



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Identificación de genes no esenciales involucrados en la resistencia a la radiación UV-C de *Salmonella*.

Identification of non-essential genes involved in *Salmonella* resistance to UV-C radiation.

Autor/es

Alicia Val Torices

Director/es

Guillermo Cebrián Auré
Silvia Calero Martínez

Facultad de Veterinaria

2024

Índice

I. Resumen.....	3
II. Summary.....	4
1. Introducción.....	5
1.1. Métodos tradicionales de conservación de los alimentos.....	5
1.2. Nuevas tecnologías de conservación de los alimentos.....	6
1.2.1. La radiación ultravioleta (UV).....	8
1.3. <i>Salmonella</i>	10
2. Justificación y objetivos.....	14
3. Metodología.....	15
3.1. Microorganismos.....	15
3.2. Medios de cultivo.....	15
3.3. Obtención de cultivos.....	15
3.4. Equipo para la aplicación de tratamientos por luz UV-C.....	16
3.5. Tratamientos con luz UV.....	17
3.6. Cribado de cepas.....	17
3.7. Adaptación de la metodología para ensayos post-cribado.....	18
3.8. Validación de los resultados del cribado.....	19
3.9. Identificación/verificación de los genes delecionados en las cepas con diferente resistencia a la radiación UV-C mediante PCR.....	19
3.10. Número de réplicas, regresión lineal y tratamiento estadístico.....	21
4. Resultados y discusión.....	22
4.1. Cribado de mutantes sensibles a la radiación UV-C.....	22
4.2. Adaptación de la metodología para los ensayos de post-cribado.....	23
4.2.1. Obtención de una recta de calibración concentración-absorbancia para media la concentración inicial de <i>Salmonella</i>	23
4.2.2. Optimización de las condiciones de tratamiento: volumen y tiempo de tratamiento.....	24
4.3. Validación de los resultados del cribado: resistencia a la luz UV-C mutantes sensibles a la radiación UV-C.....	27
4.4. Caracterización de los mutantes: PCR.....	28
5. Conclusiones.....	30
Conclusions.....	30
6. Valoración personal.....	31
7. Bibliografía.....	32

I. Resumen.

Las tecnologías emergentes de procesamiento de alimentos buscan atender las demandas de los consumidores actuales. Debido a su novedad, el conocimiento acerca de las mismas es, en general, bastante limitado, lo que en muchos casos complica su implementación en la industria alimentaria. Por su parte, *Salmonella*, es un patógeno alimentario de gran relevancia, pero cuya resistencia/comportamiento frente a estas nuevas tecnologías de procesamiento es en gran medida aún desconocido.

Una de estas nuevas tecnologías es la luz ultravioleta (UV-C). Esta tecnología es muy prometedora porque permite la inactivación de microorganismos presentes en estos productos, sin comprometer su calidad organoléptica ni su valor nutricional y siendo su coste de implementación/aplicación bastante bajo. Sin embargo, la falta de conocimiento sobre los mecanismos de resistencia microbiana frente a la misma dificulta considerablemente la optimización de tratamientos y su implementación industrial. Por todo ello, el objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado fue progresar en la identificación de aquellos genes de *Salmonella* involucrados en la resistencia a la radiación UV.

Los resultados obtenidos en el mismo indican que la supervivencia de *Salmonella* frente a la luz UV depende de muchos factores, entre los que se cuenta el tiempo y el volumen de tratamiento, pero también la forma de aplicación de los tratamientos. Por otra parte, los resultados obtenidos también demuestran que la metodología previamente puesta a punto en el grupo y la desarrollada en este TFG, permite identificar genes de *Salmonella* relacionados con la resistencia de *Salmonella* a la luz UV-C. Dos de estos genes son *trxA* y *fdhD*, cuya delección se ha comprobado que conduciría a un descenso en la resistencia de *Salmonella* Typhimurium frente a la radiación UV-C.

