(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 624 788**

(51) Int. CI.:

C12R 1/38 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
A23B 7/155 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2013 E 13382530 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2886665**

(54) Título: **Cultivo biológico de una cepa de la especie Pseudomonas graminis y uso de dicho cultivo como antagonista para el control biológico de bacterias patógenas**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2017

(73) Titular/es:

UNIVERSITAT DE LLEIDA (50.0%)
C/ Jaume II, 67 bis, 3ª planta
25001 Lleida, ES y
INSTITUT DE RECERCA I TECNOLOGIA AGROALIMENTÀRIES (50.0%)

(72) Inventor/es:

VIÑAS ALMENAR, IMMACULADA;
ABADÍAS SERÓ, MARÍA ISABEL;
USALL RODIÉ, JOSEP;
TEIXIDÓ ESPACA, NEUS y
TORRES SANCHIS, ROSARIO

(74) Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Cultivo biológico de una cepa de la especie *Pseudomonas graminis* y uso de dicho cultivo como antagonista para el control biológico de bacterias patógenas.

La presente invención se refiere a un cultivo biológico de una cepa de la especie *Pseudomonas graminis* y a la utilización de dicha cepa como antagonista para el control biológico de bacterias patógenas de transmisión alimentaria en fruta. También se refiere a un método para tratar fruta que comprende la etapa de aplicar a la fruta una preparación que comprende dicho cultivo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La fruta fresca cortada o fruta de cuarta gama es un producto de reciente aparición en los mercados. Esta fruta es sometida a un procesado mínimo consistente en la limpieza, pelado, corte, desinfección y envasado en atmósfera modificada pasiva o activa, conservándose finalmente en condiciones de refrigeración.

La fruta cortada es un producto alimenticio muy susceptible a alteraciones físicas, químicas y biológicas, que se deteriora a mayor velocidad que las piezas enteras. En la fruta cortada la respiración y los procesos metabólicos se aceleran como resultado de la manipulación, por lo que resulta esencial conservar el producto en atmósfera modificada y mantenerlo en condiciones de refrigeración.

La reglamentación actual aplica unos criterios microbiológicos muy estrictos a la fruta cortada con el objetivo de reducir al mínimo las toxiinfecciones alimentarias o enfermedades originadas por la ingesta de fruta contaminada con bacterias del tipo *Salmonella* spp., *Listeria* spp. o *Escherichia coli* O157:H7.

En la actualidad, para garantizar la seguridad alimentaria de los productos de cuarta gama resulta habitual aplicar tratamientos consistentes en lavar la fruta con agua adicionada con hipoclorito sódico. Estos tratamientos consiguen reducir la carga microbiana de los productos pero presentan el inconveniente de que pueden dejar un residuo de cloro que facilita la formación de sustancias que podrían tener carácter cancerígeno. Además, el tratamiento con hipoclorito no previene el crecimiento de los microorganismos durante la conservación de la fruta o durante la vida útil del producto.

El control biológico de las bacterias patógenas de transmisión alimentaria en productos de cuarta gama es una alternativa a los tratamientos con hipoclorito sódico que resulta muy deseable. No obstante, para que esta alternativa sea viable resulta imprescindible hallar microorganismos antagonistas que sean efectivos contra cualquiera de los tres tipos de bacterias patógenas citadas (*Salmonella* spp., *Listeria* spp., y *Escherichia coli* O157:H7), tanto a temperatura ambiente como en condiciones de refrigeración y atmósfera modificada. Además, es deseable que estos antagonistas sean innocuos tanto para los humanos como para los vegetales ya que, en caso contrario, podrían perjudicar al consumidor o al producto tratado.

En el estado de la técnica se han descrito antagonistas para el control biológico de bacterias patógenas de transmisión alimentaria en fruta (*"Biological control of postharvest decays of apple can prevent growth of Escherichia coli O157:H7 in apple wounds", Janisiewicz, W. et al. JOURNAL OF FOOD PROTECTION 62 (12): 1372-1375. 1999 y "Biocontrol of the food-borne pathogens Listeria monocytogenes and Salmonella enterica serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists." Leverentz, B. et al. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 72 (2):1135-1140. 2006).*

Sin embargo, los antagonistas empleados no pertenecen a la especie *Pseudomonas graminis* y, además, ninguno de ellos es efectivo contra cualquiera de los microorganismos *Salmonella* spp. *Listeria* spp. *y Escherichia coli O157:H7* tanto a temperatura ambiente como en condiciones de refrigeración.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

Un primer objetivo de la presente invención es proporcionar un cultivo biológico sustancialmente puro de una nueva cepa de la especie *Pseudomonas graminis* depositada con el número CBS136973 en la institución de depósito "Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) de Utrech, Holanda.

Un segundo objetivo es proporcionar un cultivo biológico sustancialmente puro de una nueva cepa de la especie *Pseudomonas graminis* depositada con el número CBS136973 para su uso como antagonista para el control biológico de bacterias patógenas de transmisión alimentaria en fruta para consumo humano.

Un tercer objetivo de la presente invención consiste en el uso del mencionado cultivo biológico de la nueva cepa como antagonista para el control biológico de bacterias patógenas de transmisión alimentaria en fruta para consumo humano.

Un cuarto objetivo consiste en proporcionar un método para tratar fruta que comprende la etapa de aplicar a la fruta una preparación que comprende el mencionado cultivo biológico de la nueva cepa.

Se ha observado que la nueva cepa aislada muestra una gran efectividad como antagonista frente

bacterias patógenas de transmisión alimentaria en fruta, en una amplia gama de patógenos y frutas, a temperatura ambiente, en atmósfera modificada y en condiciones de refrigeración. Su aplicación permite reducir el crecimiento de los patógenos durante la vida útil del producto, especialmente cuando se rompe la cadena de frío.

En la presente invención, por bacterias patógenas de transmisión alimentaria se entenderá bacterias patógenas causantes de toxiinfecciones alimentarias o enfermedades originadas por la ingesta de alimentos contaminados, por ejemplo, fruta contaminada con bacterias patógenas del tipo *Salmonella* spp., *Listeria* spp. o *Escherichia coli* O157:H7.

La nueva cepa de la especie *Pseudomonas graminis* (Behrendt et al.1999[1]) se aisló de la superficie de una manzana "Golden Delicious" mediante un lavado con agua estéril, seguido de la inmersión en solución de peptona salina (peptona, 1 g/l; NaCl, 0,85 g/l), sonicación en un baño de ultrasonidos durante 10 min y siembra del liquido de lavado en medio de cultivo NYDA (Caldo nutritivo, 8 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; dextrosa, 10 g/l y agar 15 g/l) y posterior incubación a 25 ºC durante 3 días.

El cultivo de la nueva cepa ha sido depositado por uno de los solicitantes, de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento del depósito de microorganismos para el propósito del procedimiento de patentes, en la autoridad internacional de depósito "Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)" con domicilio en Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrech, Holanda. El número de depósito asignado ha sido el CBS136973.

El aislado CBS136973 fue identificado mediante secuenciación parcial de la región 16S rRNA: *Pseudomonas sp*., y mediante secuenciación total de la región 16S rRNA: *Pseudomonas graminis* (Behrendt et al.1999[1]).

Características morfológicas y bioquímicas de la nueva cepa

La cepa CBS136973 es un bacilo gramnegativo, no formador de esporas, oxidasa negativo y catalasa positivo, móvil y aerobio. En placa, las colonias son amarillas, de forma circular con bordes enteros.

La cepa CBS136973 presenta las características bioquímicas que se detallan en la Tabla 1 y se diferencia fenotípicamente de otras especies de *Pseudomonas* por las pruebas que se muestran en la Tabla 2.

La temperatura de crecimiento está comprendida entre 5 ºC y 30 ˚C, con un óptimo entre 25 ºC y 30 ºC. No crece ni a 33 ºC ni a 0 ºC.

El crecimiento en placas puede llevarse a cabo en medio de cultivo AN (Agar Nutritivo: Triptona 5 g/l, extracto de carne 3 g/l, agar 15 g/l), TSA (Caldo de triptona soja: triptona 15 g/l, peptona de soja 5,0 g/l, cloruro sódico 5,0 g/l y agar 15 g/l, pH 7,3) o NYDA (Caldo nutritivo: 8 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; dextrosa, 10 g/l y agar 15 g/l).

El crecimiento en líquido puede llevarse a cabo en medio de cultivo TSB (Caldo de triptona soja: digerido pancreático de caseína 17,0 g/l, digerido enzimático de soja 3,0 g/l, cloruro sódico 5,0 g/l, dipotasio hidrógeno fosfato 2,5 g/l, glucosa 2,5 g/l, pH 7,3). También puede usarse el medio NB (Caldo nutritivo: triptona 10 g/l, extracto de carne 5 g/l, cloruro sódico 5 g/l, pH 7,2)

El crecimiento de la cepa CBS136973 en medio TSB o NB en condiciones aerobias, en agitación y a temperatura de 25 y 30 ºC, alcanza un máximo poblacional a las 20-24 h de incubación (generalmente entre 1,9 y 2,9 × 10^9 unidades formadoras de colonias (ufc)/ml), sin presentar grandes diferencias entre los dos medios de cultivo.

Tabla 1. Pruebas enzimáticas de las tiras bioquímicas API 20 NE – Sistema de identificación de bacterias de la marca Biomerieux. Resultados después de 24 h y 48 h a 30 ºC.

TEST	COMPONENTES ACTIVOS	Reacciones enzimáticas	Resultado 24 h	Resultado 48 h
NO_3	Nitrato potásico	Reducción de nitratos en nitritos	-	nd
		Reducción de nitratos en nitrógeno	-	nd
TRP	L-triptófano	Formación de indol (TRiPtofano)	-	nd
GLU	D-glucosa	Fermentación (GLUcosa)	-	nd
ADH	L-arginina	Arginina Di-Hidrolasa	-	-
URE	Urea	Ureasa	-	-
ESC	Esculina Citrato férrico	Hidrólisis (β-glucosidasa) (ESCulina)	+	+
GEL	Gelatina (origen bovino)	Hidrólisis (proteasa) (GELatina)	-	-
PNG	4-nitrofenil-βD-galactopiranosida	β-galactosidasa (Para-NitroFenil-βD-Galactopiranosidasa)	+	+
GLU	D-glucosa	Asimilación (GLUcosa)	+	+
ARA	L-arabinosa	Asimilación (ARAbinosa)	+	+
MNE	D-manosa	Asimilación (MaNosE)	-/w	+
MAN	D-manitol	Asimilación (MANitol)	v	+
NAG	N-acetil-glucosamina	Asimilación (N-Acetil-Glucosamina)	-	v
MAL	D-maltosa	Asimilación (MALtosa)	v	v
GNT	Gluconato potásico	Asimilación (GlucoNaTo potásico)	+	+
CAP	Ácido capricho	Asimilación (ácido CAPrico)	v	+
ADI	Ácido adípico	Asimilación (ácido ADIpico)	-	-
MLT	Ácido málico	Asimilación (MaLaTa)	+	+
CIT	Citrato trisódico	Asimilación (CITrato trisódico)	+	+
PAC	Ácido fenilacético	Asimilación (ácido fenilACético)	-	-

(+ positivo, - negativo, w débil , v variable, nd no determinado)

Tabla 2. Características fenotípicas que diferencian la cepa CBS136973 de otras especies de *Pseudomonas*.

Característica	Cepa CBS136973	*P. graminis*[a]	*P. lutea*	*P. rhizosphaerae*
Oxidasa	-[b]	-	-	-
Crecimiento a 6ºC	+	+	+	nd
Producción de ácido a partir de glucosa	-	-	-	-
Utilización de eritritol	-	-	-	+
Utilización de sorbitol	W	+	-	+
Utilización de xilitol	-	v	+	-
Utilización de melibiosa	-	-	+	-
Utilización de rhamnosa	-	-	-	+
Hidrólisis de aesculina	+	+	+	-
Hidrólisis de gelatina	-	v	-	-

[a]: Los datos de las especies de referencia se han tomado de Peix et al. (2003[3], 2004[4]) y Behrendt et al. (1999[1]). [b]: +: positivo; - : negativo; w: débil; v: reacción variable entre cepas de la misma especie; nd: datos no disponibles

Producción de sustancias antimicrobianas

Se han llevado a cabo experimentos para determinar si la cepa CBS136973 produce sustancias antimicrobianas. Para ello, la cepa se hizo crecer en medio TSB a 30 ºC, durante 20-24 h. Del cultivo obtenido, se reservó una fracción, a la que se llamó “cultivo, CUL”, que contenía tanto células como medio de cultivo y posibles metabolitos producidos durante el crecimiento. El resto se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min, a 10ºC. El pH del sobrenadante se ajustó a 6,5 y se esterilizó mediante filtración (0,22 μm), obteniendo un “sobrenadante neutro libre de células, SNLC”. La fracción celular obtenida tras la centrifugación se resuspendió en agua desionizada estéril, se

centrifugó y lavó dos veces consecutivas para la eliminación de posibles restos de medio de cultivo, obteniendo únicamente "células, CEL".

