



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

Caracterización microbiológica de derivados de soja sin
tratar y tratados por tecnologías no térmicas de
conservación

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Gómez González, Pablo

Tutor/a: Martínez López, Antonio

Cotutor/a externo: RODRIGO ALIAGA, MARIA DOLORES

Director/a Experimental: FERNANDEZ FELIPE, MARIA TERESA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agrònoma
i del Medi Natural



Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

Caracterización microbiológica de derivados de soja sin tratar y tratados por tecnologías no térmicas de conservación

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Curso Académico: 2022-2023

AUTOR: Pablo Gómez González

TUTOR ACADÉMICO: D. Antonio Martínez López

COTUTOR EXTERNO: Dña. María Dolores Rodrigo Aliaga

DIRECTOR EXPERIMENTAL: M^a Teresa Fernández Felipe

Valencia, Septiembre de 2023

Caracterización microbiológica de derivados de soja sin tratar y tratados por tecnologías no térmicas de conservación

AUTOR: Pablo Gómez González

TUTOR ACADÉMICO: D. Antonio Martínez López

COTUTOR EXTERNO: Dña. María Dolores Rodrigo Aliaga

DIRECTOR EXPERIMENTAL: M^a Teresa Fernández Felipe

Valencia, Septiembre de 2023

Resumen

En la actualidad, se están desarrollando nuevas tecnologías de higienización, que no utilizan el calor y que permiten mejorar la seguridad y mantener las características organolépticas y nutricionales de los alimentos. El plasma frío es una de estas nuevas tecnologías no térmicas, y en este trabajo se determinará si es una técnica adecuada para higienizar la harina de soja, una de las legumbres más utilizadas en la actualidad. En este estudio, se utilizan tres tipos de soja: soja amarilla, soja negra y judía mungo, también conocida como soja verde.

Para el estudio de la eficacia de la higienización por plasma frío, se hizo una caracterización microbiológica de las diferentes variedades de soja, antes y después de tratar. Para ello, se realizaron ensayos de microbiología clásica para determinar la presencia de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, anaerobios esporulados sulfito-reductores, enterobacterias, estafilococos coagulasa-positivos, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*. Los tratamientos de plasma se llevaron a cabo ionizando oxígeno y nitrógeno durante 10 y 20 minutos de exposición, a una potencia de 300W y los resultados se cotejaron en un ANOVA y análisis post-hoc Tukey, observando que los distintos tratamientos con plasma frío sí disminuyen significativamente la carga microbiana de la harina de las diferentes sojas. Esto significa que esta tecnología sí contribuye a una mejora en la seguridad dado a la eficacia de las higienizaciones, demostrando que podría resultar útil su implementación en la industria alimentaria.

Palabras clave: seguridad alimentaria, tecnología no térmica, plasma frío, soja, caracterización microbiológica.

Abstract

Currently, new sanitizing technologies are being developed that do not use heat and that allow improving the safety and maintaining the organoleptic and nutritional characteristics of foods. Cold plasma is one of these new non-thermal technologies, and this work will determine whether it is a suitable technique for sanitizing soybean meal, one of the most widely used legumes today. In this study, three types of soybeans are used: yellow soybean, black soybean and mung bean, also known as green soybean.

To study the efficacy of cold plasma sanitization, a microbiological characterization of the different soybean varieties was carried out before and after treatment. For this purpose, classical microbiological tests were carried out to determine the presence of mesophilic aerobes, molds and yeasts, sulfite-reducing sporulated anaerobes, enterobacteria, coagulase-positive staphylococci, *Salmonella spp*, *Listeria spp*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. The plasma treatments were carried out by ionizing oxygen and nitrogen for 10 and 20 minutes of exposure, at a power of 300W and the results were compared in an ANOVA and Tukey post-hoc analysis, observing that the different cold plasma treatments do significantly decrease the microbial load of the flour of the different soybeans. This means that this technology does contribute to an improvement in safety due to the effectiveness of sanitizations, demonstrating that its implementation in the food industry could be useful.

Key words: food safety, non-thermal technology, cold plasma, soybean, microbiological characterization.

Resum

En l'actualitat, s'estan desenvolupant noves tecnologies d'higienització, que no utilitzen la calor i que permeten millorar la seguretat i mantindre les característiques organolèptiques i nutricionals dels aliments. El plasma fred és una d'aquestes noves tecnologies no tèrmiques, i en aquest treball es determinarà si és una tècnica adequada per a higienitzar la farina de soja, una dels llegums més utilitzats en l'actualitat. En aquest estudi, s'utilitzen tres tipus de soja: soja groga, soja negra i jueva mungo, també coneguda com a soja verda.

Per a l'estudi de l'eficàcia de la higienització per plasma fred, es va fer una caracterització microbiològica de les diferents varietats de soja, abans i després de tractar. Per a això, es van realitzar assajos de microbiologia clàssica per a determinar la presència d'aerobis mesòfils, floridures i llevats, anaerobis esporulats sulfit-reductors, enterobacteris, estafilococs coagulasa-positius, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Escherichia coli* i *Bacillus cereus*. Els tractaments de plasma es van dur a terme ionitzant oxigen i nitrogen durant 10 i 20 minuts d'exposició, a una potència de 300W i els resultats es van acurar en un ANOVA i anàlisi post-hoc Tukey, observant que els diferents tractaments amb plasma fred sí que disminueixen significativament la càrrega microbiana de la farina de les diferents soges. Això significa que aquesta tecnologia sí que contribueix a una millora en la seguretat donat a l'eficàcia de les higienitzacions, demostrant que podria resultar útil la seua implementació en la indústria alimentària.

Paraules clau: seguretat alimentaria, tecnologia no tèrmica, plasma fred, soja, caracterització microbiològica.

Agradecimientos

Agradecer a mi familia el apoyo a través de sus consejos y ayuda, durante mi carrera universitaria y sobre todo en esta última fase. Gracias a las personas que he conocido en esta maravillosa etapa y que se han convertido en mis amigos, junto a los cuales he podido superar estos cuatro años con risas y trabajo. Por último, gracias a mis compañeros del IATA que me han guiado en la realización de este TFG y que siempre estaban dispuestos a echarme una mano cuando era necesario.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Problemas de actualidad en inocuidad alimentaria.....	1
1.2. Tecnología de plasma frío	2
1.2.1. Efecto del plasma frío sobre los microorganismos	2
1.2.2. Tipos de plasma frío según la presión de trabajo	4
1.3. La harina de soja como materia prima a tratar con plasma frío	5
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1. Procesamiento inicial de las muestras	6
3.2. Tratamiento con plasma frío	7
3.3. Caracterización microbiológica de la matriz anterior al tratamiento	7
3.3.1. Enterobacterias	8
3.3.2. <i>Escherichia coli</i>	8
3.3.3. Aerobios mesófilos	8
3.3.4. Estafilococos coagulasa-positivos	9
3.3.5. Anaerobios sulfito-reductores.....	9
3.3.6. Mohos y levaduras.....	9
3.3.7. <i>Bacillus cereus</i>	9
3.3.8. <i>Listeria</i>	10
3.3.9. <i>Salmonella</i>	10
3.4. Recuento de colonias	11
3.5. Análisis estadístico de los resultados.....	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4.1. Resultados de la caracterización microbiológica inicial	11
4.2. Efecto del tratamiento por plasma frío en la higienización de la soja	16
5. CONCLUSIONES.....	18
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

Índice de tablas

Tabla 1. Efecto del plasma sobre esporas de distintos microorganismos en distintas matrices.....	3
Tabla 2. Normas UNE-EN ISO correspondientes a cada microorganismo estudiado.....	8
Tabla 3. Resultados de la caracterización microbiológica en soja y judía mungo	12
Tabla 4. Comparación de los tratamientos en soja amarilla.....	17
Tabla 5. Comparación de los tratamientos en judía mungo.....	17
Tabla 6. Comparación de los tratamientos en soja negra.....	18

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de un sistema de plasma frío a baja presión.....	4
Figura 2. Tipos de leguminosas empleadas: a) soja amarilla, b) judía mungo, c) soja negra.....	6
Figura 3. Equipo de plasma a baja presión junto a las balas de gas de oxígeno y nitrógeno.....	7
Figura 4. Enterobacterias crecidas a partir de a) control positivo (<i>E. coli</i> CECT103) y b) soja amarilla.....	13
Figura 5. Anaerobios sulfito-reductores en soja amarilla.....	14
Figura 6. Placas con crecimiento de a): aerobios mesófilos en judía mungo y b) mohos y levaduras soja negra.....	14
Figura 7. Prueba de hemólisis de <i>Listeria</i> spp. aislada de judía mungo en agar sangre.....	15
Figura 8. Placa de Baird Parker agar con crecimiento de estafilococos en soja negra.....	16

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

SIGLA	SIGNIFICADO
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza estadístico
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
°C	Grados centígrados
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, del inglés European Food Safety Authority
h	Horas
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MYP	Manitol Yema de huevo Polixina
ND	No detectado
ODS	Objetivos de desarrollo sostenible
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCA	Plate Count Agar
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	Desviación estándar, del inglés standard deviation
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
TBX	Triptona Bilis X-glucurónido
UFC	Unidades formadoras de colonias
UHT	Ultra High Temperature
UV	Ultravioleta
VRBG	Violet Red Bile Glucose agar
XLD	Xylose Lysine Deoxycarboxylase agar

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemas de actualidad en inocuidad alimentaria

La seguridad alimentaria es un tema de gran importancia y continúa siendo un asunto que provoca mucha preocupación tanto para la industria alimentaria y los consumidores como para las autoridades sanitarias, ya que la inocuidad alimentaria depende de múltiples factores y es difícil garantizarla para un alimento determinado (Borchers et al., 2010).

