



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Aspectos fisiológicos de interés en la supervivencia de vibrios no coléricos frente a diferentes agentes y tecnologías de conservación de los alimentos

Physiological factors determining non-cholera vibrios survival to different food preservation agents and technologies

Autor/es

Cristina Marco Ayensa

Director/es

Guillermo Cebrián Auré y Pilar Mañas Pérez

Facultad de Veterinaria

Curso 2016-2017

AGRADECIMIENTOS

Para llevar a cabo este Trabajo de Fin de Grado (TFG), he podido contar con toda la suerte, la colaboración de muchas personas a las cuales quiero agradecer esta ayuda que me han prestado. En primer lugar, quisiera agradecer al profesor Guillermo Cebrián Auré, mi tutor del TFG, su ayuda, sin la cual no habría podido sacar adelante este trabajo. Además, él lo único que pretendía es que yo aprendiera con y de este trabajo y creo que lo ha conseguido.

Además a la profesora Pilar Mañas Pérez, mi otra tutora, sin cuya ayuda tampoco habría sido capaz de sacar adelante este proyecto ya que fue ella la que me animó a escoger este trabajo.

En el ámbito personal me gustaría agradecer el apoyo que he tenido desde casa para poder superar tanto los obstáculos que me surgieron con el trabajo como en el transcurso de la carrera. Sobre todo a mis padres que han estado muy pendientes de mí y me han inculcado que el esfuerzo diario es la base para el éxito. A mi hermano, mis abuelos, tíos, primos... en realidad a toda mi familia y sobre todo mis amigos tanto de fuera de la Universidad como de dentro, los cuales en estos 4 años de carrera se les podrían considerar una pequeña familia.

A todas estas personas,

Gracias.

INDICE

1. RESUMEN.....	2
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5
3.1.1. Epidemiología.....	7
3.1.2. Infección producida por <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8
3.2. <i>Vibrio vulnificus</i>	8
3.2.1. Epidemiología.....	8
3.2.2. Infecciones producidas por <i>Vibrio vulnificus</i>	9
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	12
5. MATERIAL Y MÉTODOS	13
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
6.1. Factores fisiológicos que determinan la resistencia de vibrio a los diferentes estreses medioambientales y tecnologías de conservación.....	19
6.1.1. Influencia de la fase de crecimiento	20
6.1.2. Influencia de la temperatura de crecimiento.....	21
6.1.3. Influencia del medio de crecimiento y / o condiciones de crecimiento....	22
6.1.4. Influencia de la adaptación a estreses previos y subletales	24
6.1.4.1. Influencia en la resistencia a los estreses ambientales.....	24
6.1.4.2. Influencia en la resistencia frente a tecnologías de conservación de los alimentos.....	28
7. CONCLUSIONES	31
8. CONCLUSIONS.....	32
9. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE.....	33
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. RESUMEN

La relevancia de los vibrios no coléricos desde el punto de vista de la seguridad alimentaria es bien conocida y cada vez más manifiesta. No obstante, y a pesar de su relevancia sanitaria, poco o nada se conoce acerca de su resistencia a muchos de los agentes y tecnologías utilizados habitualmente en la industria alimentaria y menos todavía acerca de aquellos aspectos fisiológicos que determinan su sensibilidad/resistencia. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido recopilar y analizar la información actualizada acerca de aquellos aspectos fisiológicos de los vibrios no coléricos (*Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*) que podrían influir en la resistencia de estas especies frente a diferentes agentes y tecnologías utilizados en la conservación de los alimentos. Para ello se ha realizado una búsqueda bibliográfica sistematizada en varias bases de datos, y utilizando diferentes estrategias de búsqueda, que han permitido seleccionar la información más relevante para elaborar esta revisión.

De acuerdo a los resultados existentes queda claro que tanto la fase como la temperatura de crecimiento ejercen una notable influencia en la resistencia al estrés de estos microorganismos. Así, las células de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* presentan, en general, una mayor resistencia al estrés en fase estacionaria de crecimiento y cuanto más alta es la temperatura de crecimiento. Por otra parte, y en relación a las respuestas de resistencia al estrés, los datos presentados en esta revisión demuestran que la adaptación a distintos estreses como al ácido, a las altas temperaturas, al etanol y a la salinidad, provoca un aumento en la resistencia a los distintos tratamientos que se usan para inactivar los microorganismos como el calor, la acidificación o los desinfectantes. Por el contrario, la adaptación a temperaturas bajas no aumentaría la supervivencia de estos microorganismos ni frente a las altas temperaturas, ni a las altas presiones hidrostáticas ni frente al ácido o al H₂O₂. Este último dato es especialmente relevante ya que los productos de la pesca y mariscos se almacenan a temperaturas bajas tras su captura para poder así ralentizar el crecimiento microbiano. Además, se ha demostrado que el tratamiento con altas presiones y un posterior almacenamiento en frío resulta en una progresiva inactivación de los microorganismos, un hecho que puede ser aprovechado para incrementar la seguridad de los productos así tratados. Finalmente, cabe destacar que la exposición a determinados agentes podría conducir a la inducción del estado VNBC o a la formación de biofilms, estados en los que las células de estos microorganismos presentan una mayor resistencia al estrés.

2. ABSTRACT

The relevance of non-cholerae vibrios from the point of view of food safety is well known and increasingly manifest. Nevertheless, and despite its sanitary relevance, little is known about its resistance to many of the agents and technologies commonly used in the food industry and even less about those physiological aspects that determine its resistance to them. Therefore, the objective of this work has been to collect and analyse updated information about those physiological aspects of non-cholerae vibrios (*Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*) that could influence the resistance of these species against different agents and technologies used for food preservation. For this purpose, a systematic bibliographic search has been carried out in several databases, and using different search strategies, which has allowed selecting the most relevant information to prepare this review.

According to the existing results it is clear that both growth phase and temperature exert a remarkable influence on the stress resistance of these microorganisms. Thus, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* cells present, in general, a greater resistance to stress in stationary phase of growth and the higher the growth temperature. On the other hand, and regarding stress resistance responses, the data presented in this review show that adaptation to different stresses such as acid, high temperatures, ethanol and salinity causes an increase in resistance to different stresses and/or technologies such as heat, acidification or disinfectants. On the contrary, the adaptation to low temperatures would not increase the survival of these microorganisms to high temperatures, high hydrostatic pressures, acid conditions or H₂O₂. This is especially relevant because fish and shellfish products are stored at low temperatures after capture in order to slow down microbial growth. In addition, it has been shown that treatment with high pressures and subsequent cold storage results in a progressive inactivation of microorganisms, a fact that can be exploited to increase the safety of the products thus treated. Finally, it should be noted that exposure to certain agents could lead to the induction of the VNBC state or the formation of biofilms, states in which the cells of these microorganisms display a greater resistance to stress.

3. INTRODUCCIÓN

La popularidad del pescado y del marisco a nivel mundial está teniendo un crecimiento exponencial, de ahí que datos de la FAO en el año 2016 indican que el consumo de estos productos ha superado los 20 kg/persona*año (FAO, 2016). Este incremento en el consumo, junto con el incremento constante en la población mundial ha conducido, a pesar de los avances impulsados por algunos países en relación a los sistemas de explotación de los recursos marinos y a la mejora de las condiciones de los lugares de pesca, a una sobre-explotación de los acuíferos y a que el estado actual de los recursos marinos –en muchos casos obtenidos en zonas con elevada contaminación- no sea el más adecuado. Por otra parte, en un mercado cada vez más globalizado, los productos de la pesca, como muchos otros, han pasado de capturarse y consumirse a nivel local a ser enviados a grandes distancias. Así, tanto para satisfacer las altas demandas de estos productos como para alargar su vida útil -de tal forma que estos productos puedan ser exportados a lugares distantes de su zona de producción y/o captura- la industria pesquera está implementando estrictos sistemas de producción/comercialización y está continuamente evaluando nuevos sistemas para tratar de mantener las características propias de los productos, tanto del marisco como del pescado, su frescura y aumentar la seguridad de los mismos (Ronholm et al., 2016).

De acuerdo con el código alimentario español, se comprende en la denominación genérica de «pescados» a los animales vertebrados comestibles, marinos o de agua dulce (peces, mamíferos, cetáceos y anfibios) frescos o conservados por distintos procedimientos autorizados y en la de «mariscos» a los animales invertebrados comestibles, marinos o continentales (crustáceos y moluscos), frescos o conservados por distintos procedimientos autorizados entre los que se incluyen, por ejemplo almejas duras (*Mercenaria mercenaria*), ostras (*Crassostrea virginica*), mejillones comunes (*Mytilus edulis*), berberechos (*Cerastoderma edule*), nécoras (*Portunus paber*), cigalas (*Nephrops norvegicus*) y langostinos (*Peaneus keraturus*). Tanto unos como otros pueden ser causa de toxi-infecciones alimentarias, especialmente en la actualidad dada la fuerte demanda del consumo de este tipo de productos en crudo o poco cocinados. Sin embargo, se considera que el marisco es un vehículo de microorganismos patógenos especialmente relevante porque estos animales se alimentan filtrando el agua del mar y durante este proceso se pueden acumular y concentrar microorganismos patógenos, que se encuentren presentes en esa agua de mar, en el tracto digestivo o las glándulas de

estos animales. Adicionalmente, el hecho de que ya tradicionalmente estos productos se suelen consumir crudos o muy ligeramente cocidos, supone un riesgo adicional ya que no existe una etapa de inactivación de estos patógenos de forma previa al consumo. Así, al menos 10 patógenos bacterianos han sido implicados en enfermedades transmitidas por los mariscos, incluyendo *Vibrio spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas spp.*, *Salmonella spp.*, y *Escherichia coli O157: H7* (Feldhusen, 2000). Desde hace ya varias décadas, uno de los patógenos bacterianos que más frecuentemente se han asociado con enfermedades debidas al consumo de mariscos han sido los microorganismos del género *Vibrio*, específicamente las especies *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*. Es más, a día de hoy se considera que *Vibrio spp.* es el agente de mayor riesgo en este tipo de productos (Wang et al., 2015).