II. Summary.

Emerging food processing technologies aim to meet the demands of today's consumers. Due to their novelty, knowledge about them is generally quite limited, which in many cases complicates their implementation in the food industry. On the other hand, *Salmonella* is a foodborne pathogen of great relevance, but its resistance/behavior towards these new processing technologies is largely still unknown.

One of these new technologies is ultraviolet (UV-C) light. This technology is very promising because it allows the inactivation of microorganisms present in these products without compromising their organoleptic quality or nutritional value, and its implementation/application cost is quite low. However, the lack of knowledge about microbial resistance mechanisms to UV-C light considerably hinders the optimization of treatments and their industrial implementation. Therefore, the main objective of this Final Degree Project was to make progress in identifying the *Salmonella* genes involved in resistance to UV radiation.

The results obtained indicate that *Salmonella* survival against UV light depends on many factors, including treatment time and volume, as well as the method of application of the treatments. Moreover, the results also demonstrate that the methodology previously established by the group and developed in this project allows the identification of *Salmonella* genes related to UV-C light resistance. Two of these genes are *trxA* and *fdhD*, whose deletion has been shown to lead to a decrease in the resistance of *Salmonella* Typhimurium to UV-C radiation.

1. Introducción.

Los alimentos constituyen, en términos generales, un sustrato ideal para el crecimiento de los microorganismos. Por ello, tanto bacterias como hongos, y particularmente los primeros, son generalmente agentes causantes de la alteración de los alimentos. Por esta misma razón, aunque no exclusivamente por ella, los alimentos son también en muchas ocasiones vehículos de enfermedades causadas por microorganismos, las más frecuentes las denominadas toxoinfecciones alimentarias (Morcillo et al., 2005).

El objetivo principal de la conservación de alimentos es mantener en condiciones óptimas e higiénicas los productos alimentarios, garantizando así su seguridad y tratando de preservar al máximo sus propiedades sensoriales y nutritivas, durante el mayor tiempo posible. Para ello, se busca evitar o reducir al mínimo la contaminación de los alimentos y/o limitar el desarrollo o la actividad de dichos agentes patógenos o alterantes, a través de la aplicación de diferentes estrategias (Morcillo et al., 2005).

1.1. Métodos tradicionales de conservación de los alimentos.

Los métodos de conservación de alimentos se pueden clasificar de acuerdo con su naturaleza en, físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos tradicionales más empleados son, la conservación por reducción de la temperatura (frío), ya sea mediante refrigeración o congelación, la reducción de la actividad de agua (por ejemplo, la deshidratación) y el calor o tratamientos térmicos, que incluye la pasteurización y esterilización. Los dos últimos métodos tienen ciertas limitaciones ya que, aunque son muy eficientes desde el punto de vista de la inactivación y/o el control del crecimiento de los microorganismos, pueden provocar alteraciones notables en las características organolépticas de los alimentos (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003).

Por su parte, el método químico más frecuente es el uso de aditivos naturales y sintéticos (incluyendo los acidificantes), que se añaden a los alimentos. El principal inconveniente de su uso es que pueden ser dañinos en determinadas concentraciones para el ser humano (Casp y Abril, 2003), lo que limita su aplicación. Adicionalmente, algunos de ellos también pueden inducir cambios notables en las propiedades de los alimentos, como es el caso de los ácidos orgánicos.

Por último, los métodos de conservación de base biológica consisten, esencialmente, en facilitar/permitir la acción de microorganismos propios o externos al alimento. Una de las aplicaciones más relevantes y conocidas es el uso de bacterias lácticas para inducir las

fermentaciones, fermentaciones que contribuyen a la conservación de los alimentos como al desarrollo de propiedades organolépticas deseables, como sucede en el caso de los aromas generados en los quesos madurados. La gran limitación de esta técnica radica en que estos mismos microorganismos también tienen la capacidad de alterar negativamente las características organolépticas de los productos, por lo que esta estrategia no es beneficiosa/aplicable en muchos productos (Casp y Abril, 2003).