Los peligros que pueden presentar los alimentos tienen multitud de procedencias, desde microorganismos patógenos, virus o parásitos hasta toxinas e incluso metales pesados, residuos de pesticidas u hormonas utilizadas en la ganadería (Borchers et al., 2010). De estos peligros, uno de los más difíciles de eliminar son los microorganismos, pues son complicados de detectar, de reducir y pueden provocar problemas de grandes dimensiones (Pinu, 2016). Con la gran cantidad de productos de consumo que se generan, la rapidez con la que se puede transmitir una enfermedad alimentaria puede ser preocupante (OMS, 1999), como ocurrió en 2020 donde 150 personas en 10 países diferentes contrajeron salmonelosis por un chocolate que se fabricó con leche contaminada (EFSA, 2022).

Además, uno de los mayores problemas que podemos encontrar son los microorganismos con capacidad de esporulación, ya que al entrar en este estado consiguen sobrevivir a tratamientos térmicos convencionales como puede ser la pasteurización, que se utiliza en la industria (Wells-Bennik et al., 2016). Ese aspecto los convierte en un gran peligro, por el cual se están invirtiendo muchos recursos en la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías, sobre todo no térmicas, para asegurar la seguridad alimentaria frente a estos patógenos resistentes (Solenio Wilches, 2015). Los microorganismos patógenos más conocidos con capacidad de esporular son *Bacillus cereus* y las bacterias del género *Clostridium*. Las esporas de *B. cereus* se han encontrado en leche o en productos lácteos que han sido tratados con UHT (Ultra High Temperature), mostrando una alta resistencia térmica (Mazas et al., 1995). Aunque estos microorganismos estén en su forma esporulada, su actividad metabólica puede continuar y provocar problemas para la salud del consumidor y dañar las cualidades organolépticas del producto, como es el caso de *Clostridium tetani* en quesos (Dürre, 2014).

En los últimos años, la preocupación de los consumidores por la frescura y la calidad organoléptica y nutricional de los alimentos ha ido aumentando (Giordano et al., 2018). El consumo de pescado y carnes crudas o poco tratadas ha crecido y del mismo modo que los productos sin aditivos químicos atraen más a los consumidores. Se busca satisfacer las peticiones del consumidor y esto pone en una situación comprometida a las autoridades sanitarias, pues los alimentos no tratados y sin conservantes pueden contener suponer un riesgo microbiológico para el consumidor (Troy et al., 2016).

Al principio se intentó preservar la frescura de los alimentos para que tuvieran una mayor vida útil (Solenio Wilches, 2015). Algunas de las tecnologías desarrolladas con el fin de preservar la frescura de los alimentos, alargando su vida útil es el caso de la atmósfera modificada, o el uso de envases barrera para preservar frutas y hortalizas u otros alimentos. Sin embargo, esto no conseguía eliminar microorganismos, simplemente se evitaba su crecimiento y reproducción. Actualmente, las investigaciones se centran en el desarrollo de tecnologías de conservación no

térmicas, las cuales buscan alcanzar una mayor inocuidad alimentaria manteniendo la frescura y la calidad de los alimentos (Solenio Wilches, 2015). Entre ellas destacan las altas presiones hidrostáticas, los campos eléctricos pulsantes de alta intensidad, los ultrasonidos, la irradiación ionizante, los campos magnéticos oscilantes, la luz blanca de alta intensidad y el plasma frío, entre otros (Solenio Wilches, 2015). Muchos de estos tratamientos sustituyen el uso de la temperatura por otros métodos que descontaminan, bien pasterizando, bien esterilizando o bien, simplemente higienizando. Algunas de estas tecnologías son la radiación ultravioleta, la luz blanca de alta intensidad, o por procesos que afectan a la membrana celular o la actividad enzimática (Solenio Wilches, 2015). Estas tecnologías, normalmente, tienen efecto sobre más de un elemento de los microorganismos para garantizar su eliminación, por ejemplo, las altas presiones hidrostáticas producen cambios en la morfología de las células, pero también desnaturaliza proteínas lo cual afecta a la permeabilidad de la membrana (Farr., 1990).

1.2. Tecnología de plasma frío

El plasma es el cuarto estado de la materia, el cual, energéticamente hablando, está por encima del estado gaseoso (Basaran et al., 2008). Este estado se consigue ionizando las partículas o átomos de un gas y se puede generar de varias maneras: calentando el gas, lo que resulta en plasma caliente, o con una corriente eléctrica, lo que nos dará plasma frío, en el cual una pequeña fracción del gas se encontrará ionizado (Lerouge et al., 2000). El plasma frío es una nueva tecnología, no térmica y sostenible, que utiliza gases puros o combinaciones de diferentes gases, que al ser sometidos a una corriente eléctrica crean especies reactivas que afectan superficialmente el producto. Una de las ventajas que tiene este tratamiento es que, al no ser térmico, se consigue mantener la calidad organoléptica y nutricional del alimento o materia prima, mientras se asegura su inocuidad (Barba et al., 2017; Misra & Jo, 2017).

La tecnología de plasma frío fue diseñada originalmente para otras industrias que no estaban relacionadas con los alimentos (Chizoba Ekezie et al., 2017). Actualmente, dentro de la industria alimentaria el plasma frío se utiliza para la desinfección de superficies en contacto con alimentos y desodorización de instalaciones (Priyadarshini et al., 2019; Sarangapani et al., 2016, 2018; Scholtz et al., 2015; Thirumdas et al., 2017). Debido a los buenos resultados obtenidos en cuanto a reducción de microorganismos, toxinas y en la descontaminación de envases, se está estudiando su uso en alimentos (Coutinho et al., 2021).

Otras ventajas de esta tecnología son: su rapidez de aplicación, el bajo coste del proceso y que tiene un bajo impacto medioambiental (Li et al., 2017; Ziuzina et al., 2014). Por desgracia, también tiene algunos inconvenientes como por ejemplo que la maquinaria requiere un alto coste de inversión y que la efectividad del tratamiento depende en gran medida del volumen y forma del producto (Song et al., 2009; Yong et al., 2015). Además, es una tecnología muy novedosa, por lo tanto, aún se está desarrollando e investigando cómo mejorar la eficiencia y estudiando el efecto que puede producir en los alimentos (Liao et al., 2017).

1.2.1. Efecto del plasma frío sobre los microorganismos

Las especies reactivas creadas con plasma frío tienen una alta capacidad de inactivar un gran rango de microorganismos como bacterias, mohos, levaduras, esporas e incluso parásitos, virus y priones (Alkawareek et al., 2014; Hayashi et al., 2013). Algunos ejemplos de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que resultan dañinas son: dióxido de nitrógeno, oxígeno singlete, ozono, peróxido de hidrogeno (Chen et al., 2020; Han et al., 2019; Jiang et al., 2020), nitrógeno atómico,

óxido nítrico y nitrógeno molecular excitado (Scholtz et al., 2015). También se pueden utilizar gases nobles como el helio o el argón que tienen importantes efectos antimicrobianos (Bermúdez-Aguirre, 2019).

La sinergia entre la radiación ultravioleta (UV) y las especies reactivas permite que con un tiempo de tratamiento corto sea posible una gran reducción de los microorganismos del alimento. Aunque también hay otros factores que afectan al grado de inactivación, como la energía aportada (Gweon et al., 2009; Song et al., 2009), el contenido en humedad del producto, la velocidad de flujo del gas (Liu et al., 2008) o el gas empleado en el proceso (Gweon et al., 2009; Kim et al., 2011; Surowsky et al., 2014). Por otra parte, la distancia entre el alimento a esterilizar y el punto donde se genera el plasma influye en la rapidez del tratamiento, pues cuanto más lejos se encuentre de este punto más tiempo necesita, ya que solo llegan al alimento las especies reactivas con una mayor vida (Liu et al., 2008).

Las especies reactivas generadas en estos procesos consiguen un efecto higienizante por la combinación de diversos mecanismos, como son la plasmólisis, los daños en el ADN y también la influencia sobre las proteínas de las bacterias (Moreau et al., 2008). La oxidación lipídica, la desnaturalización de las proteínas y la introducción de mutaciones en el material genético, generan interferencias dañinas en el metabolismo celular (Pan et al., 2019; Xu et al., 2018). En cuanto a la membrana celular, las cargas formadas desencadenan la creación de poros irreversibles, por donde la bacteria sufre una pérdida de citoplasma y orgánulos, debido a la diferencia de presiones con el medio (Zimmerman, 1986).

El plasma frío también es efectivo contra esporas, como ya se ha demostrado en investigaciones previas (tabla 1), con combinaciones de diferentes gases (Liao et al., 2019) y con tratamientos monogaseosos (Deng et al., 2006).

Tabla 1. Efecto del plasma sobre esporas de distintos microorganismos en distintas matrices (Liao et al., 2019)

Alimento	Espora	Tipo de plasma	Reducción conseguida	Referencias
Pimiento rojo	<i>Bacillus cereus</i>	Plasma frío por microondas	0.7-2.6 log esporas/cm ²	(Kim et al., 2017a)
Granos de cereal	<i>Bacillus atrophaeus</i>	Plasma atmosférico por descargas de barrera dieléctrica	5 log esporas/mL	(Los et al., 2017)
Cebolla en polvo	<i>Bacillus cereus</i>	Plasma frío por microondas	1.1-2.1 log esporas/cm ²	(Kim et al., 2017b)
Pistacho	<i>Aspergillus flavus</i>	Plasma atmosférico por descargas de barrera dieléctrica	>5 log UFC	(Sohbatzadeh et al., 2016)
Dátiles	<i>Aspergillus flavus</i>	Plasma frío de argón de doble presión atmosférica	980 log UFC/mm ²	(Ouf et al., 2015)
Leche en polvo	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Plasma frío por microondas	0.9 log UFC/g	(Oh et al., 2015)
Cebolla en polvo	<i>Bacillus cereus</i>	Plasma frío por microondas	0.4 log UFC/g	(Oh et al., 2015)
Pimienta negra	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i>	Plasma por radiofrecuencias	2.4-2.8 log UFC/g	(Hertwig et al., 2015)

En el caso de las esporas, se concluyó que el daño por oxidación afecta al recubrimiento de la espora y la consecuente lisis celular es el principal factor de mortalidad por delante de la radiación ultravioleta (Deng et al., 2006; Raguse et al., 2016; Tseng et al., 2012). El efecto del tratamiento también depende de las características de la bacteria, por ejemplo, si es Gram positiva, el tratamiento podría ser menos efectivo que si es Gram negativa, ya que la pared celular le brinda una mayor protección (Coutinho et al., 2021).