Vibrio cholerae es, sin ninguna duda, el microorganismo más relevante y conocido del género *Vibrio*. Es una bacteria Gram negativa, halófila y ubicuitaria de estuarios marinos y es el causante de la enfermedad del cólera. La principal fuente de contagio son las aguas contaminadas, donde se han vertido residuos, o aguas fecales. Estas aguas se pueden utilizar para lavar los alimentos y de ahí que puedan llegar al organismo. El cólera también puede ser transmitido por marisco o pescado debido a que ellos mismos son portadores de la bacteria y al comerlos, pueden llegar también al organismo. Normalmente el cólera resulta en una infección intestinal que causa diarreas y pueden hacer que la persona se deshidrate debido a estas diarreas tan acuosas y abundantes. Dentro de la familia *Vibrionaceae*, también se encuentran los vibrios no coléricos, que son los anteriormente nombrados *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*; y la relevancia de éstos está cada vez está más manifiesta, llegándose a considerar patógenos emergentes (Chiou et al., 2000; Vuddhakul et al., 2000; González-Escalona et al., 2005; Martínez-Urtaza et al., 2005; Cañigral, 2011). Es por ello que serán estos vibrios no coléricos los microorganismos objeto de esta revisión.

3.1. *Vibrio parahaemolyticus*

Como todas especies del grupo *Vibrionaceae* es una bacteria Gram negativa. Es halófila, con forma bacilar; tiene un único flagelo polar y es móvil cuando la bacteria es cultivada en un medio líquido. Sus condiciones óptimas de crecimiento son una temperatura de 37°C, pH entre 7,8-8,6, condiciones aeróbicas y concentraciones de

NaCl de alrededor del 3%, aunque pueden crecer con concentraciones de 0,5%. (Huang y Wong, 2012, Wang et al., 2015).

Su hábitat principal son los estuarios y ambientes marinos (ricos en nutrientes) de regiones con aguas cálidas, siendo frecuentemente aislado tanto en peces (bacalao, sardina, caballa y lenguado), como en otros animales marinos como los mariscos y crustáceos, además de a partir del agua de mar, sedimentos y plancton (Zamora y Quiroz, 2005). Además se adhiere a la quitina y cuando esto ocurre aumenta su concentración debido a que los nutrientes están más disponibles (Zamora y Quiroz, 2005). La presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en una zona determinada y, por lo tanto, en los productos capturados en esa zona, depende de la temperatura del agua. Numerosos estudios afirman que este patógeno se puede encontrar en el agua del mar cuando la temperatura supera los 15°C pero que su multiplicación y crecimiento se acelera cuando aumenta esta temperatura. En 1973 se realizó un estudio en Maryland, EE.UU., en la bahía de Chesapeake, donde se observó que la supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* aumentaba a medida que pasaban los meses de invierno y se iba acercando la primavera y con ello el aumento de la temperatura (Cañigral, 2011). En los años 2002-2004 se realizó otro estudio en Oregón donde la densidad y el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* era mucho mayor en los meses de verano donde la temperatura del agua aumentaba considerablemente (Duan y Su, 2005). Así, se considera que las principales causas del incremento de la incidencia de las toxiinfecciones producidas por estos microorganismos son los cambios en los hábitos alimenticios que han conducido al aumento del consumo de este tipo de alimentos; y además al cambio climático, que ha resultado en un incremento en la temperatura de las aguas, lo que favorece su proliferación. Los lugares donde las aguas son más cálidas, como el Caribe y las zonas asiáticas, se corresponden con los lugares donde se han producido los mayores casos de este tipo de toxiinfecciones. Sin embargo, debido al calentamiento de las aguas, los vibrios que vivían en estas aguas han llegado hasta el atlántico colonizando nuevas áreas pesqueras (Vezzulli et al., 2016).

La transmisión de *Vibrio parahaemolyticus* normalmente se produce por la ingesta de productos crudos o mal cocinados que estén contaminados. Aunque también puede propagarse por contaminación cruzada, es decir, que algún alimento haya estado en contacto con algún marisco que contenga el microorganismo durante el proceso de

manipulación de alimentos, o por el uso de agua contaminada. Sin embargo, no se transmite de persona a persona (Paris et al., 2005).

3.1.1. Epidemiología

Fujino y colaboradores, en 1951 (Wang et al., 2015), fueron los primeros investigadores en identificar a *Vibrio parahaemolyticus* como agente responsable de intoxicaciones alimentarias. Esta asociación se basó en un brote que apareció en Isaka, Japón, en donde hubo 20 fallecidos y 272 afectados por el consumo de sardinas crudas. La alta prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* en los mariscos presenta un grave problema para la salud pública (Wang et al., 2015). Así, Entre 1973 y 1998 la CDC, centro de control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica registró 40 brotes entre 1997 y 1998, entre los cuales, 4 de ellos provocaron 700 enfermos por consumo de ostras crudas en la costa del Golfo, el Pacífico Noroeste y en el Atlántico Nordeste. En los EE.UU. ha habido varios casos relacionados con *Vibrio parahaemolyticus*: En 1997-1998 hubo 209 casos en el Noroeste del pacífico (Oregón, Washington, California y la Columbia Británica de Canadá) por consumo de ostras. En los años 2004 y 2006 también se hallaron varios cuadros gastrointestinales después de comer ostras crudas en estas ciudades dejando varios enfermos. Es más, en determinadas zonas y periodos de tiempo este patógeno ha sido identificado como el responsable de toxiinfecciones alimentarias más frecuente. Así este patógeno representó el 31,1% de los 5770 brotes transmitidos por los alimentos entre 1991 y 2001 en China y el 63,8% de los brotes que ocurrieron entre 1995 y 1999 en Taiwán (Chiou et al., 2000). Por el contrario en Europa es muy poco común que *Vibrio parahaemolyticus* provoque toxiinfecciones alimentarias. No obstante, se han producido casos esporádicos en España y Francia. En España, en 1989, se registraron ocho casos de gastroenteritis provocados por *Vibrio parahaemolyticus* asociados al consumo de pescado y marisco (Molero et al., 1989). En 1999 en Galicia se produjo un brote de 64 toxi-infecciones asociadas al consumo de ostras crudas (Lozano-León et al., 2003). En Francia, en 1997, se confirmó un brote que afectó a 44 personas, debido al consumo de camarones importados de Asia (Robert-Pillot et al., 2004). Más recientemente, en A Coruña, en julio de 2004, se produjo un brote provocado por *Vibrio parahaemolyticus* que afectó a 80 personas. La infección se produjo entre los invitados de una boda debido al consumo de cangrejo cocido procesado en condiciones insalubres en un restaurante (Martínez-Urtaza et al., 2005).

Los estudios más recientes indican que la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* responsable de la mayoría de los brotes de todo el mundo desde el año 1996 es del serotipo O3:K6 y contiene el gen *tdh* (hemolisina directa termoestable) (Okuda et al., 1997; Chiou et al., 2000; Vuddhakul et al., 2000; González-Escalona et al., 2005; Martínez-Urtaza et al., 2005). En EE.UU. provocó el brote con mayor número de casos, 416, relacionado con el consumo de ostras (Cañigral, 2011). En 2004 se aisló también en Chile y en España (González-Escalona et al., 2005; Martínez-Urtaza et al., 2005; Cañigral, 2011). En los últimos 10 años las infecciones por este serotipo han ido aumentando notablemente y se ha observado que la mayoría son provocados por una mala manipulación y procesamiento de ostras y su consiguiente consumo en crudo.

3.1.2. Infección producida por *Vibrio parahaemolyticus*

El principal cuadro clínico que produce *Vibrio parahaemolyticus* es una gastroenteritis caracterizada por diarreas, vómitos y calambres abdominales (Nelapati et al., 2012). El periodo de incubación de la infección gastrointestinal es de 4-96 horas pero normalmente suele ocurrir a las 15 horas, la rapidez del desarrollo del cuadro clínico depende de la enterotoxina. Además puede producir la diarrea del viajero, infección de heridas, infección de oído y septicemia secundaria en humanos, que es causada por la entrada del microorganismo por el torrente sanguíneo.

El tratamiento para el cuadro clínico gastrointestinal es una adecuada hidratación siendo innecesario el consumo de antibióticos. La persona se recupera al cabo de las 72 horas.

3.2. *Vibrio vulnificus*

Al pertenecer a la familia *Vibrionaceae*, presenta las características microbiológicas similares a los otros vibrios. Tiene forma bacilar y no forma esporas; posee un flagelo polar. Soporta alcalinidades de hasta pH=9,0. Se distribuye naturalmente en aguas marinas o desembocaduras de ríos a través del mundo. *Vibrio vulnificus* se suele encontrar en lugares donde la salinidad no pasa de moderada ya que de lo contrario podría provocar un efecto adverso en este patógeno, si supera los 25 ppt (0,025%) (Wong y Liu, 2008). Se ha aislado del Golfo de México y de los estados que le rodean.

3.2.1 Epidemiología

El número de casos causados por *Vibrio vulnificus* es bajo en comparación con los causados por *Vibrio parahaemolyticus*, pero se han encontrado varios brotes asociados a este en los EE.UU (Klontz et al., 1988; Hlady et al., 1996; Shapiro et al., 1998;

Cañigral, 2011). La primera vez en la que se descubrió este patógeno y fue asociado con el consumo de mariscos, fue en 1970 cuando se observaron cuadros clínicos de septicemias transmitidas por los alimentos e infecciones de heridas causadas por un patógeno con características diferentes al resto de patógenos del género *Vibrio* (Hollis et al., 1976).

