



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Identificación de patógenos emergentes en FLA
procedentes de vegetales orgánicos mediante DVC-FISH

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Esteban Sanjusto, Alejandro

Tutor/a: García Hernández, Jorge

Cotutor/a externo: MORENO TRIGOS, M^a YOLANDA

Director/a Experimental: MORENO MESONERO, LAURA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

TITLE:

Identification of emerging pathogens in FLA from organic vegetables by DVC-FISH.

ABSTRACT:

Currently organic vegetables consumption presents a growing trend, due to higher concern about environment. However, as chemical fertilizers, herbicides and pesticides are not used, this type of cultivation may carry an associated risk due to the possible presence of certain organisms, such as free-living amoebae (FLA). These protozoa can act as reservoirs of alive microorganisms, some of which may be human pathogens. Conventional microbiological techniques such as culture allow the detection of microorganisms, but they result not very specific, and occasionally, organisms can adopt the viable non-culturable state (VBNC) and cannot be detected by this method. For this reason, analysing the internal content of this dangerous amoeba was decided through the molecular technique of DVC-FISH, that allows the detection of viable bacterial forms due to preincubation in DVC medium (it promotes cell growth, but it does not permit cell division) combined with the fluorescent in situ hybridization (FISH) technique that uses specific fluorescent probes. This method allows to differentiate the genus or even the bacterial specie that wants to be identified and it enables to confirm their viability.

Organic vegetable and fruit samples were studied in order to firstly, qualitatively establish the presence of FLA, and subsequently, determining the presence and viability of bacteria from the genus of *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Listeria* and *Helicobacter* as a part of isolated FLA microbiome from the organic vegetables mentioned.

A total of 35 representative samples of organic vegetables and strawberries were processed from the 'ECOFOOD' project. In all samples FLA were recovered by culture (100%). Results of DVC-FISH indicated the presence of viable cells of *Pseudomonas* spp. in 88,57% of the samples and *Salmonella* spp. in 2,86% of samples as part of microbiome isolated from FLA. In contrast, neither *Helicobacter* spp. nor *Listeria monocytogenes* was detected. The presence of certain internalized bacteria of interest for public health indicates that FLA are possible vehicles for the transmission of pathogens, offering them protection and favouring their dissemination.

Key words: Free Living amoeba (FLA); food safety; DVC-FISH; organic food; bacterial pathogens.

Author: Alejandro Esteban Sanjusto

Academic tutor: Jorge García Hernández

Tutors: Yolanda Moreno Trigos; Laura Moreno Mesonero

Valencia, September 2022

TÍTULO:

Identificación de patógenos emergentes en FLA procedentes de vegetales orgánicos mediante DVC-FISH.

RESUMEN:

Actualmente el consumo de vegetales orgánicos presenta una tendencia creciente, debido a una mayor preocupación por el medio ambiente. Sin embargo, al no utilizar fertilizantes, herbicidas o pesticidas químicos, este tipo de cultivos puede conllevar un riesgo asociado debido a la posible presencia de ciertos organismos como las amebas de vida libre (free-living amoebae, FLA). Estos protozoos pueden actuar como reservorios de microorganismos vivos, pudiendo ser algunos de estos, patógenos humanos. Las técnicas microbiológicas convencionales como el cultivo permiten la detección de microorganismos, pero resultan poco específicas, y, en ocasiones, los organismos pueden adoptar el estado viable no cultivable (VBNC), no pudiéndose detectar mediante este método. Por ese motivo, se decidió analizar el contenido bacteriano del interior de estas FLA por medio de la técnica molecular DVC-FISH, que permite la detección de formas bacterianas viables debido a la preincubación en el medio DVC (favorece el crecimiento, pero no permite la división celular) combinándose con la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) que emplea sondas fluorescentes específicas. Este método permite diferenciar el género o incluso la especie de las bacterias que se quieren identificar y además confirmar la viabilidad de estas.

Se analizaron diversas muestras de vegetales y frutas orgánicas para, en primer lugar, determinar cualitativamente la presencia de FLA, y posteriormente, detectar la presencia y viabilidad de bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Listeria* y *Helicobacter* como parte del microbioma de las FLA aisladas de dichos vegetales y frutas orgánicas.

Se procesaron un total de 35 muestras representativas de vegetales y fresas ecológicas, pertenecientes al proyecto 'ECOFOOD'. En todas las muestras se recuperaron FLA por cultivo (100%). Los resultados del DVC-FISH indicaron la presencia de células viables de *Pseudomonas* spp. en un 88,57% de las muestras y, de *Salmonella* spp. en un 2,86% de las muestras como parte del microbioma de las FLA aisladas. En cambio, no se detectó *Helicobacter* spp., ni *Listeria monocytogenes*. La presencia de ciertas bacterias internalizadas de interés para la salud pública, indica que las FLA son posibles vehículos de transmisión de patógenos, ofreciéndoles protección y favoreciendo su diseminación.

Palabras claves: amebas de vida libre (FLA), seguridad alimentaria, DVC-FISH, alimentos orgánicos, bacterias patógenas.

Autor: Alejandro Esteban Sanjusto

Tutor académico: Jorge García Hernández

Tutoras: Yolanda Moreno Trigos; Laura Moreno Mesonero

Valencia, septiembre 2022

TÍTOL:

Identificació de patògens emergents en FLA procedents de vegetals orgànics mitjançant DVC-FISH.

RESUMEN:

Actualment el consum de vegetals orgànics presenta una tendència creixent, a causa d'una major preocupació pel medi ambient. No obstant, al no utilitzar fertilitzants, herbicides o pesticides químics, aquest tipus de cultius poden comportar un risc associat per la possible presència de certs organismes com les amebes de vida lliure (free-living amoebae, FLA). Aquests protozoos poden actuar com reservoris de microorganismes vius, podent ser alguns d'aquests, patògens humans. Les tècniques microbiològiques convencionals com el cultiu permeten la detecció de microorganismes, però resulten poc específiques i, en ocasions, els organismes poden adaptar l'estat viable però no cultivable (VBNC), no podent-se detectar mitjançant aquest mètode. Per aquest motiu, es va decidir analitzar el contingut bacterià del interior d'aquestes FLA per mig de la tècnica molecular DVC-FISH, que possibilita la detecció de formes bacterianes viables a causa de preincubar-se en el medi DVC (afavoreix el creixement, però no la divisió cel·lular) i es combina amb la tècnica d'hibridació fluorescent *in situ* (FISH) que utilitza sondes fluorescents específiques. Aquest mètode permet diferenciar el gènere o inclòs l'espècie de les bactèries que es volen identificar i a més, confirmar la viabilitat d'aquestes.

S'analitzaren diverses mostres de vegetals i fruites orgànics, per a, en primer lloc, determinar qualitativament la presència de FLA i posteriorment, detectar la presència i viabilitat de bactèries dels generes *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Listeria* i *Helicobacter* com a part del microbioma de les FLA aïllades dels mencionats vegetals i fruites orgànics.

Es processaren un total de 35 mostres representatives de vegetals i freses ecològiques pertanyents al projecte 'ECOFOOD'. En totes les mostres es van recuperar FLA per cultiu (100%). Els resultats del DVC-FISH indicaren la presència de cèl·lules viables de *Pseudomonas* spp. en un 88,57% de las mostres i de *Salmonella* spp. en un 2,86% de les mostres com a part del microbioma de les FLA aïllades. En canvi, no es va detectar *Helicobacter* spp., ni *Listeria monocytogenes*. La presència de determinades bactèries internalitzades d'interès per a la salut pública indica que les FLA son possibles vehicles de transmissió de patògens, oferint-los protecció i facilitant la seua disseminació.

Paraules claus: amebes de vida lliure (FLA), seguretat alimentària, DVC-FISH, aliments orgànics, bactèries patògenes.

Autor: Alejandro Esteban Sanjusto

Tutor acadèmic: Jorge García Hernández

Tutores: Yolanda Moreno Trigós; Laura Moreno Mesonero

València, setembre 2022

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho posible que realizara este trabajo. En primer lugar, a Jorge, Yolanda y Laura por haberme dado la oportunidad, haberme guiado y ayudado durante esta etapa. Gracias también a José Luis, Inma y Lara por acogerme y por los ánimos dados en todo momento.

También doy las gracias a Jan y Fanny por su colaboración en el laboratorio y por alegrarme todos los días.

Gracias también a mi familia por el apoyo recibido y a mis amigos por haberme acompañado en los malos y buenos momentos de la carrera. Sobre todo, gracias a Lucía porque sin ti no hubiera sido posible.

Gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	1
1.1. Agricultura ecológica.....	1
1.2. Contaminación y seguridad alimentaria	2
1.3. Riesgos microbiológicos de los alimentos vegetales.....	2
1.4. Amebas de vida libre (FLA).....	3
1.4.1. Relación bacterias-FLA	4
1.5. Métodos para la detección e identificación de organismos	7
1.5.1. Identificación de bacterias mediante DVC-FISH.....	7
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1. Procedencia de las muestras.....	8
3.2. Procesado de las muestras.....	8
3.3. Eliminación de las bacterias no internalizadas.....	9
3.4. Incubación DVC y fijación de las bacterias internalizadas.	9
3.5. Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1. Procesado de muestras	12
4.2. Cultivo de FLA.....	12
4.3. Presencia y viabilidad de patógenos emergentes del interior de FLA	14
5. CONCLUSIONES	19
6. BIBLIOGRAFIA.....	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evolución del consumo interior en España desde 2012 hasta 2020 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021).	1
Tabla 2. Diversidad de amebas de vida libre (FLA) ambientales infectadas naturalmente con microorganismos resistentes a amebas (ARM) patógenos aislados del sistema de agua potable tratada (Tabla adaptada de Thomas & Ashbolt, 2011).	5
Tabla 3. Controles positivos empleados en el DVC-FISH (Conteo Directo Viable combinado con la Hibridación Fluorescente <i>In Situ</i>).	11
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados como sondas en DVC-FISH (Conteo Directo Viable combinado con la Hibridación Fluorescente <i>In Situ</i>).	11
Tabla 5. Resultados del DCV-FISH (Conteo Directo Viable combinado con la Hibridación Fluorescente <i>In Situ</i>).	16
Tabla 6. Resultados de cada muestra con la presencia de células bacterianas viables.	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estados de desarrollo de las amebas de vida libre (FLA). (A) El estado trofozoíto, en su forma metabólicamente activa; (B) En estado de quiste, en su forma metabólicamente inactiva (Greub et al., 2004).	4
Figura 2. Representación de los diferentes mecanismos de supervivencia de las bacterias después de ser ingeridas por amebas de vida libre (FLA). (A) Captación de una célula bacteriana. (B) Supervivencia de una célula bacteriana en un protozoo. (C) Supervivencia y multiplicación de bacterias en un protozoo. (D) Multiplicación y liberación de bacterias después de la lisis del protozoo. (E) Liberación de bacterias a través de vesículas expulsadas o gránulos fecales. (F) Supervivencia de bacterias en quistes o paredes de quistes (Adaptado de Vaerewijck et al., 2014).	6
Figura 3. Fotografías en microscopio de contraste de fases (40x). FLA aisladas de muestras de vegetales orgánicos. Las flechas negras señalan las amebas de vida libre (FLA) en forma de quiste, mientras que la flecha azul indica la FLA en forma de trofozoíto.	13
Figura 4. Imágenes tomadas desde el microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 en una magnificación de 40X. Las figuras A1 y A2 muestran <i>Pseudomonas fluorescens</i> hibridada con la sonda específica para <i>Pseudomonas</i> spp. y con la sonda EUB, respectivamente. Las figuras B1 y B2 muestran <i>Listeria monocytogenes</i> hibridada con la sonda específica para <i>L. monocytogenes</i> y con la sonda EUB, respectivamente. Las figuras C1 y C2 muestran <i>Salmonella typhimurium</i> hibridada con la sonda específica para <i>Salmonella</i> spp. y con la sonda EUB, respectivamente. Las figuras D1 y D2 muestran <i>H. pylori</i> hibridada con la sonda específica de <i>Helicobacter</i> spp. y con la sonda EUB, respectivamente.	15
Figura 5. Imágenes tomadas de una muestra positiva en <i>Pseudomonas</i> spp. desde el microscopio de fluorescencia (Olympus) a una magnificación de 40X. A) Detección de la sonda específica roja de <i>Pseudomonas</i> spp. B) Detección de la sonda universal EUB verde.	16
Figura 6. Imágenes tomadas de la única muestra positiva en <i>Salmonella</i> spp. viable desde el microscopio de fluorescencia (Olympus) a una magnificación de 40X. A) Detección de la sonda específica roja de <i>Salmonella</i> spp. B) Detección de la sonda universal EUB verde.	17

ABREVIATURAS

ARB: Bacterias resistentes a las amebas (Amoeba-Resistant Bacteria)

CAMPY: Agar selectivo de *Campylobacter* (*Campylobacter* Selective Agar)

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)

FBS: Suero fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)

FLA: Amebas de vida libre (Free-Living Amoebae)

g: Gramo

g/l: gramo por litro

l: Litro

LNA: Locked Nucleic Acid

mg: Miligramo

ml: Mililitro

mM: Milimolar

M: Molar

NNA: Agar no nutritivo (Non-Nutrient Agar)

NNAP: Agar no nutritivo con solución Page (Non-Nutrient Agar Page)

PBA: Agar sangre piruvato (Pyruvate Blood Agar)

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)

PCA: Agar de recuento de bacterias (Plate Count Agar)

PFA: Paraformaldehído

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecil Sulfato De Sodio (Sodium Dodecyl Sulfate)

UE: Unión Europea

μl: Microlitro

°C: Grados Celsius

%: Tanto por ciento

1.INTRODUCCION

1.1. Agricultura ecológica

La agricultura ecológica u orgánica tiene como objetivo la obtención de alimentos de óptima calidad, libres de residuos, minimizando el impacto humano en el medio. Esta promueve, entre otros aspectos, el uso responsable de la energía y los recursos naturales, el mantenimiento de la biodiversidad, al igual que mejorar la fertilidad de suelo y mantener la calidad del agua (European Comission website, 2018). En cambio, la agricultura convencional se conoce como una agricultura intensiva que busca la máxima productividad mediante el uso de fertilizantes químicos y pesticidas sintéticos (Morgan & Murdoch, 2000).