1.2.2. Tipos de plasma frío según la presión de trabajo

Podemos diferenciar dos categorías de plasma frío dentro de la industria según la presión del gas de trabajo: plasma de presión atmosférica y plasma de baja presión. El plasma de presión atmosférica emplea los gases que se encuentran en el ambiente, es menos costoso, pues no necesita la creación de vacío, y eso permite que se pueda trabajar en continuo (Niemira, 2012).

Por otro lado, para trabajar con plasma frío a baja presión (Figura 1), se necesita crear un vacío previo en la cámara donde se encuentra la matriz a tratar, empleando una bomba de vacío y después se inyecta el gas o combinación de gases de trabajo, que se ionizan generando el plasma (Laroussi, 2005). La densidad de partículas producida es baja y resulta útil para el procesamiento por lotes de producto (Niemira, 2012). Las ventajas del plasma a baja presión es que las especies reactivas requieren de menos potencia aplicada durante el tratamiento para formarse, y también permite seleccionar los gases con los cuales queremos trabajar (Niemira, 2012).

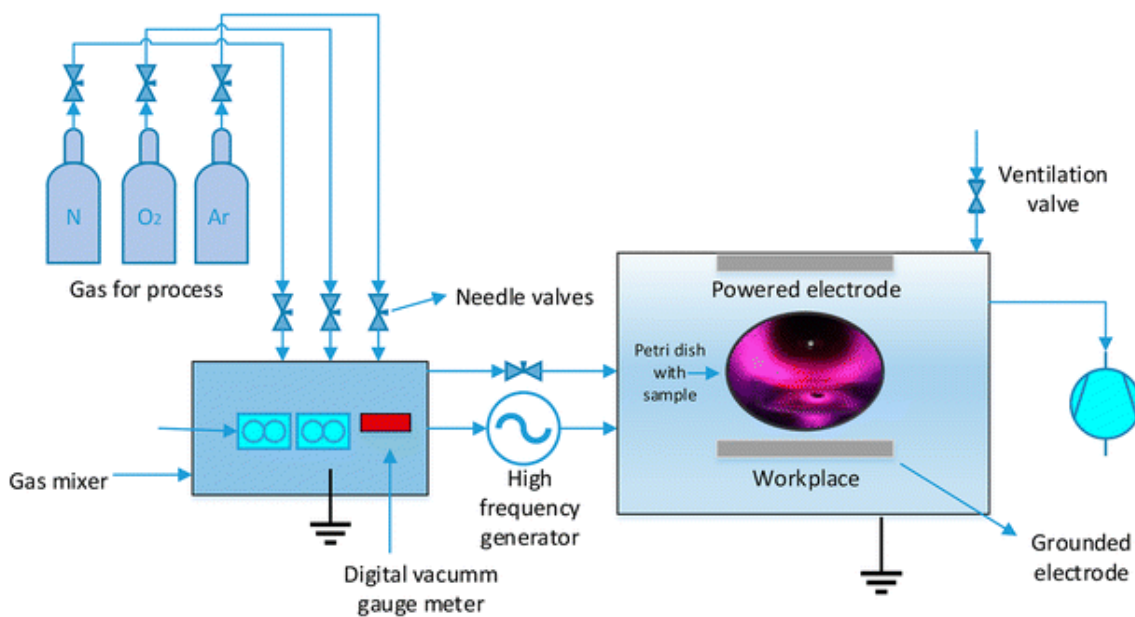


Figura 1. Esquema de un sistema de plasma frío a baja presión (Segura-Ponce et al., 2018)

1.3. La harina de soja como materia prima a tratar con plasma frío

La soja se está empleando como materia prima en gran diversidad de alimentos por su composición nutricional y al aumento de personas que deciden cambiar a una dieta vegetariana o vegana, pues con la soja se pueden crear desde bebidas vegetales hasta sustitutos cárnicos (Wang et al., 2022). Uno de sus mayores usos es como sustituto proteico por su perfil de proteínas, ya que la proteína de la soja contiene la mayoría de los aminoácidos esenciales, al igual que la proteína animal. Lo que hace que la soja sea una mejor opción es que su contenido graso es menor que el de los productos animales, sobre todo en grasa saturada, convirtiéndola en un alimento más saludable (Mni & Lokuruka, 2010). Además, es un producto que en Asia ha sido consumido desde antaño y su influencia en el mundo occidental está siendo cada vez mayor en los últimos años (Mohan et al., 2019).

En el mercado podemos encontrar distintos tipos de soja en grano, aunque la más común es la llamada 'soja amarilla', perteneciente a la especie *Glycine max* (Anjum et al., 2022). También podemos encontrar habitualmente otras versiones de soja en grano que contienen diferentes colores de cubierta, como es la soja negra, también perteneciente a la especie *Glycine max*, que presenta este color debido al elevado contenido en antocianinas (Ganesan & Xu, 2017) y, por otra parte, también es común el consumo de la llamada soja verde o judía mungo, perteneciente a la especie *Vigna radiata*, otra leguminosa de elevado contenido proteico (Dahiya et al., 2015).

La soja en grano es materia prima para la elaboración de muchos productos derivados, como la leche de soja o el tofu, que requieren una rehidratación de la misma para conseguir el producto final. Sin embargo, frecuentemente los granos de soja están contaminados por bacterias esporuladas, como es el caso de *Bacillus cereus* y bacterias del género *Clostridium* (Jung et al., 2014; Kim et al., 2004). La hidratación que requiere el procesado facilita su germinación,

suponiendo un problema posterior de inocuidad alimentaria (Uemura et al., 2010). Uno de los casos más conocidos fue el brote producido por *E. coli* en germinados de soja en Alemania durante el año 2011 (EFSA, 2011).

2. OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Grado tiene como objetivo principal el estudio de la tecnología de plasma frío como método para higienizar harina de soja. Con la finalidad de alcanzar este objetivo, se propusieron los siguientes objetivos secundarios:

1. Evaluar el efecto del tiempo de tratamiento (10 y 20 min) sobre la higienización de harina de soja.
2. Evaluar el efecto del plasma producido por diferentes gases (oxígeno y nitrógeno) en la higienización de la harina de soja.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Procesamiento inicial de las muestras

Las diferentes sojas empleadas (Figura 2) fueron obtenidas en supermercados ecológicos y se conservaron envasadas al vacío para mantener sus características.

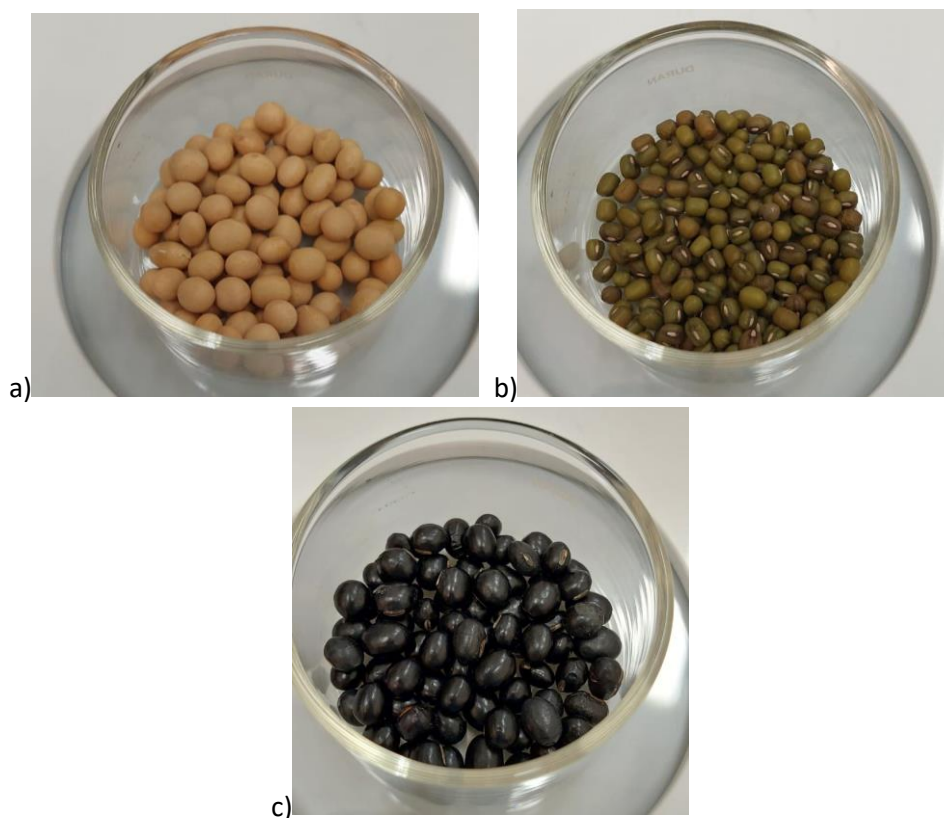


Figura 2. Tipos de leguminosas empleadas: a) soja amarilla, b) judía mungo, c) soja negra.

Se pesaron 10 gramos de cada tipo de soja para la caracterización microbiológica y también se emplearon 10 gramos de éstas para cada uno de los tratamientos realizados con plasma.

Posteriormente se trituraron con un molinillo (IKA, A11 basic, Alemania) durante 30 segundos para obtenerla en forma de harina.

3.2. Tratamiento con plasma frío

Para el tratamiento de plasma frío a vacío se empleó el equipo Pico-AR-200-PCCE7 (Diener Electronic, Alemania) (Figura 3) perteneciente al grupo de investigación. Se trata de un equipo de descarga de barrera dieléctrica (DBD) por plasma frío a baja presión. La cámara de vacío es cilíndrica con un volumen máximo de 5L. El generador es de tipo E NTPG (13,56 MHz, 0 - 300 W). El suministro de gas se controla mediante controladores de flujo másico (MFC). Además, dispone de un sensor óptico acoplado a un espectrómetro para identificar las especies reactivas formadas.