Este microorganismo es responsable de un porcentaje bastante alto de enfermedades en EE.UU. Además la gravedad de los cuadros clínicos que causa lo hace ser la principal causa de muerte en este país asociada con el consumo de mariscos (Morris J.G. Jr., 1988). La mayoría de vibrios proliferan en aguas cálidas, por lo que la mayor proliferación de *Vibrio vulnificus* ocurre durante los meses cálidos y es por eso que la aparición de la septicemia primaria (efectos producidos por el consumo de marisco que contenga este microorganismo) e infecciones de heridas, aparecen entre los meses de abril y septiembre que coinciden con los meses cálidos. La infección por *Vibrio vulnificus* es bastante rara aunque los porcentajes de mortalidad sean altos, actualmente solo se han registrado casos en EE.UU. con un total de 300 casos anuales (CDC, 2005). En España no se ha encontrado ningún tipo de infección hasta la fecha.

Diversos estudios han dejado claro que no todas las cepas de *Vibrio vulnificus* son virulentas, sino que lo que las diferencia entre ellas son el conjunto de factores expresados por *Vibrio vulnificus*, algunos de ellos son: el polisacárido capsular, cuya presencia y cantidad están relacionadas con la virulencia, el lipopolisacárido de membrana, que es uno de los responsables de la necrosis de tejidos y choque endotóxico, los pili, y las hemolisinas, de las que la más conocida es la hemolisina A que es responsable de la actividad citotóxica de la bacteria.

3.2.2 Infecciones producidas por *Vibrio vulnificus*

Los cuadros clínicos que produce *Vibrio vulnificus* son septicemia primaria, gastroenteritis e infección de heridas. La mayoría de los aislamientos de este patógeno proceden del primer síntoma, el cual está relacionado con el consumo de mariscos y pescados crudos contaminados por dicho patógeno. Esto va acompañado de fiebre y shock y sucede en personas con deficiencia inmunitaria (la tasa de mortalidad está entre el 60-75% en los casos de septicemia) (Klontz et al., 1998). El cuadro gastrointestinal es menos común pero a veces suele ir acompañado de vómitos, diarreas y calambres abdominales, también asociado con el consumo de pescados y mariscos crudos (CDC,

1993; CDC, 1996). Las infecciones de heridas se producen porque *Vibrio vulnificus* penetra en las heridas por dos razones: debido a que la herida abierta haya estado en contacto con agua contaminada o por contacto con aguas que tengan una alta prevalencia en *Vibrio vulnificus*. La mayoría de las personas a las que les sucede este cuadro clínico son personas que se dedican a estar en su día a día en contacto con estos productos, es decir, a pesqueros o marisqueros.

Para resumir, las características que son comunes para ambos microorganismos son las siguientes:

- Su hábitat es el hábitat marino y zonas costeras, siendo reservorios; además del agua, el plancton, las partículas de sedimentos suspendidas y los pescados y mariscos.
- Crecen a temperaturas de entre 10 y 44°C siendo la óptima de 35°C-37°C.
- Son halófilos, de ahí que crezcan en aguas del mar.
- Son Gram-
- Anaerobios facultativos, es decir, que toleran el oxígeno.
- El pH óptimo está entre 7,8-8,6.
- Los alimentos que los vinculan son los mismos, mariscos y pescados.

Pero estos también presentan ciertas diferencias entre ellos:

- *Vibrio parahaemolyticus* suele producir casos de gastroenteritis severa y *Vibrio vulnificus* está más asociado a cuadro sépticos e infección de heridas.
- *Vibrio parahaemolyticus* se encuentra normalmente en EE.UU. y Japón y *Vibrio vulnificus* en el Golfo de México; es decir, *Vibrio parahaemolyticus* se distribuye de manera global y *Vibrio vulnificus* tiene una distribución más local.
- Aunque *Vibrio parahaemolyticus* presenta una mayor incidencia, *Vibrio vulnificus* presenta una letalidad mayor.

Dada su relevancia sanitaria se han llevado a cabo numerosas investigaciones acerca de cómo poder reducirlos, inactivarlos o eliminarlos, para así limitar la probabilidad de que lleguen a los consumidores. Sin embargo, todavía no se tiene todo el conocimiento necesario acerca de cómo estos microorganismos pueden resistir a los diferentes agentes y tecnologías empleadas en la industria alimentaria, lo que limita el desarrollo de protocolos y sistemas efectivos para su inactivación y/o la prevención de su

crecimiento. Existen varios métodos para ello, cada uno con sus ventajas e inconvenientes, un ejemplo es el uso de tratamientos químicos, hipoclorito, etc. que presentan una alta actividad antimicrobiana pero al mismo tiempo, estos podrían formar residuos que fuesen potencialmente peligrosos para las personas (Wang et al., 2015). Así, dentro de los métodos físicos se emplean o se han propuesto: la depuración, los tratamientos térmicos o altas presiones, entre otros. En cuanto a métodos químicos, los más importantes son el empleo de agua electrolizada oxidante, el cloro y los ácidos orgánicos (Wong et al., 1998 y 2002; Ren y Su, 2006; Chiang et al., 2012; Wang et al., 2015).

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La relevancia de los vibrios no coléricos desde el punto de vista de la seguridad alimentaria es bien conocida y cada vez más manifiesta. De hecho, actualmente se consideran patógenos emergentes. Su hábitat principal son los estuarios y ambientes marinos de regiones con aguas cálidas, siendo frecuentemente aislados en pecados y mariscos. Así, se considera que las principales causas del incremento de la incidencia de las toxiinfecciones producidas por estos microorganismos son los cambios en los hábitos alimenticios, que ha conducido a un aumento del consumo de este tipo de alimentos y en muchas ocasiones crudos o muy ligeramente cocinados, y el cambio climático, que ha resultado en un incremento en la temperatura de las aguas, lo que favorece su proliferación y la colonización de nuevas áreas pesqueras. No obstante, y a pesar de la cantidad de información existente al respecto en relación a su ecología, poco o nada se conoce acerca de su resistencia a muchos de los agentes y tecnologías utilizados habitualmente en la industria alimentaria y menos todavía acerca de aquellos aspectos fisiológicos que determinan su sensibilidad/resistencia.

Por ello, el **objetivo** de este trabajo es recopilar y analizar la información actualizada acerca de aquellos aspectos fisiológicos de los vibrios no coléricos (*Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*) que podrían influir en la resistencia de estas especies frente a diferentes agentes (desinfectantes, acidificación/fermentación, reducción de la actividad de agua, conservantes y antimicrobianos naturales) y tecnologías (térmicas y no térmicas) utilizadas en la conservación de los alimentos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se describe como se llevó a cabo la búsqueda bibliográfica necesaria para alcanzar los objetivos fijados. El primer paso de esta búsqueda bibliográfica fue la definición de los términos de búsqueda, que fueron, frase/s resumen y palabras clave. Éstas se fijaron tanto en castellano como en inglés para determinar si el segundo proporcionaba más y mejores resultados, o no. Para evaluar este punto se empleó la herramienta de Google Scholar, donde se utilizaron diferentes frases resumen sobre el tema y palabras clave y se anotó cuantos resultados se obtenían. Como se muestra en la tabla 1 y figura 1 la búsqueda en inglés proporcionó mucho más resultados, resultando evidente que era en este idioma en el que había que trabajar.

Tabla1: Comparación de los resultados obtenidos con diferentes frases resumen tanto en español como en inglés utilizando Google Scholar como herramienta de búsqueda.

GOOGLE SCHOLAR			
Frase resumen	Supervivencia de <i>Vibrio vulnificus</i> frente a tecnologías de conservación de alimentos (1)	Supervivencia de vibrios no coléricos al procesado de alimentos (3)	Resistencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> a las tecnologías de conservación de los alimentos (5)
Conceptos clave	Supervivencia; <i>Vibrio vulnificus</i> ; tecnología de conservación	Supervivencia; vibrios no coléricos; Procesado	Resistencia; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ; <i>Vibrio vulnificus</i> ; tecnología de conservación
Resultados	476	122	996
Frase resumen	Inactivación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2)	Epidemiología de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (4)	
Conceptos clave	Inactivación; <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Epidemiología; <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
Resultados	313	2580	
Summary	Survival of <i>Vibrio vulnificus</i> to food preservation technologies (1)	Survival of non-cholera vibrio to food preservation processes (3)	Resistance of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> and <i>vulnificus</i> to food preservation technologies (5)
Key concepts	Survival; <i>Vibrio vulnificus</i> ; preservation technologies	Survival; non cholera; food preservation	Resistance; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ; <i>Vulnificus</i> ; Food technolgy
Results	2110	201	1750
Summary	Inactivation of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2)	Epidemiology of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (4)	
Key concepts	Inactivation; <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Epidemiology; <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
Results	24400	25500	

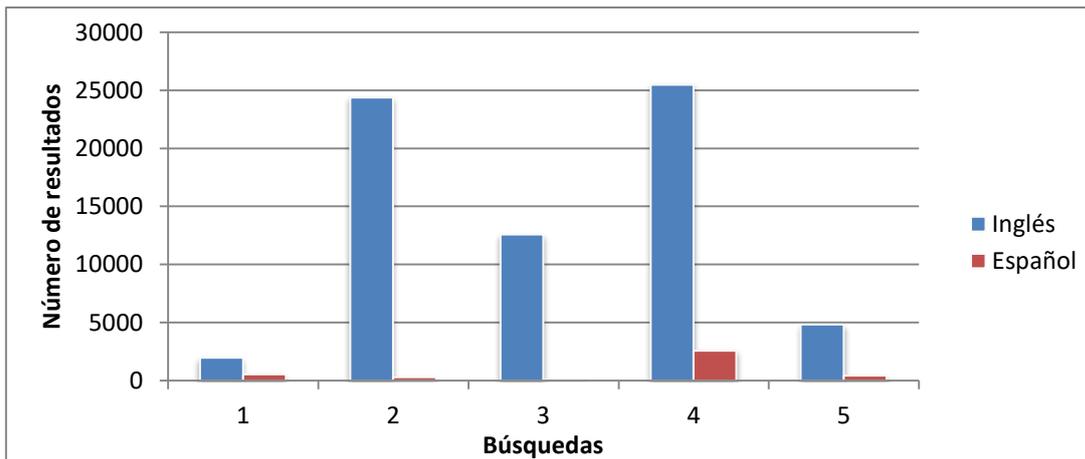


Figura 1. Gráfico que ilustra la influencia del idioma de búsqueda en el número de resultados obtenidos en Google Scholar para las diferentes “frases resumen” indicadas en la tabla 1.