Se determinó la efectividad de estas tres fracciones: CUL, SNLC y CEL, en condiciones *in vitro*, frente a varios cultivos indicadores: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*. Para ello, *Salmonella* spp. y Es*cherichia coli* O157:H7 se hicieron crecer en medio TSB y *Listeria* spp. en TYSEB (TSB suplementado con 6 g/l de extracto de levadura) a 37 ºC, durante 18-20 h. Se añadió 50 µl de cada uno de los cultivos obtenidos a tubos conteniendo 10 ml de medio TSB (*Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7) o TYSEB (*Listeria* spp.) conteniendo 7,5 g/l de agar y temperados a 45ºC.

El contenido de cada uno de los tubos (medio + cultivo indicador) se depositó sobre placas conteniendo 20 g/l extracto de carne, 20 g/l de glucosa y 15 g/l de agar. Una vez solidificado, se depositaron 5 ml del CUL, SNLC o CEL y las placas se incubaron a 30 ºC, durante 20 h, tras las cuales se indicó la presencia o no de un halo de inhibición.

No se observó inhibición del crecimiento de los patógenos indicadores en aquellos tratamientos donde se inoculó el sobrenadante neutro libre de células por lo que se descarta la producción de sustancias antimicrobianas por parte de la cepa CBS136973 en las condiciones ensayadas.

También se ha ensayado la efectividad *in vivo* en manzana cortada del sobrenadante frente a *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Listeria innocua* y se ha comparado con la efectividad de las células. Se ha visto que los sobrenadantes libres de células no tienen ningún efecto sobre el patógeno, e incluso favorecen su crecimiento tras 2 días de conservación a 20 ºC.

Fitopatogenicidad

También se ha determinado si la cepa CBS136973 es o no fitopatógena, capaz de producir reacción de hipersensitividad en hojas de tabaco, según la metodología de Noval et al. 1991[2]. Para ello se preparó una suspensión de 10^9 ufc/ml de la cepa y se inyectó en las venas de hojas de tabaco utilizando una jeringuilla de insulina. Se utilizó agua para el control negativo y la cepa CPA-3 de *Pantoea ananatis* como control positivo, ya que esta cepa sí es fitopatógena. Las plantas se mantuvieron a temperatura ambiente y periódicamente se observó si presentaban o no síntomas de hipersensitividad, en forma de necrosis, amarillamiento de la zona infiltrada y muerte de las hojas. No se observó ninguna reacción en las hojas tratadas, incluso con altas dosis de CBS136973 (10^9 ufc/ml). Por lo tanto, la cepa CBS136973 no es fitopatógena.

Supervivencia al jugo gástrico en contacto directo e inoculada en manzana

Para valorar la supervivencia en contacto directo, se añadieron 50 ml de una suspensión de 10^9 ufc/ml de la cepa CBS136973 en una solución simulada de saliva y jugo gástrico (6,2 g/l NaCl, 2,2 g/l KCl, 0,22 g/l de $CaCl_2$ y 1,2 g/l $NaHCO_3$, 0,3 g/l pepsina; pH ajustado a 2,0, temperada a 37 ºC) y se incubó a 37 ºC, durante 2 h. Se tomó muestra al cabo de 1 y 2 h. No se detectó ninguna célula viable de la cepa de la presente invención, incluso tras 10 min de contacto.

Para valorar la supervivencia al jugo gástrico de la cepa CBS136973 sobre manzana, se inocularon manzanas "Golden Delicious" con la cepa CBS136973 a una dosis de 10^7 ufc/ml mediante inmersión en baño durante 2 min. Se dejaron secar y se envasaron en barquetas de polipropileno y se sellaron con film de polipropileno de 35 µm de grosor y una permeabilidad al O_2 y CO_2 de 3500 cm^3/m^2*dia*atm a 23 ºC, y al vapor de agua de 0,9 g/m^2*día a 25 ºC y 75 % de humedad relativa, y se conservaron a 5ºC. Tras 0, 4, 7 y 14 días, se tomaron 10 g y se sometieron a una simulación de tránsito gástrico. Para ello se mezclaron con 10 ml de solución artificial de saliva (6,2 g/l NaCl, 2,2 g/l KCl, 0,22 g/l de $CaCl_2$ y 1,2 g/l $NaHCO_3$), temperada a 37 ºC. Se homogenizó durante 2 min y se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 80 ml de jugo gástrico (0,3 g/l pepsina; pH 2,0) y se incubó a 37 ºC durante 2 h. A continuación se determinó la población viable de la cepa, mediante siembra en placas de medio AN.

No se observaron células viables tras 2 h de contacto con el jugo gástrico en ninguna de las muestras analizadas. Por tanto, puede deducirse que la cepa de la presente invención no sobrevive al paso gástrico. Esto es positivo pues, aunque las células crezcan sobre la superficie de la fruta durante su conservación, dichas células no pueden causar ningún daño al ingerir la fruta tratada ya que no sobrevivirán al tránsito gástrico. Cabe mencionar también que no se han encontrado referencias que relacionen la especie *Ps. graminis* con casos de toxiinfecciones alimentarias.

Crecimiento en la fruta

Se ha observado que la cepa CBS136973 es capaz de crecer en manzana, melocotón y melón cortados a distintas temperaturas, aunque el crecimiento es mucho mayor en melón, debido a su menor acidez (mayor pH). También se ha observado crecimiento en manzana conservada en condiciones de atmósfera modificada y a temperatura o condiciones de refrigeración.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Se ha observado que la cepa CBS136973 es muy efectiva contra bacterias patógenas de transmisión alimentaria en fruta, preferiblemente, en fruta cortada a trozos y, ventajosamente, contra los microorganismos *Salmonella* spp., *Listeria* spp., y/o *Escherichia coli O157:H7*, que son los más importantes en frutas y hortalizas.

Gracias a ello, la cepa CBS136973 puede usarse como antagonista contra cualquiera de dichos microorganismos, favoreciendo el cumplimiento de los criterios microbiológicos establecidos especialmente para fruta cortada o fruta de cuarta gama, para evitar las toxiinfecciones alimentarias o enfermedades originadas por la ingesta de fruta contaminada con bacterias del tipo *Salmonella* spp., *Listeria* spp. o *Escherichia coli* O157:H7.

En particular, la efectividad en *Salmonella* spp. se ha observado para la especie *Salmonella choleraesuis*, mientras que la efectividad en *Listeria* spp. se ha observado para las especies *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*.

Según una primera realización de la presente invención, la cepa de la presente invención se usa para el control biológico en fruta, preferiblemente fruta cortada a trozos, manteniendo la fruta a una temperatura superior a 10 ºC, preferiblemente, una temperatura igual o superior a 20 ºC.

A temperatura ambiente, se ha observado que la cepa CBS136973 puede frenar el crecimiento, e incluso reducir, a cualquiera de los microorganismos antes citados, inclusive cuando estos microorganismos están presentes en la fruta a una concentración igual o superior a 10^3 ufc/g, que es una concentración muy elevada y difícil que se dé en la realidad.

Este uso es particularmente ventajoso ya que permite controlar el crecimiento de los patógenos en los casos en que la temperatura de conservación de la fruta no es la adecuada, o se corta la cadena de frío del producto durante el almacenamiento o transporte, por ejemplo, por problemas en el mantenimiento de los equipos de refrigeración de la fruta. Es muy importante que la cepa sea efectiva a temperatura ambiente, ya que a esta temperatura es cuando el microorganismo patógeno puede crecer más y por tanto se incrementa el riesgo en el consumidor.

Según una segunda realización, la cepa de la presente invención se usa para el control biológico en fruta, por ejemplo fruta cortada a trozos, manteniendo la fruta en condiciones de refrigeración. Por condiciones de refrigeración se entenderá el mantenimiento de la fruta a una temperatura de refrigeración igual o inferior a 10ºC, preferiblemente, igual o inferior a 5ºC.

Sorprendentemente, la efectividad de la cepa CBS136973 contra cualquiera de los microorganismos *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 se ha demostrado también a las temperaturas de refrigeración que son las que marca el productor o distribuidor para la conservación de la fruta.

Según una tercera realización, la cepa de la presente invención se usa para el control biológico en fruta, preferiblemente, fruta cortada, manteniendo la fruta en una atmósfera modificada. Por atmósfera modificada se entenderá una atmósfera con una composición de gases diferente a la del aire para mejorar las condiciones en que se conserva la fruta.

La cepa de la presente invención muestra también efectividad cuando la fruta es envasada en atmósfera modificada para su conservación. Gracias a ello, la cepa puede ser empleada en las condiciones habituales de comercialización, por lo que es posible garantizar la seguridad alimentaria también en las condiciones de los lineales de los supermercados o tiendas.

Ventajosamente, dicha fruta es fruta con un pH comprendido entre 3 y 7, por ejemplo, frutas como manzana, melocotón y/o melón.

Se ha observado que el crecimiento de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. o *Escherichia coli* O157:H7 puede darse en un amplio rango de fruta, a pesar de las condiciones de acidez de ciertas frutas como la manzana. También, se ha observado que el crecimiento de las mencionadas bacterias es muy rápido en frutas menos ácidas como el melón. Sin embargo, gracias a la cepa de la presente invención, el crecimiento de estos patógenos puede ser controlado en un amplio rango de frutas.

Tal y como se ha comentado en la descripción de la invención, un objetivo de la presente invención es el de proporcionar un método de preparación de fruta que comprende la etapa de aplicar a la fruta una preparación que comprende el cultivo biológico de la nueva cepa CBS136973.

Según una realización preferida de dicho método, la fruta es cortada a trozos antes de aplicar dicha preparación.

Preferiblemente, la concentración de la cepa CBS136973 en dicha preparación es igual o superior a la concentración estimada de patógeno que puede contener la fruta, preferiblemente, la fruta cortada.

Según una realización, la concentración de dicha cepa en la preparación es igual o superior a 10^5 ufc/ml.

Se ha observado que esta concentración tiene efectos contra cualquiera de los tres microorganismos *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y/o *Escherichia coli* O157:H7 y a concentraciones mucho más elevadas de las que dichos microorganismos pueden encontrarse en la fruta cortada en la realidad.

Ventajosamente, la concentración de dicha cepa en la preparación es igual o superior a 10^7 ufc/ml.

Se ha observado que esta concentración garantiza una reducción de las bacterias patógenas de al menos

dos unidades logarítmicas (dos unidades de la escala logarítmica decimal), independientemente de la concentración de bacterias patógenas de la fruta.

Según otra realización, el método comprende la etapa de envasar la fruta una vez aplicada dicha preparación.

Ventajosamente, dicho método comprende también la etapa de proporcionar a la fruta una atmósfera modificada y/o la etapa de proporcionar a la fruta una temperatura de refrigeración, por ejemplo, una temperatura igual o inferior a 10 ºC, preferiblemente, una temperatura igual o inferior a 5 ºC.

La atmósfera modificada puede proporcionarse de una forma pasiva, por ejemplo, envasando el producto mediante la utilización de películas plásticas de diferente permeabilidad a los gases, creando de forma pasiva una atmósfera modificada favorable como resultado de la permeabilidad de la pared del envase y factores como la respiración del producto y cambios bioquímicos.

El envasado del producto en atmósfera modificada contribuye a mantener la calidad de frescura de la fruta cortada durante más tiempo, por lo que la vida útil del producto se alarga.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la cepa de la presente invención es efectiva también en estas condiciones de envasado en atmósfera modificada.

Ventajosamente, dicho método de preparación de la fruta, preferiblemente fruta cortada, comprende la etapa de aplicar un antioxidante a la fruta, antes de aplicar la suspensión que contiene la cepa.

Se ha observado que la cepa de la presente invención no se ve alterada por el empleo de algunas sustancias antioxidantes, por lo que dichas sustancias antioxidantes pueden emplearse para retardar la oxidación de la fruta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para mayor comprensión de cuanto se ha expuesto se acompañan unos dibujos en los que, esquemáticamente y sólo a título no limitativo, se representan resultados de varios ejemplos de realización.