Actualmente, la agricultura ecológica está en aumento a causa del interés creciente de los consumidores por el mercado de alimentos orgánicos preocupados por su salud y la del medio ambiente (Hugner *et al.*,2007; Padel & Foster, 2005).

Durante la última década, la superficie ecológica en la UE ha aumentado unas 500.000 hectáreas por año. En España, en el año 2020, se produjo un aumento de la producción ecológica en más de 6 veces con respecto al año 2000 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020). Concretamente, la superficie dedicada a la producción ecológica consta de casi 2 millones y medio de hectáreas, ocupando así el segundo puesto de la lista de países con mayor superficie agrícola (Eurostat, 2022).

En referencia al consumo interno (Tabla 1), el gasto de los consumidores españoles en productos ecológicos ha crecido casi un 7% en 2020 respecto al año anterior, mientras que el porcentaje de gasto en alimentos ecológicos respecto al gasto total alimentario de España en dicho año creció un 10,3 % respecto a 2019. Si se compara con un periodo más amplio, como el periodo 2015-2020, el crecimiento del gasto en productos ecológicos ha sido del 67,42%; incremento que es del 154,07% si tomamos un periodo de referencia más largo (2012-2020). Según las previsiones, este crecimiento continuado del sector ecológico de España no se detendrá (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021).

Tabla 1. Evolución del consumo interior en España desde 2012 hasta 2020 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021).

AÑOS	GASTO EN PRODUCTOS ECOLÓGICOS (MILLONES DE EUROS/AÑO)	POBLACIÓN ESPAÑOLA (MILLONES DE HABITANTES)	GASTO EN P. ECOLÓGICOS PER CÁPITA (EUROS)
2012	995	46,82	21,25
2013	1.020	46,73	21,83
2014	1.205	46,51	25,91
2015	1.510	46,45	32,51
2016	1.670	46,44	35,96
2017	1.960	46,55	42,11
2018	2.180	46,93	46,45
2019	2.363	46,94	50,34
2020	2.528	47,33	53,41
(%) 2020 s/2019	6,98%	0,83%	6,10%
(%) 2020 s/2012	154,07%	1,09%	151,33%

1.2. Contaminación y seguridad alimentaria

Como consecuencia del rápido crecimiento de la población humana, la demanda actual de alimentos seguirá aumentando en los próximos años. Sin embargo, las prácticas agrícolas intensivas no sostenibles ponen en riesgo la seguridad alimentaria, la economía y el medio ambiente en todo el mundo (Martínez-Castillo, 2016). A pesar de los avances de la ciencia y la tecnología, la contaminación de los alimentos y del agua siguen siendo actualmente un problema de la salud pública, siendo las enfermedades transmitidas por los alimentos quizás el problema sanitario más extendido contemporáneamente. Además, estas son responsables de una parte de la reducción de la productividad económica (OMS/FAO, 1984). Los agentes microbiológicos comprometen la salud, afectando un amplio espectro de respuestas adversas comprendidas desde indisposiciones leves hasta enfermedades que pueden llegar a ser mortales. Eso sí, solo una pequeña proporción de los casos llega al conocimiento de los servicios de salud y, los que se investigan son aún menos. Por tanto, se estima que en los países desarrollados se notifican únicamente alrededor del 10% de los casos, mientras que en los países en desarrollo los casos notificados probablemente no van más allá del 1% del total (Annalee & Kjellström, 1998; Forsythe, 2008). Por ejemplo, algunos patógenos como *Salmonella* spp. provenientes de alimentos, tanto de origen animal como vegetal, pueden causar salmonelosis e infecciones generalizadas (Ehuwa *et al.*, 2021); otros como *Escherichia coli* O157:H7 generan toxinas que pueden afectar gravemente a órganos susceptibles como riñón e hígado (Lim *et al.*, 2010).

Seguramente las enfermedades transmitidas por los alimentos se mantendrán con el tiempo, ya que se encontrarán nuevos riesgos debido a los cambios constantes de características de los microorganismos; cambios en metodologías, en el ambiente y ecología. Asimismo, la globalización, es decir, el comercio global de alimentos también pone en mayor peligro la seguridad alimentaria. De este modo, se necesitan medidas más fiables y en mayor número que aborden la seguridad alimentaria (Haveelar *et al.*, 2010).

Por estos motivos, en respuesta a esta problemática, en los últimos años, la sociedad se ha enfrentado a nuevos retos relacionados con el desarrollo de alternativas ecológicas, eficientes y sostenibles para satisfacer la creciente demanda de alimentos (Martínez-Castillo, 2016).

1.3. Riesgos microbiológicos de los alimentos vegetales

Hay una creencia generalizada de los consumidores de que los alimentos orgánicos son "más seguros" y "más saludables" que los alimentos convencionales, basándose en que las frutas y verduras orgánicas están libres de fertilizantes químicos y pesticidas sintéticos (Somasundram *et al.*, 2016). Pero, en términos científicos, la calidad microbiológica y la seguridad de los productos orgánicos siguen siendo controvertidas y debatidas (Magkos *et al.*, 2006). Es más, estudios anteriores han sugerido que prácticas utilizadas en la producción orgánica, como el uso de estiércol, pueden aumentar el riesgo de contaminación microbiológica, ya que pueden albergar patógenos que pueden persistir durante mucho tiempo en suelo y que se transmitan por los alimentos (Balali *et al.*, 2020; Hamilton *et al.*, 2020; Pell, 1997) como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* o *E. coli* O157:H7 (Johannessen *et al.*, 2004; McMahon & Wilson, 2001; Stephenson, 1997; Williams, 2002). Sin embargo, es difícil concluir que el consumo de productos orgánicos frescos confiere un mayor riesgo microbiológico que los alimentos convencionales análogos. Además del método de cultivo, la contaminación microbiana puede ocurrir durante la cosecha, el manejo posterior a la cosecha o en cualquier punto a lo largo de la cadena de suministro de alimentos (Beuchat & Ryu, 1997).

Las frutas y verduras, y en particular las que se consumen crudas, se reconocen cada vez más como vehículos importantes para la transmisión de patógenos humanos (Berger *et al.*, 2010). En la literatura se pueden encontrar varios ejemplos de ello, como en lechuga, calabacín, zanahorias, incluso en patata *in vitro* (Reina *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2016; Siggers *et al.*, 2008; Tyrell *et al.*, 2006; Vaerewijck *et al.*, 2014). Una de las fuentes de contaminación más importantes es el agua de riego, normalmente contaminada por contacto con materia fecal o animal, ya que los microorganismos pueden mantener su viabilidad durante un largo periodo de tiempo en ella (Banach & van der Fels-Klerx, 2020; Pachepsky *et al.*, 2011; Toze, 1999). Otras fuentes podrían ser el estiércol, anteriormente mencionado, y el suelo (Tyrell *et al.*, 2006).

Hay diversos tipos de microorganismos que pueden sobrevivir en numerosos ecosistemas adaptándose a las distintas condiciones, pudiendo suponer un problema para la salud. Destaca la presencia de protozoos en vegetales frescos que pueden ocasionar enfermedades graves, como *Giardia duodenalis* (Rafael *et al.*, 2017) o *Toxoplasma gondii* tanto en alimentos orgánicos como inorgánicos (Lilly & Webster 2021; Marchioro *et al.*, 2016; Pinto-Ferreira *et al.*, 2020). Del mismo modo, se ha descrito la presencia FLA en estos ecosistemas (Greub & Raoult, 2004; Moreno *et al.*, 2018). Además de que algunas especies de FLA suponen un peligro para la salud pública, también pueden actuar como reservorios de bacterias patógenas que resisten la fagocitosis, ofreciendo así protección a las bacterias internalizadas frente a condiciones hostiles (Cateau *et al.*, 2014; Greub *et al.*, 2004). En la literatura hay ejemplos en los que se han detectado FLA en vegetales (Chavatte *et al.*, 2016; Vaerewijck *et al.*, 2011). Sin embargo, solamente hay un estudio de la relación entre bacterias internalizadas en FLA aisladas de vegetales procedentes de agricultura convencional, en el que se confirmaba la presencia de bacterias patógenas. Como *Helicobacter pylori* en estos protozoos (Moreno-Mesonero *et al.*, 2020).

1.4. Amebas de vida libre (FLA)

Las FLA son organismos unicelulares pertenecientes al reino de los protozoos que están distribuidas globalmente y se pueden encontrar en cualquier lugar que exista un hábitat o nicho adecuado, tanto en hábitats naturales como artificiales. Normalmente viven en las interfaces, como suelo-agua, agua-plantas, agua-animal, incluso dentro de animales. Se han descrito como parásitos facultativos heterótrofos, ya que se alimentan de bacterias, levaduras, hongos, algas y otros protozoos, y como patógenos oportunistas, ya que pueden causar infecciones en humanos (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Vaerewijck *et al.*, 2014; Zeybek *et al.*, 2010).

Las FLA se caracterizan por poseer pseudópodos (en griego: «falso pie»), que son extensiones citoplasmáticas transitorias usadas para el movimiento y alimentación. Sin embargo, existen FLA de tamaño reducido que se mueven como un todo sin presentar pseudópodos (Vaerewijck *et al.*, 2014).

En las últimas décadas, el interés por las FLA ha aumentado considerablemente debido a que juegan un papel importante como patógenos humanos, como reservorios y como vectores de otros microorganismos patógenos (Scheid, 2019). Entre todos los géneros de FLA que existen en la naturaleza, tan solo cuatro están asociados con enfermedades humanas: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia*. En concreto, el género *Acanthamoeba* tiene varias vías de entrada en el huésped susceptible: a través de los ojos puede causar queratitis amebiana (AK), a través de las fosas nasales produce encefalitis amebiana granulomatosa (GAE) y/o infección diseminada en individuos inmunocomprometidos, y a través de la piel produce GAE, infección diseminada o lesiones cutáneas en individuos inmunocomprometidos. *Balamuthia mandrillaris* también es capaz de producir una encefalitis similar a la GAE: encefalitis amebiana por

Balamuthia (BAE). Del mismo modo, *Sappinia* produce encefalitis amebiana por *Sappinia* (SAE). Por otro lado, *Naegleria fowleri* puede causar meningoencefalitis amebiana primaria (PAM), afectando al sistema nervioso central de individuos inmunocompetentes e inmunocomprometidos (Visvesvara *et al.*, 2007).

Las FLA presentan dos ciclos de vida distinguidos: el quiste (forma durmiente) y el trofozoíto (forma metabólicamente activa) (Figura 1). El trofozoíto es la etapa de la vida en la que la célula se alimenta y se multiplica. El enquistamiento (formación del quiste) conduce a un cambio en la morfología y fisiología del trofozoíto inducido por la falta de nutrientes, condiciones ambientales desfavorables o acumulación de ciertos metabolitos (Vaerewijck *et al.*, 2014). Si se compara el tamaño de ambos, el trofozoíto varía entre rangos de 15 μm a 25 μm , mientras que el quiste es más pequeño, con una media de tamaño de 10 μm (Liang *et al.*, 2010).

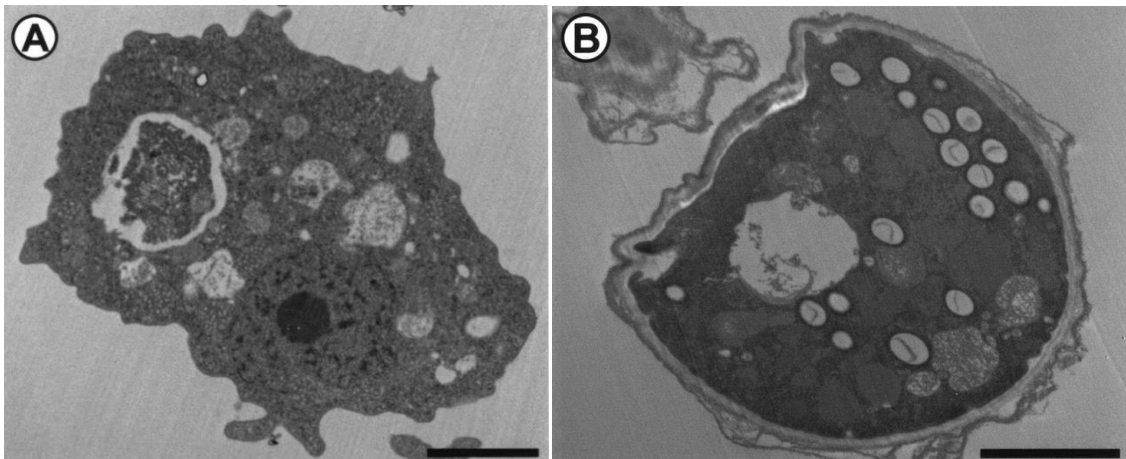


Figura 1. Estados de desarrollo de las amebas de vida libre (FLA). (A) El estado trofozoíto, en su forma metabólicamente activa; (B) En estado de quiste, en su forma metabólicamente inactiva (Greub *et al.*, 2004).