El siguiente paso consistió en la selección de las fuentes bibliográficas a consultar. Siguiendo el criterio de los directores del Trabajo de Fin de Grado, se eligieron en primer lugar las fuentes secundarias que fueron las siguientes:

- Science Direct
- Web of Science
- Pubmed
- Library of University of Reading
- Alcorze

Para llevar a cabo las búsquedas en estas bases de datos se utilizó en todos casos la herramienta de búsqueda avanzada, que permite precisar y depurar las búsquedas mejor que las herramientas de búsqueda simple o estándar. Como se describirá más adelante se utilizaron diferentes combinaciones de términos (cada vez más complejas) y también diferentes operadores booleanos: AND (que estén presentes todos ellos → todas las palabras); OR (que esté presente alguno de ellos → alguna palabra) y NOT (que no esté ninguno → sin las palabras). Finalmente, las búsquedas se limitaron en fecha (años 1997-2017) y en idioma (inglés).

Una vez ejecutada la búsqueda se examinaron las referencias encontradas, es decir, se procedió al análisis y evaluación de los resultados obtenidos, para determinar si la incorporación de nuevos términos y/o operadores booleanos conseguía el efecto esperado: ir reduciendo el número de resultados (artículos potencialmente interesantes) descartando aquellos alejados del tema de estudio pero sin excluir publicaciones

potencialmente relevantes. En la siguiente tabla se puede observar, a modo de ejemplo, cómo se va depurando la búsqueda de artículos, en el caso de la fuente Web of Science.

Tabla 2: Resultados obtenidos (número de artículos) tras la búsqueda en Web of Science con diferentes combinaciones de palabras y operadores.

WEB OF SCIENCE	
Palabras	Resultados
Vibrio	24048
<i>Vibrio</i> AND <i>parahaemolyticus</i> OR <i>vulnificus</i>	5152
<i>Vibrio</i> AND <i>parahaemolyticus</i> OR <i>vulnificus</i> AND food	3526
<i>Vibrio</i> AND <i>parahaemolyticus</i> OR <i>vulnificus</i> AND food AND resistance	4309
<i>Vibrio</i> AND <i>parahaemolyticus</i> OR <i>vulnificus</i> AND food AND inactivation	4307
<i>Vibrio</i> AND <i>parahaemolyticus</i> AND food AND resistance	66
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AND food AND resistance NOT detection	59
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AND food AND inactivation	46
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AND food AND inactivation NOT detection	42
<i>Vibrio vulnificus</i> AND food AND resistance	34
<i>Vibrio vulnificus</i> AND food AND resistance NOT detection	31
<i>Vibrio vulnificus</i> AND food AND inactivation	18
<i>Vibrio vulnificus</i> AND food AND inactivation NOT detection	17

Como puede observarse en la tabla, el número de artículos obtenidos al introducir el término *vibrio* superó los 24.000 por lo que era evidente que era necesaria una depuración de la búsqueda. Primero se añadieron los operadores booleanos AND y OR para que la fuente seleccionara los artículos de *Vibrio parahaemolyticus* (todos ellos) y/o *Vibrio vulnificus*. Como se puede observar, al introducir este cambio el número de resultados obtenidos se redujo en un 80% aproximadamente. Al ir añadiendo términos específicos como “food”, ”inactivation” y ”detection” y a su vez introduciendo los

operadores booleanos se obtuvo un mejor refinamiento y depuración de los artículos hasta reducir su número hasta niveles razonablemente abordables, alrededor de 100 al sumar los obtenidos para *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*.

La búsqueda y depuración de resultados en las otras 4 fuentes secundarias seleccionadas resultó mucho más compleja y dio resultados no satisfactorios. Así, a pesar del empleo de diferentes combinaciones y operadores booleanos no se consiguió bajar de los 2.000 resultados en Science Direct y la temática de los resultados obtenidos en Alcorze no se ajustaba a los objetivos del presente trabajo. En el caso de Pubmed y la biblioteca de la Universidad de Reading, muchos de los resultados se centraron en temas de antibióticos, aunque en este caso sí que se pudo depurar la búsqueda por lo que, finalmente, y para la siguiente fase, se seleccionaron artículos a partir de las búsquedas en Web of Science, Pubmed y en la biblioteca de la Universidad de Reading.

Una vez realizada la búsqueda en las fuentes secundarias, se realizó una segunda búsqueda en las siguientes fuentes primarias, seleccionadas por los directores del TFG, principalmente en base a criterios de impacto científico:

- Foodborne Pathogens and Disease
- International Journal of Food Microbiology
- Applied and Environmental Microbiology
- Journal of Food Protection

Esta búsqueda se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito para las fuentes secundarias (adaptando el uso de términos y operadores booleanos a las características de cada buscador).

En total, tras este proceso de cribado se seleccionaron 454 artículos (tabla 3). Dado su elevado número se procedió a identificar aquellos que aparecieron repetidos en las diferentes búsquedas y se realizó una primera selección en base al título del mismo. Adicionalmente se tuvo en cuenta la accesibilidad a los documentos aunque esto finalmente no resultó un problema. Tras este proceso quedaron 125 artículos, un número todavía demasiado elevado para los fines de este Trabajo Fin de Grado. Así, finalmente y tras la lectura de los resúmenes de los mismos, y en base a los criterios de los directores del Trabajo Fin de Grado, se seleccionaron 37 artículos para su lectura crítica y redacción del trabajo. A ellos, se añadieron una serie de referencias

seleccionadas directamente por los directores de este Trabajo Fin de Grado y empleadas, principalmente, para elaborar la introducción; y algunas más obtenidas tras la lectura de los artículos seleccionados tras esta búsqueda a partir de las referencias presentes en dichos artículos.

Tabla 3: Número de artículos obtenidos utilizando las combinaciones de términos y operadores booleanos en cada una de las fuentes consultadas.

Fuentes secundarias	Keywords	Resultados	Suma
Web of science	<i>Vibrio vulnificus</i> AND food AND inactivation NOT detection	17	59
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AND food AND inactivation NOT detection	42	
Pubmed	<i>Vibrio</i> AND <i>parahaemolyticus</i> OR <i>vulnificus</i> AND inactivation NOT detection	84	84
Universidad de Reading	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> AND food AND resistance NOT detection NOT anti*	153	153
Fuentes primarias	Keywords	Resultados	Suma
Applied and Environmental microbiology	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Food inactivation	45	68
	<i>Vibrio vulnificus</i> food inactivation no detection	23	
Journal of Food Protection	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> inactivation	5	8
	<i>Vibrio vulnificus</i> inactivation	3	
International Journal of Food Microbiology	<i>Vibrio</i> AND <i>parahaemolyticus</i> AND food AND inactivation NO detection	33	48
	<i>Vibrio</i> AND <i>vulnificus</i> AND food AND inactivation NO detection	15	
Foodborne Pathogens and Disease	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	28	34
	<i>Vibrio vulnificus</i>	6	
Total			454

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha indicado anteriormente, el objetivo de este trabajo es revisar el conocimiento existente a día de hoy acerca de los factores fisiológicos que determinan la resistencia de los vibrios no coléricos frente a diferentes estreses ambientales y tecnologías de conservación de los alimentos. No obstante, y antes de profundizar en estos aspectos fisiológicos, parece oportuno definir a qué estreses, que puedan tener relevancia desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, se puede enfrentar *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*; y de qué tecnologías dispone la industria alimentaria para inactivar y/o controlar estos microorganismos.

Como ya se ha descrito en la introducción, estas dos especies del género vibrio son Gram negativas, halófilas, es decir, que toleran elevadas concentraciones de sal, relativamente termotolerantes y capaces de crecer a pH moderadamente básico. Debido a su hábitat y los productos que contaminan, los estreses ambientales más típicos a los que se puede enfrentar el microorganismo son: a los cambios de temperatura, a la salinidad (estrés osmótico), al pH extremo y a la limitación de nutrientes, que son los que se considerarán en este trabajo.

Por otra parte, la tecnología de los alimentos dispone de diferentes estrategias para la conservación de los alimentos y, más en concreto, del marisco y del pescado. Las más frecuentemente utilizadas son aquellas cuya base es la limitación o enlentecimiento del crecimiento microbiano. Entre ellas se encuentran la refrigeración, la congelación o el envasado en atmósferas modificadas. No obstante, estas tecnologías no son capaces de inactivar los microorganismos con las posibles consecuencias que esto supone. Por ello, la tecnología de los alimentos ha desarrollado (y sigue haciéndolo) métodos que sean capaces de inactivar los microorganismos, que serán a los que se preste especial atención en este trabajo.

El calor es una tecnología que se usa desde hace mucho tiempo para la descontaminación de los alimentos aunque su aplicación para el marisco y el pescado está muy limitada por el efecto que ejerce sobre sus características organolépticas (Belletti, N., 2017). A pesar de su amplia implementación en la industria, su mecanismo de acción todavía no es bien conocido aunque sí que se sabe que son múltiples factores los que afectan a su eficacia (Cebrián, 2009).

Entre las alternativas que se han propuesto al calor para la inactivación de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en pescado y marisco, se encuentra la irradiación, una tecnología de intervención física que emplea las radiaciones ionizantes. Éstas causan, principalmente, daños en el ADN de los microorganismos que son los que conducen a su muerte (Wang et al., 2015). Esta tecnología tiene una ventaja que es que provoca pocos cambios en las propiedades sensoriales de estos productos (Wang et al., 2015).