En dichos dibujos,

la figura 1 es una representación gráfica que muestra la población de *Escherichia coli* O157:H7 en los cilindros de manzana tras la inoculación (concentración inicial), tras 2 días de incubación a 20 ºC sin antagonista (control) y con 10 de los antagonistas seleccionados, entre los que se encuentra el antagonista CBS136973. Los valores representan la media de 6 valores (2 ensayos con 3 repeticiones cada uno) y las barras representan el error estándar. Los números entre paréntesis indican la media de la reducción obtenida.

la figura 2 es una representación gráfica que muestra la población de *Salmonella choleraesuis* BAA-709 en los cilindros de manzana tras la inoculación (concentración inicial), tras 2 días de incubación a 20 ºC sin antagonista (control) y con 10 de los antagonistas seleccionados, entre los que se encuentra la cepa CBS136973. Los valores representan la media de 6 valores (2 ensayos con 3 repeticiones cada uno) y las barras representan el error estándar. Los números entre paréntesis indican la media de la reducción obtenida.

la figura 3 es una representación gráfica que muestra la población de *Listeria innocua CECT-910* en los cilindros de manzana tras la inoculación (concentración inicial), tras 2 días de incubación a 20 ºC sin antagonista (control) y con 10 de los antagonistas seleccionados, entre los que se encuentra la cepa CBS136973. Los valores representan la media de 6 valores (2 ensayos con 3 repeticiones cada uno) y las barras representan el error estándar. Los números entre paréntesis indican la media de la reducción obtenida.

la figura 4 es una representación gráfica que muestra la población de *Escherichia coli* O157:H7 en los cilindros de melocotón tras la inoculación (concentración inicial), tras 2 días de incubación a 20 ºC sin antagonista (control) y con 10 de los antagonistas seleccionados, entre los que se encuentra la cepa CBS136973. Los valores representan la media de 6 valores (2 ensayos con 3 repeticiones cada uno) y las barras representan el error estándar. Los números entre paréntesis indican la media de la reducción obtenida.

la figura 5 es una representación gráfica que muestra la población de *Salmonella choleraesuis* BAA-709 en los cilindros de melocotón tras la inoculación (concentración inicial), tras 2 días de incubación a 20 ºC sin antagonista (control) y con 10 de los antagonistas seleccionados, entre los que se encuentra la cepa CBS136973. Los valores representan la media de 6 valores (2 ensayos con 3 repeticiones cada uno) y las barras representan el error estándar. Los números entre paréntesis indican la media de la reducción obtenida.

la figura 6 es una representación gráfica que muestra la población de *Listeria innocua CECT-910* en los cilindros de melocotón tras la inoculación (concentración inicial), tras 2 días de incubación a 20 ºC sin antagonista (control) y con 10 de los antagonistas seleccionados, entre los que se encuentra la cepa CBS136973. Los valores representan la media de 6 valores (2 ensayos con 3 repeticiones cada uno) y las barras representan el error estándar. Los números entre paréntesis indican la media de la reducción obtenida.

la figura 7 es una representación gráfica que muestra la población de *Salmonella choleraesuis* BAA-709 en los cilindros de melón tras la inoculación (concentración inicial) y tras 2 días de incubación a 20 ºC sin antagonista (control) y con 12 de los antagonistas seleccionados, entre los que se encuentra la cepa CBS136973. Los valores

representan la media de 6 valores (2 ensayos con 3 repeticiones cada uno) y las barras representan el error estándar. Los números entre paréntesis indican la media de la reducción obtenida.

la figura 8 es una representación gráfica que muestra la población de *Listeria monocytogenes* LM230/3 en los cilindros de melón tras la inoculación (concentración inicial), tras 2 días de incubación a 20 ºC sin antagonista (control) y con 12 de los antagonistas seleccionados, entre los que se encuentra la cepa CBS136973. Los valores representan la media de 6 valores (2 ensayos con 3 repeticiones cada uno) y las barras representan el error estándar. Los números entre paréntesis indican la media de la reducción obtenida.

la figura 9 es una representación gráfica que muestra la evolución en el tiempo de la población de *Escherichia coli* O157:H7 en cilindros de manzana co-inoculados o no con una suspensión de la cepa CBS136973 (10^8 ufc/ml) y conservados a 5 ºC.

la figura 10 es una representación gráfica que muestra la evolución en el tiempo de la población de *Escherichia coli* O157:H7 en cilindros de melocotón co-inoculados o no con una suspensión de la cepa CBS136973 (10^8 ufc/ml) y conservados a 5 ºC y a 10 ºC.

la figura 11 es una representación gráfica que muestra la evolución en el tiempo de la población de *Salmonella cholearaesuis* BAA-709 en cilindros de melocotón co-inoculados o no con una suspensión de la cepa CBS136973 (10^8 ufc/ml) y conservados a 5 ºC.

la figura 12 es una representación gráfica que muestra la evolución en el tiempo de la población de *Salmonella cholearaesuis* BAA-709 en cilindros de melón co-inoculados o no con una suspensión de la cepa CBS136973 (10^8 ufc/ml) y conservados a 5 ºC y a 10 ºC.

la figura 13 es una representación gráfica que muestra la evolución en el tiempo de la población de un cóctel de cepas de *Listeria monocytogenes* (CECT-4031, CECT-4032, CECT-933, CECT-940 y LM230/3) en cilindros de melón co-inoculados o no con la cepa CBS136973 a distintas concentraciones y conservados a 10 ºC.

la figura 14 es una representación gráfica que muestra la evolución en el tiempo de la población de un cóctel de cepas de *Salmonella choleraesuis* (BAA-707, BAA-709, BAA-710 y BAA-711) en cilindros de melón co-inoculados o no con la cepa CBS136973 a distintas concentraciones y conservados a 10 ºC.

la figura 15 es una representación gráfica que muestra la evolución en el tiempo de la población de un cóctel de cepas de *Salmonella choleraesuis* (BAA-707, BAA-709, BAA-710 y BAA-711) en manzana cortada tratada con antioxidante e inoculada o no con la cepa CBS136973 a 10^7 ufc/ml, mediante inmersión durante 2 min, y conservada en envasado en atmósfera modificada (MAP) a 5 ºC y 10 ºC.

la figura 16 es una representación gráfica que muestra la evolución en el tiempo de la población de un cóctel de cepas de *Listeria monocytogenes* (CECT-4031, CECT-4032, CECT-933, CECT-940 y LM230/3) en manzana cortada tratada con antioxidante e inoculada o no con la cepa CBS136973 a 10^7 ufc/ml, mediante inmersión durante 2 min, y conservada en envasado en atmósfera modificada (MAP) a 5 ºC y 10 ºC.

DESCRIPCIÓN DE EJEMPLOS

A continuación se exponen distintos ensayos los cuales deben interpretarse como un medio auxiliar para la mejor comprensión de la invención y no como limitaciones al objeto de la misma.

El efecto antagonista se ha ensayado en distintas cepas de los géneros *Salmonella* y *Listeria* y en una cepa de *Escherichia coli* O157:H7. Estos patógenos son los más importantes en frutas y hortalizas. En la Tabla 3 adjunta aparecen las cepas de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria utilizados en los ensayos.

En primer lugar, se describen los ejemplos realizados para demostrar la efectividad en condiciones de laboratorio. En segundo lugar, se describen los ejemplos realizados para demostrar la efectividad en condiciones que simulan la producción comercial.

<u>Ensayos para demostrar la efectividad de la cepa CBS136973 frente a los principales patógenos de transmisión alimentaria en fruta cortada en condiciones de laboratorio.</u>

A continuación se describen una pluralidad de ejemplos de ensayos en condiciones de laboratorio que demuestran la efectividad de la cepa CBS136973 aplicada a distintas dosis, en distintas frutas, a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración.

Las cepas de microorganismos patógenos utilizados en estos ensayos fueron: *Listeria innocua* (CECT-910), *Escherichia. coli* O157:H7 (NCTC-12900), y *Salmonella choleraesuis* (BAA-709, BAA-707, BAA-709, BAA-710 y BAA-711) y, en algún caso, *Listeria monocytogenes* (CECT-4031, CECT-4032, CECT-933, CECT-940 y LM230/3), (ver Tabla 3).

Las frutas se desinfectaron previamente mediante aspersión con etanol 70%. A continuación se prepararon trozos en forma cilíndrica de la fruta a ensayar, mediante un sacabocados, de dimensiones 1,2 cm de diámetro y 1 cm de altura, que equivalen aproximadamente a 1 g de fruta. Estos trozos se introdujeron en el interior de tubos de ensayo estériles y se inocularon con 15 µl de una suspensión que contenía los dos microorganismos (patógeno y antagonista),

llámese co-inoculación. En el tratamiento control, el patógeno se añadió a un tubo con 10 ml de agua estéril (sin microorganismo antagonista). Tras la co-inoculación, se dejó secar la fruta a temperatura ambiente. A continuación, se tomaron 3 tubos, de los que se midió la concentración inicial de patógeno mediante siembra en medios de cultivo específicos. Los otros tubos se conservaron a 20 ºC, 10 ºC o 5 ºC, en función del ensayo. Al cabo de 2 días (ensayos conservación a 20 ºC), o de 2-3 días, 5-7 días y 10 días (ensayos a 5 o 10 ºC), se volvió a determinar la concentración de patógeno por trozo de fruta en las muestras con antagonista (tratamiento con antagonista) y en las que no tenían antagonista (tratamiento control). Los datos de concentración se transformaron a logaritmo decimal.

Para calcular el valor de reducción del crecimiento del patógeno se usó la siguiente fórmula:

Reducción (unidades logarítmicas decimales) = $\log_{10} C_{t\text{-control}} - \log_{10} C_{t+\text{antagonista}}$, donde:

$C_{t\text{-control}}$ es la concentración del patógeno en el tratamiento control después de "t" días de conservación, y $C_{t+\text{antagonista}}$ es la concentración del patógeno en el tratamiento con antagonista después de "t" días de conservación.

Valores positivos de la reducción indican que el crecimiento del patógeno en la fruta ensayada en presencia del antagonista es menor que el mismo sin antagonista. A mayor valor, mayor efectividad frente al patógeno estudiado

En los ensayos a temperatura ambiente (20 ºC), para obtener la suspensión de la cepa CBS136973 y de las otras cepas ensayadas, se utilizó la producción en medio NYDA incubado a 25 ºC durante 48 h. Se tomaron colonias aisladas que se suspendieron en agua desionizada estéril y a partir de dicha suspensión se preparó otra suspensión que se ajustó, mediante un espectrofotómetro, a distintos porcentajes de transmitancia (λ=420 nm) que se corresponden con las distintas concentraciones de antagonistas ensayadas (10^5 ufc/ml, 10^6 ufc/ml, 10^7 ufc/ml y 10^8 ufc/ml).

En los ensayos en condiciones de refrigeración (5 ºC o 10 ºC), para obtener la suspensión de la cepa CBS136973, se utilizó la producción en medio líquido. Para ello, se inoculó un matraz Erlenmeyer con 50 ml de TSB, que se incubó a 30ºC durante 20-24 h. Se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm y se redisolvió con 25 ml de agua desionizada estéril.

Los patógenos se inocularon en tubos conteniendo 10 ml de medio TSB (*Salmonella choleraesuis* BAA-707, BAA-709, BAA-710 y BAA-711 y *Escherichia coli* O157:H7) o TYSEB (*Listeria innocua* CECT-910 y *Listeria monocytogenes* CECT-4031, CECT-4032, CECT-933, CECT-940 y LM230/3), que se incubaron a 37 ºC durante 20-24 h. A continuación se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min y el precipitado celular se redisolvió con 5 ml de solución salina (0,85 g/l de NaCl). Mediante la medición de la transmitancia a 420 nm y una curva previamente obtenida en el laboratorio para cada uno de los patógenos, se determinó la concentración estimada de patógeno.

Tabla 3. Listado de cepas de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria utilizados en los ensayos.

Colección	Especie	Serovar	Nomenclatura
ATCC BAA-707	*Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (Smith) Weldin	Agona	BAA-707
ATCC BAA-709	*Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (Smith) Weldin	Michigan	BAA-709
ATCC BAA-710	*Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (Smith) Weldin	Montevideo	BAA-710
ATCC BAA-711	*Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (Smith) Weldin	Gaminara	BAA-711
CECT-4031	*Listeria monocytogenes* (Murray et al. 1926[8]) Pirie 1940	1a	CECT-4031
CECT-4032	*Listeria monocytogenes* (Murray et al. 1926[8]) Pirie 1940	4b	CECT-4032
CECT-933	*Listeria monocytogenes* (Murray et al. 1926[8]) Pirie 1940	3a	CECT-933
CECT-940	*Listeria monocytogenes* (Murray et al. 1926[8]) Pirie 1940	4d	CECT-940
	*Listeria monocytogenes**	1/2a	LM230/3
CECT-910	*Listeria innocua*		*L. innocua*
NCTC-12900 / ATCC 700728	*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers serotype O157:H7		*E. coli* O157:H7

*: Aislada de lechuga fresca cortada en nuestro laboratorio (Abadias et al. 2008[5])

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; ATTC: American Type Culture Collection; NCTC: National Collection of Type Cultures.