1.4.1. Relación bacterias-FLA

La asociación entre diversas especies bacterianas con las FLA es bastante común. Las FLA son capaces de establecer relaciones simbióticas con otros microorganismos, tales como bacterias, de forma neutral, mutualista (ambos individuos se benefician); simbiótica; comensalista (un individuo se beneficia y al otro no le afecta), o parasitaria (uno se beneficia y el otro se perjudica). El tipo de asociación no es estático y puede cambiar dependiendo de factores externos (por ejemplo, la temperatura y el agotamiento de los alimentos). Estas relaciones pueden llevar a la muerte de la ameba por la proliferación de los simbiositos en su interior, o que le confieran mayores probabilidades de sobrevivir (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Vaerewijck *et al.*, 2014).

Hay ciertas bacterias que tienen la capacidad de resistir a la digestión de FLA, por lo que se sugiere que también serían capaces de imitar esa función con macrófagos en el cuerpo humano, suponiendo una amenaza para la salud. Cuando las FLA presentan su forma activa, es decir, trofozoíto, toman bacterias como presas y otros microorganismos a través de la fagocitosis. Una vez dentro de las FLA, los microorganismos ingeridos generalmente se digieren en vacuolas ácidas, pero algunos son capaces de sobrevivir evitando la digestión. Los microorganismos con esta capacidad se denominan comúnmente como microorganismos resistentes a las amebas (ARM, amoebae-resisting microorganism) y cuando se hace referencia específicamente a las bacterias, se denominan bacterias resistentes a las amebas (ARB, amoebae-resisting bacteria) (Thomas & Ashbolt, 2011). Algunos ejemplos de ello se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Diversidad de amebas de vida libre (FLA) ambientales infectadas naturalmente con microorganismos resistentes a amebas (ARM) patógenos aislados del sistema de agua potable tratada (Tabla adaptada de Thomas & Ashbolt, 2011).

GÉNERO DE FLA	ESPECIES DE FLA	ARM	PROCEDENCIA MUESTRAS AGUA POTABLES
FLA ambiental	No identificada	<i>Flavobacterium indologines</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Sistema de distribución de agua
Acanthamoeba	<i>Acanthamoeba</i> spp. genotipo T4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Legionella</i> sp. <i>Neochlamydia</i> sp.	Sistema de distribución de agua Reservorios de sedimentos Grifo
Echinamoeba	<i>E. exundans</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> <i>Legionella londiniensis</i> <i>Legionella donaldsonii</i>	Planta de tratamiento de agua
Hartmannella	<i>H. vermiformis</i>	<i>Neochlamydia</i> sp. <i>Legionella pneumophila</i>	Planta de tratamiento de agua Grifo
Naegleria	<i>N. andersoni</i> <i>N. gruberi</i>	<i>Flavobacterium johnsoniae</i> <i>Legionella micdadei</i> <i>Legionella anisa</i>	Planta de tratamiento de agua
Vannella	<i>V. cirrifera</i>	Microsporidia like organism	Grifo

Después de ser internalizadas, las bacterias pueden sobrevivir de tres formas distintas: manteniendo su viabilidad sin multiplicarse (Figura 2B); multiplicándose dentro de la FLA sin romper su pared celular (Figura 2C); o multiplicándose dentro de la FLA rompiéndola (Figura 2D) (Thomas *et al.*, 2010) El ejemplo más estudiado de la interacción FLA-bacteria es el caso de *Legionella pneumophila*. Esta bacteria ha desarrollado un sistema complejo que le permite secuestrar a la vacuola fagocítica, evadiendo el camino endocítico disminuyendo la acidificación, estableciendo así un nicho intracelular seguro llamado *Legionella*-containing vacuole (LCV), permitiendo la replicación intracelular (Hoffmann *et al.*, 2014; Schulz & Horn, 2015; Strassmann & Shu, 2017). Las bacterias también tienen otros mecanismos que pueden emplear a su favor como la expulsión de toxinas, pigmentos tóxicos o alteraciones en la capa más externa de su pared celular (Barker y Brown, 1994).

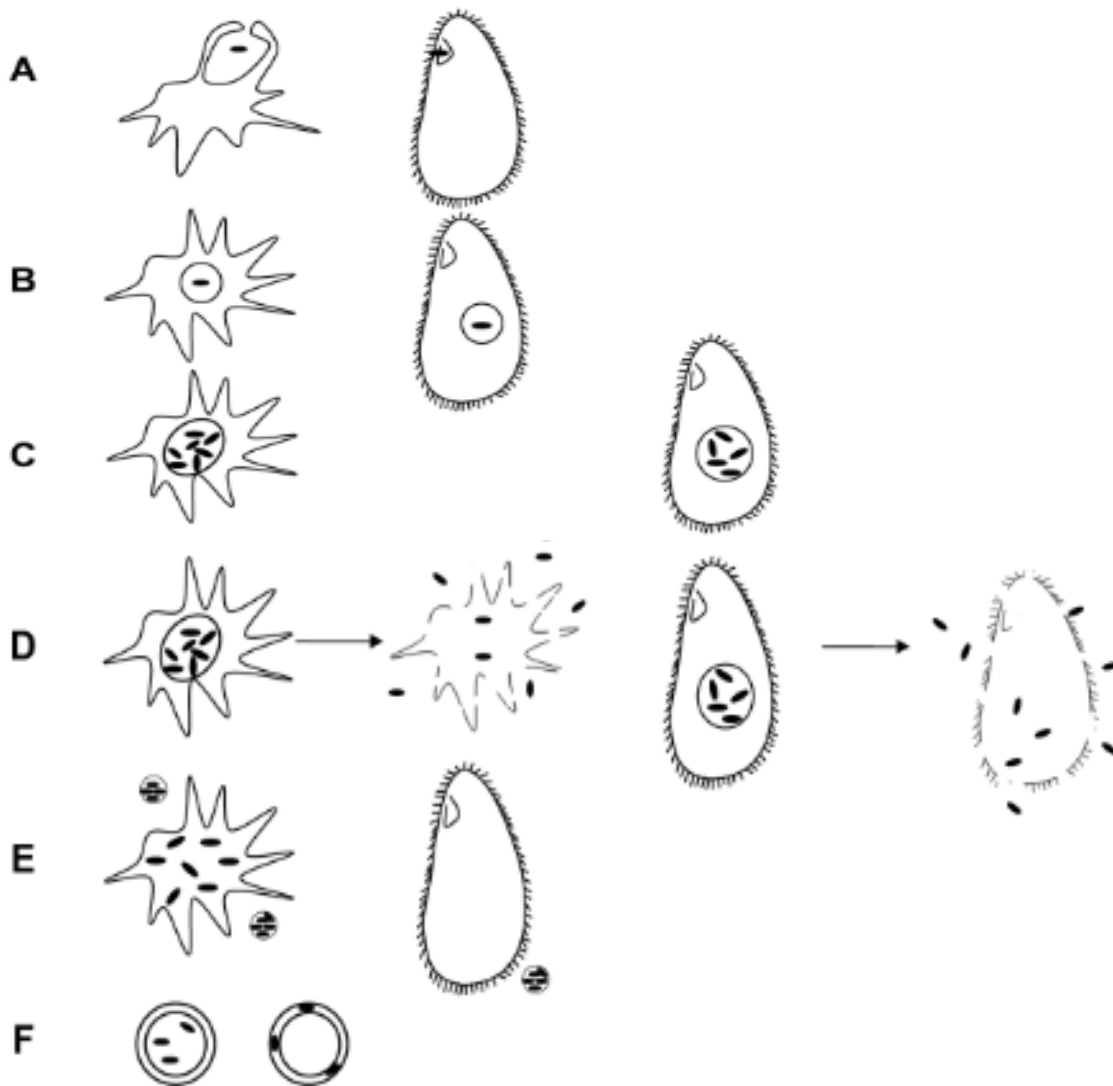


Figura 2. Representación de los diferentes mecanismos de supervivencia de las bacterias después de ser ingeridas por amebas de vida libre (FLA). (A) Captación de una célula bacteriana. (B) Supervivencia de una célula bacteriana en un protozoo. (C) Supervivencia y multiplicación de bacterias en un protozoo. (D) Multiplicación y liberación de bacterias después de la lisis del protozoo. (E) Liberación de bacterias a través de vesículas expulsadas o gránulos fecales. (F) Supervivencia de bacterias en quistes o paredes de quistes (Adaptado de Vaerewijck et al., 2014).

Por ese motivo, las FLA pueden actuar como “caballos de Troya”, evitando condiciones adversas para las bacterias internalizadas como, por ejemplo, el tratamiento con biocidas. Además de diversos estudios *in vitro* en los que se demuestra la internalización en las FLA de distintos géneros de bacterias, también se ha comprobado la internalización y/o viabilidad de diversas bacterias en las FLA en muestras ambientales, tales como *H. pylori* o *L. pneumophila* en agua residual y agua potable (Moreno-Mesonero et al., 2017). También se encontraron células de *Pseudomonas aeruginosa* viables en FLA procedentes del sistema de agua potable de un hospital (Michel et al., 1995). Del mismo modo, ambas bacterias, al igual que otras como *Salmonella* y *Pseudomonas*, se encontraron en muestras de vegetales, concretamente en lechugas (Moreno-Mesonero et al., 2020).

Como se ha comprobado, las FLA tienen un papel importante como vehículo de transmisión de bacterias patógenas. Por lo tanto, es preciso definir el microbioma que albergan estos protozoos en alimentos, especialmente en los que se consumen crudos, con el fin de comprobar si se trata de un peligro real para la salud pública.

1.5. Métodos para la detección e identificación de organismos

Actualmente, se sigue considerando el método de cultivo como “gold-standard” para detectar el crecimiento *in vitro* de microorganismos responsables de enfermedades transmitidas por alimentos. De hecho, normalmente la especificidad y sensibilidad de otros métodos de diagnóstico se comprueban comparándose con los resultados del método de cultivo (Sadeghi *et al.*, 2021).

Sin embargo, este método es muy laborioso, consume mucho tiempo y, a menudo, es inadecuado para la diferenciación de especies fenotípicamente similares. Estos límites son especialmente importantes desde el punto de vista del diagnóstico médico porque la identificación rápida y adecuada de los patógenos es un factor esencial en la implementación de la terapia adecuada. Además, la detección sistemática de la identificación de microorganismos también es un tema clave en áreas como la industria farmacéutica, el control de calidad de los alimentos y la investigación ambiental, donde es muy importante no tener un retraso temporal porque puede suponer un riesgo para la salud y seguridad (Buszewski *et al.*, 2017). Por ejemplo, para la identificación y cuantificación de *Legionella* spp. se puede tardar hasta 14 días para obtener unos resultados con poca reproducibilidad y poca sensibilidad (Collins *et al.*, 2015).

Como se ha dicho anteriormente, los microorganismos patógenos son normalmente identificados por métodos dependiente de cultivo. No obstante, muchas bacterias patógenas pueden entrar en un estado viable pero no cultivable (VBNC, Viable But Not Culturable en inglés) resultando en una infraestimación de células viables. Los patógenos VBNC están tomando relevancia debido a que pueden ser un riesgo potencial para la salud humana (Oliver, 2005). En el mundo de la agricultura, como en suelos y abonos, no abunda la literatura sobre patógenos fecales que entren en un estado VBNC, debido a la falta de métodos apropiados independientes de cultivo para detectar células viables en esos ambientes que contienen barro y materia orgánica. Por lo que, para solucionar estos inconvenientes la investigación se ha enfocado en desarrollar métodos alternativos para la identificación rápida e inequívoca de microorganismos directamente del material analizado independientemente de cultivo, como el método DVC-FISH. Este método, la detección directa de formas viables (DVC, Direct Viable Count en inglés) combinado con la técnica molecular de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, Fluorescent *In Situ* Hybridization en inglés) ha obtenido buenos resultados en identificar diversas bacterias como *Escherichia coli* en abono (Wu *et al.*, 2009); *Vibrio parahaemolyticus* en ostras y mejillones (García-Hernández *et al.*, 2021); o *Helicobacter* spp. en aguas de riego (Hortelano *et al.*, 2020), por lo que la combinación de ambos es un método prometedor.