Otra alternativa son las altas presiones hidrostáticas, técnica que consiste en someter al alimento a altos niveles de presión hidrostática (entre 100 y 1000 MPa, generalmente). Los efectos que produce en los microorganismos son la alteración de la membrana y pared celulares (con la consiguiente liberación del contenido citoplasmático) y desnaturalización proteica, entre otros fenómenos, que a su vez pueden conducir, finalmente, a la degradación del ADN bacteriano (Wang et al., 2015).

Finalmente, otras alternativas podrían ser los métodos químicos tales como el agua electrolizada oxidante que también se ha investigado como método de descontaminación de pescados y mariscos. Esta tecnología se basa en el principio de la electrólisis de una solución salina de agua de tal forma que un flujo de corriente eléctrica pasa por dos electrodos que se encuentran en compartimentos separados por una membrana que regula el paso de iones. Al final del proceso se obtiene agua con baja concentración de electrones en el ánodo y agua con alta concentración de electrones en el cátodo. La primera tiene elevada capacidad oxidante y, por lo tanto, antimicrobiana (Fernández et al., 2011). Además, también son frecuentemente utilizados en la industria alimentaria los desinfectantes químicos tales como los derivados clorados y los amonios cuaternarios. Los primeros actúan principalmente alterando los ácidos nucleicos e interfiriendo con la oxidación de la glucosa, mientras que se ha demostrado que los amonios cuaternarios interactúan con la membrana citoplasmática, causando daños a la misma y favoreciendo la salida de compuestos intracelulares (Lin et al., 2013).

6.1. Factores fisiológicos que determinan la resistencia de vibrio a los diferentes estreses medioambientales y tecnologías de conservación.

De forma general, los factores que determinan la resistencia microbiana a los diferentes estreses y agentes se pueden clasificar en 3 grupos: factores que actúan antes del tratamiento, durante el tratamiento y después del tratamiento. Como el estado

fisiológico de las células de vibrio cuando son sometidas a los diferentes estreses y/o tecnologías depende esencialmente de los factores que afectan antes del tratamiento, estos serán los que se van a considerar en este trabajo. De entre todos los factores que actúan antes del tratamiento los más relevantes son los siguientes: fase de crecimiento, temperatura de crecimiento, medio de crecimiento y/o condiciones de crecimiento y, finalmente, exposición y/o adaptación a estreses a nivel subletal (Cebrián, 2009).

6.2.1 Influencia de la fase de crecimiento

Según los hallazgos y las investigaciones de Chiang et al. (2012), quedó demostrado que la fase de crecimiento determina la tolerancia ácida de *Vibrio parahaemolyticus*. En el estudio de dichos autores quedó demostrado que las células en fase estacionaria eran más resistentes al pH ácido que las células en fase exponencial, al comparar su supervivencia tras 4 horas a pH 4,5. Esto se atribuye a que las células en fase estacionaria poseen una mayor actividad RpoS (RNA polimerasa, sigma S) que es una subunidad de la RNA-polimerasa que controla la expresión de genes involucrados en la resistencia a diferentes estreses, entre ellos algunos de los reguladores de la respuesta de tolerancia al medio ácido (ATR) (Chiang et al., 2012). Adicionalmente, merece la pena señalar que, como se verá más adelante, la fase de crecimiento no sólo determina la resistencia al medio ácido sino también la capacidad de adaptación al mismo.

También se ha demostrado que la fase de crecimiento determina la resistencia de *Vibrio parahaemolyticus* al estrés osmótico. Así, según el estudio de Huang y Wong (2012), más de cinco ciclos logarítmicos resultaban inactivados tras 10 minutos de un tratamiento de baja salinidad del 0,25% de NaCl cuando las células estaban en fase exponencial mientras que si estaban en fase estacionaria eran más resistentes. De forma similar a lo descrito para el medio ácido los resultados de estos autores sugieren que la capacidad de desarrollar respuestas de resistencia tras la exposición a medios con baja salinidad también depende de la fase de crecimiento en que se encuentren las células.

En cuanto a la temperatura, al someter a *Vibrio parahaemolyticus* a temperaturas superiores a las óptimas de su crecimiento, 47°C, se pudo observar que las células en fase exponencial media tuvieron una menor resistencia que las de fase exponencial tardía y las de fase estacionaria, coincidiendo así con estudios que se realizaron con *Listeria monocytogenes* donde se observó esta misma tendencia (Chiang y Chou, 2009). Estos autores sugirieron que los cambios en las envolturas que ocurren durante la

división celular que se lleva a cabo durante la fase exponencial podrían hacer que estos microorganismos fueran más sensibles a determinados estreses, como el calor, en dicha fase que en la fase estacionaria.

Por otra parte, otro aspecto en el que influye la fase de crecimiento es en la inducción del estado viable pero no cultivable (VBNC), un estado fisiológico caracterizado por la actividad metabólica muy baja o nula, que se analizará en profundidad en el siguiente epígrafe. De acuerdo a Wong y Wang (2004), las células en fase exponencial de *Vibrio parahaemolyticus* entraron antes en este estado que las células en fase estacionaria. De forma similar, para que *Vibrio vulnificus* entrase en este estado cuando las células estaban en fase estacionaria, se necesitó el doble de tiempo que para las células en fase exponencial (Wong y Wang, 2004). Una explicación podría ser que las proteínas del estrés que aparecen en la fase estacionaria, ralentizarían el cambio a este paso y protegerían la célula de inducir el estado VBNC (Wong y Wang, 2004).

6.2.2 Influencia de la temperatura de crecimiento

El estudio realizado por Beuchat y Worthington (1976), demostró la influencia de la temperatura de crecimiento en la termo-resistencia de *Vibrio parahaemolyticus*. Así, el valor D₄₇ (tiempo en minutos que se necesita para reducir la población viable en un 90%) fue de 0,8 minutos cuando las células habían sido crecidas a 21°C con 0,5% de NaCl mientras que fue de 6,5 minutos cuando se cultivaron a 37°C con 7,5% de NaCl. Es decir, que al aumentar la temperatura de crecimiento, el microorganismo se mostró más resistente al calor.

Además de determinar directamente la resistencia al estrés, la temperatura de crecimiento también condiciona otros fenómenos de gran relevancia desde el punto de vista de la seguridad alimentaria. Así, cuando la temperatura de crecimiento está por debajo de 15°C, se induce el estado VBNC.

Por otra parte, los resultados del estudio de Han et al. (2016) demostraron que la capacidad de formación de biofilms aumentó conforme la temperatura se iba aumentando, aunque también observaron no solo que la temperatura influía en este acontecimiento, sino que la superficie (placas microtiter, acero inoxidable, camarón o cangrejo) también lo hacía en gran medida en dicha tendencia, siendo más evidente en unos casos que en otros.

6.2.3 Influencia del medio de crecimiento y / o condiciones de crecimiento

El estudio de Beuchat y Worthington (1976), evidenció que la concentración de NaCl influyó en la resistencia al calor de *Vibrio parahaemolyticus* actuando de forma coordinada con la temperatura, es decir, que a baja temperatura, 21°C, con una baja concentración de NaCl, 0,5%, la resistencia de *Vibrio parahaemolyticus* es baja, en cambio, conforme aumentó la temperatura y la concentración de NaCl, 29 y 37°C, y 7,5 % de NaCl, la resistencia también aumentó (Beuchat y Worthington, 1976). Por lo tanto, la presencia de NaCl incrementaría la termo-resistencia de *Vibrio parahaemolyticus*. De la misma forma en el estudio de Covert y Woodburn (1972), se observó que el almacenamiento de *Vibrio parahaemolyticus* a temperaturas de 5, -5 y -18°C, entre 16-31 días, redujo casi al completo las poblaciones de *Vibrio parahaemolyticus* independientemente de la concentración de NaCl; en cambio, a temperaturas de -18°C la cantidad de 6% NaCl aumentó la resistencia y con ello, hubo más número de células viables a esta temperatura de almacenamiento que a 5 y a -5°C; ocurriendo lo mismo a 48°C, temperatura a la cual la concentración de NaCl añadida aumentó la resistencia de este nuestro microorganismo a esta temperatura.

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Lasa, 2004), lo que, de forma general, resulta en una mayor resistencia al estrés y a agentes antimicrobianos. Recientemente, un estudio de Park et al. (2015), demostró que CabA, una proteína extracelular esencial para la formación de biofilms en *Vibrio vulnificus*, es necesario para la resistencia de los biofilms que forma dicho microorganismo a diferentes estrategias de descontaminación tales como a la desinfección por NaOCl y a la vibración (descontaminación física). En este mismo estudio se demostró que CabA contribuye a la integridad estructural de los biofilms de *Vibrio vulnificus* presumiblemente formando filamentos en la matriz lo que contribuiría a que las células de los biofilms sobrevivan a las diferentes estrategias de descontaminación.

De forma similar los estudios de Han et al. (2016), demuestran que existe una enzima exoproteasa que mejora la formación y fijación de biofilms de *Vibrio parahaemolyticus*, y que potencialmente aumentaría la resistencia al estrés de las células de este microorganismo. Además, tanto esta exoproteasa como el sistema autoinductor 2 aumentan su expresión con el aumento de las temperaturas entre 15-30°C, pero a 37°C

se inhibe su expresión. Así, de acuerdo a este último autor las superficies de contacto con alimentos serían la causa principal de formación de biofilms a temperaturas altas (25-30°C).

Por otra parte, y como ya se ha citado anteriormente en el caso de las temperaturas por debajo de 15°C, una respuesta común que tienen determinadas bacterias ante condiciones adversas es inducir un estado reversible en el que las células tienen una actividad metabólica baja, lo que hace que no puedan crecer en medios de cultivo, pero del que son capaces de revertir, es decir, volver a un estado activo y viable cuando las condiciones mejoran. Este estado de latencia se conoce como estado “Viable pero no cultivable” (VBNC). Las células bacterianas pueden inducir este estado en respuesta a diferentes estreses, como a los que se puede enfrentar *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, como pueden ser cambios en la temperatura, baja salinidad y privación de nutrientes (Nowakowska y Oliver, 2013). Este fenómeno es especialmente relevante ya que los microorganismos que están en este estado suelen tener una mayor resistencia al estrés.

