8:** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR específica para *H. pylori* obtenidas para diferentes muestras: Calle1: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Calles 2,4 y 5: Muestras 12,15 y 17 de lechuga a 0 horas. Calles 3,5 y 7: Muestras 12,15 y 17 de lechuga a 48 horas. Calle 8. Control positivo, *H. pylori* NCTC 11637. Calle 9: Control negativo. Calle 10: Marcador de peso molecular.

Atapoor *et al.* (2014) obtuvieron resultados similares a los nuestros en muestras de lechuga (20 %, 8/40) y espinacas sin lavar (10 %, 4/40), con una distribución equivalente: se observaron más positivos en las muestras de lechugas (40 %, 10/25) que en las de espinacas (8 %, 2/25).

Es importante destacar que aquellas muestras que se analizaron por PCR a 0 horas fueron aquellas en las cuales se detectó un mayor número de resultados positivos (73,33 %, 11/15) en comparación con las muestras analizadas mediante PCR tras 48 horas de enriquecimiento (26,67 %, 4/15).

En la investigación llevada a cabo por Santiago *et al.* (2015) se observó una mayor detección de *H. pylori* antes del enriquecimiento, de forma análoga a los resultados obtenidos en nuestro estudio. La detección del DNA de las células de *H. pylori* sin función vital es la explicación más plausible respecto a la mejor detección del patógeno en las muestras sin enriquecer. Una vez realizado el enriquecimiento, se reduce la concentración de dichas células sin función vital, por lo que aumenta la especificidad del ensayo y se reduce la cantidad de muestras positivas.

Otra posible explicación a este fenómeno sería la mayor labilidad de *H. pylori* frente a la microbiota acompañante, y su menor capacidad para la competencia ecológica, lo que haría que, tras 48 horas, otros microorganismos competidores, más resistentes, con mayor tasa de crecimiento o menores requerimientos nutricionales inhibieran el crecimiento de las células de *H. pylori*, ya estresadas por las condiciones en las que se encuentran en las muestras ambientales.

#### 4.2. Detección de *H. pylori* mediante cultivo

En este estudio no se ha podido aislar ninguna colonia de *H. pylori* entre las muestras analizadas. Diversas investigaciones han reportado la dificultad en el aislamiento del patógeno (Goodman & Correa, 1995).

Otros autores han observado la dificultad en el aislamiento del patógeno, especialmente en muestras ambientales (Al-Sulami *et al.*, 2012; Goodman & Correa, 1995). No existen apenas estudios sobre el cultivo de *H. pylori* en muestras vegetales. No obstante, Moreno-Mesonero *et al.* (2020) no fueron capaces de detectar la presencia de *H. pylori* en muestras de lechuga mediante cultivo, lo que está en consonancia con los resultados obtenidos en este estudio.

## 5. CONCLUSIONES:

1. El método de cultivo no es adecuado para el aislamiento e identificación de *Helicobacter pylori* en muestras de vegetales.
2. La técnica PCR ha demostrado ser rápida y específica, útil para la detección directa de *Arcobacter* sp. y *Helicobacter pylori* en muestras ambientales, mucho más sensible que el aislamiento por cultivo, especialmente en el caso de *H. pylori*.
3. El enriquecimiento de las muestras previo a la PCR mejora los niveles de detección de *Arcobacter* sp. en vegetales. Sin embargo, para *Helicobacter pylori*, este paso de enriquecimiento disminuye la sensibilidad de la técnica.
4. Mediante PCR se ha detectado *Arcobacter* en un 10% de los vegetales analizados. Se encontró un porcentaje de detección mayor en muestras de espinacas que en lechugas.
5. Un 24% de las muestras analizadas han sido positivas para *Helicobacter pylori* por PCR, con un nivel de contaminación ligeramente mayor en lechugas que en espinacas.
6. En este estudio se ha demostrado por primera vez la presencia de *Arcobacter* sp. y de *Helicobacter pylori* en vegetales cultivados orgánicamente destinados al consumo humano, lo que demuestra la posibilidad de transmisión de ambos patógenos a través de este tipo de alimentos, si estos se consumen sin las adecuadas medidas de higiene en su manipulación.
7. Los niveles de contaminación para ambos patógenos en los vegetales orgánicos analizados son similares al obtenido por otros autores en vegetales cultivados convencionalmente, por lo que no parece que el cultivo orgánico incremente el riesgo para el consumidor. Sin embargo, deberían ampliarse estos estudios con más muestras, antes de obtener conclusiones definitivas.