1.5.1. Identificación de bacterias mediante DVC-FISH

El método de conteo directo (DVC, Direct Viable Count en inglés), está basado en la incubación de muestras en presencia de nutrientes y un agente inhibidor de la DNA-girasa. De ese modo, el antibiótico previene la división celular sin afectar a otras actividades metabólicas que tengan lugar en la célula. De esta forma, las células pueden seguir metabolizando nutrientes y elongarse y/o engrosarse después de la incubación. Las células viables pueden ser fácilmente diferenciadas de las no viables por su tamaño. Para mejorar la eficiencia de detección y métodos de enumeración, se emplea conjuntamente con la técnica molecular hibridación fluorescente *in situ* (FISH), que permite detectar grupos específicos de bacterias en poblaciones mixtas de microorganismos (Wu *et al.*, 2009).

Combinando estas dos técnicas, la incubación en un medio DVC, que provoca el aumento de los niveles de rRNA intracelular y la elongación y/o engrosamiento de las bacterias, pero impide su

división celular, con el método FISH, marcaje con sondas fluorescentes dirigido hacia secuencias del gen rRNA específicas, se obtiene un procedimiento útil que permite diferenciar células viables de no viables de un grupo específico de bacterias a partir de una población de microorganismos (Tirodimos *et al.*, 2014).

Este método ya se ha visto que ha obtenido buenos resultados en detectar células de *H. pylori* internalizadas en FLA, concretamente en *Acanthamoeba castellanii*, en un ensayo *in vitro* y también de la misma bacteria en FLA aisladas de muestras de agua potable y residual (Moreno-Mesonero *et al.*, 2016). Del mismo modo, este método ha tenido eficacia en identificar *Listeria monocytogenes* procedentes de muestras vegetales (Moreno *et al.*, 2012) y *H. pylori* de FLA procedentes de muestras vegetales (Moreno-Mesonero *et al.*, 2020). Por ello, la combinación de DVC con FISH se ha propuesto como una herramienta muy útil para el seguimiento de células viables en diferentes entornos.

2. OBJETIVOS

Como se ha afirmado anteriormente, la presencia y diversidad de las FLA no está muy estudiada en el sector alimentario, al igual que su microbioma. Por lo tanto, el objetivo principal del presente estudio es determinar la presencia y viabilidad de diversos géneros bacterianos pertenecientes al microbioma de FLA aisladas de alimentos ecológicos frescos para estudiar su potencial riesgo para la salud pública.

Para ello, se han planteado diversos objetivos específicos:

- Aislar FLA a partir de muestras de alimentos ecológicos frescos de distintos orígenes.
- Determinar la presencia y viabilidad de determinadas especies bacterianas potencialmente patógenas del microbioma de las FLA aisladas mediante el uso de la técnica molecular DVC-FISH.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Procedencia de las muestras

Las muestras del presente trabajo pertenecen al proyecto de investigación nacional “ECOFOOD” (PID2019-105691RB-I00), que está desarrollándose conjuntamente por investigadores del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) y el Departamento de Biotecnología de la Universitat Politècnica de València. Para el estudio, se compraron en distintas tiendas locales de Valencia un total de 25 vegetales y frutas ecológicos. Por otro lado, se tomaron 10 muestras de vegetales y frutas directamente de un huerto ecológico de la huerta de Valencia. En total se analizaron 35 muestras: 18 de col (*Brassica oleracea*), 11 de fresa (*Fragaria vesca*), 3 de espinaca (*Spinacia oleracea*) y 3 de lechuga (*Lactuca sativa* y *Chicorium intybus*).

3.2. Procesado de las muestras.

Para la preparación de las verduras (col, lechuga y espinaca), se seleccionaron muestras representativas de 50 g de las hojas intactas exteriores y se colocaron en una bolsa de Stomacher estéril. A las muestras se les añadieron 250 ml de solución salina de PAGE 1X (0.12 g NaCl; 0.004 g MgSO₄; 0.142 g Na₂HPO₄; 0.136 g KH₂PO₄; 0.004 g CaCl₂) y se procesaron y homogeneizaron en Stomacher (Mayo Homogenius HG 400) durante 1 minuto y a máxima velocidad.

Para la preparación de las fresas, se seleccionó la misma cantidad, 50 g, la cual se colocó igualmente en una bolsa de Stomacher, pero, en lugar de homogeneizarse en Stomacher, esta homogeneización se realizó en el agitador durante 5 minutos y a velocidad media.

Una vez realizado este paso, se filtraron los 250 ml de cada muestra, tanto para las verduras como para las fresas, a través de embudos de filtración y una bomba de vacío a través de membranas de nitrocelulosa Millipore con tamaño de poro de 1,2 μm . Una vez filtrado todo el volumen, la membrana de filtración se transfirió en condiciones estériles a placas Petri con medio non-nutrient agar PAGE (NNAP; 15 g/l agar bacteriológico (Scharlau, ref. 07-004-500) disuelto en medio PAGE 1X) anteriormente preparadas y esterilizadas. La superficie de la membrana que estaba en contacto con el líquido se colocó en contacto con el medio de cultivo. Tras 24 horas de incubación, se retiraron las membranas y las placas se mantuvieron en incubación a 28°C de 7 a 10 días, hasta que se observó crecimiento de las FLA.

Tras el periodo de incubación, se procedió a visualizar la presencia de FLA en las muestras a través de un microscopio de contraste de fases. En primer lugar, se añadieron 15 μl de PBS 1X (137 mM NaCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 2.7 mM KCl; 1.8 mM KH_2PO_4) estéril en un portaobjetos limpio. En segundo lugar, también en condiciones estériles, se rascó con un asa de siembra una pequeña porción de superficie del medio de cultivo y se frotó con el tampón PBS que se encontraba en el portaobjetos. En este, posteriormente, se añadió un cubreobjetos para visualizar en el microscopio. La observación se realizó empleando el objetivo de 40X.

3.3. Eliminación de las bacterias no internalizadas

Una vez confirmada la presencia de FLA se procedió a eliminar las bacterias no internalizadas en las mismas para estudiar su microbioma. En primer lugar, se añadieron 2 ml de PAGE 1X a las placas con presencia de FLA y se rascó con una espátula estéril la superficie del medio para recuperar el máximo número posible de FLA. A continuación, con una pipeta se recogieron los 2 ml y se distribuyeron en microtubos de 1.5 ml. Seguidamente se centrifugaron los tubos a 3.000 rpm durante 8 minutos para luego eliminar el sobrenadante y concentrar los pellets en un único microtubo, repitiendo posteriormente el mismo paso, hasta obtener un único pellet. Posteriormente se resuspendió el pellet en un volumen final de 1 ml de PAGE 1X que contenía una concentración de 100 ppm de hipoclorito de sodio (NaClO) con el objetivo de dañar las bacterias no internalizadas en las FLA. Las muestras se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante una hora. Seguidamente, se centrifugó cada microtubo a 3.000 rpm durante 8 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 600 μl de PBS 1X.

3.4. Incubación DVC y fijación de las bacterias internalizadas.

Después de la hora de incubación, tras haber eliminado las bacterias no internalizadas en las FLA se procedió al proceso de incubación en tres medios DVC distintos para la detección de células viables de *Listeria monocytogenes*; *Helicobacter* spp.; *Pseudomonas* spp. y *Salmonella* spp.

Para la detección de células de *L. monocytogenes* viables que forman parte del microbioma de FLA se añadieron 200 μl de cada muestra a 5 ml de medio DVC preparado para esta bacteria, el cual contenía 37 mg/ml de BHI (Brain Heart Infusion Broth en inglés) (Sigma Aldrich, ref. 53286) suplementado con 2.5 mg/ml de extracto de levadura (Condalab, ref. 1702) y como agente inhibidor de la división celular, 2 mg/ml de ciprofloxacina (Sigma Aldrich, ref. 17850) El cultivo se realizó durante 7 horas a 37°C (Besnard *et al.*, 2000).

Por otro lado, para identificar células de *Helicobacter* spp. viables internalizadas en FLA se añadieron 200 μl de cada muestra a 5 ml de medio DVC preparado para esta bacteria, el cual

incluía 28 g/l de Brucella Broth (Biolife italiana, ref. 4042742) suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (FBS, Fetal Bovine Serum en inglés) (Fischer Scientific, ref. 16141061) y como antibiótico 0.5 µg/ml de novobiocina (Sigma Aldrich, ref. 491207). El cultivo se realizó durante 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia, es decir, 5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂ (Piqueres *et al.*, 2006).

Por último, para la detección de células viables de *Pseudomonas* spp. y *Salmonella* spp. se añadieron 200 µl de cada muestra a 5 ml de medio DVC preparado para esta bacteria, el cual contenía 13 g/l de Lactose Broth (Merck, ref. 70142) suplementado con 2.5 g/l de extracto de levadura (Condalab, ref. 1702) y 40 µg/ml de ácido nalidíxico (Fisher Scientific, ref. 10373622) como antibiótico. El cultivo se realizó durante 18 horas a 37°C (Rengifo-Herrera *et al.*, 2013).

Una vez finalizado el periodo de incubación, las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 7.000 rpm, eliminando el sobrenadante. Se lavó con PBS 1X y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones, repitiendo este paso 2 veces, eliminando todos los posibles restos del cultivo. Una vez realizado este paso, se procedió a la fijación celular, que es diferente para bacterias gram positivas y gram negativas.

Por un lado, para las bacterias gram negativas, como *Helicobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Pseudomonas* spp., se procedió a resuspender el pellet en una proporción 1:3 de PBS 1X y PFA (250 µl de PBS 1X y 750 µl de PFA) y se incubaron durante 3 horas a 4°C. Pasadas las 3 horas, las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 7.000 rpm y se añadió posteriormente PBS 1X para eliminar los restos de PFA. Este paso de lavado se realizó dos veces. Finalmente, el pellet se resuspendió en proporciones 1:1 de PBS y etanol absoluto (500 µl de PBS 1X y 500 µl de etanol absoluto) y se guardó a -20 °C hasta que se llevó a cabo la hibridación. Por otro lado, para la bacteria gram positiva, es decir *L. monocytogenes*, directamente se resuspendió la muestra con una proporción de 1:1 de PBS y etanol absoluto (500 µl de PBS 1X y 500 µl de etanol absoluto) y se guardaron las muestras a -20 °C, omitiendo los pasos del tratamiento con PFA.

3.5. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Una vez fijadas las células, se procedió a la hibridación de las muestras. En primer lugar, se gelatinizaron los portaobjetos, con la finalidad de asegurar la retención de la muestra en los pocillos. Para preparar este tipo de portaobjetos, se calentó agua destilada a 60°C, se añadió gelatina bacteriológica al 0,1% y cromato de sulfato de potasio (KCr(SO₄)₂) al 0,01%, bajo agitación hasta su completa disolución. Se atemperó la solución a 35 °C y se sumergieron los portaobjetos recubiertos con teflón (politetrafluoroetileno). Finalmente se escurrieron y se dejaron secar.

Una vez listos los portaobjetos, se cargaron 5 µl de suspensión celular de cada muestra en un pocillo del portaobjetos gelatinizado, siempre dejando al menos un pocillo libre, donde se colocaba el control positivo. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron a 46°C durante 10 minutos. Tras este tiempo, se hicieron lavados sucesivos de 3 minutos en 3 frascos de etanol al 50, 80 y 100%, respectivamente. Pero, si en la muestra se pretendía observar una bacteria gram positiva como *Listeria*, antes de estos lavados se añadieron 10 µl de lisozima (50 mg/ml) y se incubó la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente con el posterior lavado de agua destilada.

Las cepas de referencia se incubaron en los caldos DVC y según las condiciones descritas para cada uno de los géneros y especies estudiados y se fijaron también conforme se ha descrito anteriormente para su posterior uso como controles positivos de la hibridación (Tabla 3).

Tabla 3. Controles positivos empleados en el DVC-FISH (Conteo Directo Viable combinado con la Hibridación Fluorescente In Situ).

CONTROLES	CONDICIONES DE CULTIVO
<i>Salmonella typhimurium</i> NCTC ^a 12117	Placas de PCA (20 g/l) 37°C 24h
<i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637	Placas de PBA (40g/l CAMPY, 10% sangre desfibrilada de caballo, 0.025% piruvato de sodio) 37°C 48h condiciones microaeróbicas
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CECT ^b 378	Placas de PCA (20 g/l) 37°C 24h
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935	Placas de PCA (20 g/l) 37°C 24h

^aNCTC: National Collection of Type Cultures (England)

^bCECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

Una vez seco el portaobjetos, cada uno de los pocillos se cubrió con 10 µl de tampón de hibridación al 30% de formamida (0,9M de NaCl, 0,01% SDS, 20 mM de Tris-HCl) que contenía 50 ng de la sonda específica para cada bacteria y otros 50 ng de la sonda EUB que hibrida con el género bacteria (Tabla 4), marcadas con el correspondiente fluorocromo para proveer una hibridación específica a los organismos objetivos. Todas las sondas hibridan con una región del gen 16S rRNA, excepto la sonda de *Salmonella* spp., que hibrida con una del gen 23S RNA. Las sondas fueron sintetizadas por la compañía TIB MOLBIOL. A continuación, el portaobjetos se introdujo en horizontal en un tubo de 50 ml, en el cual se había introducido previamente papel de celulosa humedecido con tampón de hibridación para crear una atmósfera húmeda. La reacción se llevó a cabo a 46°C durante 3 horas y en oscuridad según Moreno *et al.* (2001).