Así, de acuerdo a Nowakowska y Oliver (2013), las células VBNC presentaron una mayor resistencia al calor que las de la fase logarítmica de crecimiento, las células control, las que no estaban en estado VBNC. Estos resultados coinciden con los de Wong y Wang (2004), sobre la resistencia de las células en estado VBNC a las altas temperaturas. Una de las soluciones que se ha propuesto para conseguir reducir el nivel de contaminación de las ostras a un nivel no detectable, es pasterización a baja temperatura, 50°C/10min, ya que esta temperatura reduce drásticamente el número de células de estos microorganismos en las ostras; pero si las células se encuentran en estado VBNC este tratamiento no sería suficiente porque estas resistirían a este tratamiento, de ahí a que este fenómeno tenga una gran relevancia.

En cuanto al estrés con pH ácido, el estudio de Nowakowska y Oliver (2013), destacó que las células en estado VBNC eran más resistentes que las células normales y además se observó que la resistencia al pH ácido dependía del tipo de cepa, ya que en los resultados se observaron resultados distintos para las dos cepas estudiadas de *Vibrio vulnificus*, pero ambas dieron resultados altos de resistencia al pH bajo. Esto coincide con el estudio de Wong y Wang (2004), que dijeron que las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* en estado VBNC eran las más resistentes al pH ácido de 4,0

comparadas con las células en estado normal; aun estableciendo que el pH idóneo para inducir el VBNC es el pH entre 7,0-8,0.

Además de estos estreses, que son los que se tratan en este estudio, en el estudio de Nowakowska y Oliver 2013, se sometieron a las células de *Vibrio vulnificus* a otros estreses, etanol, daño oxidativo, antibióticos y metales pesados, observándose en todos los casos una mayor resistencia de las células VBNC, aunque en algunos casos se observaron diferencias también entre cepas, de igual o mayor magnitud que las diferencias entre células cultivables y VNBC. En el caso particular del estrés oxidativo la mayor resistencia de las células VNBC parece que estaría relacionada con una mayor expresión del gen *oxyR*, que controla diferentes mecanismos de resistencia frente a este tipo de estreses.

6.2.4 *Influencia de la adaptación a estreses previos y subletales*

El último factor fisiológico que se va a tratar en este estudio es la influencia de la adaptación previa de los microorganismos a estreses ambientales en la posterior resistencia tanto a estreses ambientales como frente a diferentes tecnologías de inactivación microbiana.

6.1.4.1. *Influencia en la resistencia a los estreses ambientales*

Como describen Chiang et al. (2012) el desarrollo de respuestas de adaptación al medio ácido depende tanto del tiempo de adaptación como del pH que se estudie. Así, al comparar la resistencia a pH 4,5 de células adaptadas durante 30, 60 y 90 minutos a pH 5,0, con células sin adaptar, no se observaron diferencias; en cambio si se adaptaban a pH 5,5 y 6,0, sí que las hubo, ya que las células que habían sido adaptadas mostraron una mayor resistencia al tratamiento con pH ácido. Esto contrasta los resultados de Wong et al. (1998) ya que estos autores observaron que la mayor resistencia se alcanzaba tras la adaptación a un pH de 5,0. Estas diferencias podrían ser debidas a que cada cepa de *Vibrio parahaemolyticus* se comportara de diferente manera frente al pH. Además las células adaptadas durante 90 minutos fueron las que desarrollaron la mayor resistencia frente al medio ácido. Entre los mecanismos propuestos para explicar esta adaptación al medio ácido se encuentra que las células adaptadas al ácido mantendrían el pH intracelular a un nivel más alto y que además sintetizarían unas proteínas de respuesta al choque ácido, como chaperonas y descarboxilasas, que ayudarían a la supervivencia del microorganismo ante este estrés.

Por otro lado, la adaptación ácida hizo que las células de *Vibrio parahaemolyticus* presentaran también una mayor resistencia frente a la baja salinidad y a la inactivación térmica (Wong et al., 1998), lo que podría explicarse por la síntesis de proteínas relacionadas con la reparación del daño, como las chaperonas.

En relación a la adaptación tras los denominados choques térmicos Wong et al. (2002) observaron que las células sometidas a un choque térmico a 42 °C/30 minutos mostraron una mayor resistencia a 47 °C que las células no chocadas. Tras la incubación a estas temperaturas se indujeron varias proteínas, entre ellas sólo se encontraron en grandes cantidades 3 proteínas con peso molecular de 47,6, 62,3 y 65,6 kDa. Chiang y Chou (2009), obtuvieron resultados similares observando que las células adaptadas al calor tuvieron mayor resistencia a 47 °C que las no adaptadas, en la fase estacionaria. Las células adaptadas al calor y sometidas a estrés con 8% de etanol, tuvieron también una mayor resistencia al calor en la fase estacionaria; en cambio las células sometidas a estrés posterior de pH 4,4 y 20 % de NaCl, obtuvieron los resultados más altos en las células no adaptadas al calor previamente. Este mismo tipo de respuesta al choque térmico se estudió con *Vibrio cholerae* y los resultados del patrón de expresión proteica fueron diferentes lo que, de nuevo, podría ser debido a que cada especie y/o cepa se comporta de forma diferente. No obstante no se puede descartar que la metodología de análisis (que fue diferente entre los diferentes estudios) pudiera contribuir también a explicar estas diferencias (Wong et al., 2002).

La mayor resistencia de estos microorganismos frente al calor tras el choque térmico se ha atribuido a la sobreexpresión de proteínas como GroEL (62 kDa), DnaJ (47 kDa) y GroES (12 kDa) (Wong et al., 2002) que pertenecen a dos de las familias más importantes de proteínas del choque térmico que incluyen chaperonas y proteasas: la familia hsp70 (que incluye DnaK, DnaJ, GrpE) y la familia hsp60 (que incluye a GroEL y GroES). Por otro lado, el choque térmico a 42°C también aumenta la producción de *tdh* que es el principal factor de virulencia en *Vibrio parahaemolyticus*, pero a 37°C y a 25°C no (Wong et al., 2002).

De acuerdo a los resultados de Lin et al. (2004) exponer a las células de *Vibrio parahaemolyticus* a una temperatura de 15 y 20°C durante 2 y 4 horas en caldo PBS con 3% de NaCl incrementó la supervivencia de dichas células tanto a posteriores tratamientos a 5 como a -18°C, de forma similar a lo descrito para *E. coli* y *Listeria*

monocytogenes (Lin et al., 2004). Además de estudiar el efecto que tuvo el choque en frío frente a temperaturas bajas de inactivación, en este estudio también se comparó con la tolerancia al calor, al H₂O₂ y al ácido. A diferencia de la adaptación ácida, que aumenta la tolerancia a la inactivación térmica (Wong et al., 1998), la adaptación al frío no aumenta la supervivencia frente a temperaturas de 47 °C, ni frente al H₂O₂ o los ácidos orgánicos, de tal forma que las células control mostraron una mayor resistencia. Estos resultados se han atribuido al efecto que produce el choque frío en las células ya que este induce cambios en la composición lipídica y afecta a la fluidez y permeabilidad de la membrana, lo que podría sensibilizar a la célula frente a otros estreses (Tabla 4).

Tabla 4: Cuadro resumen acerca de la influencia de la adaptación previa al calor (42 °C) y al frío (15-20 °C) en la resistencia de *Vibrio parahaemolyticus* frente a diferentes estreses.

	Sometidas a tratamientos posteriores de:			
	8% etanol	pH 4,4	20%NaCl	Inactivación térmica 47°C
Células adaptadas al calor previamente (42°C)	Incrementa resistencia*	Sin cambio	Sin cambio	Incrementa resistencia*

* Para células en fase estacionaria

	Sometidas a tratamientos posteriores de:			
	5 y -18°C	Inactivación térmica 47°C	H ₂ O ₂	Ácidos orgánicos
Células adaptadas a temperaturas frías (15-20°C)	Incrementa resistencia	Disminuye resistencia	Disminuye resistencia	Disminuye resistencia

Someter a las células de *Vibrio parahaemolyticus* a un choque con etanol al 5% también provoca cambios en la composición y permeabilidad de la membrana. Así, el choque con etanol aumenta la proporción de ácido cis-vacénico (insaturado) frente a palmítico (saturado), de forma similar a lo que ocurre con *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Chiang et al., 2008). Este choque con etanol disminuye la supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* al ácido, de forma similar a lo descrito para el choque frío; pero, a diferencia del choque frío, resulta protector frente al H₂O₂. Se desconoce qué mecanismo es el responsable de este efecto protector aunque sí se sabe que no sería a través de un aumento en la expresión de la catalasa ni de la superóxidodismutasa (proteínas implicadas en la degradación de compuestos oxidantes).

Estos resultados coinciden con los resultados de Chiang y Chou (2009), que también observaron que el choque previo con etanol, disminuye la supervivencia al pH ácido. Estos autores también observaron que el choque con etanol resultaba en una sensibilización al medio hiperosmótico (20% de NaCl), pero en un incremento en la resistencia frente al calor lo que se ha sugerido que podría estar relacionado con la inducción de proteínas del choque térmico (Tabla 5).

Tabla 5. Cuadro resumen acerca de la influencia de la adaptación previa al etanol en la resistencia de *Vibrio parahaemolyticus* frente a diferentes estreses.