Se colocan 10 gramos de harina de soja en placas Petri de borosilicato de 90 mm y se introducen en la cámara del equipo. En primer lugar, se despresuriza la cámara para eliminar el gas atmosférico y después se inyecta el gas deseado hasta una presión de 0.35 mbar. Se mantiene la presión constante de gas durante el tiempo de tratamiento seleccionado. Pasado el tiempo, se detiene la inyección del gas y se presuriza la cámara.

En este estudio se emplearon como gases ionizantes oxígeno y nitrógeno, durante 10 y 20 minutos de exposición y empleando 300 W de potencia. En total se realizaron dos repeticiones independientes para cada tratamiento.



Figura 3. Equipo de plasma a baja presión junto a las balas de gas de oxígeno y nitrógeno.

3.3. Caracterización microbiológica de la matriz anterior al tratamiento

Para evaluar la capacidad de la tecnología de plasma frío para higienizar la soja, se llevó a cabo una caracterización microbiológica de las tres matrices de soja empleadas en el estudio tras los tratamientos por plasma y se compararon con los valores obtenidos para las muestras sin tratamiento (controles). La harina se introdujo en bolsas para stomacher junto con 90 mL de agua de peptona tamponada (Scharlab, España). Después, se homogeneizó la muestra, empleando un homogeneizador tipo Stomacher (IUL, clásico/panorámico, España) durante 1 minuto. Posteriormente, se realizaron ensayos de microbiología clásica basados en metodologías UNE-EN-ISO para determinar la presencia de microorganismos patógenos de interés. En la tabla 2 se muestran los microorganismos estudiados y los métodos empleados:

Tabla 2. Normas UNE-EN ISO correspondientes a cada microorganismo estudiado.

Microorganismo	Normativa
Enterobacterias	UNE-EN ISO 21528-2
<i>Escherichia coli</i>	UNE-EN ISO 16649-3
Aerobios mesófilos	UNE-EN ISO 4833-1
Estafilococos coagulasa-positivos	UNE-EN ISO 6888-2
Anaerobios sulfito-reductores	UNE-EN ISO 15213-1
Mohos y levaduras	UNE-EN ISO 21527-1
<i>Bacillus cereus</i>	UNE-EN ISO 7932
<i>Listeria</i>	UNE-EN ISO 11290-2
<i>Salmonella</i>	UNE-EN ISO 6579-1

Adicionalmente a las muestras estudiadas, y con el fin de ayudar en la identificación de los patógenos estudiados se llevó a cabo un control positivo, inoculando intencionadamente muestras de soja con los siguientes microorganismos, en un medio estándar, pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Paterna, Valencia): *E. coli* (CECT103), *B. cereus* (CECT148), *L. monocytogenes* (CECT4032), *S. Typhimurium* (CECT443) y *S. aureus* (CECT976,). Esto sirve para tener una caracterización precisa de la morfología de las bacterias.

3.3.1. Enterobacterias

Para la determinación de enterobacterias, se siguió el protocolo UNE-EN ISO 21528-2. Para la identificación, se hizo una siembra en profundidad, adicionando 1 mL de la muestra previamente homogenizada con el stomacher a una placa petri estéril y empleando el agar selectivo para enterobacterias, VRBG agar (Scharlab, España). La adición de glucosa permite que en este medio las enterobacterias puedan crecer mejor y la combinación de cristal violeta y sales biliares consigue inhibir a la mayoría de bacterias gram positivas (Paulsen et al., 2008). Una vez solidificado el agar, se añadió otra capa fina de agar VRBG de nuevo y se incubó de forma invertida a una temperatura de 37 °C durante 24 ± 2 h. Esta determinación se hizo por duplicado, es decir, se sembraron dos placas por dilución. Las colonias de enterobacterias son de color rosado o púrpura y pueden presentar un halo a su alrededor.

3.3.2. *Escherichia coli*

El protocolo seguido para este microorganismo fue la norma UNE-EN ISO 16649-3. En una placa Petri estéril se hizo una siembra en profundidad, añadiendo 1 mL de la muestra previamente homogenizada con el stomacher y se recubrió con agar TBX (Scharlab, España). Este agar es un medio selectivo de *E. coli*, ya que contiene un beta-D-glucurónido y la mayoría de las cepas de *E. coli* son productoras de la enzima beta-D-glucuronidasa, que rompe la molécula y les da el color típico azul-verdoso, indicativo de las colonias de *E. coli* (Vergine et al., 2017). Se dejó solidificar el agar y se incubó a 44 ± 1 °C durante 21 ± 3 h. En la determinación de *E. coli* se sembraron dos placas por dilución.

3.3.3. Aerobios mesófilos

La norma UNE-EN ISO 4833-1 se utilizó como protocolo para la determinación de aerobios mesófilos en las muestras. Se realizó una siembra en profundidad con 1 mL de la muestra previamente homogenizada con el stomacher y se empleó el medio PCA agar (Scharlab, España). Una vez solidificado el medio, se invirtieron las placas Petri y se incubaron a 30 °C durante 72 ±

3 horas. Las colonias de aerobios mesófilos tienen una gran variedad de formas y tamaños dado que el medio utilizado no es uno selectivo, por lo que diferentes microorganismos son capaces de desarrollarse en este agar. La determinación de aerobios mesófilos se hizo con un duplicado de las placas.

3.3.4. Estafilococos coagulasa-positivos

Para el recuento de *Staphylococcus aureus* y otros estafilococos coagulasa-positivos se siguió la norma UNE-EN ISO 6888-2. Para ello, se hizo una siembra en profundidad en una placa Petri estéril añadiendo 1 mL de la muestra previamente homogenizada con el stomacher y se vertió el agar selectivo para estafilococos, el agar Baird Parker (Scharlab, España), suplementado con yema de huevo con telurito (Scharlab, España). El agar Baird Parker es un medio selectivo porque contiene glicina y litio que inhibe el crecimiento de los microorganismos que no interesan, mientras ayudan al crecimiento de estafilococos. La yema de huevo también contiene lecitina y telurito, los cuales son degradados por los estafilococos coagulasa-positivos y no por los demás estafilococos (Schoeller & Ingham, 2001). En esta determinación se hizo un duplicado de las placas. Estas se incubaron de forma invertida en estufa a 36 ± 1 °C durante 24 h. Si durante este periodo de tiempo no fuesen identificables las colonias, se pueden incubar de 18 a 24 h más. Debido a la reducción del telurito, producen colonias de color gris oscuro a negro y si son productores de lecitinasa descomponen la yema de huevo creando zonas transparentes alrededor.

3.3.5. Anaerobios sulfito-reductores

En esta determinación se siguió el protocolo UNE-EN ISO 15213-1 para el recuento de *Clostridium spp.* y otros anaerobios sulfito-reductores. Como queremos determinar los esporulados presentes en el alimento, primero se realizó un tratamiento térmico previo, introduciendo una alícuota de la muestra previamente homogenizada con el stomacher en un vial y calentando en un baño de agua a 80 °C durante 10 minutos. Para la determinación, se realiza una siembra en profundidad con 1 mL de la dilución por duplicado con agar de sulfito de hierro modificado (Scharlab, España).

Una vez se ha solidificado el agar, se vertió otra fina capa de medio. Las placas se introdujeron en una jarra de anaerobiosis (Oxoid, España), junto a un indicador de anaerobiosis (bioMérieux, Francia) ya activado con unas gotas de agua destilada y un paquete generador de anaerobiosis (GENbox anaer, 96124, Francia). Se incubó a 37°C durante 48 ± 2 h. Los anaerobios sulfito-reductores en estas condiciones forman colonias blancas, amarillas o negras.

3.3.6. Mohos y levaduras

El protocolo empleado para la determinación de mohos y levaduras fue la norma UNE-EN ISO 21527-1. Como nuestra muestra es un alimento que tiene una actividad de agua menor a 0.95, el medio utilizado fue el agar DG18 (Scharlab, España), al cual se le debe añadir glicerol (Scharlab, España). Este medio es único para mohos y levaduras pues contiene cloranfenicol, un inhibidor del crecimiento bacteriano (Beuchat et al., 1996). Para su determinación se hizo una siembra en superficie en una placa de 140 mm de diámetro, añadiendo 1 mL de la muestra previamente homogenizada con el stomacher y extendiendo con un asa Digrafsky estéril. Las placas se incubaron en una estufa a 25 °C de 5 a 7 días. Esta determinación se hizo por duplicado, es decir, se sembraron dos placas por dilución.

3.3.7. *Bacillus cereus*

Para la determinación de *B. cereus* se usó la norma UNE-EN ISO 7932. El medio utilizado para la identificación de *B. cereus* fue el medio selectivo MYP. Este medio fue obtenido con la

combinación de un agar cromogénico (Scharlab, España), el cual tiene que ser suplementado con yema de huevo (Scharlab, España) y con Polimixina B (Scharlab, España) para que resulte en el medio MYP. Lo que hace selectivo a este medio es la resistencia de *B. cereus* a la poliximina y que este microorganismo degrada la lecitina de la yema de huevo, creando un halo alrededor (Tallent et al., 2012).

Cuando el medio estuvo listo se vertió sobre una placa Petri estéril y se esperó a su solidificación. Ya sólido, se hizo una siembra en superficie con 0.1 mL de la muestra previamente homogenizada con el stomacher y se extendió con un asa de plástico estéril. Una vez absorbida la muestra en el agar, se invirtieron las placas y se incubaron de 18 a 24 horas en una estufa a 30 °C. La siembra se hizo por duplicado para cada dilución. Si no se observan colonias, las placas se pueden incubar otras 24 horas.

Las colonias presuntivas de *B. cereus* son de color rosado y de gran tamaño, con un halo de precipitados (ISO 7932, 2005). Para la confirmación de que sean colonias de *B. cereus*, se utilizaron placas de agar sangre de oveja (ThermoFisher, Alemania) para realizar la prueba de hemólisis. Se seleccionaron las colonias presuntivas, junto a un control positivo de *B. cereus* y se añadieron a la placa con agar sangre. Estas placas se incubaron durante 24 horas a 30 °C. Pasado este tiempo, si la colonia presentaba un halo transparente alrededor, se confirma que la colonia es de *B. cereus*.