## 6. BIBLIOGRAFÍA:

- Al-Sulami, A. A., Al-Edani, T. a. A., & Al-Abdula, A. A. (2012). Culture Method and PCR for the Detection of *Helicobacter pylori* in Drinking Water in Basrah Governorate Iraq. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012, e245167.  
<https://doi.org/10.1155/2012/245167>
- Atabay, H. I., & Corry, J. E. L. (1997). The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chickens. *Journal of Applied Microbiology*, 83(5), 619-626.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00277.x>
- Atabay, H. I., & Corry, J. E. L. (1998). Evaluation of a new arcobacter enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of *Campylobacter* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 41(1), 53-58.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00034-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00034-8)
- Atapoor, S., Safarpour Dehkordi, F., & Rahimi, E. (2014). Detection of *Helicobacter pylori* in Various Types of Vegetables and Salads. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.5812/jjm.10013>
- Bastyns, K., Cartuyvels, D., Chapelle, S., Vandamme, P., Goossens, H., & De Wachter, R. (1995). A Variable 23S rDNA Region is a Useful Discriminating Target for Genus-Specific and Species-Specific PCR Amplification in *Arcobacter* Species. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(3), 353-356.  
[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80427-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80427-3)
- Bode, G., Mauch, F., & Malfertheiner, P. (1993). The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiology & Infection*, 111(3), 483-490.  
<https://doi.org/10.1017/S0950268800057216>
- Brightwell, G., Mowat, E., Clemens, R., Boerema, J., Pulford, D. J., & On, S. L. (2007). Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*. *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), 318-325. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.09.008>

- Buchanan, R. L., Anderson, W., Anelich, L., Cordier, J. L., Dewanti-Hariyadi, R., Ross, T., & Zwietering, M. H. (2018). *Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management*. Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68460-4>
- Bunn, J. E. G., MacKay, W. G., Thomas, J. E., Reid, D. C., & Weaver, L. T. (2002). Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: Implications for transmission in early life. *Letters in Applied Microbiology*, *34*(6), 450-454. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01122.x>
- Campbell, B. J., Engel, A. S., Porter, M. L., & Takai, K. (2006). The versatile  $\epsilon$ -proteobacteria: Key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology*, *4*(6), 458-468. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1414>
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2008). Presence of *Arcobacter* spp. In environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environmental Microbiology*, *10*(6), 1635-1640. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01555.x>
- Collado, L., Kasimir, G., Perez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., Huguet, J. M., & Figueras, M. J. (2010). Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. Along the Llobregat River catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant. *Water Research*, *44*(12), 3696-3702. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.04.002>
- D, O. J. (2005). The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *Journal of Microbiology*, *43*(spc1), 93-100.
- Denis, M., Refrégier-Petton, J., Laisney, M.-J., Ermel, G., & Salvat, G. (2001). *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. Coli*. *Journal of Applied Microbiology*, *91*(2), 255-267. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01380.x>

- Dent, J. C., & McNulty, C. A. M. (1988). Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7(4), 555-558. <https://doi.org/10.1007/BF01962615>
- Dunn, B. E., Cohen, H., & Blaser, M. J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clinical microbiology reviews*, 10(4), 720-741.
- Eppinger, M., Baar, C., Raddatz, G., Huson, D. H., & Schuster, S. C. (2004). Comparative analysis of four *Campylobacterales*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(11), 872-885. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1024>
- Factors Related to Helicobacter pylori Prevalence in an Adult Population in Brazil—Zaterka—2007—Helicobacter—Wiley Online Library*. (s. f.). Recuperado 1 de julio de 2021, de [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1523-5378.2007.00474.x?casa\\_token=Wf4ky9Jelh0AAAAA%3ACAwxPWBKL6u2FUpn862AHBQ15WaJmdC9k57SoRj\\_Ezsx27\\_qaqf2DzPhWTEKIHSUP5eW8TETFktS5Gw](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1523-5378.2007.00474.x?casa_token=Wf4ky9Jelh0AAAAA%3ACAwxPWBKL6u2FUpn862AHBQ15WaJmdC9k57SoRj_Ezsx27_qaqf2DzPhWTEKIHSUP5eW8TETFktS5Gw)
- Fließbach, A., Oberholzer, H.-R., Gunst, L., & Mäder, P. (2007). Soil organic matter and biological soil quality indicators after 21 years of organic and conventional farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 118(1), 273-284. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.05.022>
- Fujimura, S., Kato, S., & Watanabe, A. 2008. (s. f.). Water source as a *Helicobacter pylori* transmission route: A 3-year follow-up study of Japanese children living in a unique district. *Journal of Medical Microbiology*, 57(7), 909-910. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47683-0>
- Gomiero, T., Pimentel, D., & Paoletti, M. G. (2011). Environmental Impact of Different Agricultural Management Practices: Conventional vs. Organic Agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(1-2), 95-124. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.554355>
- González, A., Bayas Morejón, I. F., & Ferrús, M. A. (2017). Isolation, molecular identification and quinolone-susceptibility testing of *Arcobacter* spp. Isolated