La mayoría de los procesos de conservación tradicionales, son incapaces de garantizar la inocuidad de los alimentos, ya que se basan en limitar el crecimiento de los agentes patógenos. Adicionalmente, los alimentos conservados con estos agentes/procesos son, como no puede ser de otra forma, muy sensibles a las modificaciones de las condiciones de conservación, como la ruptura de la cadena de frío, ya que estos cambios pueden provocar el crecimiento de microorganismos patógenos. De las técnicas mencionadas anteriormente, el calor es la única técnica que actúa mediante inactivación, por lo que es muy utilizada en la industria alimentaria. Sin embargo, dado que existen agentes de alteración (microorganismos y/o enzimas) muy termo-resistentes en muchas ocasiones, se necesita la aplicación de tratamientos térmicos extremos, que pueden afectar al valor nutricional y organoléptico del alimento (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003).

1.2. Nuevas tecnologías de conservación de los alimentos.

Por todo lo mencionado anteriormente, se están buscando alternativas al procesamiento térmico tradicional como medio de inactivación de microorganismos patógenos. Estas alternativas incluyen alternativas en las que sí se utiliza calor como agente de inactivación, pero buscando una mayor velocidad de calentamiento o un calentamiento más homogéneo que en los métodos tradicionales, como el calentamiento óhmico o por microondas y tecnologías no térmicas (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003), como las que se describen a continuación.

Una tecnología de procesado relevante, aunque probablemente no puede clasificarse como emergente, son las radiaciones ionizantes. La radiación ionizante es un proceso de conservación que consiste en la aplicación de dicho tipo de radiaciones (partículas α , rayos β , rayos X o las radiaciones γ) a los alimentos. Este tipo de radiación es capaz de ionizar y provocar inestabilidad de átomos y moléculas, provocando una alteración del material genético del microorganismo que conduce a su muerte (Herrero y Romero de Avila, 2006). A pesar de algunos efectos en las propiedades nutricionales y sensoriales, se sostiene que la calidad de los alimentos irradiados puede preservarse optimizando las condiciones de procesamiento (Cebrián y Condón, 2011). Así, en la industria agroalimentaria, esta tecnología se usa para inhibir la germinación en patatas,

eliminar insectos y parásitos, retardar la maduración de frutas y verduras, alargar la vida útil de carnes y pescados, eliminar microorganismos patógenos y esterilizar especias y otros productos deshidratados (Crawford and Ruff, 1996).

Por su parte, la tecnología pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV), consiste en someter un alimento a un campo eléctrico de alto voltaje (superior generalmente a los 10 kV/cm), de manera intermitente, de forma que se le aplican pulsos con una duración de entre 1 microsegundo y 0,1 milisegundos (Dunn et al, 1991). En el caso de esta tecnología, la inactivación microbiana está relacionada con su capacidad para permeabilizar las membranas, que se reorganizan generándose poros que acaban siendo letales para ellos (Zimmermann et al., 1974). Alguna de las ventajas que incluye el uso de esta tecnología, es la capacidad de inactivación microbiana que posee sin afectar a la calidad de los alimentos, ya que la aplicación de PEAV no implica un aumento significativo de la temperatura, por lo que podría realizarse una pasteurización. Por otra parte, esta tecnología tiene también ciertas limitaciones, como que, al menos por sí sola, no es aplicable para la esterilización de los alimentos, ya que los esporos bacterianos son resistentes a su aplicación (Cebrián y Condón, 2011).