Las concentraciones de patógeno ensayadas oscilan entre 10^5 ufc/ml y 10^7 ufc/ml. Sin embargo, en condiciones reales se estima que la concentración de patógeno 10^5 ufc/ml, que en los ensayos realizados corresponde a 10^3 ufc/g de producto, es incluso una concentración muy elevada de patógeno (Salleh et al., 2003[6]; Nguz et al., 2005[7]), por lo que los resultados obtenidos se presentan en condiciones desfavorables/adversas para la cepa CBS136973.

Ejemplo 1. Efectividad de la cepa CBS136973 frente a distintos patógenos de transmisión alimentaria en manzana "Golden Delicious" a 20ºC

Las figuras 1 a 3 muestran un ejemplo de resultados obtenidos frente a las cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis* BAA-709 y *Listeria innocua CECT-910*, en manzana "Golden Delicious", comparando la efectividad de la cepa CBS136973 con otras cepas aisladas en el laboratorio y que se ensayaron en las mismas condiciones.

La suspensión que se inoculó tenía una concentración de la cepa CBS136973 de aproximadamente 10^8 ufc/ml y 10^7 ufc/ml de microorganismo patógeno. El pH de las manzanas fue de 3,8±0,2 y la acidez entre 1,6 y 2,9 g ácido málico/l.

Tal y como muestra la figura 1, la concentración inicial de *E. coli* O157:H7 fue de 5,1 $\log_{10}$ufc/g y aumentó en el tratamiento control (sin antagonista) hasta 6,8 $\log_{10}$ufc/g. En cambio, en los trozos co-inoculados con distintos antagonistas, el crecimiento fue menor, observándose reducciones entre 1,0 y 1,6 unidades logarítmicas. En el caso de la cepa CBS136973, la población de patógeno tras los dos días de conservación a 20 ºC fue menor incluso que la inicial (2,4 $\log_{10}$ ufc/g), lo que nos indica una reducción efectiva de 4,5 unidades logarítmicas.

Resultados similares se obtuvieron cuando se ensayó la efectividad de distintas cepas frente a *Salmonella* BAA-709 (figura 2), con reducciones entre 0,3 y 1,0 unidades logarítmicas en el caso de los otros antagonistas y de 4,7 unidades logarítmicas en el caso de la cepa CBS136973.

El crecimiento de *Listeria innocua* en manzana no tratada con antagonista tras la conservación a 20 ºC durante 2 días fue mayor, de 2,5 $\log_{10}$ ufc/g. En el caso de algunos de los antagonistas aislados en el laboratorio la reducción fue notable, entre 1,1 y 2,2 unidades logarítmicas, pero la cepa CBS136973 mostró unos resultados mucho mejores, con una reducción de 5,9 unidades logarítmicas tras la conservación, lo que indica que la población de *Listeria innocua* en manzanas que habían sido tratadas con la cepa CBS136973 fue menor de 2 $\log_{10}$ ufc/g (figura 3).

Ejemplo 2. Efectividad de la cepa CBS136973 frente a distintos patógenos de transmisión alimentaria en distintas variedades de melocotón a 20ºC

Las figuras 4 a 6 muestran un ejemplo de resultados obtenidos frente a las cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis* BAA-709 y *Listeria innocua* CECT-910, en melocotón, comparando la efectividad de la cepa CBS136973 con otras cepas aisladas en el laboratorio y que se ensayaron en las mismas condiciones.

Se utilizaron melocotones de las variedades "Merry O'Henry", "Tardibelle", "Roig d'Albesa", "Placido", "Royal Glory" y "Elegant Lady". La suspensión que se inoculó tenía una concentración de la cepa CBS136973 de aproximadamente 10^8 ufc/ml y 10^7 ufc/ml de microorganismo patógeno. El pH de los melocotones utilizados fue de 3,6-5,3, con una acidez entre 2,8 y 7,8 g ácido málico/l.

Tal y como muestra la figura 4, la concentración inicial de *E. coli* O157:H7 en melocotón fue de 4,9 $\log_{10}$ufc/g, y aumentó aproximadamente 3 unidades logarítmicas en los trozos no tratados con antagonista tras 2 días de conservación a 20 ºC. En los trozos inoculados con algunos de los antagonistas aislados, la concentración de *E. coli* O157:H7 se redujo entre 1,8 y 3,0 unidades logarítmicas, mientras que con la cepa CBS136973, la reducción fue de 4,3 unidades logarítmicas, siendo la concentración a los 2 días incluso inferior a la inicial, lo que demuestra su gran efectividad.

En la figura 5 se muestran los resultados del mismo ensayo, pero realizado con la cepa de *Salmonella* BAA-709. En este caso, el incremento en la población tras dos días de conservación a 20 ºC fue menor que el de *E. coli* O157:H7, con aproximadamente 2,5 log de incremento. En general, las reducciones con los otros antagonistas fueron menores, entre 0,4 y 1,8 logaritmos, pero la reducción de *Salmonella* BAA-709 en aquellos trozos de manzana tratados con la cepa CBS136973 fue la mayor con 2,8 unidades logarítmicas.

La figura 6 muestra los datos referentes a *Listeria innocua* en melocotón. En esta figura 6 se observa que la población de *Listeria innocua* en el tratamiento control (sin antagonista) también aumentó aproximadamente 3 unidades logarítmicas en cada trozo de melocotón, mientras que en aquellos trozos inoculados con distintos antagonistas aislados en el laboratorio, la población fue menor, observándose reducciones entre 0,7 y 2,1 unidades logarítmicas. De nuevo, la reducción obtenida con la cepa CBS136973 fue superior, de 4 unidades logarítmicas, logrando también que la población final fuera incluso inferior a la inicial.

Ejemplo 3. Efectividad de la cepa CBS136973 frente a distintos patógenos de transmisión alimentaria en melón a 20 ºC

Las figuras 7 y 8 muestran un ejemplo de resultados obtenidos frente a las cepas de *Salmonella choleraesuis* BAA-709 y *Listeria monocytogenes* LM230/3, en melón, comparando la efectividad de la cepa CBS136973 con otras cepas aisladas en el laboratorio y que se ensayaron en las mismas condiciones.

El melón es una fruta con pH más neutro y menos acidez que la manzana y el melocotón (pH 5,7-6,5, acidez 0,7-1,9 g ácido cítrico/l, generalmente). En este caso, la problemática de los patógenos es más importante porque el pH no ejerce de barrera al crecimiento de los patógenos de transmisión alimentaria. La suspensión que se inoculó tenía una concentración de la cepa CBS136973 de aproximadamente 10^8 ufc/ml y 10^7 ufc/ml de microorganismo patógeno.

La figura 7 muestra los resultados de distintas cepas de microorganismos antagonistas, incluida la CBS136973 frente a *Salmonella* en trozos de melón "Piel de sapo". En este caso, los valores de reducción oscilaron entre 1,5 y 3,2 unidades logarítmicas, siendo la reducción mayor la obtenida con la cepa CBS136973, con un total de 3,5 unidades logarítmicas. Puede observarse que el crecimiento de *Salmonella* en melón en el tratamiento control (sin antagonista) tras 2 días de conservación a 20 ºC fue muy elevado, de 4,2 unidades logarítmicas, superándose la población en más de 10^8 ufc/g de producto.

La figura 8 muestra la efectividad de la cepa CBS136973 frente a la cepa de *Listeria monocytogenes* LM230/3, en melón conservado 2 días a 20 ºC. Tal y como puede observarse, en este caso, también hay una reducción del patógeno respecto al control no tratado.

Ejemplo 4. Efectividad de la cepa CBS136973 frente a *Escherichia coli* O157:H7 en manzana "Golden Delicious" en condiciones de refrigeración

La figura 9 muestra el resultado de la efectividad de la cepa CBS136973 frente a *E. coli* O157:H7 en manzana "Golden Delicious" conservada a 5 ºC. El ensayo se realizó mediante co-inoculación de 15 µl de una suspensión que contenía ambas cepas, *E. coli* O157:H7 a 10^7 ufc/ml y CBS136973 (30 % transmitancia, aproximadamente 10^8 ufc/ml).

Tal y como puede verse en la figura, a 5 ºC no se observó crecimiento de *E. coli* O157:H7 en manzana cortada en el tratamiento control, en cambio, en las muestras co-inoculadas con el antagonista, se vio una reducción a partir del segundo día de conservación y, a partir de los 7 días, la población se redujo por debajo de 10 ufc/g.

Ejemplo 5. Efectividad de la cepa CBS136973 frente a distintos patógenos de transmisión alimentaria en melocotón en condiciones de refrigeración

Las figura 10 y 11 muestran la efectividad de la cepa CBS136973 en melocotón (variedades "Elegant Lady" y "Plácido"), a 5 y 10 ºC, frente a *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* BAA-709. La suspensión que se inoculó tenía una concentración de la cepa CBS136973 de aproximadamente 10^8 ufc/ml y 10^7 ufc/ml de microorganismo patógeno.

Tal y como muestra la figura 10, la cepa CBS136973 reduce la concentración de patógeno, siendo esta reducción mayor a 5 ºC que a 10 ºC y manteniéndose incluso por debajo del límite de detección tras 6 días de conservación.

Resultados similares se obtuvieron cuando la cepa CBS136973 se utilizó frente a *Salmonella* en melocotón de la variedad "Placido" (figura 11). En este caso, tras 6 días de conservación a 5 ºC, no se detectó *Salmonella* en los trozos de melocotón cortado, mientras que la población se mantuvo en el tratamiento sin antagonista (control).

Ejemplo 6. Efectividad de la cepa CBS136973 frente a *Salmonella choleraesuis* BAA-709, en melón en condiciones de refrigeración

La figura 12 muestra la efectividad de la cepa CBS136973 en melón conservado a 10 ºC frente a *Salmonella* BAA-709. La suspensión que se inoculó tenía una concentración de la cepa CBS136973 de aproximadamente 10^8 ufc/ml y 10^7 ufc/ml de microorganismo patógeno.

Tal y como muestra la figura, a 10 ºC el patógeno creció en el tratamiento control (sin antagonista), mientras que el tratamiento en el que se aplicó CBS136973 la población se mantuvo más baja, con una reducción de más de 1,5 unidades logarítmicas a partir del sexto día de conservación. A 5 ºC, en las condiciones ensayadas, *Salmonella* no fue capaz de crecer y la adición de la cepa CBS136973 no representó ningún cambio respecto el tratamiento control.

Ejemplo 7. Efectividad de la cepa CBS136973 aplicada a distintas dosis frente a distintos patógenos de transmisión alimentaria en manzana Golden Delicious a 20ºC

Las tablas 4, 5 y 6 muestran la efectividad de la cepa CBS136973 aplicada a distintas dosis, y frente a distintas concentraciones de patógenos *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis* BAA-709 y *Listeria innocua CECT-910*. Esta efectividad se midió en unidades logarítmicas decimales de reducción de crecimiento según la fórmula citada más arriba.

Tal y como puede observarse en las tablas adjuntas, los resultados muestran reducción del crecimiento de patógenos para concentraciones de la cepa CBS136973 iguales o superiores a la concentración inoculada de patógeno.

Tabla 4. Valores de reducción (unidades logarítmicas decimales) de *Escherichia coli* O157:H7 aplicada a distintas concentraciones, en función de la dosis de la cepa CBS136973, en manzana “Golden Delicious” conservada a 20ºC durante 2 días.

	Concentración de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada (ufc/ml)		
Dosis cepa CBS 136973 (ufc/ml)	10^5	10^6	10^7
10^8	4,7	6,1	3,6
10^7	3,8	3,4	2,0
10^6	1,5	1,7	0,6
10^5	0,7	1,6	0,3

Tabla 5. Valores de reducción (unidades logarítmicas decimales) de *Salmonella choleraesuis* BAA-709 aplicada a distintas concentraciones, en función de la dosis de la cepa CBS136973, en manzana “Golden Delicious” conservada a 20ºC durante 2 días.

	Concentración de *Salmonella choleraesuis* BAA-709 inoculada (ufc/ml)		
Dosis cepa CBS136973 (ufc/ml)	10^5	10^6	10^7
10^8	5,4	3,8	4,5
10^7	5,0	3,3	3,3
10^6	3,2	1,9	1,3
10^5	1,9	1,5	0,3

Tabla 6. Valores de reducción (unidades logarítmicas decimales) de *Listeria innocua* aplicada a distintas concentraciones, en función de la dosis de la cepa CBS136973, en manzana ‘Golden Delicious’ conservada a 20ºC durante 2 días.