from fresh vegetables in Spain. *Food Microbiology*, 65, 279-283.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.011>

González, A., & Ferrús, M. A. (2011). Study of *Arcobacter* spp. Contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 311-314.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.018>

González, N., Marquès, M., Nadal, M., & Domingo, J. L. (2019). Occurrence of environmental pollutants in foodstuffs: A review of organic vs. conventional food. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 370-375.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.021>

GOODMAN, K. J., & CORREA, P. (1995). The Transmission of *Helicobacter pylori*. A Critical Review of the Evidence. *International Journal of Epidemiology*, 24(5), 875-887. <https://doi.org/10.1093/ije/24.5.875>

Gupta, R. S. (2006). Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (Campylobacterales). *BMC Genomics*, 7(1), 167. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-167>

Hausdorf, L., Fröhling, A., Schlüter, O., & Klocke, M. (2011). Analysis of the bacterial community within carrot wash water. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(5), 447-452. <https://doi.org/10.1139/w11-013>

Hausdorf, L., Neumann, M., Bergmann, I., Sobiella, K., Mundt, K., Fröhling, A., Schlüter, O., & Klocke, M. (2013). Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp. In a spinach-processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(4), 235-243. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.02.003>

Hemmatinezhad, B., Momtaz, H., & Rahimi, E. (2016). *VacA*, *cagA*, *iceA* and *oipA* genotypes status and antimicrobial resistance properties of *Helicobacter pylori* isolated from various types of ready to eat foods. *Annals of Clinical*

- Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0115-z>
- Herrero, R., Park, J. Y., & Forman, D. (2014). The fight against gastric cancer – the IARC Working Group report. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 28(6), 1107-1114. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.10.003>
- Hsu, T.-T. D., & Lee, J. (2015). Global Distribution and Prevalence of Arcobacter in Food and Water. *Zoonoses and Public Health*, 62(8), 579-589. <https://doi.org/10.1111/zph.12215>
- Huber, M., Rembiałkowska, E., Średnicka, D., Bügel, S., & Vijver, L. P. L. van de. (2011). Organic food and impact on human health: Assessing the status quo and prospects of research. *NJAS: Wageningen Journal of Life Sciences*, 58(3-4), 103-109. <https://doi.org/10.1016/j.njas.2011.01.004>
- Hurtado-Barroso, S., Tresserra-Rimbau, A., Vallverdú-Queralt, A., & Lamuela-Raventós, R. M. (2019). Organic food and the impact on human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(4), 704-714. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1394815>
- JOHNSON, L. G., & MURANO, E. A. (1999). Comparison of Three Protocols for the Isolation of Arcobacter from Poultry. *Journal of Food Protection*, 62(6), 610-614. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.6.610>
- Kayman, T., Abay, S., Hizlisoy, H., Atabay, H. İ., Diker, K. S., & Aydin, F. 2012. (s. f.). Emerging pathogen Arcobacter spp. in acute gastroenteritis: Molecular identification, antibiotic susceptibilities and genotyping of the isolated arcobacters. *Journal of Medical Microbiology*, 61(10), 1439-1444. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.044594-0>
- Kim, N. H., Park, S. M., Kim, H. W., Cho, T. J., Kim, S. H., Choi, C., & Rhee, M. S. (2019). Prevalence of pathogenic Arcobacter species in South Korea: Comparison of two protocols for isolating the bacteria from foods and