Otra “nueva tecnología” son las altas presiones hidrostáticas (APH), que consiste en aplicar presiones elevadas (entre 100 y 900 MPa) a los alimentos durante un tiempo de entre 1 a 30 minutos. Es una tecnología muy útil para inactivar las formas vegetativas de los microorganismos, tanto patógenos como alterantes, pero como el caso de los PEAV, su aplicación para la esterilización de los alimentos no es viable a nivel industrial hoy en día (Patterson, 2005). La aplicación de las APH afecta a numerosas dianas celulares (envolturas, proteínas...) y genera además daño oxidativo (Mañas y Pagán, 2004) aunque no es capaz de destruir enlaces covalentes, iónicos ni interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, su aplicación sí que provoca alteraciones de la estructura de las proteínas (Fernández-Martín et al., 1997) y del almidón (Jobling, 2004), los cuáles afectan en última instancia a las propiedades macroscópicas de los alimentos. Su principal aplicación es prolongar la vida útil de los alimentos (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003), aunque también tiene otras aplicaciones más particulares como para la fabricación del surimi, en el que puede inducir la formación de geles “no térmicos” o en el caso de productos del mar con concha, donde su aplicación favorece la extracción de la carne adherida a la concha (Cebrián y Condón, 2011).

Por último, el plasma frío, es una nueva tecnología con un nivel de desarrollo inferior a las anteriores pero que está recibiendo también mucha atención. Un plasma es un fluido con altas concentraciones de iones, radicales libres y electrones que inactiva los microorganismos por los

efectos físico-químicos y biológicos que les producen, como daños en el material genético y en la membrana celular, entre otros (Laroussi, Mendis, y Rosenberg, 2003; Laroussi et al., 2005). Entre sus aplicaciones más evidentes/relevantes está su uso para la descontaminación de las superficies de los equipamientos y/o para los vegetales de cuarta gama (Cebrián y Condón, 2011).

1.2.1. La radiación ultravioleta (UV).

La radiación ultravioleta (UV) es un tipo de radiación electromagnética localizada en el espectro electromagnético entre la luz visible y los rayos X. Esta radiación abarca longitudes de onda que van desde 10 hasta 400 nm, y se divide en cuatro categorías según sus longitudes de onda: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm), UV-C (200-280 nm) y UV de vacío (<200 nm) (Hinds et al., 2019; Delorme et al., 2020).

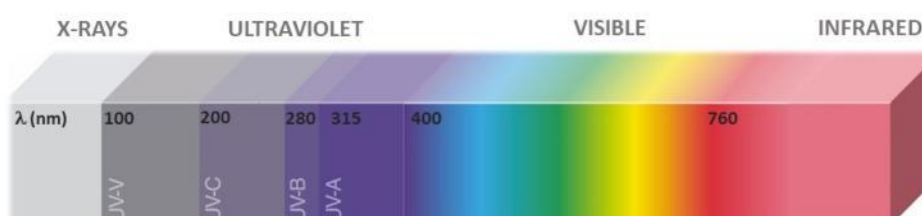


Figura 1. Espectro electromagnético. “Postharvest Ultraviolet Radiation in Fruit and Vegetables” (Darre et al., 2022)

Aunque el sol es el principal emisor de radiación UV, la atmósfera y la capa de ozono que rodean la Tierra limitan significativamente la cantidad de esta que llega a la superficie terrestre. Para aplicaciones prácticas, como la conservación de alimentos, se recurre a lámparas artificiales. Tradicionalmente, las lámparas de mercurio, xenón, incandescentes y fluorescentes, así como algunos láseres, han sido comunes como fuentes de UV (FDA, 2020). De todas ellas, las lámparas de mercurio han sido la fuente más frecuente de este tipo de radiación. No obstante, debido al riesgo potencial de exposición a este material considerado tóxico, se está limitando cada vez más su uso. Por ello, actualmente, la tendencia apunta hacia el uso de lámparas LED (Diodo Emisor de Luz), que son más respetuosas con el medio ambiente, más seguras y ofrecen ventajas tecnológicas como una menor emisión de calor y la ausencia de necesidad de consumo energético para el calentamiento de las lámparas (Hinds et al., 2019; Delorme et al., 2020).