	Concentración de *Listeria innocua* inoculada (ufc/ml)		
Dosis CBS136973 (ufc/ml)	10^5	10^6	10^7
10^8	5,0	4,5	3,5
10^7	4,2	3,9	2,2
10^6	3,1	2,1	1,1
10^5	2,2	1,3	0,8

En el caso de *Salmonella* y *Listeria innocua*, inoculadas en manzana, la relación 1:1 (patógeno:antagonista) es suficiente para observar reducciones superiores a 1,9 unidades logarítmicas.

De las dosis ensayadas, la 10^8 ufc/ml es la que presenta los resultados más buenos para los tres patógenos (reducciones superiores a 3,5 unidades logarítmicas). No obstante, la dosis 10^7 ufc/ml de la cepa CBS136973 es la que se considera más adecuada para la aplicación comercial, ya que garantiza un mínimo de dos unidades logarítmicas de reducción para los tres patógenos estudiados, independientemente de la concentración de bacterias patógenas de la fruta.

Ejemplo 8. Efectividad de la cepa CBS136973 aplicada a distintas dosis frente a distintos patógenos de transmisión alimentaria en melón a 20ºC y 10ºC

En este ejemplo, se utilizó un cóctel de cepas de *Salmonella choleraesuis* (BAA-707, BAA-709, BAA-710 y BAA-711) o de *Listeria monocytogenes* (CECT-4031, CECT-4032, CECT-933, CECT-940 y LM230/3).

Las tablas 7 y 8 muestran la efectividad en melón conservado a 20 ºC de la cepa CBS136973, aplicada a distintas dosis, y frente a distintas concentraciones de cóctel de patógenos de los géneros *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Esta efectividad se midió en unidades logarítmicas decimales de reducción de crecimiento según la fórmula citada más arriba.

Tabla 7. Valores de reducción (unidades logarítmicas decimales) de *Salmonella choleraesuis* aplicada a distintas concentraciones, en función de la dosis de la cepa CBS136973, en melón “Piel de sapo” conservado a 20 ºC durante 2 días.

	Concentración de *Salmonella choleraesuis* inoculada (ufc/ml)	
Dosis CBS136973 (ufc/ml)	10^5	10^7
10^8	7,3	2,1
10^7	3,7	0,9
10^6	0,2	0,4

Tabla 8. Valores de reducción (unidades logarítmicas decimales) de *Listeria monocytogenes* aplicada a distintas concentraciones, en función de la dosis de la cepa CBS136973, en melón “Piel de sapo” conservado a 20 ºC durante 2 días.

	Concentración de *Listeria monocytogenes* inoculada (ufc/ml)	
Dosis CBS136973 (ufc/ml)	10^5	10^7
10^8	5,3	4,9
10^7	4,2	2,8
10^6	2,1	1,0

Tal y como puede verse en las tablas, en melón, la dosis 10^7 ufc/ml de la cepa CBS136973 muestra valores de reducción de crecimiento iguales o superiores a 3,7 unidades logarítmicas de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* aplicadas a 10^5 ufc/ml de melón que equivale aproximadamente a 10^3 ufc/g melón.

Las figuras 13 y 14 muestran la efectividad a distintas concentraciones de la cepa CBS136973, en melón conservado a 10 ºC, frente a los mencionados cócteles de *Salmonella choleraesuis* y *Listeria monocytogenes* aplicados a una concentración de 10^5 ufc/ml.

Tal y como muestran las figuras, la reducción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* es mayor a mayor concentración de la cepa CBS136973.

Ensayo para demostrar la efectividad de la cepa antagonista CBS136973 frente a los principales patógenos de transmisión alimentaria en fruta cortada en condiciones que simulan la producción comercial.

A continuación se describe un ejemplo de un ensayo en manzana “Golden Delicious” en condiciones que simulan la producción comercial.

En este ejemplo se utilizó un cóctel de cepas de *Salmonella choleraesuis* (BAA-707, BAA-709, BAA-710 y BAA-711) y un cóctel de cepas de *Listeria monocytogenes* (CECT-4031, CECT-4032, CECT-933, CECT-940 y LM230/3).

Las manzanas enteras se desinfectaron, se descorazonaron y se cortaron en diez gajos. A continuación se sumergieron en un baño que contenía el antioxidante NatureSeal® AS1 (6%, Agricoat Ltd., Great Shefford, UK), durante 2 min y en agitación, y se dejaron secar.

Una vez tratados con antioxidante, los trozos de manzana se sumergieron en una suspensión que contenía el cóctel de cepas del patógeno y el antagonista, durante 1 min y en agitación, simulando la aplicación que tendría lugar en un tanque de la línea de tratamiento de fruta. En el tratamiento control, los trozos de manzana se sumergieron en una suspensión que contenía el cóctel de cepas del patógeno sin la cepa antagonista.

A continuación, los trozos de manzana se dejaron escurrir y se envasaron (200 g) en barquetas de polipropileno de 500 ml de capacidad y se sellaron con un film de polipropileno del tipo habitualmente empleado de 35 μm de grosor y una permeabilidad al O_2 y CO_2 de 3500 cm^3/m^2*día*atm a 23ºC, y al vapor de agua de 0,9 g/m^2*día a 25ºC y 75% de humedad relativa. Debido a la respiración del fruto y las características de permeabilidad al O_2 y al CO_2 del film, se crea en el interior del envase una atmósfera modificada pasiva (MAP). La cepa antagonista CBS136973 puede verse afectada por esta atmósfera, por lo que su efectividad ha de demostrarse también en estas condiciones de atmósfera modificada.

Los trozos de manzanas se conservaron a 5 ºC y a 10 ºC durante 15 días (vida útil estimada para este tipo de productos). Periódicamente se realizaron recuentos microbiológicos y se hizo una determinación de distintos parámetros de calidad (color, textura, pH, acidez, contenido en sólidos solubles y calidad visual).

Para obtener la suspensión de la cepa CBS136973, se utilizó la producción en medio líquido TSB y se ajustó el porcentaje de transmitancia (λ=420 nm) para una concentración de la cepa de 10^7 ufc/ml.

Los patógenos se inocularon en tubos conteniendo 10 ml de medio TSB (*Salmonella choleraesuis* BAA-707, BAA-709, BAA-710 y BAA-711) o TYSEB (*Listeria monocytogenes* CECT-4031, CECT-4032, CECT-933, CECT-940 y LM230/3), que se incubaron a 37 ºC durante 20-24 h. A continuación se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min y el precipitado celular se redisolvió con 5 ml de solución salina (0,85 g/l de NaCl). Mediante la medición de la transmitancia a 420 nm y una curva previamente obtenida en el laboratorio para cada uno de los patógenos, se determinó la concentración estimada de patógeno, que en el ensayo que se describe fue una suspensión con una concentración de 10^5 ufc/ml.

Ejemplo 9. Efectividad de la cepa CBS136973 en condiciones que simulan las comerciales frente a distintos patógenos de transmisión alimentaria en manzana “Golden Delicious” cortada y envasada a diferentes temperaturas

Las figuras 15 y 16 muestran los resultados obtenidos frente a los mencionados cócteles de cepas de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, en manzana “Golden Delicious” a 5 ºC y 10 ºC.

La suspensión que se inoculó mediante inmersión de los trozos de manzana contenía una concentración de la cepa CBS136973 de 10^7 ufc/ml y una concentración de 10^5 ufc/ml de ambos microorganismos patógenos.

Tal y como puede observarse en las figuras, la cepa CBS136973 ha resultado efectiva frente a *Salmonella*, especialmente a 10 ºC, donde se observó crecimiento. En el caso de *Listeria monocytogenes*, se observó reducción del crecimiento tanto a 5 ºC como a 10 ºC.

Por lo tanto, puede concluirse que la cepa CBS136973 es efectiva frente a distintos patógenos de transmisión alimentaria en condiciones que simulan las comerciales (refrigeración y atmósfera modificada pasiva MAP).

Además, es importante destacar que la aplicación de la cepa CBS136973 no afectó al color, ni a la textura, ni a los sólidos solubles, ni a la acidez de las manzanas.

A pesar de que se ha descrito y representado ejemplos concretos de la presente invención, es evidente que el experto en la materia podrá introducir variantes y modificaciones, o substituir los detalles por otros técnicamente equivalentes, sin apartarse del ámbito de protección definido por las reivindicaciones adjuntas.

Referencias:

(1) Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Erler, W., Burghardt, J., Seyfarth, W. 1999. A taxonomic study of bacteria isolated from grasses: a proposed new species *Pseudomonas graminis* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 49: 297-308.

(2) Noval, C. 1991. Comprobación del poder patógeno. En: Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. Ed. MAPA, pp.137-148.

(3) Peix, A.; Rivas, R., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Rodriguez-Barrueco, C.,Velazquez, E. 2003. *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 2067-2072.

(4) Peix, A., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Rodriguez-Barrueco, C., Velazquez, E. 2004. *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 847-850.

(5) Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. International Journal of Food Microbiology, 123: 121-129.

(6) Salleh, N.A.; Rusul, G., Hassan, Z., Reezal, A., Isa, S.H. Nishibuchi, M.; Radu, S. 2003. Incidence of Salmonella spp. in raw vegetables in Salangor, Malaysia. Food Control 14: 475-479.

(7) Nguz, K., Shindano, J., Samapundo, S., Huyghebaert, A. 2005. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. Food Control 16: 623-628.

(8) Murray, E.G.D., Webb, R.E., Swann, M.B.R. 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus Bacterium monocytogenes (n. sp.). J. Pathol. Bacteriol. 29: 407-439.

REIVINDICACIONES

1. Cultivo biológico sustancialmente puro de una cepa de la especie *Pseudomonas graminis*, depositada con el número CBS136973 en la institución de depósito “Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) de Utrech, Holanda.

2. Uso del cultivo CBS136973 de la reivindicación 1 como antagonista para el control biológico de bacterias patógenas de transmisión alimentaria en fruta para consumo humano.

3. Uso según la reivindicación 2, en la que dicha fruta es fruta cortada a trozos o fruta de cuarta gama.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que dichas bacterias patógenas son seleccionadas de un grupo que consiste en microorganismos *Salmonella* spp., microorganismos *Listeria* spp. y microorganismos *Escherichia coli* O157:H7 o una combinación de los mismos.

5. Uso según la reivindicación 4, en el que la *Salmonella* spp. es de la especie *Salmonella choleraesuis*.

6. Uso según la reivindicación 4, en el que la *Listeria* spp. es de cualquiera de las especies *Listeria monocytogenes* o *Listeria innocua*.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho control biológico se lleva a cabo manteniendo la fruta a una temperatura superior a 10 ºC, preferiblemente, a una temperatura igual o superior a 20ºC.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dicho control biológico se lleva a cabo manteniendo la fruta a una temperatura igual o inferior a 10ºC.

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que dicho control biológico se lleva a cabo manteniendo la fruta en una atmósfera modificada con una composición de gas diferente de la del aire.

10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que dicha fruta es fruta con un pH comprendido entre 3 y 7.

11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicha fruta es seleccionada de un grupo que consiste en manzana, melocotón y melón.

12. Método para tratar fruta que comprende la etapa de aplicar a la fruta una preparación que comprende un cultivo de una cepa de la especie *Pseudomonas graminis*, depositada con el número CBS136973 en la institución de depósito “Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) de Utrech, Holanda.

13. Método según la reivindicación 12, que comprende la etapa de cortar la fruta a trozos antes de aplicar dicha preparación.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en el que la concentración de la cepa CBS136973 en dicha preparación es igual o superior a la concentración estimada de patógeno que puede contener la fruta.

15. Método según la reivindicación 14, en el que la concentración de la cepa CBS136973 en dicha preparación es igual o superior a 10^5 ufc/ml, preferiblemente, igual o superior a10^7 ufc/ml.