3.3.8. Listeria

El protocolo seguido para la determinación de *Listeria* fue la norma UNE-EN ISO 11290-2. Se utilizó el agar selectivo para *Listeria spp.* de Ottiviani y Agosti (Scharlab, España), al cual se le añade el suplemento selectivo para *Listeria* de Ottiviani y Agosti (Scharlab, España) y el suplemento enriquecedor para *Listeria* de Ottiviani y Agosti (Scharlab, España). Este medio es específico de *Listeria* porque contiene cloruro de litio, que impide el crecimiento de otros microorganismos y un compuesto beta-D-glucopiranosido, que en presencia de la enzima beta-glucoronidasa nos permite visualizar las colonias azul-verdosas características de *Listeria* (Angelidis et al., 2015).

Cuando se mezclaron los suplementos, se vertió el medio en una placa Petri estéril. Una vez gelifica el agar, se siembra en superficie añadiendo 0.1 mL de muestra previamente homogenizada con el stomacher y se extiende con un asa Digrafsky estéril. En caso de que se llegara a un límite de detección y no creciera *Listeria*, se pueden utilizar las placas Petri de 140 mm y sembrar 1 mL de las diluciones. Se incubaron las placas invertidas durante 24 ± 2 horas a 37 °C. En la determinación de *Listeria* se sembraron dos placas por dilución. Si queremos tener un mejor desarrollo de las colonias o no se pueden diferenciar las colonias presuntivas, se pueden volver a incubar 24 horas más.

Las colonias presuntivas de *Listeria spp.* en estas condiciones son aquellas que tienen un color verde azulado y que pueden presentar alrededor un halo (ISO 11290-2, 2018). Para confirmar las colonias presuntivas, se realiza la prueba de la beta-hemólisis. En esta prueba se utilizaron placas de agar sangre de oveja (ThermoFisher, Alemania) y se inocularon colonias presuntivas de *Listeria* de forma espaciada, incubándose a 37 °C durante 24 horas. Si estas colonias tienen un halo transparente a su alrededor significa que presentan hemólisis (ISO 11290-2, 2018).

3.3.9. Salmonella

Para la determinación de presencia o ausencia de *Salmonella*, se siguió como protocolo la norma UNE-EN ISO 6579-1. En este protocolo se utilizan dos tipos diferentes de enriquecimiento, con sus respectivos procedimientos. Primero, la muestra previamente homogenizada con el

stomacher junto al medio de pre-enriquecimiento (agua de peptona tamponada) (Scharlab, España), se incubó a una temperatura de 36 ± 2 °C durante 18 ± 2 horas. Después, se transfirieron 0.1 mL a un vial que contenía el medio Rappaport Vassiliadis (Scharlab, España) y se incubó a 41.5 °C durante 24 ± 3 horas. Por otro lado, también debíamos añadir a un vial que contenía el medio de tetratiato de Muller Kauffman (Scharlab, España), 1 mL de la muestra preenriquecida e incubarlo a 36 ± 2 °C durante 24 ± 3 horas. Una vez listo, se vertió sobre una placa Petri estéril, el agar selectivo XLD (Scharlab, España) y se hizo una siembra en superficie inoculando 0.1 mL de los medios de enriquecimiento en el agar y extendiendo con un asa Digiransky estéril. Las disoluciones enriquecidas también se sembraron en agar cromogénico, específico para *Salmonella* (CHROMagar, Francia), con las mismas cantidades y en siembra en superficie. Todas las placas se incubaron de forma invertida a una temperatura de 37 °C durante 24 ± 3 horas. Se hizo un duplicado de cada placa en esta determinación. El agar XLD es selectivo de *Salmonella* porque la lisina previene la fermentación de la xilosa por parte de las colonias de *Salmonella*, ya que, si ésta fermentase la xilosa, se acidificaría el medio y no sería distinguible de las colonias de otros microorganismos. Las colonias presuntivas de *Salmonella* en el agar XLD son de color negro en el centro y una zona transparente y ligeramente rojiza alrededor (ISO 6579-1, 2017). Por su parte, las colonias presuntivas de *Salmonella* aparecen de color rosado en el agar cromogénico.

3.4. Recuento de colonias

Se cuentan las unidades formadoras de colonia (UFC) crecidas en placa, se realiza la corrección en función del factor de dilución mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{UFC}{Volumen sembrado (mL)} * factor de dilución$$

Posteriormente, teniendo en cuenta los gramos de soja de partida empleados, se calcula la concentración de microorganismos por gramo de muestra.

3.5. Análisis estadístico de los resultados

Se realiza un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y contrastes post-hoc Tukey para comparación múltiple de medias y así determinar si hay diferencias significativas entre los tratamientos y el control, empleando el software IBM Statistical Packaging for Social Sciences (IBM SPSS), versión 29.0. Se emplea un p-valor < 0.05 .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados de la caracterización microbiológica inicial

Tras el recuento de colonias de la caracterización, los resultados fueron introducidos en la tabla 3, donde los guiones significan una ausencia del microorganismo y los números nos indican el promedio de las unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) junto a su desviación estándar (SD).

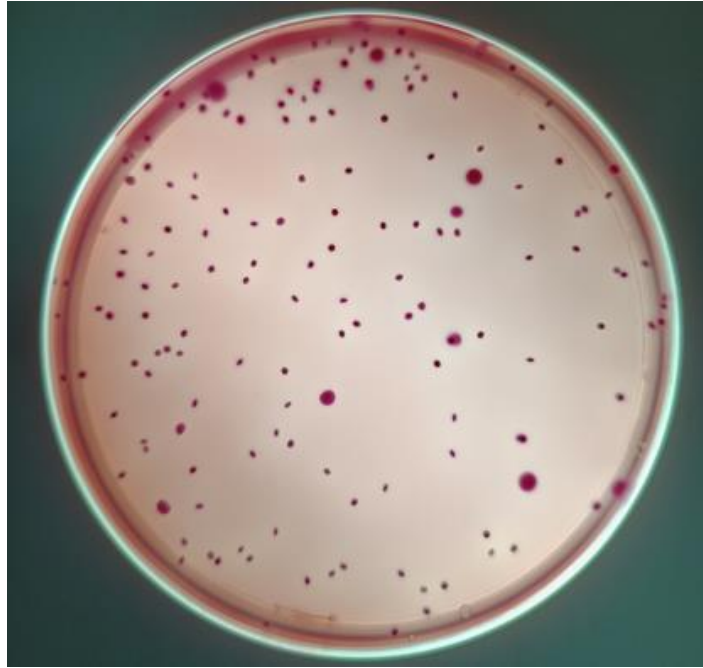
Tabla 3. Resultados de la caracterización microbiológica en soja y judía mungo en UFC/g.

	Soja negra (UFC/g)	Soja amarilla (UFC/g)	Judía mungo (UFC/g)
Enterobacterias	-	35 ± 7.07	-
<i>E. coli</i>	-	-	-
Aerobios mesófilos	215 ± 7.07	116.67 ± 15.28	366.67 ± 28.87
Estafilococos	700 ± 283	-	-
Anaerobios sulfito-reductores	-	25 ± 7.07	-
Mohos y levaduras	45 ± 7.07	15 ± 7.07	45 ± 7.07
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Listeria spp.</i>	-	-	100 ± 0
<i>Salmonella</i>	-	-	-

Los resultados son expresados como promedio de UFC/g ± desviación estándar (SD).

Como podemos observar en la tabla 3, en ninguna de las muestras se aisló *Salmonella spp.*, *E. coli* y *B. cereus*, pero sí aparecen otros microorganismos, algunos de ellos patógenos importantes, demostrando que la soja debe ser un alimento que tiene que ser higienizado antes de su consumo o transformación.

Los resultados muestran presencia de enterobacterias (Figura 4) y anaerobios sulfito-reductores (Figura 5) que podrían ser un ejemplo de contaminación fecal (Davin-Regli et al., 2019; Viegas et al., 2020), esto se puede deber a que, al recoger la soja amarilla, el producto haya estado en contacto con el suelo o que durante su procesado hubo una contaminación. En la figura 5 se observa una colonia presuntiva de *Clostridium* con el color negro y el halo que es característico de las colonias de esta especie cuando crecen en el medio utilizado (ISO 15213-1, 2023).



Fotografía a)



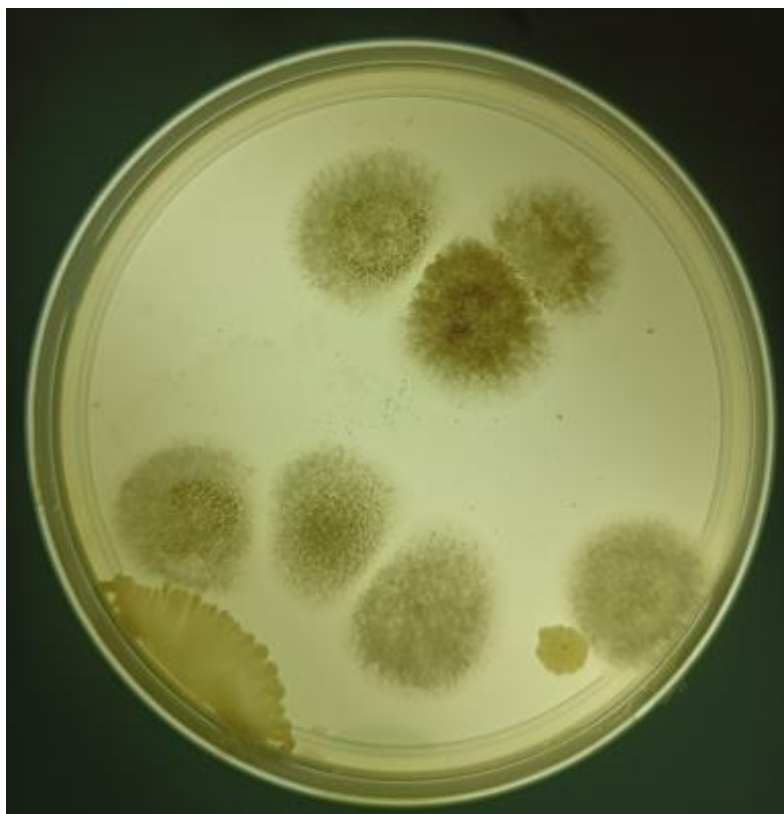
Fotografía b)

Figura 4. Enterobacterias crecidas a partir de a) control positivo (*E. coli* CECT103) y b) soja amarilla.