La luz UV se clasifica como una tecnología no térmica y permite, al menos en algunos escenarios, prescindir del uso de sustancias químicas con propiedades germicidas. De esta manera, se considera una fuente de energía segura, no tóxica y con una eficaz capacidad germicida,

actuando sobre bacterias, virus, protozoos, hongos e incluso algas (Delorme et al., 2020). Así, la radiación UV se puede usar en la industria alimentaria con numerosos fines, como la descontaminación de superficies, agua y efluentes, la prolongación de la vida útil de los alimentos y la pasteurización y esterilización de alimentos o envases en contacto de alimentos (Fau, 2021).

En cuanto a su modo de acción sobre los microorganismos, existen básicamente dos formas/procesos a través de los que esta radiación puede inactivarlos.

La radiación UV puede afectar a las proteínas, las cuáles absorben mayoritariamente en longitudes de onda inferiores a 230 nm. La inactivación de los microorganismos mediante este mecanismo requiere una radiación muy elevada, por lo que limita su aplicabilidad en la práctica. Por otro lado, la radiación puede absorberse por los nucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina) que codifican el ADN, en una longitud de onda máxima de entre 200 y 300 nm UV-C y teniendo mayor efecto germicida entre los 260 y 265 nm (Gayán, Condón y Álvarez, 2013).

La absorción por parte de los nucleótidos provoca una reacción fotoquímica, dando lugar a la formación de dímeros de timina cuando dos timinas se encuentran en proximidad, siendo este fenómeno también observable, aunque en menor medida, cuando dos citocinas están cerca. Estos dímeros de timina inducen alteraciones en la estructura del ADN, lo que interfiere en su replicación normal (Bolton y Cotton, 2008).

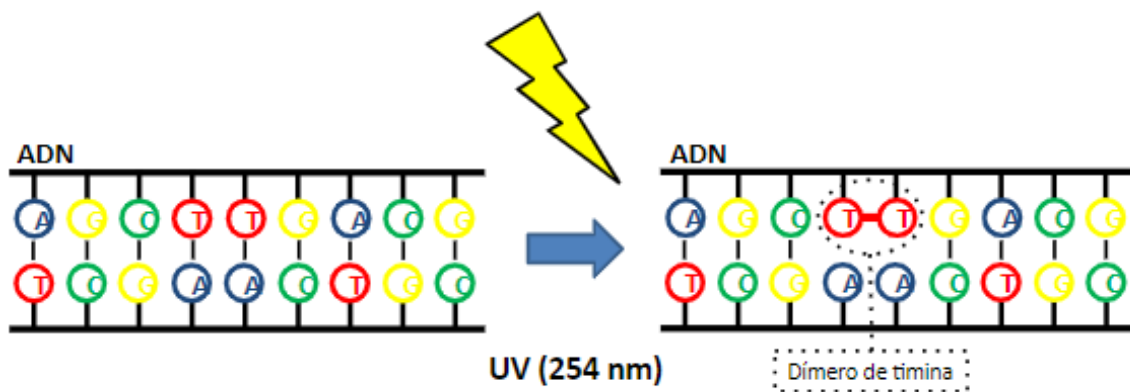


Figura 2. Acción de la radiación sobre la cadena de ADN (Cebrián y Condón, 2011).

El equipo para llevar a cabo un tratamiento de UV-C no es muy complejo. En general, para alimentos sólidos, se utiliza una cabina cerrada donde se coloca el alimento o muestra sobre una superficie de altura ajustable. En la parte superior de la cabina se ubican las lámparas de luz UV-C (Delorme et al., 2020).