- examination of nine putative virulence genes. *Food Microbiology*, 78, 18-24.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.008>
- Lau, P. P., DeBrunner-Vossbrinck, B., Dunn, B., Miotto, K., MacDonell, M. T., Rollins, D. M., Pillidge, C. J., Hespell, R. B., Colwell, R. R., Sogin, M. L., & Fox, G. E. (1987). Phylogenetic Diversity and Position of the Genus *Campylobacter*. *Systematic and Applied Microbiology*, 9(3), 231-238.  
[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(87\)80027-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(87)80027-9)
- Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Teng, J. L. L., Leung, K. W., & Yuen, K. Y. (2002). Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Molecular Pathology*, 55(3), 182-185.
- Lee, C., Agidi, S., Marion, J. W., & Lee, J. (2012). *Arcobacter* in Lake Erie Beach Waters: An Emerging Gastrointestinal Pathogen Linked with Human-Associated Fecal Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5511-5519. <https://doi.org/10.1128/AEM.08009-11>
- Lewerin, S. S., Sokolova, E., Wahlström, H., Lindström, G., Pers, C., Strömqvist, J., & Sörén, K. (2019). Potential infection of grazing cattle via contaminated water: A theoretical modelling approach. *Animal*, 13(9), 2052-2059.  
<https://doi.org/10.1017/S1751731118003415>
- Lu, Y., Redlinger, T. E., Avitia, R., Galindo, A., & Goodman, K. (2002). Isolation and Genotyping of *Helicobacter pylori* from Untreated Municipal Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1436-1439.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1436-1439.2002>
- Mazari-Hiriart, M., Ponce-de-León, S., López-Vidal, Y., Islas-Macías, P., Amieva-Fernández, R. I., & Quiñones-Falconi, F. (2008). Microbiological Implications of Periurban Agriculture and Water Reuse in Mexico City. *PLOS ONE*, 3(5), e2305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002305>

- Merga, J. Y., Leatherbarrow, A. J. H., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C. A., Miller, W. G., & Williams, N. J. (2011). Comparison of Arcobacter Isolation Methods, and Diversity of Arcobacter spp. In Cheshire, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1646-1650.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01964-10>
- Morejón, I. F. B., González, A., & Ferrús, M. A. (2017). Detection, Identification, and Antimicrobial Susceptibility of Arcobacter spp. Isolated from Shellfish in Spain. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(4), 238-243.  
<https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2202>
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Ferrús, M. A., Hernández, M., & Hernández, J. (2003). Specific Detection of Arcobacter and Campylobacter Strains in Water and Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1181-1186.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1181-1186.2003>
- Moreno-Mesonero, L., Hortelano, I., Moreno, Y., & Ferrús, M. A. (2020). Evidence of viable Helicobacter pylori and other bacteria of public health interest associated with free-living amoebae in lettuce samples by next generation sequencing and other molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 318, 108477. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108477>
- Mottola, A., Bonerba, E., Bozzo, G., Marchetti, P., Celano, G. V., Colao, V., Terio, V., Tantillo, G., Figueras, M. J., & Di Pinto, A. (2016). Occurrence of emerging food-borne pathogenic Arcobacter spp. Isolated from pre-cut (ready-to-eat) vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 236, 33-37.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.012>
- Mottola, A., Ciccarese, G., Sinisi, C., Savarino, A. E., Marchetti, P., Terio, V., Tantillo, G., Barrasso, R., & Di Pinto, A. (2021). Occurrence and characterization of Arcobacter spp. From ready-to-eat vegetables produced in Southern Italy.

*Italian Journal of Food Safety*, 10(1), 8585.

<https://doi.org/10.4081/ijfs.2021.8585>

Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Hirayama, H., Nunoura, T., Horikoshi, K., & Sako, Y. (2005). Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-Proteobacteria in a deep-sea hydrothermal field. *Environmental Microbiology*, 7(10), 1619-1632. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00856.x>

Ng, C. G., Loke, M. F., Goh, K. L., Vadivelu, J., & Ho, B. (2017). Biofilm formation enhances *Helicobacter pylori* survivability in vegetables. *Food Microbiology*, 62, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.010>

Nilsson, H.-O., Blom, J., Al-Soud, W. A., Ljungh, Å., Andersen, L. P., & Wadström, T. (2002). Effect of Cold Starvation, Acid Stress, and Nutrients on Metabolic Activity of *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 11-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.11-19.2002>

Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2018). Revisiting the Taxonomy of the Genus *Arcobacter*: Getting Order From the Chaos. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02077>

Quaglia, N. C., & Dambrosio, A. (2018). *Helicobacter pylori*: A foodborne pathogen? *World Journal of Gastroenterology*, 24(31), 3472-3487. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i31.3472>

Rahimi, E. (2014). Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran. *British Poultry Science*, 55(2), 174-180. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.878783>

Reganold, J. P., & Wachter, J. M. (2016). Organic agriculture in the twenty-first century. *Nature Plants*, 2(2), 1-8. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.221>

Salas-Massó, N., Linh, Q. T., Chin, W. H., Wolff, A., Andree, K. B., Furones, M. D., Figueras, M. J., & Bang, D. D. (2019). The Use of a DNA-Intercalating Dye for



- Quantitative Detection of Viable *Arcobacter* spp. Cells (v-qPCR) in Shellfish. *Frontiers in Microbiology*, 10, 368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00368>
- Santiago, P., Moreno, Y., & Ferrús, M. A. (2015). Identification of Viable *Helicobacter pylori* in Drinking Water Supplies by Cultural and Molecular Techniques. *Helicobacter*, 20(4), 252-259. <https://doi.org/10.1111/hel.12205>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- SHAH, A. H., SALEHA, A. A., MURUGAIYAH, M., ZUNITA, Z., & MEMON, A. A. (2012). Prevalence and Distribution of *Arcobacter* spp. In Raw Milk and Retail Raw Beef. *Journal of Food Protection*, 75(8), 1474-1478. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-487>
- Šilha, D., Vacková, B., & Šilhová, L. (2019). Occurrence of virulence-associated genes in *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from foodstuff, water, and clinical samples within the Czech Republic. *Folia Microbiologica*, 64(1), 25-31. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0628-x>
- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., & Dooley, J. S. G. (2006). Under the Microscope: *Arcobacter*. *Letters in Applied Microbiology*, 42(1), 7-14. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01841.x>
- Tao, C., Li, R., Xiong, W., Shen, Z., Liu, S., Wang, B., Ruan, Y., Geisen, S., Shen, Q., & Kowalchuk, G. A. (2020). Bio-organic fertilizers stimulate indigenous soil *Pseudomonas* populations to enhance plant disease suppression. *Microbiome*, 8(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00892-z>
- Twing, K. I., Kirchman, D. L., & Campbell, B. J. (2011). Temporal study of *Helicobacter pylori* presence in coastal freshwater, estuary and marine waters. *Water Research*, 45(4), 1897-1905. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.12.013>
- Velázquez, M., & Feirtag, J. M. (1999). *Helicobacter pylori*: Characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods

- and water. *International Journal of Food Microbiology*, 53(2), 95-104.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00160-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00160-9)
- Vesga, F.-J., Moreno, Y., Ferrús, M. A., Campos, C., & Trespalacios, A. A. (2018). Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water treatment plants in Bogotá, Colombia, using cultural and molecular techniques. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(4), 595-601.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.04.010>
- Waage, A. S., Vardund, T., Lund, V., & Kapperud, G. (1999). Detection of Small Numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Cells in Environmental Water, Sewage, and Food Samples by a Seminested PCR Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1636-1643.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.65.4.1636-1643.1999>
- Wesley, I. V., & Miller, W. G. (2010). *Arcobacter*: An Opportunistic Human Food-Borne Pathogen? En *Emerging Infections* 9 (pp. 185-212). John Wiley & Sons, Ltd.  
<https://doi.org/10.1128/9781555816803.ch9>
- Wier, M., & Calverley, C. (2002). Market potential for organic foods in Europe. *British Food Journal*, 104(1), 45-62. <https://doi.org/10.1108/00070700210418749>
- Yahaghi, E., Khamesipour, F., Mashayekhi, F., Safarpour Dehkordi, F., Sakhaei, M. H., Masoudimanesh, M., & Khameneie, M. K. (2014). *Helicobacter pylori* in Vegetables and Salads: Genotyping and Antimicrobial Resistance Properties. *BioMed Research International*, 2014, e757941.  
<https://doi.org/10.1155/2014/757941>