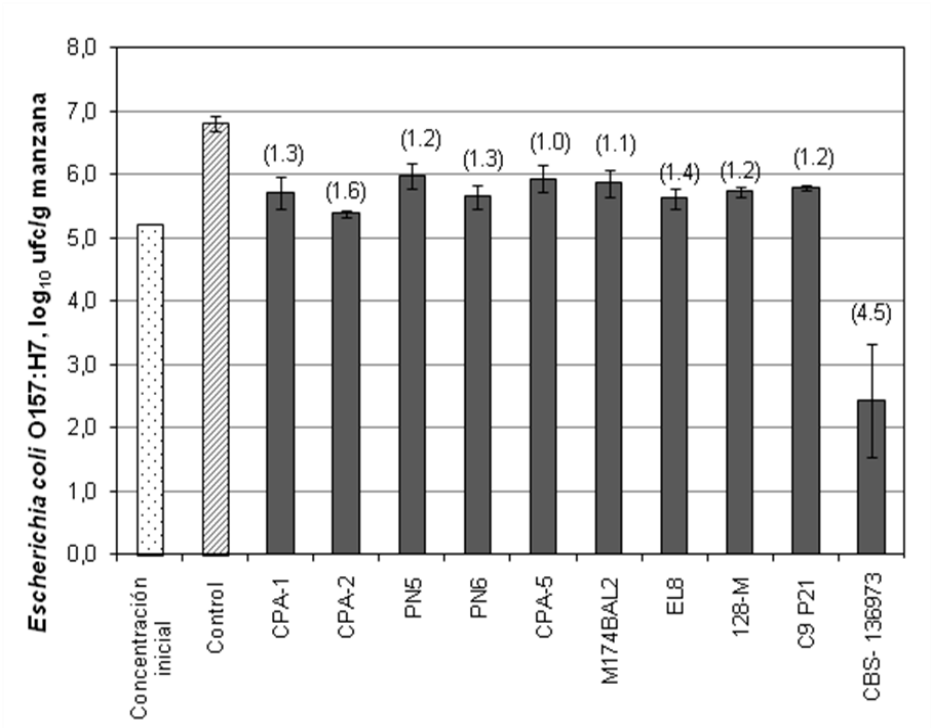
Escherichia coli O157:H7, log10 ufc/g manzana
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
(1.3)
(1.6)
(1.2)
(1.3)
(1.0)
(1.1)
(1.4)
(1.2)
(1.2)
(4.5)
Concentración inicial
Control
CPA-1
CPA-2
PN5
PN6
CPA-5
M174BAL2
EL8
128-M
C9 P21
CBS- 136973

FIG. 1

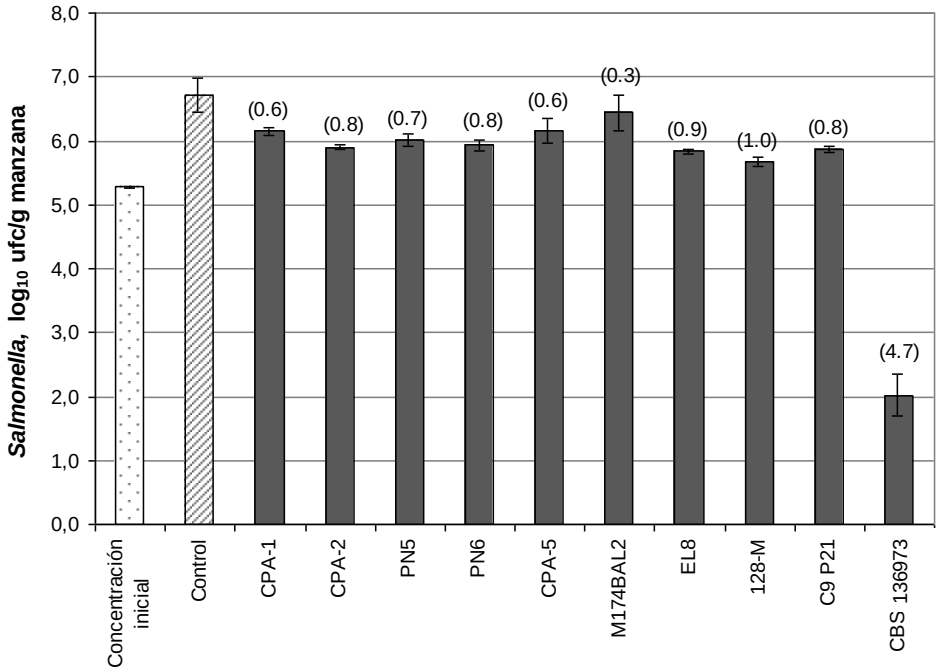
Salmonella, log10 ufc/g manzana
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
(0.6)
(0.8)
(0.7)
(0.8)
(0.6)
(0.3)
(0.9)
(1.0)
(0.8)
(4.7)
Concentración inicial
Control
CPA-1
CPA-2
PN5
PN6
CPA-5
M174BAL2
EL8
128-M
C9 P21
CBS 136973

FIG. 2

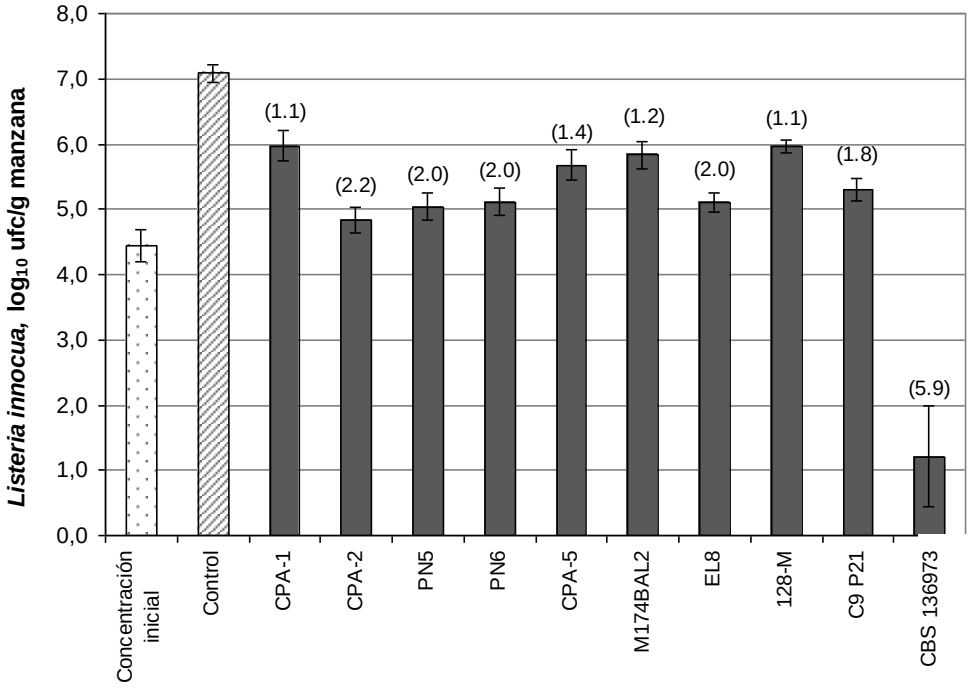
Listeria innocua, log10 ufc/g manzana
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
(1.1)
(2.2)
(2.0)
(2.0)
(1.4)
(1.2)
(2.0)
(1.1)
(1.8)
(5.9)
Concentración inicial
Control
CPA-1
CPA-2
PN5
PN6
CPA-5
M174BAL2
EL8
128-M
C9 P21
CBS 136973

FIG. 3

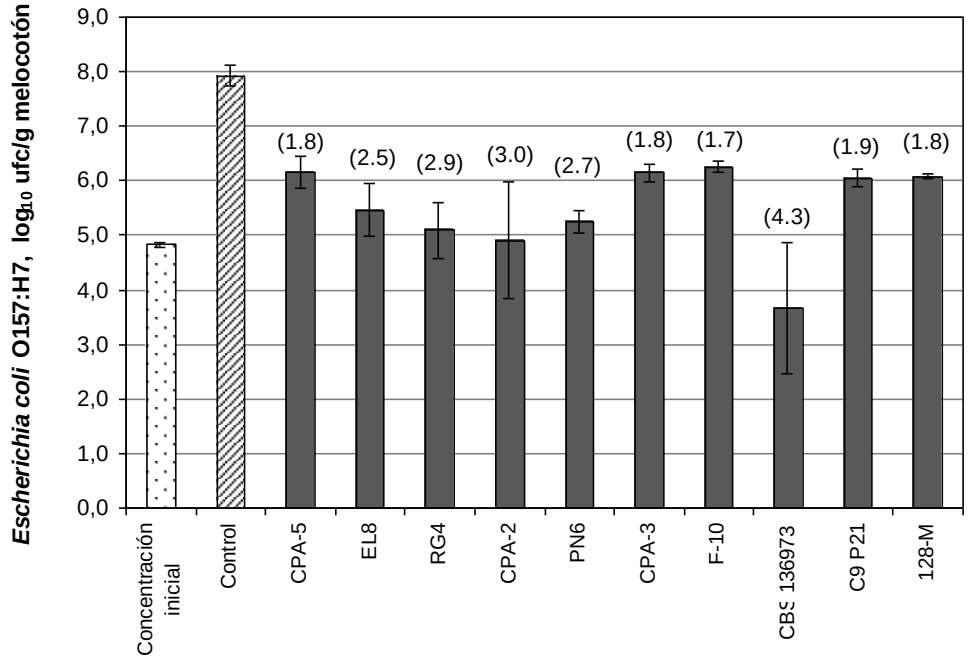
Escherichia coli O157:H7, log10 ufc/g melocotón
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
(1.8)
(2.5)
(2.9)
(3.0)
(2.7)
(1.8)
(1.7)
(4.3)
(1.9)
(1.8)
Concentración inicial
Control
CPA-5
EL8
RG4
CPA-2
PN6
CPA-3
F-10
CBS 136973
C9 P21
128-M

FIG. 4

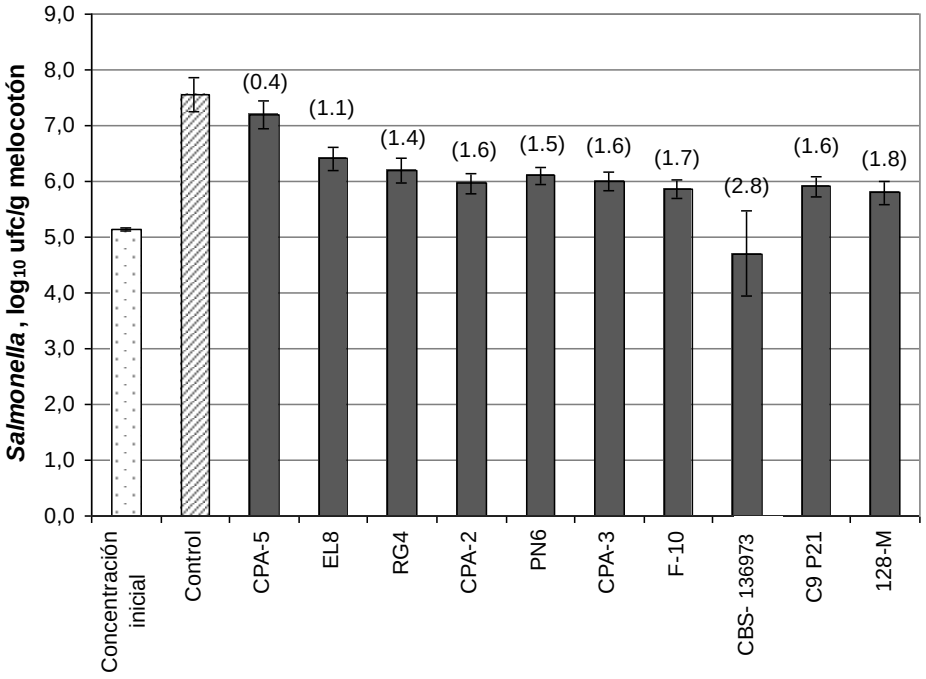
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Salmonella , log10 ufc/g melocotón
(0.4)
(1.1)
(1.4)
(1.6)
(1.5)
(1.6)
(1.7)
(2.8)
(1.6)
(1.8)
Concentración inicial
Control
CPA-5
EL8
RG4
CPA-2
PN6
CPA-3
F-10
CBS- 136973
C9 P21
128-M