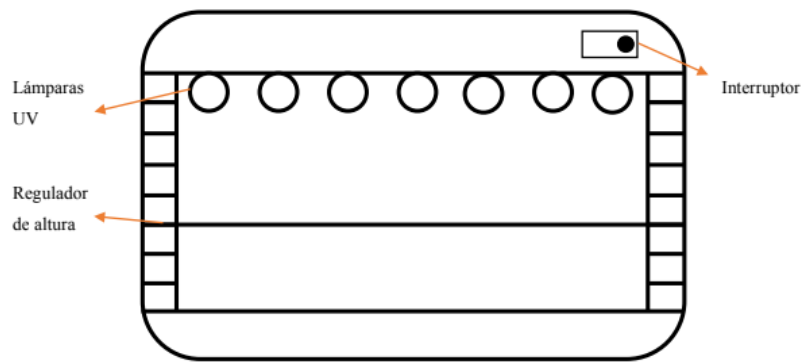


Figura 3. Equipo de tratamiento UV (Fau, 2021).

Además, la radiación ultravioleta también se podría emplear con el objetivo de alargar la vida útil de los alimentos. La calidad de los alimentos no es constante a lo largo del tiempo y esto provoca que tengan un periodo en el que sus características sensoriales y sus propiedades se encuentran dentro de unos límites considerados aceptables. Este tiempo es el que se conoce como vida útil (Carrillo Inungaray y Reyes Munguía, 2013).

Un ejemplo de su capacidad es el empleo de la UV-C para la descontaminación de la superficie de un queso fresco logrando aumentar la vida útil del producto en un 80% (Lacivita et al., 2016). Otro ejemplo es la aplicación de la radiación UV-C en combinación con un proceso de calentamiento medio sobre zumo de zanahoria. De esta última forma se ha observado que se puede alcanzar la inactivación de 5 ciclos logarítmicos de los patógenos más resistentes logrando una vida útil de 29 días en refrigeración preservando significativamente mejor las propiedades organolépticas de dicho zumo que si se le aplica un tratamiento tradicional de pasteurización (Gouma et al., 2020).

La radiación UV se ha empleado también, con la finalidad de pasteurizar y esterilizar alimentos o embalajes que se encuentren en contacto con ellos. Unos autores sometieron vino blanco a un tratamiento con UV-C y obtuvieron una inactivación microbiana de 6 unidades logarítmicas. Otros sometieron huevo líquido al tratamiento con ultravioleta logrando una inactivación de 5 unidades logarítmicas para *E. coli* (Diesler et al., 2019)

La radiación ultravioleta ha demostrado ser eficaz en la inactivación de esporos. Sin embargo, la información disponible aún es escasa y las dosis necesarias para llevar a cabo la inactivación son variables en función del autor (Gayán, Álvarez y Condón, 2013).

1.3. *Salmonella*.

Salmonella es un género de bacterias Gram negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Se caracterizan por poseer forma de bacilos, además de ser anaerobias

facultativas y no formadoras de esporos. Mayoritariamente son móviles ya que disponen de flagelos peritricos y también de fimbrias que les permiten infectar a una gran variedad de huéspedes, tanto mamíferos como reptiles, aves o anfibios (Jajere, 2019).

El género de *Salmonella* se divide en dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, que, a su vez, se dividen en varias subespecies. *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies y a su vez, estas se dividen en variantes serológicas (Guillén, 2022).

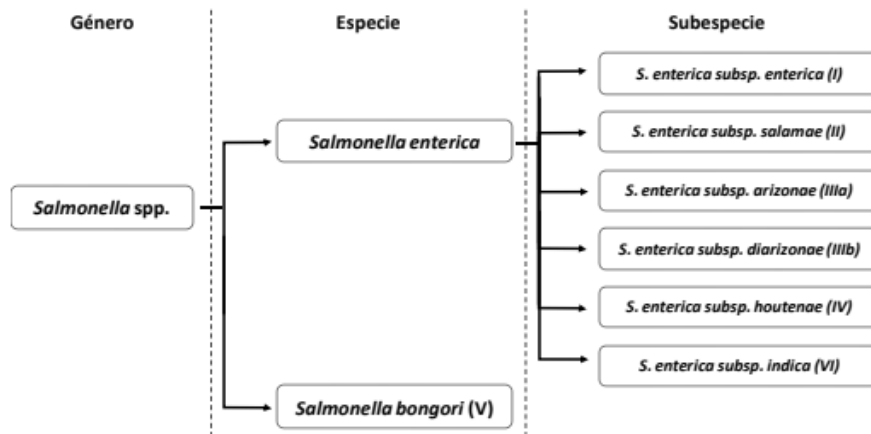


Figura 4. Clasificación de los microorganismos del género de *Salmonella* (Guillén, 2022).