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados como sondas en DVC-FISH (Conteo Directo Viable combinado con la Hibridación Fluorescente In Situ).

SONDA	COLOR	SECUENCIA (5' - 3')	REFERENCIA
Sonda bacteriana universal EUB338 (EUB338-I, EUB338-II, EUB338-III)	Verde (FLUOS)	EUB338-I: GCT GCC TCC CGT AGG AGT EUB338-II: GCA GCC ACC CGT AGG TGT EUB338-III: GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Moreno-Mesonero <i>et al.</i> , 2016; Amann <i>et al.</i> , 1990
<i>Salmonella</i> spp. (SA23)	Rojo (CY3)	CAC TTC ACC TAC GTG TCA	Santiago <i>et al.</i> , 2018
<i>Pseudomonas</i> spp. (RYD208)	Rojo (CY3)	AAT CGC GCG AGG CCT TAC	Amann <i>et al.</i> , 1996
<i>Helicobacter</i> spp. (HEL717)	Rojo (CY3)	AGG TCG CCT TCG CAA TGA GTA	Chan <i>et al.</i> , 2005
<i>L. monocytogenes</i> (Lmon)	Rojo (CY3)	CTA TCC ATT GTA GCA CGT G	Moreno <i>et al.</i> , 2011

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al lavado del portaobjetos con 50 ml de una solución de lavado (0,02 M Tris-HCl, 9,8 M NaCl, 1% EDTA, 0,1% µl SDS; enrasando con

agua milli Q) atemperada a 48°C. Primero se vertió una pequeña cantidad de esta solución sobre el portaobjetos para arrastrar el tampón de hibridación y, a continuación, se sumergió el portaobjetos en el volumen restante de la solución de lavado para eliminar los restos de sonda que no se hubieran unido al gen rRNA. El tiempo de lavado fue de 15 minutos, manteniéndose a 48°C en oscuridad.

Finalmente, los portaobjetos se lavaron con agua ultrapura estéril, se dejaron secar en oscuridad y se guardaron a -20°C hasta que fueron observados. A continuación, se añadió Vectashield (VECTOR laboratories, ref. H-1000-10) y se colocó un cubreobjetos para que las muestras pudieran ser observadas en el sistema de microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 con los filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG. Las fotografías se realizaron con la cámara DP-10 de Olympus.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Procesado de muestras

Se analizaron un total de 35 muestras: 18 de col, 11 de fresa, 3 de espinacas y 3 de lechuga. El método empleado para el aislamiento de FLA permitió que se analizaran todos los vegetales, ya que se pudo filtrar, a través de las membranas de 1,2 µm de tamaño de poro, todo el contenido del volumen homogeneizado en Stomacher en el caso de las verduras o en el agitador en el caso de las fresas.

Sin embargo, otros autores en estudios similares utilizan comúnmente menor cantidad de muestra para el procesado de los vegetales. Por un lado, Moreno-Mesonero *et al.* (2020) homogeneizaron 10 g de las hojas exteriores de muestras de lechuga con 90 ml de solución PAGE 1X. Al igual que Chavatte *et al.* (2016), siguieron el mismo procedimiento, aunque solo emplearon 1 ml del homogeneizado de muestras de vegetales en PAGE para aislar FLA. Asimismo, Vaerewijck *et al.* (2011) aplicaron el mismo protocolo, pero además homogeneizaron hojas exteriores de lechuga con 50 ml de PAGE en Stomacher, usando solo 30 ml del homogeneizado para llevar a cabo el aislamiento de FLA. Mientras que Gourabathini *et al.* (2008) lavaron hojas de lechuga y espinaca con una solución salina y transfirieron posteriormente alícuotas de esta a placas NNAP. Pese a esta diferencia en las cantidades de vegetales y fresas procesadas en trabajos anteriores, en el presente trabajo se decidió emplear 50 g, ya que esta cantidad se considera una ración. Además, se optó por filtrar todo el volumen empleado en la homogenización para así analizar la muestra completa.

4.2. Cultivo de FLA

En el presente estudio el método empleado para cultivar FLA fue en placas NNAP, del mismo modo que Moreno-Mesonero *et al.* (2020), sin haber sembrado ningún tipo de microorganismo en las placas. Esto fue debido a que el homogeneizado obtenido a partir de los vegetales y fresas orgánicos contiene una gran proporción de microorganismos, como bacterias, que pueden servir de alimento para las FLA. Por ese motivo, no fue necesario añadir ninguna fuente de alimento, como en Delafont *et al.* (2013) que añadieron al cultivo levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* o en Gourabathini *et al.* (2008), que añadieron células muertas de *E. coli* como alimento.

En el 100% de las muestras analizadas se detectó el crecimiento de FLA (35/35). Es decir, se aislaron FLA a partir de coles, lechugas, espinacas y fresas ecológicas. La forma más observada fue la de quiste, una frecuencia mucho mayor que la de trofozoíto, que apenas se pudo observar

alguna vez (Figura 3). Se puede confirmar, por tanto, que el tamaño de poro de 1,2 μm retiene a las FLA procedentes del homogeneizado.

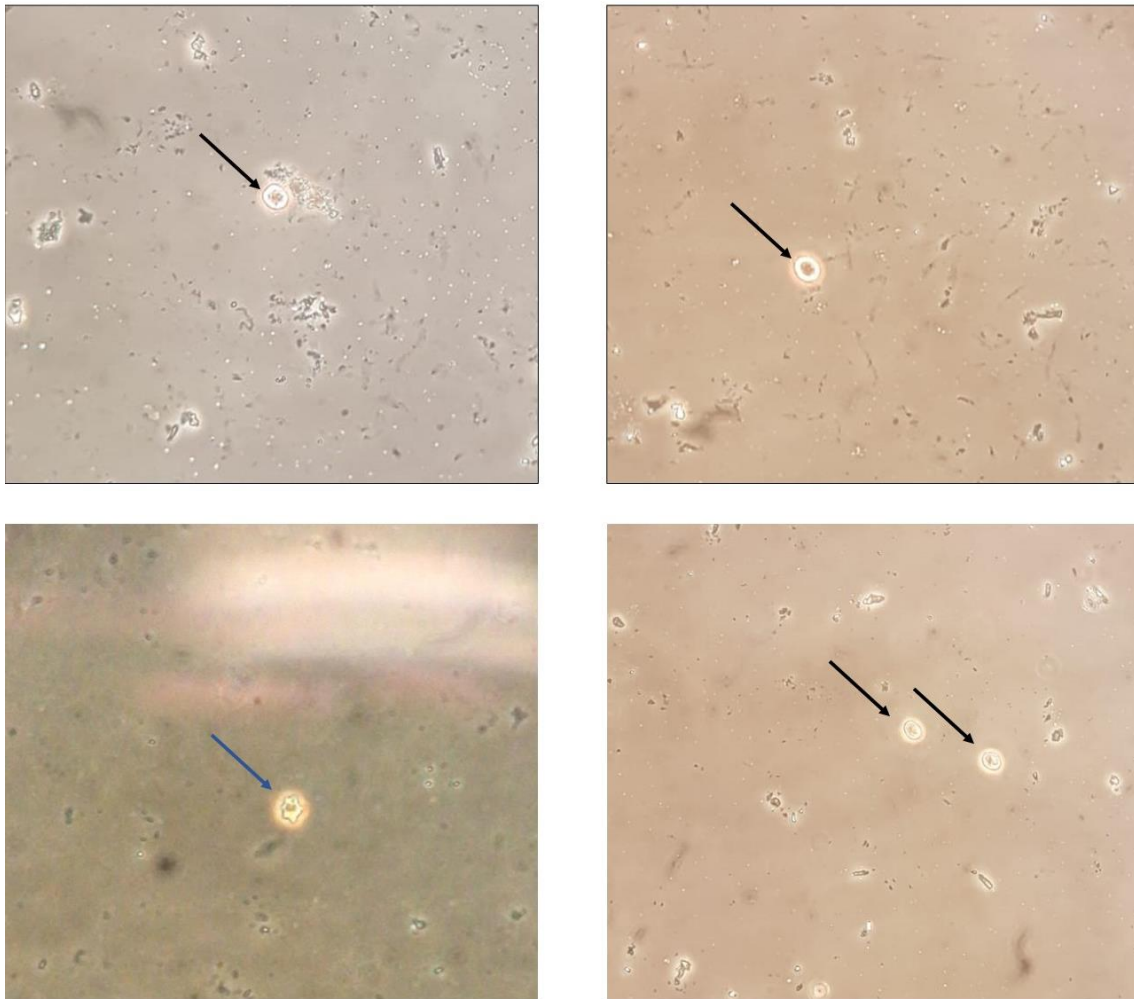


Figura 3. Fotografías en microscopio de contraste de fases (40x). FLA aisladas de muestras de vegetales orgánicos. Las flechas negras señalan las amebas de vida libre (FLA) en forma de quiste, mientras que la flecha azul indica la FLA en forma de trofozoito.

Hasta la actualidad, hay pocas investigaciones centradas en estudiar la presencia de FLA en alimentos, concretamente, en vegetales. Por un lado, en el estudio realizado por Moreno-Mesonero *et al.* (2020) y Vaerewijck *et al.* (2011), todas las muestras vegetales de lechuga analizadas fueron positivas para la presencia de FLA, del mismo modo que ocurre en este trabajo. Por otro lado, Chavatte *et al.* (2016) y Gourabathini *et al.* (2008) estudiaron la abundancia de protozoos de vida libre (FLP), que incluye otros géneros además de las FLA, en muestras de: alfalfa, remolacha, berros, guisantes, puerro, frijol mungo y col lombarda, en el caso de Chavatte *et al.* (2016); y en muestras de espinacas y lechuga en el caso de Gourabathini *et al.* (2008) y encontraron FLA en una abundancia inferior en las muestras vegetales, concretamente del 79% y 7% respectivamente. Gourabathini *et al.* (2008) propusieron que la prevalencia de FLA estaba subrepresentada, debido a que las FLA tienden a adherirse a las superficies, lo que sugiere que un paso de homogeneización, como el que se ha realizado en el presente estudio es más adecuado que el método de lavado usado por estos autores.

Además, en un estudio se comprobó que, en lechugas comercializadas, a pesar de llevar a cabo procesos de lavado, homogeneizado, hisopado o escisión, las FLA seguían presentes tras una

semana de cultivo. Esto indica que las FLA son capaces de resistir a un lavado industrial en forma de quiste y proliferar cuando se dan las condiciones adecuadas (Vaerewijck *et al.*, 2011). Estos resultados demuestran la necesidad de implementar un procedimiento que permita excluir las FLA de los alimentos que consumimos frescos para una mejor prevención de las enfermedades transmitidas por los mismos.

4.3. Presencia y viabilidad de patógenos emergentes del interior de FLA

En anteriores estudios se ha comprobado, a través del cocultivo, que ciertas bacterias son capaces de sobrevivir y proliferar dentro de diversas especies la FLA de *Acanthamoeba*, como *Salmonella typhimurium* en Gaze *et al.* (2003); del mismo modo que *L. monocytogenes* en Akya *et al.*, (2009). Además, se detectó la viabilidad de *H. pylori* a través de un ensayo de cocultivo con *A. castellanii*, por medio de detección DVC-FISH en Moreno-Mesonero *et al.* (2016).

En el presente estudio, el método empleado que se siguió fue el de DVC-FISH para comprobar la presencia de ciertos patógenos emergentes como *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Helicobacter* spp. y *L. monocytogenes* y evaluar su viabilidad en el interior de las FLA. La técnica FISH ha sido usada para la detección e identificación de microorganismos en muestras ambientales (Aistleitner *et al.*, 2018; Amann *et al.*, 1995; Pasulka *et al.*, 2021). Es un método que presenta numerosas ventajas frente a otras técnicas como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que no necesita seguir un protocolo para obtener el DNA, ni se encuentran presentes inhibidores en la propia muestra y los resultados positivos pueden ser observados directamente desde la muestra (Amann *et al.*, 1995). Asimismo, se ha visto que es más efectiva que los métodos de cultivo en métodos clínicos (Zeybek *et al.*, 2017; Rüssmann *et al.*, 2001).

Al combinar FISH con DVC, se posibilita la distinción entre las células objetivo viables y no viables. Por lo tanto, las células que se observan elongadas (al menos el doble de su tamaño original) y/o engrosadas serán las identificadas como vivas o metabólicamente activas y las no elongadas y/o no engrosadas, como células muertas. Esta conjugación ha tenido éxito en la detección e identificación de células viables en comunidades mixtas de microorganismos como en sistemas de depuración de aguas (Moreno & Ferrús, 2012), en ríos (Tirodimos *et al.*, 2014), en vegetales procesados (Moreno *et al.*, 2016) e incluso dentro de FLA procedentes de agua potable y aguas residuales (Moreno-Mesonero *et al.*, 2017).