FIG. 5

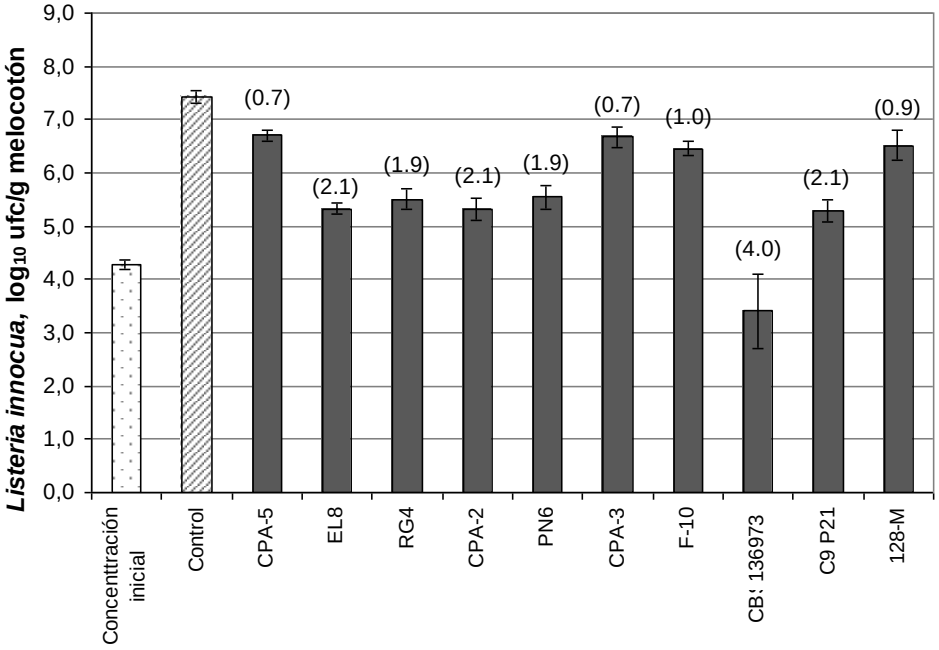
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Listeria innocua, log10 ufc/g melocotón
(0.7)
(2.1)
(1.9)
(2.1)
(1.9)
(0.7)
(1.0)
(4.0)
(2.1)
(0.9)
Concenttración inicial
Control
CPA-5
EL8
RG4
CPA-2
PN6
CPA-3
F-10
CB: 136973
C9 P21
128-M

FIG. 6

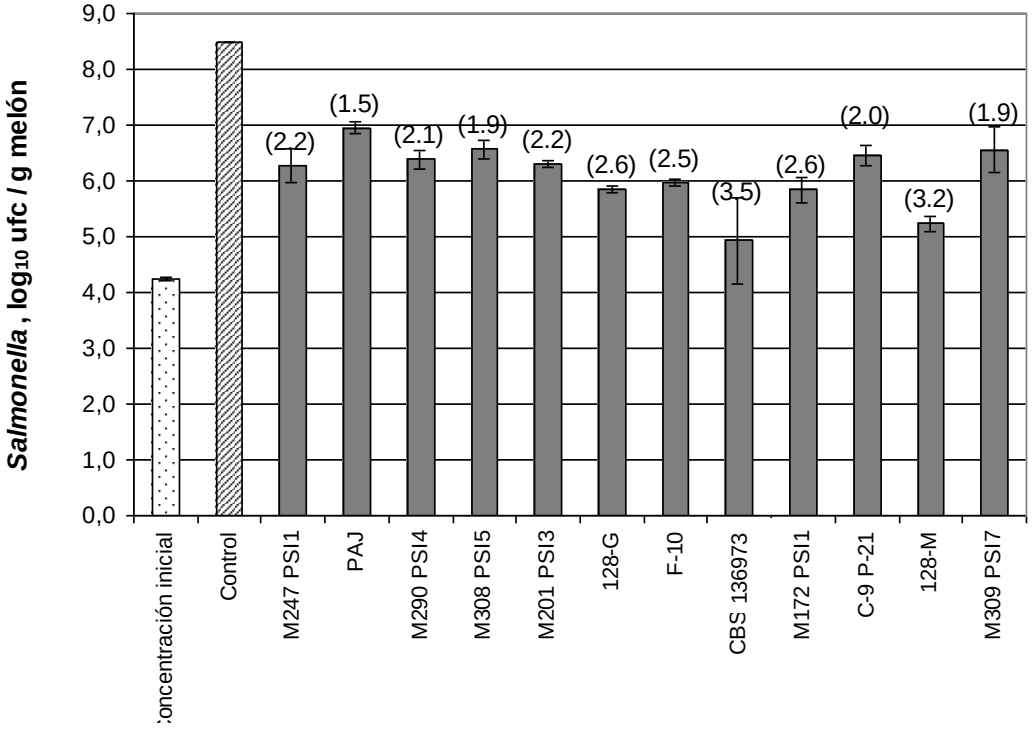
Salmonella , log10 ufc / g melón
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
(2.2)
(1.5)
(2.1)
(1.9)
(2.2)
(2.6)
(2.5)
(3.5)
(2.6)
(2.0)
(3.2)
(1.9)
Concentración inicial
Control
M247 PSI1
PAJ
M290 PSI4
M308 PSI5
M201 PSI3
128-G
F-10
CBS 136973
M172 PSI1
C-9 P-21
128-M
M309 PSI7

FIG. 7

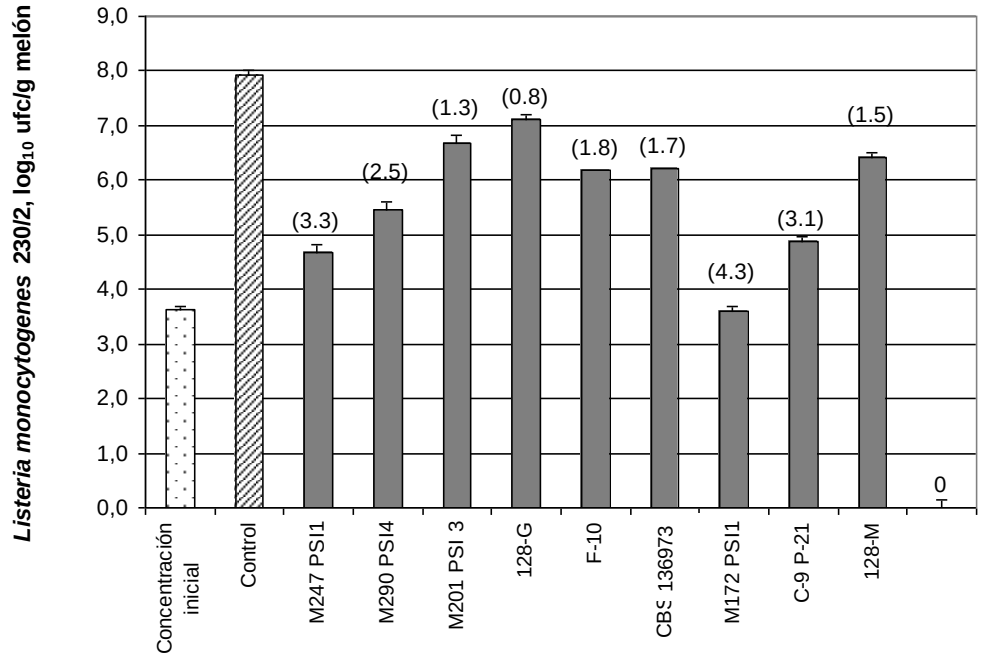
Listeria monocytogenes 230/2, log10 ufc/g melón
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
(3.3)
(2.5)
(1.3)
(0.8)
(1.8)
(1.7)
(4.3)
(3.1)
(1.5)
0
Concentración inicial
Control
M247 PSI1
M290 PSI4
M201 PSI 3
128-G
F-10
CBS 136973
M172 PSI1
C-9 P-21
128-M

FIG. 8

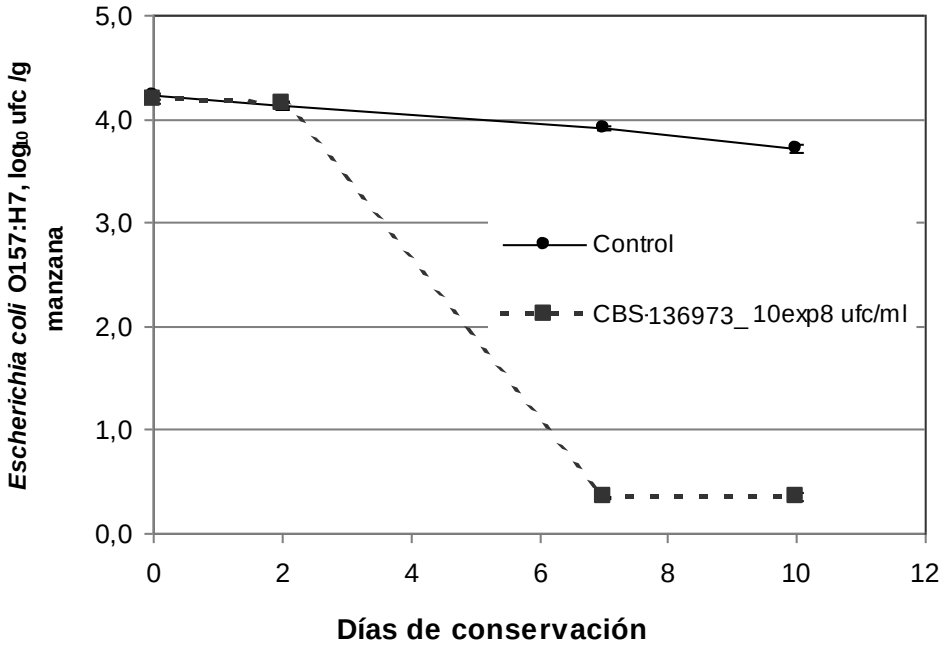
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
0
2
4
6
8
10
12
Escherichia coli O157:H7, log10 ufc /g manzana
Control
CBS-136973_ 10exp8 ufc/ml
Días de conservación

FIG. 9

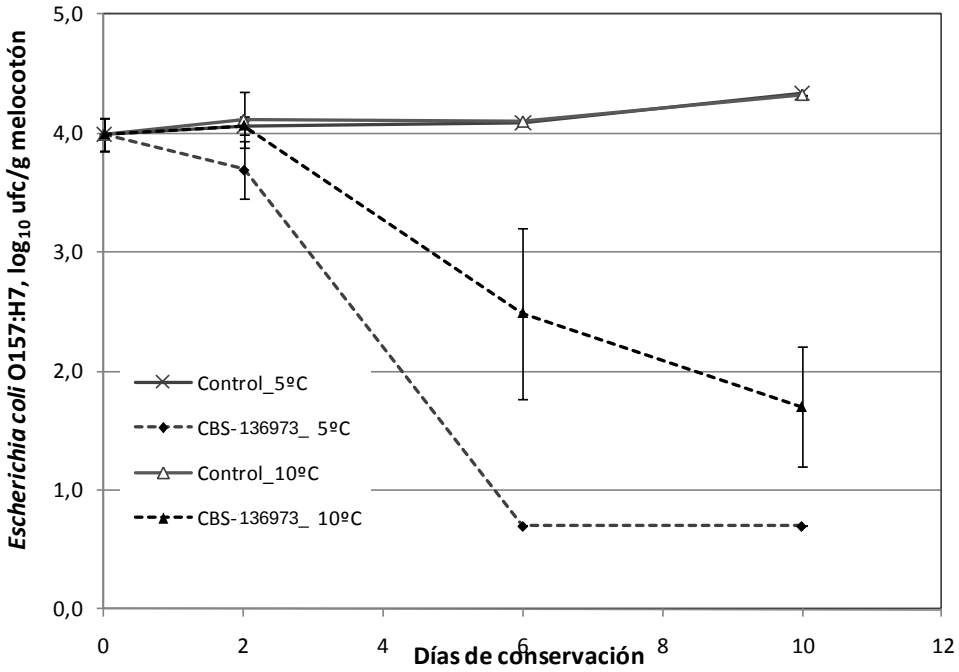
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
0
2
4
6
8
10
12
Escherichia coli O157:H7, log10 ufc/g melocotón
Control_5ºC
CBS-136973_ 5ºC
Control_10ºC
CBS-136973_ 10ºC
Días de conservación

FIG. 10

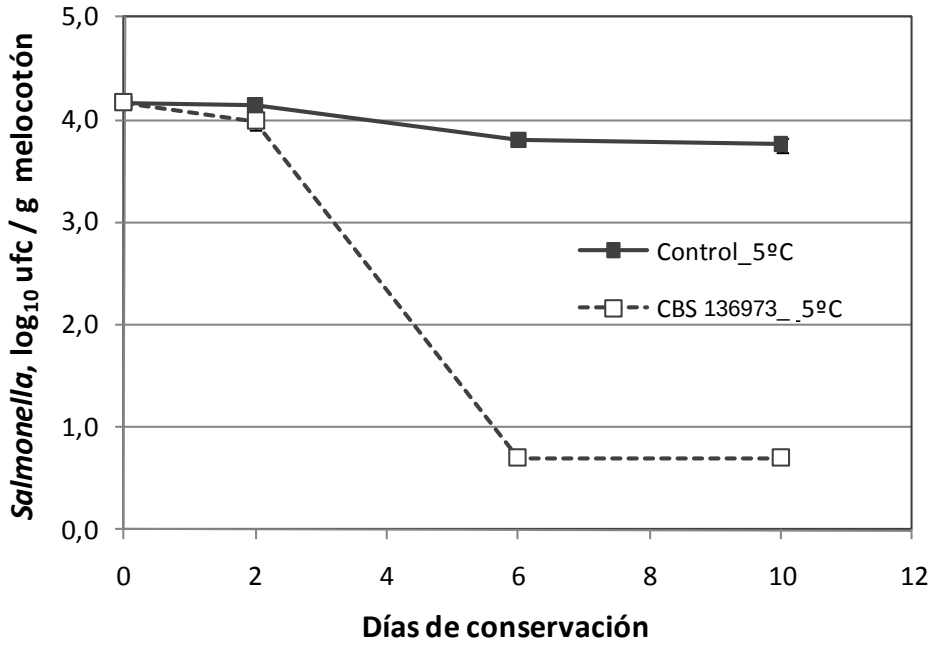
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Salmonella, log10 ufc / g melocotón
0
2
4
6
8
10
12
Días de conservación
Control_5ºC
CBS 136973_ _5ºC