Como se deduce de lo anterior, *Salmonella* se caracteriza por su gran diversidad. Existen muchas serovariedades capaces de colonizar o infectar a una amplia gama de huéspedes y algunas serovariedades que son específicas de un hospedador, por ejemplo, *Salmonella* Typhi se limita a los seres humanos (Jajere, 2019).

Esta serovariedad Typhi que es el agente infeccioso que produce la fiebre tifoidea, es potencialmente mortal. Sin embargo, también existen numerosas serovariedades no tifoideas, que producen millones de casos de gastroenteritis y miles de muertes cada año, suponiendo un problema de salud pública.

De hecho, la salmonelosis es la segunda enfermedad zoonótica más común en la Unión Europea (UE) y la primera causa de brotes alimentarios. En 2022, en la UE hubo 65.208 casos confirmados de salmonelosis, de los cuales se reportaron 11.287 hospitalizaciones y 81 muertes. Únicamente en España, se confirmaron 8.832 casos de salmonelosis en 2022 (EFSA, 2023). *Salmonella* Typhimurium fue el principal serotipo de *Salmonella* identificado en los mismos, seguido de cerca por *Salmonella* Enteritidis (RNVE, 2022).

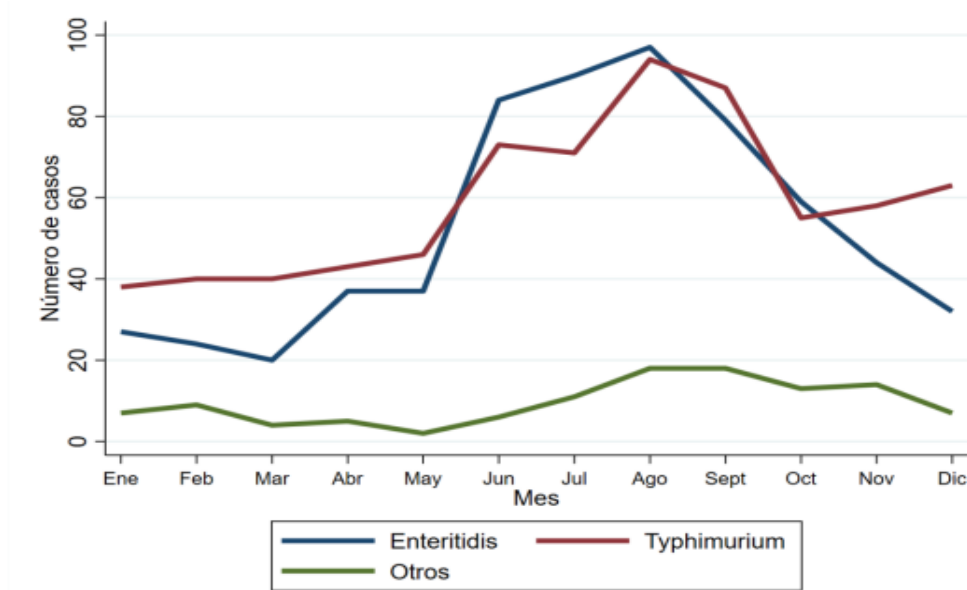


Figura 5. Casos identificados con serotipos de *Salmonella* distribuidos por meses en el año 2022 (RNVE, 2022).