Como se aprecia en la Figura 4 se puede observar que las sondas específicas de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Helicobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. (emiten fluorescencia roja) y la sonda universal EUB para el género bacteria (emite fluorescencia verde) funcionaron correctamente con las cepas control. Si se empleara únicamente una sonda, los falsos positivos serían más habituales debido a presencia de partículas de alimentos con morfología de bacteria o por hibridación cruzada con otra bacteria. Esto puede ser efectivamente prevenido al usar la sonda EUB junto la específica. Del mismo modo, se previenen los falsos positivos por autofluorescencia, ya que al identificar la célula en dos canales diferentes, los falsos positivos pueden ser excluidos (Rohde *et al.*, 2017).

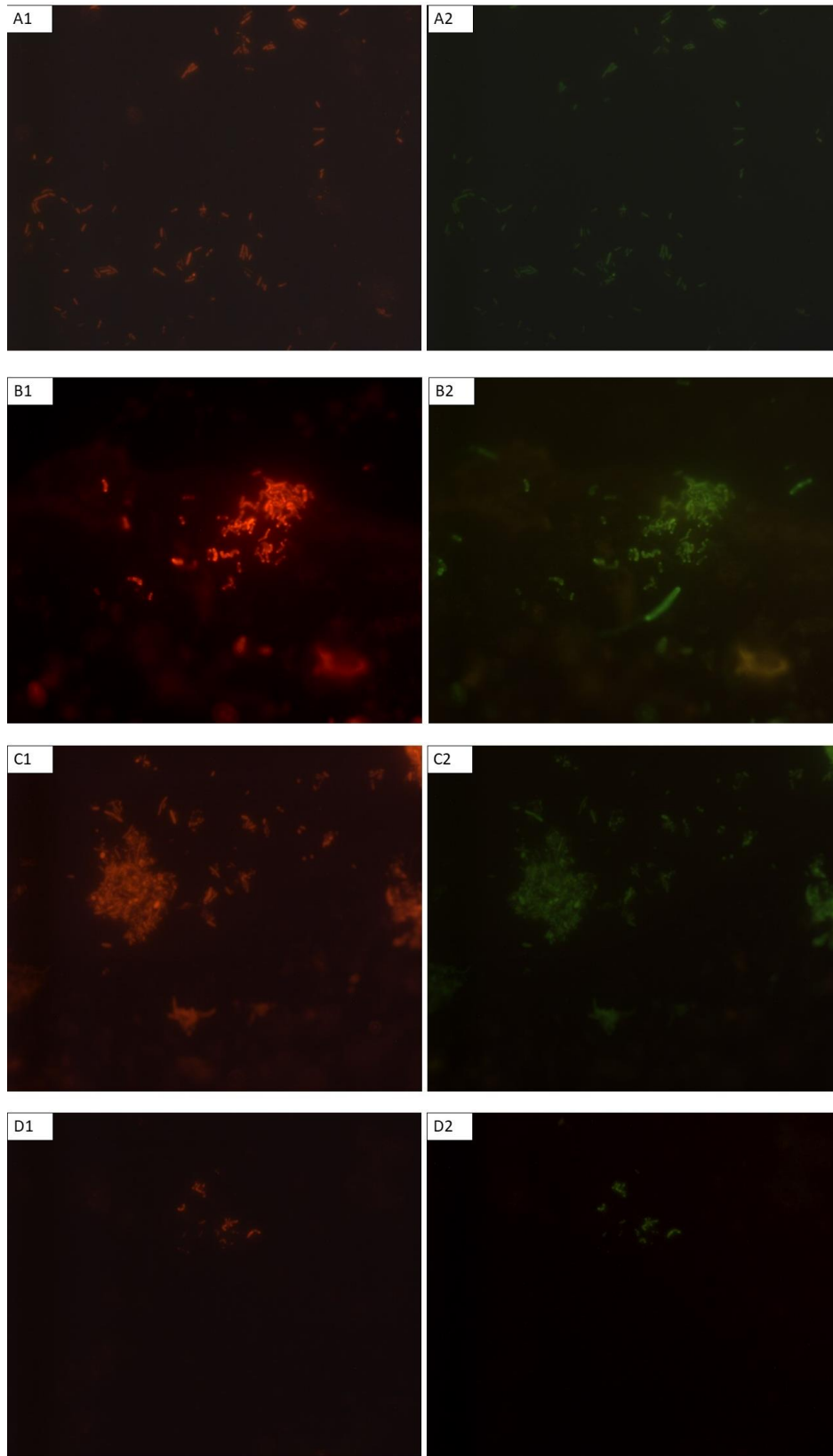


Figura 4. Imágenes tomadas desde el microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 en una magnificación de 40X. Las figuras A1 y A2 muestran *Pseudomonas fluorescens* hibridada con la sonda específica para *Pseudomonas* spp. y con la sonda EUB, respectivamente. Las figuras B1 y B2 muestran *Listeria monocytogenes* hibridada con la sonda específica para *L. monocytogenes* y con la sonda EUB, respectivamente. Las figuras C1 y C2 muestran *Salmonella typhimurium* hibridada con la sonda específica para *Salmonella* spp. y con la sonda EUB, respectivamente. Las figuras D1 y D2 muestran *H. pylori* hibridada con la sonda específica de *Helicobacter* spp. y con la sonda EUB, respectivamente.

Los resultados mostrados en la Tabla 5 muestran que en un 88,57% de las muestras de alimentos ecológicos analizados en este trabajo se detectaron bacterias viables del género *Pseudomonas* procedentes del microbioma de las FLA aisladas; en un 2,86% de las muestras se detectaron células viables de *Salmonella* spp. como parte del microbioma de FLA; y en ninguna muestra de los alimentos orgánicos analizados se detectó *L. monocytogenes*, ni *Helicobacter* spp. viables como parte del microbioma de las FLA aisladas.

Tabla 5. Resultados del DCV-FISH (Conteo Directo Viable combinado con la Hibridación Fluorescente In Situ).

DVC-FISH	MUESTRAS POSITIVAS	PORCENTAJE
<i>Pseudomonas</i> spp.	31/35	88,57%
<i>Salmonella</i> spp.	1/35	2,86%
<i>L. monocytogenes</i>	0/35	0,00%
<i>Helicobacter</i> spp.	0/35	0,00%

El género *Pseudomonas* estuvo presente en prácticamente todas las muestras (88,57%), además con gran abundancia (Figura 5). Estos datos se asemejan a los resultados de Gajas-Priego (2021) y Moreno-Mesonero *et al.* (2020), que estudiaron el microbioma de FLA procedente de vegetales, siendo *Pseudomonas* uno de los géneros más abundantes encontrados. Dentro de este género se encuentra *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria es una especie oportunista capaz de adaptarse a gran variedad de ambientes, afectando a huéspedes con el sistema inmunológico deprimido, siendo también una causa importante de infecciones nosocomiales (De Bentzmann, & Plésiat 2011). Además, esta bacteria se ha relacionado con anterioridad con FLA y ha sido identificada como ARB (Delafont *et al.*, 2013).

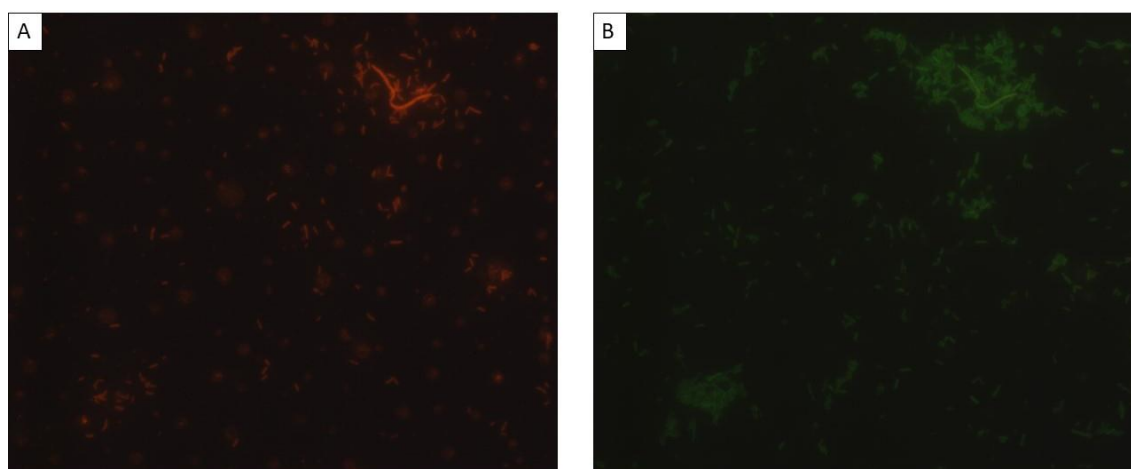


Figura 5. Imágenes tomadas de una muestra positiva en *Pseudomonas* spp. desde el microscopio de fluorescencia (Olympus) a una magnificación de 40X. A) Detección de la sonda específica roja de *Pseudomonas* spp. B) Detección de la sonda universal EUB verde.

En cambio, tan solo se observó en una de las 35 muestras la presencia células de *Salmonella* spp. viables (Figura 6). Cabe destacar que este género se encontró en otras 4 muestras, pero sin presentar una forma elongada, por lo que no eran viables. Esto podría confirmar la interacción FLA-*Salmonella* spp., sin embargo, en el presente trabajo no presenta altos índices de supervivencia en el interior de las FLA aisladas. En estudios anteriores, se ha mostrado la presencia de *Salmonella* spp. en el microbioma de FLA procedentes de vegetales, pero no en un porcentaje muy elevado (Gajas-Priego, 2021; Moreno-Mesonero *et al.*, 2020). Incluso en Gourabathini *et al.* (2008) demostraron que ciertas FLA procedentes de vegetales secuestraban *Salmonella enterica*, pero estas eran capaces de sobrevivir, multiplicarse e incluso salir de las

vesículas de las FLA. Estos autores destacaban que la relación FLA-*Salmonella* podría ser de forma específica, es decir, relación entre determinadas especies.

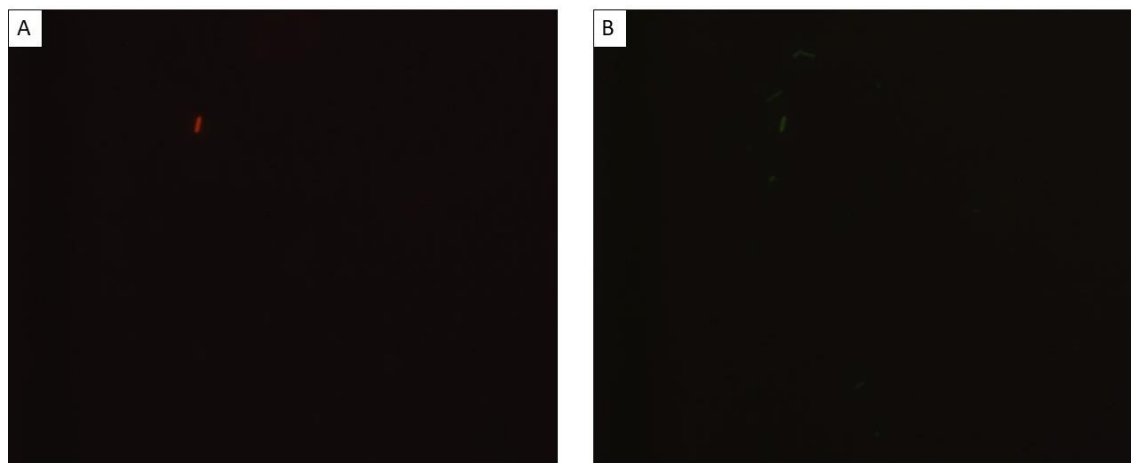


Figura 6. Imágenes tomadas de la única muestra positiva en *Salmonella* spp. viable desde el microscopio de fluorescencia (Olympus) a una magnificación de 40X. A) Detección de la sonda específica roja de *Salmonella* spp. B) Detección de la sonda universal EUB verde.

Se debe remarcar que se ha buscado una relación entre el tipo de alimento ecológico y la presencia de bacterias (Tabla 6), pero a la vista de los resultados obtenidos, no se ha podido establecer esta relación. En el caso de *Pseudomonas* spp., se observa que en todos los tipos de muestras ecológicas (lechuga, espinaca, col y fresas) existen FLA que presentan en su interior células viables del género *Pseudomonas*. En el caso de *Salmonella* spp., la única muestra en la que se han detectado células viables del microbioma de FLA ha sido la col.

Tabla 6. Resultados de cada muestra con la presencia de células bacterianas viables.