FIG. 11

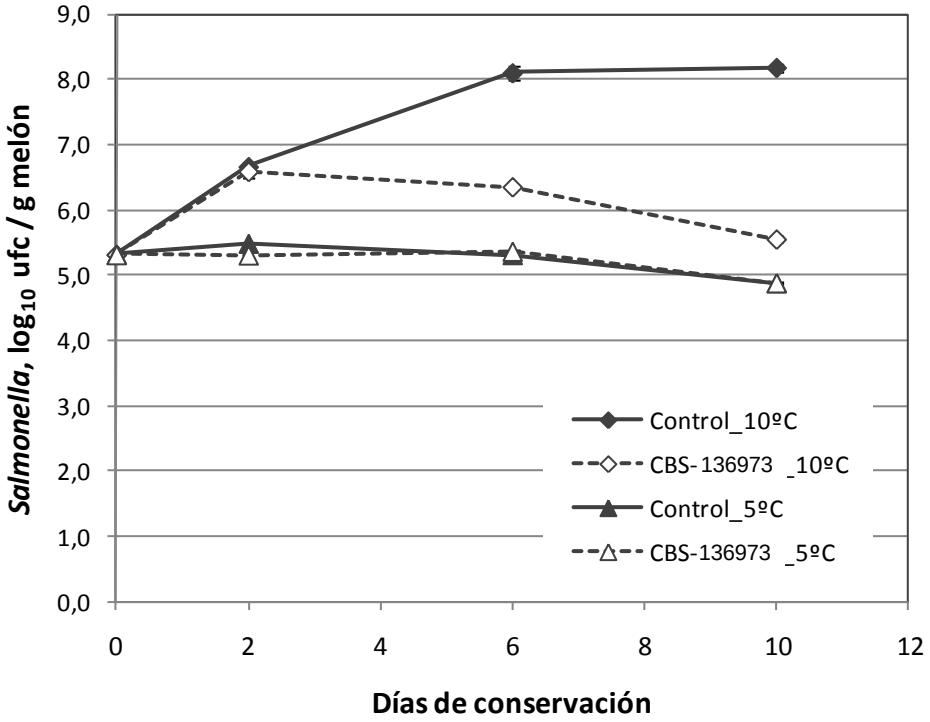
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Salmonella, log10 ufc / g melón
0
2
4
6
8
10
12
Días de conservación
Control_10ºC
CBS-136973 _10ºC
Control_5ºC
CBS-136973 _5ºC

FIG. 12

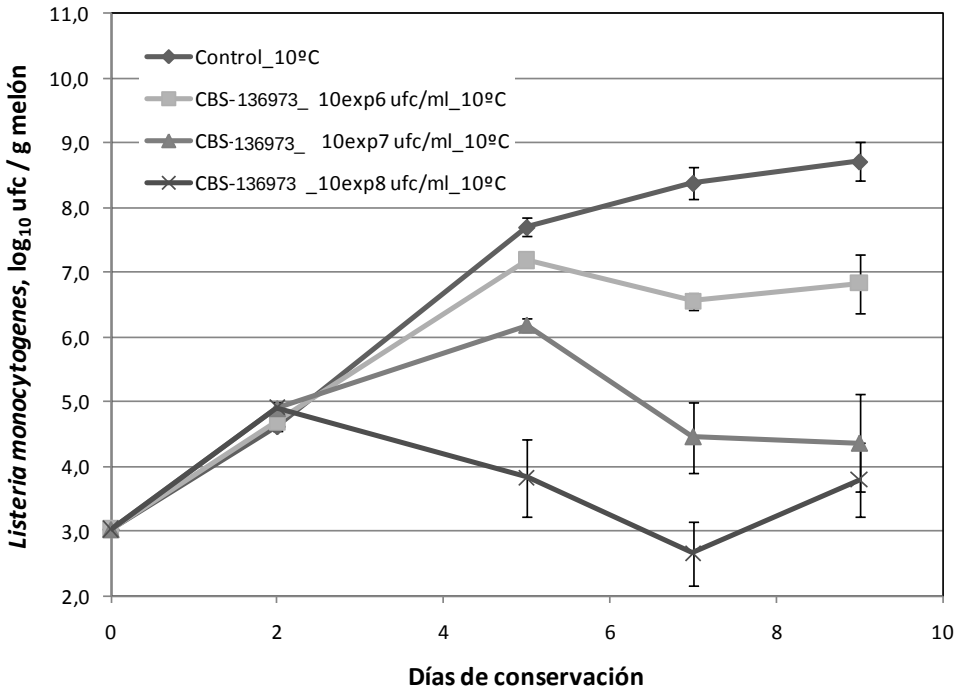
Control_10ºC
CBS-136973_ 10exp6 ufc/ml_10ºC
CBS-136973_ 10exp7 ufc/ml_10ºC
CBS-136973 _10exp8 ufc/ml_10ºC
Listeria monocytogenes, log10 ufc / g melón
Días de conservación

FIG. 13

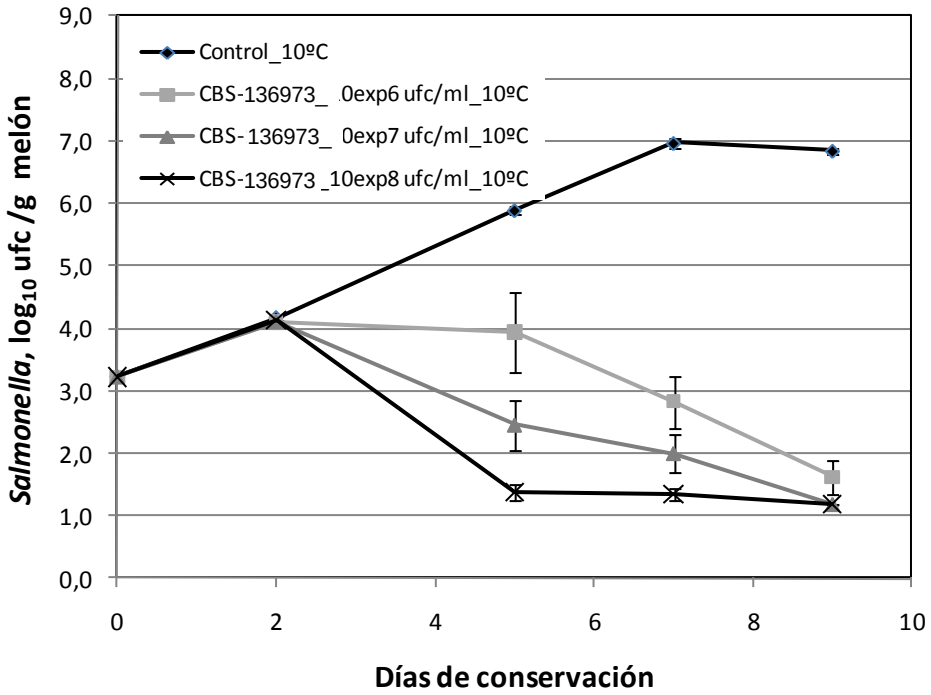
Control_10ºC
CBS-136973_ 0exp6 ufc/ml_10ºC
CBS-136973_ 0exp7 ufc/ml_10ºC
CBS-136973 _10exp8 ufc/ml_10ºC
Salmonella, log10 ufc /g melón
Días de conservación

FIG. 14

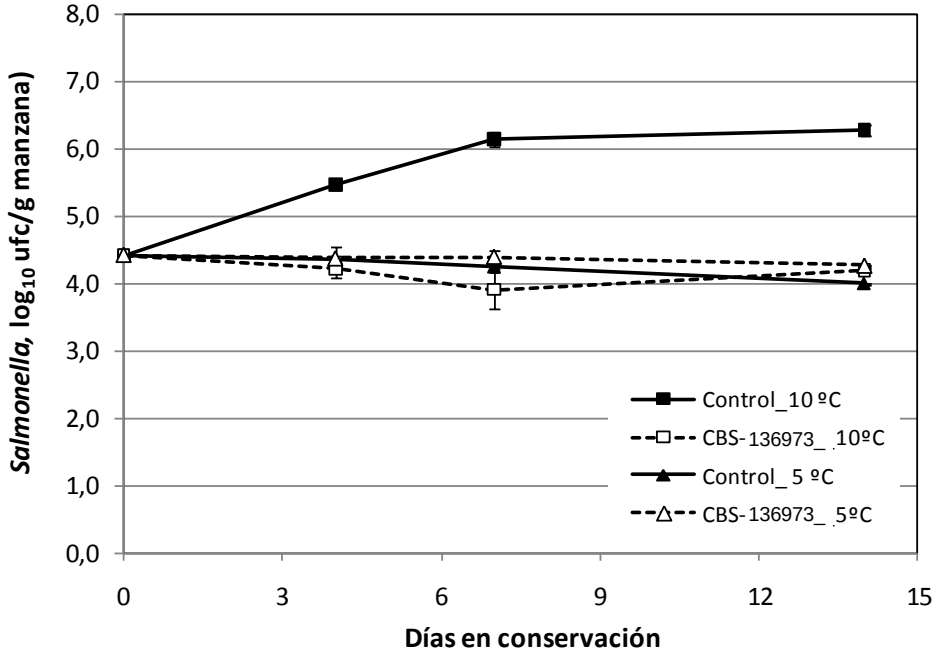
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Salmonella, log10 ufc/g manzana)
0
3
6
9
12
15
Días en conservación
Control_10 ºC
CBS-136973_ 10ºC
Control_ 5 ºC
CBS-136973_ 5ºC

FIG. 15

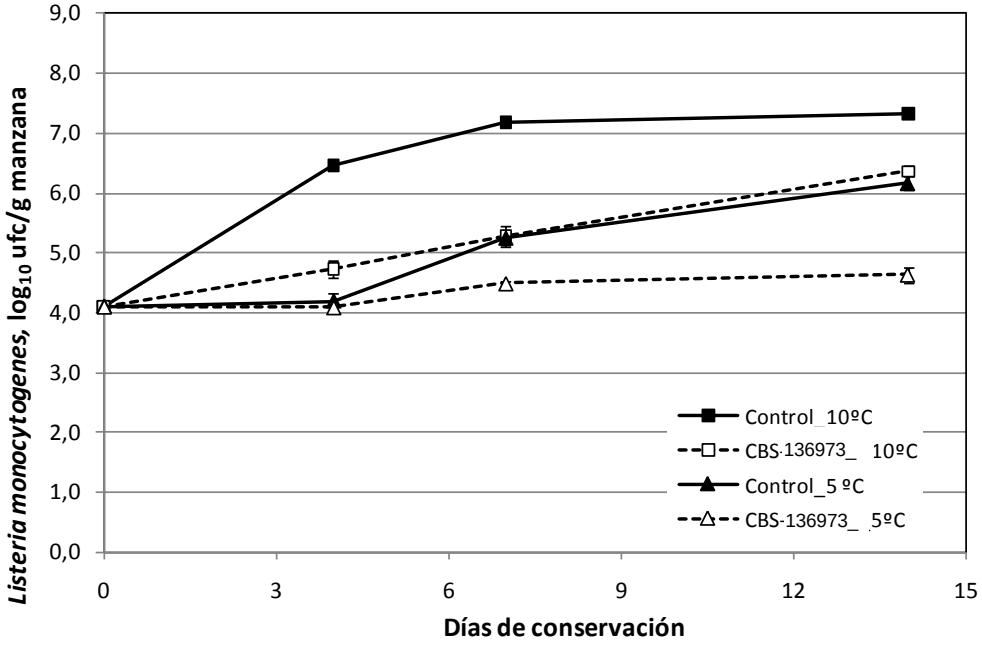
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Listeria monocytogenes, log10 ufc/g manzana
0
3
6
9
12
15
Días de conservación
Control_10ºC
CBS-136973_ 10ºC
Control_5 ºC
CBS-136973_ 5ºC

FIG. 16