	Sometidas a tratamientos posteriores de:			
	Ácidos	H ₂ O ₂	20% NaCl	Inactivación térmica 47°C
Células adaptadas a etanol a 5%	Disminuye resistencia	Incrementa resistencia	Disminuye resistencia	Incrementa resistencia

6.1.4.2. Influencia en la resistencia frente a tecnologías de conservación de los alimentos

Como se ha comentado en la introducción el calor sigue siendo la principal herramienta de la tecnología de los alimentos para la inactivación microbiana. No obstante, dado que el efecto de la adaptación al choque térmico ya se ha descrito, la primera de las tecnologías que se va a tratar en este epígrafe son las altas presiones hidrostáticas (HHP). En el trabajo de Ye et al. (2013), se estudió cómo afectaba la temperatura de almacenamiento antes del tratamiento a la supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* frente a las HHP. Así, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en resistencia a las HHP entre el almacenamiento en frío (-18, 4 y 10 °C) y el almacenamiento a 21 y 35°C. Dado que el almacenamiento previo en refrigeración no afectó a la sensibilidad de los vibrios y que *Vibrio parahaemolyticus* se mostró más baro-resistente, los autores decidieron estudiar como afectaba el frío en el post procesamiento de esta segunda especie. De los resultados se desprende que el almacenamiento en frío post-procesamiento resultó en una progresiva inactivación de los supervivientes frente a los tratamientos de HHP. Este efecto se ha atribuido bien a que ambos agentes (frío y HHP) afecten a las mismas dianas o a que las bajas temperaturas serían capaces de inhibir la recuperación de las células lesionadas llevándolas a la muerte. Estos resultados sugieren que las HHP con el posterior

almacenamiento de hielo podrían ser aplicadas en la industria pesquera como un tratamiento post cosecha para inactivar *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en las ostras crudas y podría mejorar la seguridad microbiana de las ostras congeladas.

Otro de los tratamientos que se ha propuesto para la inactivación de los vibrios no coléricos del marisco es el agua electrolizada oxidante. Normalmente en la industria para depurar las ostras se utiliza agua del mar limpia, pero se observó que para algunas bacterias, no tenía la eficacia suficiente, como es en el caso de *Vibrio spp*, por la colonización de dicha bacteria en el tracto intestinal (Kelly y Dinuzzo, 1985). De ahí que se probara la utilización de esta agua electrolizada para comprobar su actividad antimicrobiana. Un aspecto muy importante en relación a esta tecnología es que debe aplicarse en agua con NaCl pero sin embargo, el NaCl resulta protector para los vibrios frente a esta tecnología, probablemente por tratarse de microorganismos relativamente halófilos (Ren y Su., 2006). En dicho estudio, quedo claramente demostrado que *Vibrio parahaemolyticus* era más resistente a esta tecnología que *Vibrio vulnificus*. Con niveles de 1,5-2% de NaCl *Vibrio parahaemolyticus* tuvo cierta resistencia al agua electrolizada pero *Vibrio vulnificus* no, con lo que para que tuviera más efectividad, las características que tiene que tener son 30 ppm de cloro y $\leq 1\%$ de sal, ya que al tener un porcentaje bajo de sal, estos no pueden crecer de manera cómoda debido a que no son sus condiciones óptimas de crecimiento. El tiempo necesario serían de entre 4 a 6 horas ya que si aumentamos más el tiempo de tratamiento podríamos conseguir que las ostras muriesen; este efecto se conseguiría también si los ppm de cloro se aumentasen.

Por último, en la industria alimentaria se utilizan para desinfectar las superficies desinfectantes químicos tales como los que contienen amonio cuaternario, el cloro y dióxido de cloro. En el estudio de Lin et al. (2013) quedó demostrado que la exposición frente al choque ácido, frío o térmico aumenta la supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* frente al amonio cuaternario a 25°C. De forma similar, los choques previos también incrementaron las resistencia de este microorganismo frente al Clidox-S, un desinfectante que contiene cloro (Lin et al., 2013). No se sabe a ciencia cierta cuál es el mecanismo protector en ninguno de los dos casos, aunque la síntesis de proteínas de choque térmico (hsp) que aumentan la capacidad de recuperación celular podría ser una de ellas (Lin et al., 2013).

En resumen, los resultados obtenidos por diferentes investigadores indican que la fase de crecimiento ejerce una notable influencia en la resistencia de estos microorganismos frente a estreses de diferente naturaleza. A pesar de que no se ha encontrado información acerca de la influencia de este factor en la resistencia frente a otras tecnologías consideradas en este trabajo es previsible que el efecto sea similar al descrito a la vista de los resultados obtenidos para otras especies (Cebrián, 2009). Las causas de la mayor resistencia de las células cuando se encuentran en fase estacionaria podría ser variada, aunque muchos autores coinciden en señalar dos factores como los que probablemente sean los más relevantes: la mayor actividad RpoS de las células en fase estacionaria (Chiang et al., 2012) y al hecho de que las células en fase exponencial previsiblemente posean unas envolturas más frágiles.

La temperatura de crecimiento (que para estos microorganismos se encuentra entre 15 y 40-42°C, aproximadamente) también ejercería un importante papel no sólo en el desarrollo de resistencia de estos microorganismos sino también en otros aspectos de su fisiología. Así, en el estudio de Beuchat y Worthington (1976), quedó demostrado que cuanto más alta es la temperatura a la que crecen los microorganismos estos son más resistentes. Por otra parte, temperaturas por encima de los 42°C se consideran subletales y potencialmente podrían dar lugar a la activación de la respuesta al choque térmico, mientras que se ha observado que a temperaturas por debajo de 15°C se induce el estado VBNC el cual queda demostrado que puede incrementar la resistencia al estrés. Además, también se ha demostrado que cuanto mayor es la temperatura de crecimiento mayor es la capacidad de formación de los biofilms en las superficies tanto de los equipos e instalaciones como de los mariscos.

En relación a las respuestas de resistencia al estrés los datos presentados en esta revisión demuestran que la adaptación a distintos estreses como al ácido, a las altas temperaturas, al etanol y a la salinidad, provoca un aumento en la resistencia a los distintos tratamientos que se usan para inactivar los microorganismos como el calor, la acidificación o los desinfectantes. Por el contrario, la adaptación a temperaturas bajas no aumentaría la supervivencia de estos microorganismos ni frente a las altas temperaturas, ni a las altas presiones hidrostáticas ni frente al ácido ni al H₂O₂. Este último dato es especialmente relevante ya que los productos de la pesca y mariscos se almacenan a temperaturas bajas tras su captura para poder así ralentizar el crecimiento microbiano. Además, también se ha demostrado que el tratamiento con altas presiones y un posterior

almacenamiento en frío resulta en una progresiva inactivación de los microorganismos, un hecho que puede ser aprovechado para incrementar la seguridad de los productos así tratados.

Finalmente, cabe destacar que la exposición a determinados agentes podría conducir a la inducción del estado VNBC. Este fenómeno deberá ser estudiado en mayor profundidad ya que supone un reto para la seguridad alimentaria desde diferentes puntos de vista (métodos de detección, inactivación, evaluación de riesgos, etc.).

7. CONCLUSIONES

A continuación, se procede a enumerar las conclusiones extraídas de la revisión bibliográfica realizada en este Trabajo de Fin de Grado:

- La fase de crecimiento influye notablemente en la resistencia al estrés de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* lo que se ha atribuido a que la entrada en la fase estacionaria conduce a un aumento en la actividad RpoS y en la estabilidad de las envolturas celulares.
- La temperatura de crecimiento también ejerce un importante papel no sólo en la resistencia al estrés de estos microorganismos sino también en otros aspectos de su fisiología. Mayores temperaturas de crecimiento resultarían en una mayor resistencia al calor y en una mayor capacidad de formación de biofilms.
- La adaptación a distintos estreses como al ácido, a las altas temperaturas, al etanol y a la salinidad, conduce a un aumento en la resistencia frente a diferentes agentes inactivantes como el calor, la acidificación o los desinfectantes y se ha atribuido a la síntesis de proteínas del choque térmico, del choque ácido o de desarrollo de mecanismos de regulación del pH intracelular, entre otros. No obstante, la capacidad de desarrollar respuestas de resistencia estaría condicionada por múltiples factores, tales como la fase de crecimiento.
- Diferentes agentes, entre los que se encuentran temperaturas de crecimiento por debajo de los 15°C, pueden conducir a la inducción del estado VBNC en estos microorganismos, lo que resultaría en un aumento de su resistencia al estrés (pH ácido, estrés oxidativo, alta temperatura y etanol).
- Por el contrario, la adaptación a temperaturas bajas no aumentaría la supervivencia de estos microorganismos ni frente a las altas temperaturas, ni a las altas presiones hidrostáticas ni frente al ácido ni al H₂O₂. Este hecho es especialmente relevante ya que los productos de la pesca y mariscos se almacenen a temperaturas bajas tras su captura para poder así ralentizar el crecimiento microbiano.
- Es más, el tratamiento con altas presiones y un posterior almacenamiento en frío resulta en una progresiva inactivación de los microorganismos ya que estas temperaturas inhiben la recuperación de las células que han sido dañadas durante el tratamiento con presión.

8. CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn from the bibliographic review carried out in this End of Degree Project:

- Growth phase has a significant influence on the stress resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*, a phenomenon that has been attributed to the fact that the entry into the stationary phase leads to an increase in RpoS activity and cell envelopes' stability.
- Growth temperature also exerts an important role not only in the stress resistance of these microorganisms but also in other aspects of their physiology. Growth at elevated temperatures leads to an increased heat resistance and a greater capacity of biofilm formation.
- Adaptation to different stresses such as acid, high temperatures, alcohol and salinity, results in an increase in resistance to different inactivating agents such as heat, acidification or disinfectants, a phenomenon that has been attributed to the synthesis of heat shock proteins, acid shock proteins and/or to the development of intracellular pH regulation mechanisms. Nevertheless, the capacity to develop resistance responses would be conditioned by multiple factors, such as the growth phase.
- Different agents, including growth at temperatures below 15°C, can lead to the induction of the VBNC status in these microorganisms, which results in an increase in their resistance to stress (acid pH, oxidative stress, high temperature and ethanol).
- By contrast adaptation to low temperatures does not lead to an increase in resistance to high temperatures, high hydrostatic pressures acid conditions or H₂O₂. This fact is especially relevant because fish and shellfish products are stored at low temperatures after capture in order to slow down microbial growth.
- Moreover, treatment with high pressures and subsequent cold storage results in a progressive inactivation of microorganisms since these temperatures inhibit the recovery of cells that have been damaged during HHP treatments.