NÚMERO MUESTRA	MUESTRA	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Helicobacter</i> spp.
1	ESPINACA	+	-	-	-
2	ESPINACA	+	-	-	-
3	ESPINACA	+	-	-	-
4	FRESA	+	-	-	-
5	FRESA	+	-	-	-
6	FRESA	-	-	-	-
7	FRESA	+	-	-	-
8	FRESA	+	-	-	-
9	FRESA	+	-	-	-
10	FRESA	+	-	-	-
11	FRESA	-	-	-	-
12	FRESA	+	-	-	-
13	FRESA	+	-	-	-
14	FRESA	+	-	-	-
15	COL	+	-	-	-
16	COL	-	-	-	-
17	COL	+	-	-	-
18	COL	+	-	-	-
19	COL	+	-	-	-
20	COL	+	-	-	-
21	COL	+	-	-	-

22	COL	+	-	-	-
23	COL	-	-	-	-
24	COL	+	-	-	-
25	COL	+	-	-	-
26	COL	+	-	-	-
27	COL	+	-	-	-
28	COL	+	-	-	-
29	COL	+	-	-	-
30	COL	+	+	-	-
31	COL	+	-	-	-
32	COL	+	-	-	-
33	LECHUGA	+	-	-	-
34	LECHUGA	+	-	-	-
35	LECHUGA	+	-	-	-

Por último, en ninguna muestra se identificó la presencia de *Helicobacter* spp., ni de *L. monocytogenes*. Otros investigadores como Moreno-Mesonero *et al.* (2020) detectaron la especie *H. pylori* en más del 50% de muestras de FLA procedentes de vegetales mediante qPCR y en 25% de las muestras se halló de forma viable a través del método DVC-FISH, ratificando que el método empleado es útil para el presente trabajo. Sin embargo, los vegetales analizados por estos autores procedían de la agricultura convencional. También se vio en Moreno-Mesonero *et al.*, (2017) que *H. pylori* era capaz de sobrevivir en FLA procedentes de aguas residuales y agua potable. En este trabajo no se ha empleado la sonda específica de *H. pylori*, ya que las muestras fueron negativas para género. La especie *L. monocytogenes* no se identificó en ninguna muestra. Este hecho lo corroboran investigaciones anteriores, donde Doyscher *et al.* (2013) confirman que *L. monocytogenes* es incapaz de persistir con vida en el interior de FLA. Del mismo modo que ni Brandl *et al.* (2005), ni Gourabathini *et al.* (2008) pudieron observar la replicación de *L. monocytogenes* en el interior de FLA. Adicionalmente, en el estudio del microbioma de FLA procedentes de vegetales orgánicos de Gajas-Priego (2021); Moreno-Mesonero *et al.* (2020) no encontraron ninguna señal de ninguna bacteria del género *Listeria*.

Esto indica, por tanto, que para el estudio de patógenos asociados a FLA, el método DVC-FISH resulta una herramienta rápida, específica y visual para la identificación de células viables procedentes del microbioma de FLA. Los resultados obtenidos muestran cómo *Pseudomonas* spp., y en menor medida, *Salmonella* spp. son capaces de mantenerse con vida en el interior de FLA aisladas de muestras de frutas y vegetales, pudiendo suponer un problema para la salud pública. A su vez, la presencia de estas bacterias en productos frescos puede no ser detectables por métodos convencionales de cultivo, ya que son capaces de adquirir un estado viable no cultivable, debido a las condiciones de estrés. Esto significa que su presencia puede pasar desapercibida en controles alimentarios rutinarios tradicionales. Por lo que, este método podría utilizarse en futuros trabajos para determinar si existen patógenos de los géneros *Pseudomonas* y *Salmonella* intraamoélicos o de otro tipo, ya que hay muy pocos estudios al respecto.

Según la Estrategia de Desarrollo Sostenible 2030, concretamente el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) número 3, "Garantizar una vida sana y promover el bienestar de todos para todas las edades", es necesario conocer con más extensión los riesgos microbiológicos relacionados con la alimentación. El proyecto "ECOFOOD" en el que se enmarca el presente trabajo, además de estudiar las FLA aisladas a partir de muestras de alimentos orgánicos, también estudia las FLA aisladas a partir de alimentos no orgánicos o procedentes de agricultura

convencional. Uno de los objetivos del proyecto “ECOFOOD” es comparar los microbiomas bacterianos de las FLA aisladas a partir de ambos tipos de muestras, orgánicas y convencionales, con tal de establecer si solamente el riesgo microbiológico está asociado a muestras procedentes de alimentos orgánicos. Además, se está estudiando la presencia de FLA y su contenido bacteriano en muestras procedentes de aguas residuales, de riego y de tierra.

5. CONCLUSIONES

Tras los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que:

1. Todos los vegetales orgánicos analizados contenían amebas de vida libre (FLA).
2. La presencia de *Pseudomonas* spp. en el interior de FLA procedentes de productos frescos orgánicos es muy abundante.
3. *Salmonella* spp. es un género que no está muy presente en el microbioma de las FLA, ya que solo se ha identificado en una muestra de col.
4. Las bacterias *L. monocytogenes* y *Helicobacter* spp. no se han detectado como parte del microbioma de las FLA aisladas a partir de vegetales orgánicos analizados en el presente trabajo.
5. Entre el microbioma de las FLA se detectaron géneros en los que se identifican especies de bacterias patógenas humanas, lo que supone que las FLA pueden actuar como vehículos de transmisión de potenciales patógenos, pudiendo causar problemas de salud pública. Serían necesarios futuros estudios para confirmar el riesgo real para el consumidor.
6. El método DVC-FISH es una técnica útil para la detección *in situ* de patógenos específicos viables en muestras de FLA procedentes de productos frescos.

6. BIBLIOGRAFIA

Aistleitner, K., Jeske, R., Wölfel, R., Wießner, A., Kikhney, J., Moter, A., & Stoecker, K. (2018). Detection of *Coxiella burnetii* in heart valve sections by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Medical Microbiology*, 67(4), 537-542. doi:10.1099/jmm.0.000704

Akya, A., Pointon, A., & Thomas, C. (2009). Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba* spp: *Acanthamoeba* eliminate *L. monocytogenes* cells. *FEMS Microbiology Ecology*, 70(1), 20-29. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00736.x

Amann, R. I., Krumholz, L., & Stahl, D. A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 762-770. doi:10.1128/jb.172.2.762-770.1990

Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143-169. doi:10.1128/mr.59.1.143-169.1995

Amann, R., Ludwig, W., Schulze, R., Spring, S., Moore, E., & Schleifer, K.-H. (1996). rRNA-targeted oligonucleotide probes for the identification of genuine and former pseudomonads. *Systematic and Applied Microbiology*, 19(4), 501-509. doi:10.1016/s0723-2020(96)80023-3

Annalee, Y., Kjellström, T. (1998). Capítulo 53, Riesgos ambientales para la salud. En C. Dufresne (Ed), *ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO*. (53.1-53.37) Ministerio de Trabajo

y Asuntos Sociales. Recuperado 30 de junio de 2022, de Insst.es website: <https://www.insst.es/documents/94886/162520/Cap%C3%ADtulo+53.+Riesgos+ambientales+para+la+salud>

Balali, G. I., Yar, D. D., Afua Dela, V. G., & Adjei-Kusi, P. (2020). Microbial contamination, an increasing threat to the consumption of fresh fruits and vegetables in today's world. *International Journal of Microbiology*, 2020, 3029295. doi:10.1155/2020/3029295

Banach, J. L., & van der Fels-Klerx, H. J. (2020). Microbiological reduction strategies of irrigation water for fresh produce. *Journal of Food Protection*, 83(6), 1072-1087. doi:10.4315/JFP-19-466

Barker, J., & Brown, M. R. (1994). Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology (Reading, England)*, 140 (Pt 6)(6), 1253-1259. doi:10.1099/00221287-140-6-1253

Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens: Fresh produce as vehicles for transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385-2397. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x

Besnard, V., Federighi, M., & Cappelier, J. M. (2000). Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*: Dvc procedure in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(1), 77-81. doi:10.1046/j.1472-765x.2000.00771.x

Beuchat, L. R., & Ryu, J. H. (1997). Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4), 359-465. doi:10.3201/eid0304.970407

Brandl, M. T., Rosenthal, B. M., Haxo, A. F., & Berk, S. G. (2005). Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne Tetrahymena species. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1562-1569. doi:10.1128/AEM.71.3.1562-1569.2005

Buszewski, B., Rogowska, A., Pomastowski, P., Złoch, M., & Railean-Plugaru, V. (2017). Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *Journal of AOAC International*, 100(6), 1607-1623. doi:10.5740/jaoacint.17-0207

CAECV. 2022. *AGRICULTURA ECOLÓGICA - CAECV*. [online] Available at: <<https://www.caecv.com/agricultura-ecologica-2/>> [Accessed 17 May 2022].

Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y., & Rodier, M. H. (2014). Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *The Journal of Hospital Infection*, 87(3), 131-140. doi:10.1016/j.jhin.2014.05.001

Chan, V., Crocetti, G., Grehan, M., Zhang, L., Danon, S., Lee, A., & Mitchell, H. (2005). Visualization of *Helicobacter* species within the murine cecal mucosa using specific fluorescence in situ hybridization. *Helicobacter*, 10(2), 114-124. doi:10.1111/j.1523-5378.2005.00298.x

Chavatte, N., Lambrecht, E., Van Damme, I., Sabbe, K., & Houf, K. (2016). Abundance, diversity and community composition of free-living protozoa on vegetable sprouts. *Food Microbiology*, 55, 55-63. doi:10.1016/j.fm.2015.11.013

Collins, S., Jorgensen, F., Willis, C., & Walker, J. (2015). Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of *Legionella* in environmental samples. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 1158-1169. doi:10.1111/jam.12911

- De Bentzmann, S., & Plésiat, P. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections: *Pseudomonas aeruginosa* and human infections. *Environmental Microbiology*, *13*(7), 1655-1665. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02469.x
- Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L., & Héchard, Y. (2013). Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Research*, *47*(19), 6958-6965. doi:10.1016/j.watres.2013.07.047
- Doyscher, D., Fieseler, L., Dons, L., Loessner, M. J., & Schuppler, M. (2013). Acanthamoeba feature a unique backpacking strategy to trap and feed on *Listeria monocytogenes* and other motile bacteria: Interaction of *Listeria monocytogenes* with Acanthamoeba. *Environmental Microbiology*, *15*(2), 433-446. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02858.x
- Ehuwa, O., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). *Salmonella*, food safety and food handling practices. *Foods (Basel, Switzerland)*, *10*(5). doi:10.3390/foods1005090
- European Commission website - La agricultura ecológica en pocas palabras. (2018, noviembre 16). Recuperado 17 de mayo de 2022, de Comisión Europea: https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/farming/organic-farming/organics-glance_es
- Eurostat - Database - agriculture -. (s. f.). Last update: 11-08-2022 Recuperado 17 de mayo de 2022, de Europa.eu website: <https://ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/data/database>
- Forsythe, S. J. (2008). *The microbiological risk assessment of food*. Recuperado de <https://books.google.at/books?id=geg3fQzKbJsC>
- Fouque, E., Trouilhé, M.-C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M.-H., & Héchard, Y. (2012). Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryotic Cell*, *11*(4), 382-387. doi:10.1128/EC.05301-11
- Gajas-Priego, S.M (2021). *Microbioma de amebas de vida libre (FLA) presentes en alimentos orgánicos: ¿potencial riesgo para la Salud Pública?* Universitat Politècnica de València
- García-Hernández, J., Hernández, M., & Moreno, Y. (2021). Combination of direct viable count and fluorescent in situ hybridization (DVC-FISH) as a potential method for identifying viable *Vibrio parahaemolyticus* in oysters and mussels. *Foods (Basel, Switzerland)*, *10*(7), 1502. doi:10.3390/foods10071502
- Gaze, W. H., Burroughs, N., Gallagher, M. P., & Wellington, E. M. H. (2003). Interactions between *Salmonella typhimurium* and Acanthamoeba polyphaga, and observation of a new mode of intracellular growth within contractile vacuoles. *Microbial Ecology*, *46*(3), 358-369. doi:10.1007/s00248-003-1001-3
- Gourabathini, P., Brandl, M. T., Redding, K. S., Gunderson, J. H., & Berk, S. G. (2008). Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(8), 2518-2525. doi:10.1128/AEM.02709-07
- Greub, G., & Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*, *17*(2), 413-433. doi:10.1128/CMR.17.2.413-433.2004
- Hamilton, K. A., Ahmed, W., Rauh, E., Rock, C., McLain, J., & Muenich, R. L. (2020). Comparing microbial risks from multiple sustainable waste streams applied for agricultural use: Biosolids, manure, and diverted urine. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, *14*, 37-50. doi:10.1016/j.coesh.2020.01.003