Figura 5. Anaerobios sulfito-reductores en soja amarilla.

Por otro lado, los mohos, levaduras y aerobios mesófilos (Figura 6) son microorganismos que están presentes en el ambiente y pueden contaminar fácilmente a cualquier alimento (Castillo Bascur et al., 2017; Blanco-Rios et al., 2011).



Fotografía a)



Fotografía b)

Figura 6. Placas con crecimiento de a): aerobios mesófilos en judía mungo y b) mohos y levaduras en soja negra.

La aparición de *Listeria spp* en judía mungo puede tener un origen en la mala higiene de los trabajadores durante su manipulación, contaminaciones ya presentes en el producto o en el agua (Muñoz et al., 2013). En el caso de *Listeria*, la prueba de hemólisis resultó positiva, indicando que puede tratarse de *L. monocytogenes* o de *L. ivanovii* (figura 7).



Figura 7. Prueba de hemólisis de *Listeria spp.* aislada de judía mungo en agar sangre.

Por último, la contaminación por estafilococos en la soja negra (figura 8), podría provenir de la manipulación del alimento, dado que es un microorganismo que se encuentra frecuentemente en la piel y las superficies de trabajo (Predari & Carla., 2007).

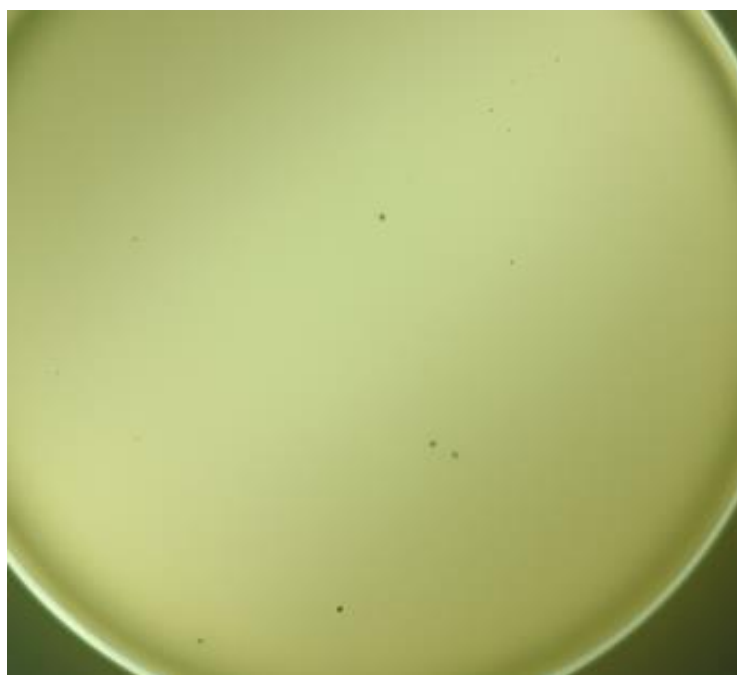


Figura 8. Placa de Baird Parker agar con crecimiento de estafilococos en soja negra.

4.2. Efecto del tratamiento por plasma frío en la higienización de la soja

Los resultados de la caracterización microbiológica tras el tratamiento por plasma a 10 y 20 min utilizando como gases ionizantes oxígeno y nitrógeno se muestran a continuación. Para organizar y representar mejor los resultados, y para compararlos, se han creado las tablas 3, 4 y 5, donde se representan los promedios de los recuentos junto a la desviación estándar en soja amarilla, judía mungo y soja negra, respectivamente. Para determinar la existencia de diferencias significativas al 95% entre los diferentes tratamientos aplicados y también con el control (muestra sin tratar por plasma) se llevaron a cabo ANOVAs. Tras los análisis, los valores con asterisco (*) (tabla 3, 4 y 5) indican que el tratamiento difiere significativamente del control, mientras que los valores sin asterisco indican que no hay una diferencia significativa entre tratamiento y control. Para los tratamientos con el mismo gas, pero diferente tiempo de exposición al tratamiento, la manera de indicar que difieren significativamente es añadiendo diferentes letras en mayúscula al final de los valores. Es necesario destacar que en ningún caso se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos con distintos gases.

En la tabla 4, donde se representan los resultados obtenidos en soja amarilla, se indica que hay una reducción significativa en el recuento de microorganismos en todos los tratamientos con plasma respecto al control, excepto en el caso de mohos y levaduras, pero aun así se observa que el promedio de UFC por gramo en las muestras tratadas es inferior al control. Adicionalmente, en el caso de los tratamientos con oxígeno, se ve una mayor reducción con el incremento del tiempo de tratamiento. En el caso de aerobios mesófilos con los tratamientos de oxígeno a 10 y 20 minutos, el p-valor obtenido tiene un valor inferior a 0.05 (0.002), indicando que ambos tratamientos difieren de forma significativa, obteniendo una mayor reducción de aerobios mesófilos durante los 20 minutos de tratamiento. Se destaca, además, que, en el tratamiento de oxígeno de 20 minutos, los anaerobios esporulados no se detectan. Esto es un

gran avance porque los esporulados son uno de los mayores problemas en la industria alimentaria y son muy difíciles de eliminar con las técnicas tradicionales debido a la baja a_w de la harina de soja (Wells-Bennik et al., 2016). También se llega a la no detección en otros microorganismos como las enterobacterias con tratamientos de nitrógeno y de oxígeno, demostrando la gran capacidad de higienización del plasma frío tanto con oxígeno como con nitrógeno.

Tabla 4. Comparación de los tratamientos en soja amarilla.

	Control	Oxígeno		Nitrógeno	
	0 min	10 min	20 min	10 min	20 min
Anaerobios esporulados sulfito-reductores (UFC/g)	25.00 ± 7.07	6.67 ± 4.17*	ND*	1.67 ± 2.36*	3.33 ± 4.71*
Enterobacterias (UFC/g)	35.00 ± 7.07	ND*	3.33 ± 4.71*	ND*	ND*
Aerobios mesófilos (UFC/g)	116.67 ± 15.28	55.80 ± 1.18 ^A	6.67 ± 0.00 ^B	31.70 ± 2.36*	13.30 ± 5.77*
Mohos y levaduras (UFC/g)	15.00 ± 7.07	7.50 ± 10.61	3.33 ± 4.71	1.67 ± 2.36	6.67 ± 4.71

Los valores son el promedio de UFC/g ± desviación estándar

ND= no detectado

(*) significa que ese valor difiere significativamente con el control.

^(A-B) indica que esos valores difieren significativamente con el tratamiento a diferente tiempo de exposición.

En cuanto a la higienización de la judía mungo (tabla 5), también hay diferencias significativas entre las concentraciones de los diferentes microorganismos de las muestras control y de las tratadas durante 20 min con cualquiera de los 2 gases, poniendo de manifiesto de nuevo la capacidad de la tecnología de plasma frío para higienizar muestras de judía mungo. Sin embargo, no aparecen diferencias entre el tipo de gas aplicado y o el tiempo de tratamiento.

Tabla 5. Comparación de los tratamientos en judía mungo.

	Control	Oxígeno		Nitrógeno	
	0 min	10 min	20 min	10 min	20 min
Listeria spp. presuntiva (UFC/g)	100 ± 0.00	ND*	6.67 ± 9.43*	8.33 ± 11.80*	3.33 ± 4.71*
Aerobios mesófilos (UFC/g)	366.67 ± 28.87	323 ± 46.20	250 ± 43.60*	320 ± 30.00	237 ± 35.10*
Mohos y levaduras (UFC/g)	45.00 ± 7.07	5.00 ± 7.07*	3.33 ± 4.71*	15 ± 2.36*	5.00 ± 2.36*

Los valores son el promedio de UFC/g ± desviación estándar

ND= no detectado

(*) significa que ese valor difiere significativamente con el control.

^(A-B) indica que esos valores difieren significativamente con el tratamiento a diferente tiempo de exposición.

Por último, con respecto a la soja negra, se logra reducir con todos los tratamientos la carga microbiana, además, todos los tratamientos tienen diferencias significativas con el control (tabla 6). En aerobios mesófilos se observa una tendencia a la disminución de microorganismos a mayor tiempo de exposición con ambos gases, siendo significativa en el caso de los tratamientos con oxígeno. Es necesario recalcar que conseguimos reducir el contenido de estafilococos hasta el punto de no detectarlos empleando ambos gases, lo que es una señal de la eficacia de los tratamientos de plasma frío para inactivar microorganismos patógenos.

Tabla 6. Comparación de los tratamientos en soja negra.

	Control	Oxígeno		Nitrógeno	
	0 min	10 min	20 min	10 min	20 min
Estafilococos coagulasa-positivos (UFC/g)	700 ± 283	1.67 ± 2.36*	ND*	ND*	ND*
Aerobios mesófilos (UFC/g)	215.00 ± 7.07	65.00 ± 7.07* ^A	6.67 ± 5.77* ^B	26.70 ± 4.71*	10.00 ± 0.00*
Mohos y levaduras (UFC/g)	45.00 ± 7.07	1.67 ± 2.36*	3.33 ± 5.75*	6.67 ± 0.00*	1.67 ± 2.36*

Los valores son el promedio de UFC/g ± desviación estándar

ND= no detectado

(*) significa que ese valor difiere significativamente con el control.

^(A-B) indica que esos valores difieren significativamente con el tratamiento a diferente tiempo de exposición.