9. APORTACIONES EN MATERIA DE APRENDIZAJE

De acuerdo con la Guía Docente se va a proceder a la evaluación personal del Trabajo de Fin de Grado y de lo aprendido en su planificación y desarrollo:

Considero haber adquirido grandes destrezas en este Trabajo de Fin de Grado y desde mi punto de vista realizar este tipo de trabajos resulta esencial para cualquier estudiante ya que te ayudan a defenderte mejor a la hora de redactar trabajos, informes, etc.

Me ha servido para ampliar mis conocimientos acerca del tema elegido, además de aprender a utilizar diversas bases de datos, obteniendo, analizando y sintetizando toda la información encontrada. Me ha servido también para aprender la utilidad de un gestor bibliográfico esencial para organizar un artículo, como los empleados en esta revisión y además al tener que emplear fundamentalmente textos en inglés, he podido ampliar mi inglés científico.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Belleti, N. (2017). Tecnologías de conservación de peix y marisc. Disponible en: http://agricultura.gencat.cat/web/.content/pe_pesca_aquicultura/pe03_comercialitzacio_peix/documents/fitxers_estatics/tecniques_conservacio_peix_marisc.pdf. Fecha visita: 17/11/2017.
- Beuchat, L.R., y Worthington, R.E. (1976). Relationships between heat resistance and phospholipid fatty acid composition of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and environmental microbiology*, 31(3), 389-394.
- Cañigral, I. (2011). Desarrollo de métodos moleculares para la detección y caracterización de bacterias patógenas emergentes del género vibrio en aguas y alimentos. Tesis Doctoral: Universitat Politècnica de Valencia, Valencia. [Consulta: 06 de Junio de 2017]
- Cebrián, G. (2009). Mecanismos de inactivación y resistencia de Staphylococcus aureus a diferentes procesos de conservación de los alimentos. Tesis Doctoral: Universidad de Zaragoza. [Consulta: 04 de Septiembre de 2017]
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2005). Vibrio illnesses after hurricane Katrina-Multiple States, August–September. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 54, 928–931.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2006). *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with consumption of raw shellfish—Three States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 55, 1–2.
- Chiou, C.S., Hsu, S.Y., Chiu, S.I., Wang, T.K., Chao, C.S. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4621–4625.
- Chiang, M.L., y Chou, C.C. (2009). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* under environmental stresses as influenced by growth phase and pre-adaptation treatment. *Food Microbiology*, 26, 391–395.
- Chiang, M.L., Chou, C.C., Chen, H.C., Tseng, Y.T., y Chen, M.J. (2012). Adaptive acid tolerance response of *Vibrio parahaemolyticus* as affected by acid adaptation

- conditions, growth phase, and bacterial strains. *Foodborne Pathogens Disease*, 9(8), 734-40.
- Chiang, M.L., Hob, W.L., y Chou, C.C. (2008). Ethanol shock changes the fatty acid profile and survival behaviour of *Vibrio parahaemolyticus* in various stress conditions. *Food Microbiology*, 25, 359–365.
- Cover, D., y Woodburn, M. (1972). Relationships of temperature and sodium chloride concentration to the survival of *Vibrio parahaemolyticus* in broth and fish homogenate. *Applied Microbiology*, 23(2), 321-325.
- Criado, M. (2016). El calentamiento está aumentando la presencia de patógenos en el Atlántico. *El País*.
- DECRETO 2484/19.67, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. Boletín Oficial del Estado. 17 de octubre de 1967, núm. 248, pp. 14180-14448.
- Duan, J., Su, Y.C. (2005). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two Oregon oyster-growing bays. *Journal of Food Science*, 70, 58–63.
- Feldhusen, F. (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, 2, 1651–60.
- Fernández, B.R, Castillo, B, Díaz, E, Camacho, J.H. (2011). Evaluación de la aplicación de agua electrolizada oxidante como fungicida en dos variedades de rosa (*Rosa* sp) en invernadero. *Ingeniería e investigación*, 31(2), 91-101.
- González-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Rioseco, M.L., Vergara, J.A., Cabello, F., Romero, J., Espejo, R.T. (2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerging Infections Diseases*, 11, 129–131.
- Han, N., Mizan, Md FK., Jahid., IK., y Ha., S.D. (2016). Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature. *Food control*, 70, 161-166.
- Hollis, D.G., Weaver R.E., Baker C.N., Thornsberry, C. (1976). Halophilic vibrio species isolated from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 3(4), 425-31.

- Huang, W.S., Wong, H.C. Characterization of low salinity stress in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, 75(2), 231-237.
- Kelly, M.T., and A. Dinuzzo. (1985). Uptake and clearance of *Vibrio vulnificus* from Gulf coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 1548–1549.
- Klontz K.C., Lieb S., Schreiber M., Janowski H.T., Baldy L.M., Gunn R.A. (1988). Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. Clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. *Annals of Internal Medicine*, 109, 318.
- Lasa, I. (2004). Biofilms bacterianos. Instituto de agrobiotecnología y recursos naturales y departamento de producción agraria. Universidad Pública de Navarra. *Actualidad SEM*, 37, 14-18.
- Lin, M.H., Tsai, T.Y., Hsieh, S.C., Yu, R.C., y Chou, C.C. (2013). Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to disinfectants after prior exposure to sublethal stress. *Food Microbiology*, 34, 202-206.
- Lin, C., Yu, R.C., y Chou, C.C. (2004). Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 207– 215.
- Lozano-León, A., Torres, J., Osorio, C.R., Martínez-Urtaza, J. (2003). Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS. Microbiology Letters*, 226, 281–284.
- Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C., Pousa, A. (2005). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1319–1320.
- Molero, X., Bartolomé, R.M., Vinuesa, T., Guarner, L., Accarino, A., Casellas, F., García, R. (1989). Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain: presentation of 8 cases. *Medicina Clínica*, 92, 1–4.
- Moreno M.L., Landgraf M. (1998). Virulence factors and pathogenicity of *Vibrio vulnificus* strains isolated from seafood. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 747.

- Morris Jr J.G. (1988). *Vibrio vulnificus*, a new monster of the deep? *Annals of Internal Medicine*, 109, 261.
- Nelapati, S., Nelapati, K., Chinnam, B.K. (2012). *Vibrio parahaemolyticus*- An emerging foodborne pathogen-A Review. *Veterinary World*, 5(1), 48-62.
- Nowakowska, J., y Oliver, JD. (2013). Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS. Microbiology Ecology*, 84, 213–222.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.K., Grag, S., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B., Nishibuchi, M. (1997). Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travellers arriving in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 3150–3155.
- Organización Mundial de la Salud. (1989). La irradiación de los alimentos: Técnica para conservar y preservar la inocuidad de los alimentos. Informe de un grupo científico de la OMS.OMS (Ginebra).
- Paris, E., Ríos, J. C., Bettini, M., Mieres, J. J., Sánchez, P. y De la Barra, T. (2005). Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. Centro de información toxicológica Pontificia Universidad Católica de Chile (CITUC).
- Park, J.H., Jo, Y., Jang, S.Y., Kwon, H., Irie, Y., Parsek, M.R., Kim, M.H., Choi, S.H. (2015). The cab ABC operon essential for biofilm and rugose Colony development in *Vibrio vulnificus*. *PLoS Pathogens*, 11.
- Robert-Pillot, A., Guérolé, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M., Quilici, M.L. (2004). Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *International of Food Microbiology*, 91, 319–325.
- Ren, T., y Su, Y.C. (2006). Effects of electrolyzed oxidizing water treatment on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in raw oysters. *Journal of Food Protection*, 69(8), 1829–1834.

- Ronholm, J., Lau, F., y Banerjee, S.W. (2016). Emerging seafood preservation techniques to extend freshness and minimize vibrio contamination. *Frontiers in Microbiology*, 7, 350.
- Shapiro R.L., Altekruze S., Hutwagner L., Bishop R., Hammond R., Wilson S., Ray B., Thompson S., Tauxe R.V., Griffin P.M. (1998). The role of Gulf Coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States. *Journal Infectious Diseases*, 178(3), 752-9.
- Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P.C., Hélaouët, P., Edwards, M., Höfle, M.G., y Pruzzo, C. (2016). Climate influence on vibrio and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34), 5062–5071.
- Vuddhakul, V., Chowdhury, A., Laohaprertthisan, V., Pungrasamee, P., Patararungrong, N., Thianmontri, P., Ishibashi, M., Matsumoto, C., y Nishibuchi, M. (2000). Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2685–2689.
- Wang, W., Li, M., y Li, Y. (2015). Intervention strategies for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: A review. *Journal of Food Science*, 8(1).
- Wong, H.C., Peng, P.Y., Han, J.M., Chang, C.Y., y Lan, S.L. (1998). Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, 66(7), 3066–3071.
- Wong, H.C., Liu, S.H. (2008). Characterization of the low-salinity stress in *Vibrio vulnificus*. *Journal of Food Protection*, 71(2), 416-419.
- Wong, H.C., Peng, P.Y., Lan, S.L., Chen, Y.C., Lu, K.H., Shen, C.T., y Lan, S.F. (2002). Effects of heat shock on the thermotolerance, protein composition, and toxin production of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, 65(3), 499–507.
- Wong, H.C., y Wang, P. (2004). Induction of viable but non culturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 359–366.
- Ye, M., Huang, Y., Gurtler, J.B., Niemira, B.A., Sites J.E., y Chen, H. (2013). Effects of pre- or post-processing storage conditions on high-hydrostatic pressure inactivation of *Vibrio*

parahaemolyticus and *Vibrio vulnificus* in oysters. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 146-152.

Zamora, D.R., y Quiróz, C. (2005). Un enemigo marino silencioso *Vibrio parahaemolyticus*. *Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación*, UNAM, 6(4).