- Havelaar, A. H., Brul, S., de Jong, A., de Jonge, R., Zwietering, M. H., & Ter Kuile, B. H. (2010). Future challenges to microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology*, *139 Suppl 1*, S79-94. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.015
- Ho, S. A., Hoyle, J. A., Lewis, F. A., Secker, A. D., Cross, D., Mapstone, N. P., ... Taylor, G. R. (1991). Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *Journal of Clinical Microbiology*, *29*(11), 2543-2549. doi:10.1128/jcm.29.11.2543-2549.1991
- Hoffmann, C., Harrison, C. F., & Hilbi, H. (2014). The natural alternative: protozoa as cellular models for Legionella infection: Protozoa models for Legionella infection. *Cellular Microbiology*, *16*(1), 15-26. doi:10.1111/cmi.12235
- Hortelano, I., Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., & Ferrús, M. A. (2020). Deep-amplicon sequencing (DAS) analysis to determine the presence of pathogenic Helicobacter species in wastewater reused for irrigation. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, *264*(114768), 114768. doi:10.1016/j.envpol.2020.114768
- Hughner, R. S., McDonagh, P., Prothero, A., Shultz, C. J., & Stanton, J. (2007). Who are organic food consumers? A compilation and review of why people purchase organic food. *Journal of Consumer Behaviour*, *6*(2-3), 94-110. doi:10.1002/cb.210
- Kuan, C.-H., Rukayadi, Y., Ahmad, S. H., Wan Mohamed Radzi, C. W. J., Thung, T.-Y., Premarathne, J. M. K. J. K., ... Radu, S. (2017). Comparison of the microbiological quality and safety between conventional and organic vegetables sold in Malaysia. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1433. doi:10.3389/fmicb.2017.01433
- Liang, S.-Y., Ji, D.-R., Hsia, K.-T., Hung, C.-C., Sheng, W.-H., Hsu, B.-M., ... Ji, D.-D. (2010). Isolation and identification of Acanthamoeba species related to amoebic encephalitis and nonpathogenic free-living amoeba species from the rice field: Isolation of free-living amoebas from the rice field. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(4), 1422-1429. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04779.x
- Lilly, E. L., & Webster, N. J. (2021). Detection of Toxoplasma gondii oocysts on organic and conventionally grown produce. *Food Microbiology*, *99*(103798), 103798. doi:10.1016/j.fm.2021.103798
- Lim, J. Y., Yoon, J., & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*(1), 5-14. doi:10.4014/jmb.0908.08007
- Magkos, F., Arvaniti, F., & Zampelas, A. (2006). Organic food: buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *46*(1), 23-56. doi:10.1080/10408690490911846
- Marchioro, A. A., Tiyo, B. T., Colli, C. M., de Souza, C. Z., Garcia, J. L., Gomes, M. L., & Falavigna-Guilherme, A. L. (2016). First detection of Toxoplasma gondii DNA in the fresh leaves of vegetables in south America. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, *16*(9), 624-626. doi:10.1089/vbz.2015.1937
- Martínez-Castillo, R. (2016). Sustainable agricultural production systems. *Revista Tecnología en Marcha*, *29*(5), 70. doi:10.18835/tm.v29i5.2518

Michel, R., Burghardt, H., & Bergmann, H. (1995). Acanthamoeba, naturally intracellularly infected with Pseudomonas aeruginosa, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin [International journal of hygiene and environmental medicine]*, 196(6), 532-544. Recuperado de <https://europepmc.org/article/med/7619202>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2020). La Producción Ecológica. (s. f.). Recuperado 17 de mayo de 2022, de Gob.es website: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/produccion-eco/>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2021). Últimas noticias. (s. f.). Recuperado 23 de mayo de 2022, de Gob.es website: <https://www.mapa.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/el-gasto-en-productos-ecol%C3%B3gicos-en-espa%C3%B1a-se-incrementa-un-7--con-respecto-ala%C3%B1o-anterior-/tcm:30-583763>

Moreno, Y., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Jiménez, A., & Hernández, J. (2003). Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Research*, 37(9), 2251-2256. doi:10.1016/S0043-1354(02)00624-3

Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., Amorós, I., Pérez, R., Morillo, J. A., & Alonso, J. L. (2018). Multiple identification of most important waterborne protozoa in surface water used for irrigation purposes by 18S rRNA amplicon-based metagenomics. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(1), 102-111. doi:10.1016/j.ijheh.2017.10.008

Moreno, Yolanda, & Ferrús, M. A. (2012). Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *Helicobacter*, 17(5), 327-332. doi:10.1111/j.1523-5378.2012.00961.x

Moreno, Yolanda, Ballesteros, L., García-Hernández, J., Santiago, P., González, A., & Ferrús, M. A. (2011). Specific detection of viable *Listeria monocytogenes* in Spanish wastewater treatment plants by Fluorescent In Situ Hybridization and PCR. *Water Research*, 35(15), 4634-4640. doi:10.1016/j.watres.2011.06.015

Moreno, Yolanda, Sánchez-Contreras, J., Montes, R. M., García-Hernández, J., Ballesteros, L., & Ferrús, M. A. (2012). Detection and enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells from ready-to-eat and processed vegetable foods by culture and DVC-FISH. *Food Control*, 27(2), 374-379. doi:10.1016/j.foodcont.2012.04.017

Moreno-Mesonero, L. (2018). *Estudio del papel de las amebas de vida libre como reservorio de Helicobacter pylori y otras bacterias patógenas en aguas y alimentos mediante técnicas moleculares*. Universitat Politècnica de València

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), 108477. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108477

Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Alonso, J. L., & Ferrús, M. A. (2016). DVC-FISH and PMA-qPCR techniques to assess the survival of *Helicobacter pylori* inside *Acanthamoeba castellanii*. *Research in Microbiology*, 167(1), 29-34. doi:10.1016/j.resmic.2015.08.002

- Moreno-Mesonero, L., Moreno, Y., Alonso, J. L., & Ferrús, M. A. (2017). Detection of viable *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in wastewater and drinking water samples from Eastern Spain. *Environmental Microbiology*, *19*(10), 4103-4112. doi:10.1111/1462-2920.13856
- Morgan, K., & Murdoch, J. (2000). Organic vs. conventional agriculture: knowledge, power and innovation in the food chain. *Geoforum; Journal of Physical, Human, and Regional Geosciences*, *31*(2), 159-173. doi:10.1016/s0016-7185(99)00029-9
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical pesticides and human health: The urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in Public Health*, *4*, 148. doi:10.3389/fpubh.2016.00148
- Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* *43*:93–100.
- Pachepsky, Y., Shelton, D. R., McLain, J. E. T., Patel, J., & Mandrell, R. E. (2011). Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: A review. En *Advances in Agronomy* (pp. 75-141). Elsevier
- Padel, S., & Foster, C. (2005). Exploring the gap between attitudes and behaviour: Understanding why consumers buy or do not buy organic food. *British Food Journal (Croydon, England)*, *107*(8), 606-625. doi:10.1108/00070700510611002
- Pasulka, A. L., Howes, A. L., Kallet, J. G., VanderKelen, J., & Villars, C. (2021). Visualization of probiotics via epifluorescence microscopy and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Journal of Microbiological Methods*, *182*(106151), 106151. doi:10.1016/j.mimet.2021.106151
- Pinto-Ferreira, F., Reis, J. B., Paschoal, A. T. P., Balbino, L. S., Bertão-Santos, A., Lucas, J. I., ... Mitsuka-Breganó, R. (2020). Molecular diagnosis of the curly lettuce parasitic contamination from hydroponic cultivation from supermarkets. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária [Brazilian Journal of Veterinary Parasitology]*, *29*(4), e015820. doi:10.1590/S1984-29612020095
- Piqueres, P., Moreno, Y., Alonso, J. L., & Ferrús, M. A. (2006). A combination of direct viable count and fluorescent in situ hybridization for estimating *Helicobacter pylori* cell viability. *Research in Microbiology*, *157*(4), 335-349. doi:10.1016/j.resmic.2005.09.003
- Rafael, K., Marchioro, A. A., Colli, C. M., Tiyo, B. T., Evangelista, F. F., Bezagio, R. C., & Falavigna-Guilherme, A. L. (2017). Genotyping of *Giardia duodenalis* in vegetables cultivated with organic and chemical fertilizer from street markets and community vegetable gardens in a region of Southern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *111*(12), 540-535. doi:10.1093/trstmh/try013
- Reina, L. D., Fleming, H. P., & Breidt, F., Jr. (2002). Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. *Journal of Food Protection*, *65*(12), 1881-1887. doi:10.4315/0362-028x-65.12.1881
- Rengifo-Herrera, J. A., Castaño, O. L., & Sanabria, I. J. (2013). Culturability and viability of *Salmonella typhimurium* during photo-Fenton process at pH 5.5 under solar simulated irradiation. *Journal of water resource and protection*, *05*(08), 21-27. doi:10.4236/jwarp.2013.58a003
- Robertson, L. J. (2016). Parasitic protozoa in salad vegetables. En *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (pp. 69-88). Elsevier.

- Rodríguez-Zaragoza, S. (1994). Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*, 20(3), 225-241. doi:10.3109/10408419409113556
- Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., & Al Dahouk, S. (2017). Differential detection of pathogenic *Yersinia* spp. by fluorescence in situ hybridization. *Food Microbiology*, 62, 39-35. doi:10.1016/j.fm.2016.09.013
- Rüssmann, H., Kempf, V. A., Koletzko, S., Heesemann, J., & Autenrieth, I. B. (2001). Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 304-308. doi:10.1128/JCM.39.1.304-308.2001
- Sadeghi, Y., Kananzadeh, P., Moghadam, S. O., Alizadeh, A., Pourmand, M. R., Mohammadi, N., ... Ranjbar, R. (2021). The sensitivity and specificity of loop-mediated isothermal amplification and PCR methods in detection of foodborne microorganisms: A systematic review and meta-analysis. *Iranian Journal of Public Health*, 50(11), 2172-2182. doi:10.18502/ijph.v50i11.7571
- Saggers, E. J., Waspe, C. R., Parker, M. L., Waldron, K. W., & Brocklehurst, T. F. (2008). *Salmonella* must be viable in order to attach to the surface of prepared vegetable tissues. *Journal of Applied Microbiology*, 105(5), 1239-1235. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03795.x
- Santiago, P., Jiménez-Belenguer, A., García-Hernández, J., Estellés, R. M., Hernández Pérez, M., Castillo López, M. A., ... Moreno, Y. (2018). High prevalence of *Salmonella* spp. in wastewater reused for irrigation assessed by molecular methods. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(1), 95-101. doi:10.1016/j.ijheh.2017.10.007
- Scheid, P. L. (2019). Free-living amoebae and their multiple impacts on environmental health. En *Encyclopedia of Environmental Health* (pp. 77-90). Elsevier.
- Schulz F, Horn M (2015) Intranuclear bacteria: inside the cellular control center of eukaryotes. *Trends in Cell Biology* 25: 339–346. 10.1016/j.tcb.2015.01.002
- Shaheen, M., Scott, C., & Ashbolt, N. J. (2019). Long-term persistence of infectious *Legionella* with free-living amoebae in drinking water biofilms. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 222(4), 678-686. doi:10.1016/j.ijheh.2019.04.007
- Somasundram, C., Razali, Z., & Santhirasegaram, V. (2016). A review on organic food production in Malaysia. *Horticulturae*, 2(3), 12. doi:10.3390/horticulturae2030012
- Strassmann, J. E., & Shu, L. (2017). Ancient bacteria-amoeba relationships and pathogenic animal bacteria. *PLoS Biology*, 15(5), e2002460. doi:10.1371/journal.pbio.2002460
- Szénási, Z., Endo, T., Yagita, K., & Nagy, E. (1998). Isolation, identification and increasing importance of «free-living» amoebae causing human disease. *Journal of Medical Microbiology*, 47(1), 5-16. doi:10.1099/00222615-47-1-5
- Thomas, J. M., & Ashbolt, N. J. (2011). Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environmental Science & Technology*, 45(3), 860-869. doi:10.1021/es102876y
- Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D. S., & Greub, G. (2006). Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2428-2438. doi:10.1128/AEM.72.4.2428-2438.2006

- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S. P., & Maillard, J.-Y. (2010). Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(3), 231-259. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00190.x
- Tiroidimos, I., Bobos, M., Kazakos, E., Haidich, A.-B., Dardavessis, T., Kostopoulos, I., & Arvanitidou, M. (2014). Molecular detection of *Helicobacter pylori* in a large Mediterranean river, by direct viable count fluorescent in situ hybridization (DVC-FISH). *Journal of Water and Health*, 12(4), 868-873. doi:10.2166/wh.2014.171
- Toze, S. (1999). PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research*, 33(17), 3535-3556. doi:10.1016/s0043-1354(99)00071-8
- Tyrrel, S. F., Knox, J. W., & Weatherhead, E. K. (2006). Microbiological water quality requirements for salad irrigation in the United Kingdom. *Journal of Food Protection*, 69(8), 2029-2035. doi:10.4315/0362-028x-69.8.2029
- Vaerewijck, M. J. M., Baré, J., Lambrecht, E., Sabbe, K., & Houf, K. (2014). Interactions of Foodborne Pathogens with Free-living Protozoa: Potential Consequences for Food Safety: Interactions of foodborne pathogens with FLP.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 924-944. doi:10.1111/1541-4337.12100
- Vaerewijck, M. J. M., Sabbe, K., Baré, J., & Houf, K. (2011). Occurrence and diversity of free-living protozoa on butterhead lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), 105-111. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.015
- Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(1), 1-26. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x
- Wu, S., Ueno, D., Inoue, K., & Someya, T. (2009). Direct viable count combined with fluorescence in situ hybridization (DVC-FISH) for specific enumeration of viable *Escherichia coli* in cow manure. *Microbes and Environments*, 24(1), 33-38. doi:10.1264/jsme2.me08543
- Zeybek, Z., Dogruoz Gungor, N., & Turetgen, I. (2017). Investigation of heterotrophic bacteria, *Legionella* and free - living amoeba in cooling tower samples by FISH and culture methods. *European Journal of Biology*, 76(1), 7-13. doi:10.5152/eurjbiol.2017.1702
- Zeybek, Z., Üstüntürk, M., & Binay, A. R. (2010). Morphological characteristics and growth abilities of free living amoeba isolated from domestic tap water samples in İstanbul. *European Journal of Biology*, 69(1), 17-23. Recuperado de <https://dergipark.org.tr/en/pub/iufsjb/issue/9054/112921>