5. CONCLUSIONES

Los resultados indican que, con los tratamientos de plasma frío a baja presión, tanto con oxígeno como con nitrógeno, se obtiene una alta reducción de la carga microbiana en soja amarilla, en soja negra y en judía mungo, lo que significa que esta tecnología sí es eficaz en la higienización

de estas matrices alimentarias, incluyendo microorganismos esporulados y patógenos importantes en alimentos.

Cuando se trata de hallar el mejor gas para la higienización, los resultados de los tratamientos con oxígeno y nitrógeno muestran que no hay casos donde se encuentren diferencias significativas cuando comparamos entre ellos, con lo cual no se puede concluir que un gas es mejor que el otro para la higienización. Pero si observamos los resultados en cuanto a los diferentes tiempos, se aprecia que cuanto mayor es el tiempo expuesto, mayor es la capacidad de esterilización del tratamiento.

Es necesario añadir que esta tecnología, al ser tan novedosa, debe seguir investigándose y desarrollándose para su introducción en la industria alimentaria.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkawareek, M. Y.; Gorman, S. P.; Graham, W. G. & Gilmore, B. F. (2014). Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(2), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.08.022>
- Al-Khayri, J.M.; Mohan, S. & Johnson, D.V. (2019). *Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes Volume 7*. Editorial Springer. Suiza
- Angelidis, A. S.; Kalamaki, M. S. & Georgiadou, S. S. (2015). Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a β -d-glucosidase-positive phenotype on Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti (ALOA). *International Journal of Food Microbiology*, 193: 114–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.022>
- Anjum, S.; Rana, S.; Dasila, K.; Agnihotri, V.; Pandey, A. & Pande, V. (2022). Comparative nutritional and antimicrobial analysis of Himalayan black and yellow soybean and their okara. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(12), 5358–5367. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11889>
- Barba, F. J.; Koubaa, M.; do Prado-Silva, L.; Orlie, V. & Sant'Ana, A. de S. (2017). Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 66, pp. 20–35). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.011>
- Basaran, P.; Basaran-Akgul, N. & Oksuz, L. (2008). Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. *Food Microbiology*, 25(4): 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.12.005>
- Bermudez-Aguirre, D. (2019). Advances in the inactivation of microorganisms and viruses in food and model systems using cold plasma. In *Advances in Cold Plasma Applications for Food Safety and Preservation* (pp. 49–91). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814921-8.00002-5>
- Beuchat, L.; Hwang, C.; King, A.; Samson, R. & Tapia de Daza, M. (1996). Evaluation of modified dichloran 18% glycerol (DGL8) agar for enumerating fungi in wheat flour: a collaborative study. In *International Journal of Food Microbiology* 29.
- Blanco-Ríos, F.; Casadiego-Ardila, G. & Pacheco, P. (2011). Calidad microbiológica de alimentos remitidos a un laboratorio de salud pública en el año 2009. *Salud Pública* 13 (6): 953-965

- Borchers, A.; Teuber, S. S.; Keen, C. L. & Gershwin, M. E. (2010). Food safety. In *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 39(2): 95–141. <https://doi.org/10.1007/s12016-009-8176-4>
- Castillo Bascur, B.; Díaz Altamirano, C. & Santibañez Gallegos, P. (2017). Contaminación por mohos e incidencia de *Cladosporium* en cámaras frigoríficas de plantas procesadoras de alimentos marinos y empresas frigoríficas del sur de Chile. *Boletín Micológico*, 32(1): 1. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2017.32.1.628>
- Chen, Y. Q.; Cheng, J. H. & Sun, D. W. (2020). Chemical, physical and physiological quality attributes of fruit and vegetables induced by cold plasma treatment: Mechanisms and application advances. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60 (16): 2676–2690. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1654429>
- Chizoba Ekezie, F. G.; Sun, D. W. & Cheng, J. H. (2017). A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: Current applications and future trends. In *Trends in Food Science and Technology* 69: 46–58. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.007>
- Coutinho, N. M.; Silveira, M. R.; Rocha, R. S.; Freitas, M. Q.; Duarte, M. C. K. H.; Quero, R. F.; Pimentel, T. C.; Esmerino, E. A.; Silva, M. C. & da Cruz, A. G. (2021). Cold Plasma. In *Sustainable Food Processing and Engineering Challenges* (pp. 109–135). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822714-5.00004-8>
- Dahiya, P. K.; Linnemann, A. R.; Van Boekel, M. A. J. S.; Khetarpaul, N.; Grewal, R. B. & Nout, M. J. R. (2015). Mung Bean: Technological and Nutritional Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(5): 670–688. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.671202>
- Davin-Regli, A.; Lavigne, J. P. & Pagès, J. M. (2019). Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. In *Clinical Microbiology Reviews* 32 (4). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>
- Deng, X.; Shi, J. & Kong, M. G. (2006). Physical mechanisms of inactivation of *Bacillus subtilis* spores using cold atmospheric plasmas. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34(4 II): 1310–1316. <https://doi.org/10.1109/TPS.2006.877739>
- Dürre, P. (2014). Physiology and Sporulation in *Clostridium*. *Microbiology Spectrum*, 2(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0010-2012>
- EFSA (2011). Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France. (2011). *EFSA Supporting Publications*, 8(7). 23pp. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2011.EN-176>
- EFSA (2022). Multi-country outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium sequence type ST34. EFSA supporting publications. *EFSA Supporting Publications*. 15 pp.
- Farr, D. (1990). High pressure technology in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 1: 14-16.
- Ganesan, K. & Xu, B. (2017). A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. In *Nutrients* 9(5) MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu9050455>
- Giordano, S.; Clodoveo, M. L.; De Gennaro, B. & Corbo, F. (2018). Factors determining neophobia and neophilia with regard to new technologies applied to the food sector: A systematic review. In *International Journal of Gastronomy and Food Science* 11: 1–19. AZTI-Tecnalia. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2017.10.001>

- Gweon, B.; Kim, D. B.; Moon, S. Y. & Choe, W. (2009). Escherichia coli deactivation study controlling the atmospheric pressure plasma discharge conditions. *Current Applied Physics*, 9(3): 625–628. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2008.06.001>
- Han, Y.; Cheng, J. H. & Sun, D. W. (2019). Activities and conformation changes of food enzymes induced by cold plasma: A review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(5): 794–811. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1555131>
- Hayashi, N.; Akiyoshi, Y.; Kobayashi, Y.; Kanda, K.; Ohshima, K. & Goto, M. (2013). Inactivation characteristics of bacillus thuringiensis spore in liquid using atmospheric torch plasma using oxygen. *Vacuum*, 88(1): 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2012.03.023>
- Hertwig, C.; Reineke, K.; Ehlbeck, J.; Knorr, D. & Schlüter, O. (2015). Decontamination of whole black pepper using different cold atmospheric pressure plasma applications. *Food Control*, 55: 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.003>
- Jiang, Y. H.; Cheng, J. H. & Sun, D. W. (2020). Effects of plasma chemistry on the interfacial performance of protein and polysaccharide in emulsion. In *Trends in Food Science and Technology* 98: 129–139. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.009>
- Juneja, V. K. (2007). Thermal inactivation of Salmonella spp. in ground chicken breast or thigh meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(12): 1443–1448. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01362.x>
- Jung, J. Y.; Lee, S. H. & Jeon, C. O. (2014). Microbial community dynamics during fermentation of doenjang-meju, traditional Korean fermented soybean. *International Journal of Food Microbiology*, 185: 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.003>
- Kim, B.; Yun, H.; Jung, S.; Jung, Y.; Jung, H.; Choe, W. & Jo, C. (2011). Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. *Food Microbiology*, 28(1): 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.022>
- Kim, H.-J.; Lee, D. S. & Paik, H.-D. (2004). Characterization of Bacillus cereus Isolates from Raw Soybean Sprouts. In *Journal of Food Protection* 67(5).
- Kim, J. E.; Choi, H. S.; Lee, D. U. & Min, S. C. (2017a). Effects of processing parameters on the inactivation of Bacillus cereus spores on red pepper (Capsicum annum L.) flakes by microwave-combined cold plasma treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 263: 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.014>
- Kim, J. E.; Oh, Y. J.; Won, M. Y.; Lee, K. S. & Min, S. C. (2017b). Microbial decontamination of onion powder using microwave-powered cold plasma treatments. *Food Microbiology*, 62: 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.006>
- Laroussi, M. (2005). Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art. In *Plasma Processes and Polymers* 2(5): 391–400. <https://doi.org/10.1002/ppap.200400078>
- Lerouge, S.; Fozza, A. C.; Wertheimer, M. R.; Marchand, R. & Yahia, L' H. (2000). Sterilization by Low-Pressure Plasma: The Role of Vacuum-Ultraviolet Radiation. In *Plasmas and Polymers* 5(1). <https://www.researchgate.net/publication/258820303>
- Li, J.; Xiang, Q.; Liu, X.; Ding, T.; Zhang, X.; Zhai, Y. & Bai, Y. (2017). Inactivation of soybean trypsin inhibitor by dielectric-barrier discharge (DBD) plasma. *Food Chemistry*, 232: 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.167>

- Liao, X.; Liu, D.; Xiang, Q.; Ahn, J.; Chen, S.; Ye, X. & Ding, T. (2017). Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. In *Food Control* 75: 83–91. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.021>
- Liao, X.; Muhammad, A. I.; Chen, S.; Hu, Y.; Ye, X.; Liu, D. & Ding, T. (2019). Bacterial spore inactivation induced by cold plasma. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(16): 2562–2572. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1460797>
- Liu, H.; Chen, J.; Yang, L. & Zhou, Y. (2008). Long-distance oxygen plasma sterilization: Effects and mechanisms. *Applied Surface Science*, 254(6): 1815–1821. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2007.07.152>
- Los, A.; Ziuzina, D.; Boehm, D.; Cullen, P. J. & Bourke, P. (2017). The potential of atmospheric air cold plasma for control of bacterial contaminants relevant to cereal grain production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 44: 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.008>
- Mazas, M.; González, I.; López, M.; González, J. & Sarmiento, R. M. (1995). Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Science & Technology*, 30(1): 71–78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb01948.x>
- Misra, N. N. & Jo, C. (2017). Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry. In *Trends in Food Science and Technology* 64: 74–86. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.005>
- Mni, L. & Lokuruka, M. (2010). Soybean nutritional properties: the good and the bad about soy foods consumption-a review. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 10(4): 2439-2459.
- Monteagudo, P. A. E. (2022). The SDGs and maritime transport in Mexico: the international legal framework to achieve the goals of SDG 3: Good Health and Well-Being and SDG 13 Climate Action. *Revista de La Facultad de Derecho y Ciencias Políticas*, 52(136): 24–38. <https://doi.org/10.18566/rfdcp.v52n136.a02>
- Moreau, M.; Orange, N, & Feuilloley, M. G. J. (2008). Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination. In *Biotechnology Advances* 26(6): 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.001>
- Muñoz, Á. B.; Chaves, J. A.; Rodríguez, E. C. & Realpe, M. E. (2013). *Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: Un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. *Biomedica*, 33(2): 283–291. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i2.716>
- Niemira, B. A. (2012). Cold plasma decontamination of foods *. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1): 125–142. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101132>
- Oh, Y. J.; Lee, H.; Kim, J. E.; Lee, S. H.; Cho, H. Y. & Min, S. C. (2015). Cold plasma treatment application to improve microbiological safety of infant milk powder and onion powder. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 47(4): 486–491. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2015.47.4.486>
- OMS (1999). Regional Office for the Eastern Mediterranean. *Food safety*. 29 pp.
- Ouf, S. A.; Basher, A. H. & Mohamed, A. A. H. (2015). Inhibitory effect of double atmospheric pressure argon cold plasma on spores and mycotoxin production of *Aspergillus niger* contaminating date palm fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(15): 3204–3210. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7060>

- Pan, Y.; Cheng, J. H.; Lv, X. & Sun, D. W. (2019). Assessing the inactivation efficiency of Ar/O₂ plasma treatment against *Listeria monocytogenes* cells: Sublethal injury and inactivation kinetics. *LWT*, 111: 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.041>
- Pinu, F. R. (2016). Early detection of food pathogens and food spoilage microorganisms: Application of metabolomics. In *Trends in Food Science and Technology* 54: 213–215. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.018>
- Predari, A. & Carla, S. (2007). Revista Argentina de Microbiología. *Revista Argentina de Microbiología*, 39(1): 1–3. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016792001>
- Priyadarshini, A.; Rajauria, G.; O'Donnell, C. P. & Tiwari, B. K. (2019). Emerging food processing technologies and factors impacting their industrial adoption. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(19): 3082–3101. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1483890>
- Raguse, M.; Fiebrandt, M.; Denis, B.; Stapelmann, K.; Eichenberger, P.; Driks, A.; Eaton, P.; Awakowicz, P. & Moeller, R. (2016). Understanding of the importance of the spore coat structure and pigmentation in the *Bacillus subtilis* spore resistance to low-pressure plasma sterilization. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 49(28). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/28/285401>
- Sarangapani, C.; Thirumdas, R.; Devi, Y.; Trimukhe, A.; Deshmukh, R. R. & Annapure, U. S. (2016). Effect of low-pressure plasma on physico-chemical and functional properties of parboiled rice flour. *LWT*, 69: 482–489. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.003>
- Sarangapani, C.; Patange, A.; Bourke, P.; Keener, K. & Cullen, P. J. (2018). *Recent Advances in the Application of Cold Plasma Technology in Foods*. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117>
- Schoeller, N. P. & Ingham, S. C. (2001). Comparison of the Baird-Parker agar and 3M™ Petrifilm™ rapid *S. aureus* count plate methods for detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, 18(6): 581–587. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0432>
- Scholtz, V.; Pazlarova, J.; Souskova, H.; Khun, J. & Julak, J. (2015). Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. In *Biotechnology Advances* 33(6): 1108–1119. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.002>
- Segura-Ponce, L. A.; Reyes, J. E.; Troncoso-Contreras, G. & Valenzuela-Tapia, G. (2018). Effect of Low-pressure Cold Plasma (LPCP) on the Wettability and the Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on Fresh-Cut Apple (Granny Smith) Skin. *Food and Bioprocess Technology*, 11(5): 1075–1086. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2079-4>
- Sohbatzadeh, F.; Mirzanejad, S.; Shokri, H. & Nikpour, M. (2016). Inactivation of *Aspergillus flavus* spores in a sealed package by cold plasma streamers. *Journal of Theoretical and Applied Physics*, 10(2): 99–106. <https://doi.org/10.1007/s40094-016-0206-z>
- Soleno Wilches, R. (2015). Tecnologías no térmicas en el procesado y conservación de alimentos vegetales. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 2, 73. <https://doi.org/10.23850/24220582.172>
- Song, H. P.; Kim, B.; Choe, J. H.; Jung, S.; Moon, S. Y.; Choe, W. & Jo, C. (2009). Evaluation of atmospheric pressure plasma to improve the safety of sliced cheese and ham inoculated by 3-strain cocktail *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 26(4): 432–436. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.010>

- Surowsky, B.; Fröhling, A.; Gottschalk, N.; Schlüter, O. & Knorr, D. (2014). Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: Inactivation kinetics and mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 174: 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.031>
- Tallent, S. M.; Kotewicz, K. T. M.; Strain, E. A. & Bennett, R. W. (2012). Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. *Journal of AOAC International*, 95(2): 446–451. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-251>
- Thirumdas, R.; Kadam, D. & Annapure, U. S. (2017). Cold Plasma: an Alternative Technology for the Starch Modification. In *Food Biophysics* 12(1): 129–139. Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11483-017-9468-5>
- Troy, D. J.; Ojha, K. S.; Kerry, J. P. & Tiwari, B. K. (2016). Sustainable and consumer-friendly emerging technologies for application within the meat industry: An overview. *Meat Science*, 120: 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.002>
- Tseng, S.; Abramzon, N.; Jackson, J. O. & Lin, W. J. (2012). Gas discharge plasmas are effective in inactivating *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6): 2563–2570. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3661-0>
- Uemura, K.; Takahashi, C. & Kobayashi, I. (2010). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores in soybean milk by radio-frequency flash heating. *Journal of Food Engineering*, 100(4): 622–626. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.05.010>
- UNE-EN ISO (2000). Método horizontal para el recuento oficial de estafilococos coagulasa-positivos. *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal*. 6888-2. 14 pp.
- UNE-EN ISO (2005). Método horizontal para el recuento de *Bacillus cereus* presuntivos. *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal*. 7392. 22 pp.
- UNE-EN ISO (2008). Horizontal method for the enumeration of yeast and moulds. *Microbiology of food and animal feeding stuffs*. 21527-1. 14 pp.
- UNE-EN ISO (2014). Método horizontal para el recuento de microorganismos. *Microbiología de la cadena alimentaria*. 4833-1. 16 pp.
- UNE-EN ISO (2017). Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. *Microbiología de la cadena alimentaria*. 6579-1. 64 pp.
- UNE-EN ISO (2017). Método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli* beta-glucuronidasa positiva. *Microbiología de la cadena alimentaria*. 16649-3. 20 pp.
- UNE-EN ISO (2018). Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. *Microbiología de la cadena alimentaria*. 11290-2. 43 pp.
- UNE-EN ISO (2018). Método horizontal para la detección y el recuento de *Enterobacteriaceae*. *Microbiología de la cadena alimentaria*. 21528-2. 26 pp.
- UNE-EN ISO (2023). Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. *Microbiology of the food chain*. 15213-1. 11 pp.
- Vergine, P.; Salerno, C.; Barca, E.; Berardi, G. & Pollice, A. (2017). Identification of the faecal indicator *Escherichia coli* in wastewater through the β -D-glucuronidase activity: Comparison between two enumeration methods, membrane filtration with TBX agar, and Colilert®-18. *Journal of Water and Health*, 15(2): 209–217. <https://doi.org/10.2166/wh.2016.119>

- Viegas, F. M.; Ramos, C. P.; Xavier, R. G. C.; Lopes, E. O.; Junior, C. A. O.; Bagno, R. M.; Diniz, A. N.; Lobato, F. C. F. & Silva, R. O. S. (2020). Fecal shedding of *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, and *Clostridioides difficile* in dogs fed raw meat-based diets in Brazil and their owners' motivation. *PLoS ONE*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231275>
- Wang, W.; Wang, M.; Xu, C.; Liu, Z.; Gu, L.; Ma, J.; Jiang, L.; Jiang, Z. & Hou, J. (2022). Effects of Soybean Oil Body as a Milk Fat Substitute on Ice Cream: Physicochemical, Sensory and Digestive Properties. *Foods*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/foods11101504>
- Wells-Bennik, M. H. J.; Eijlander, R. T.; Den Besten, H. M. W.; Berendsen, E. M.; Warda, A. K.; Krawczyk, A. O.; Nierop Groot, M. N.; Xiao, Y.; Zwietering, M. H.; Kuipers, O. P. & Abee, T. (2016). Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. In *Annual Review of Food Science and Technology* 7: 457–482. Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033144>
- Xu, H.; Liu, D.; Wang, W.; Liu, Z.; Guo, L.; Rong, M. & Kong, M. G. (2018). Investigation on the RONS and bactericidal effects induced by He + O₂ cold plasma jets: In open air and in an airtight chamber. *Physics of Plasmas*, 25(11). <https://doi.org/10.1063/1.5055802>
- Yong, H. I.; Kim, H. J.; Park, S.; Alahakoon, A. U.; Kim, K.; Choe, W. & Jo, C. (2015). Evaluation of pathogen inactivation on sliced cheese induced by encapsulated atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. *Food Microbiology*, 46: 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.010>
- Zimmerman, U (1986). Electrical breakdown, electroporation and electrofusion. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 105: 175-256.
- Ziuzina, D.; Patil, S.; Cullen, P. J.; Keener, K. M. & Bourke, P. (2014). Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. *Food Microbiology*, 42: 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.007>