La enfermedad se caracteriza por causar una gran variedad de síntomas, como fiebre entérica, bacteriemia, enterocolitis, e infecciones focales. La contaminación de los productos alimentarios se puede deber a diversos factores, como una contaminación directa o indirecta de los alimentos a través de animales, por contaminación cruzada entre comidas preparadas, por hábitos de higiene inadecuados por parte de los manipuladores o por ambientes de contaminación fecal, por ejemplo, el agua. De esta manera, los productos alimentarios que se destacaron con mayor frecuencia como causantes de los brotes de *Salmonella* en la Unión Europea en 2022, como podemos observar en la Figura 6, fueron los huevos y ovoproductos (EFSA, 2023).

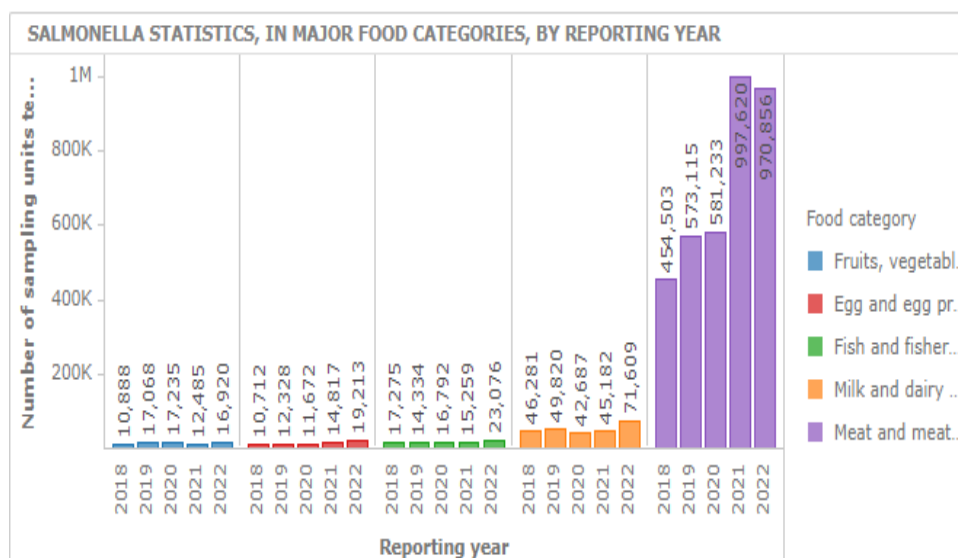


Figura 6. Estadísticas *Salmonella* por años y por categorías de producto (EFSA, 2023)

Por otra parte, *Salmonella* también se caracteriza por su gran capacidad de adaptación y resistencia al estrés. Así, estas bacterias sobreviven en un rango de temperaturas desde los 7 hasta los 46,2°C, siendo su rango óptimo de crecimiento entre los 35 y los 43°C (D'Aoust, 1989). Otro de los factores relevantes para su crecimiento/supervivencia es el pH. Así su rango de pH de crecimiento se encuentra entre 3,8 y 9,5, siendo su crecimiento óptimo a un pH de alrededor de 7,5. En cuanto a la actividad de agua, se observa que el límite inferior de crecimiento es de 0,93, mientras que el crecimiento óptimo es a actividades de agua de 0,99 (Podolak et al., 2010).

El potencial de la radiación UV-C para la inactivación de *Salmonella* en matrices alimentarias, se ha demostrado en varios estudios, como el realizado por Huang y Chen, quienes inocularon distintas serovariedades de *Salmonella* en alimentos de origen vegetal, como arándanos, tomates y lechuga. En dicho estudio, consiguieron una reducción de entre 2 y 5 unidades logarítmicas para tratamientos de 1 a 2 minutos (Huang y Chen, 2018). No obstante, también existen factores que potencialmente podrían afectar a la inactivación de *Salmonella* o la de la composición del alimento y/o las condiciones de tratamiento (temperatura, por ejemplo) (Fau, 2021).

Debido al elevado número de casos y el coste económico y sanitario asociado en la UE, se está tratando de reducir el número de brotes que causa *Salmonella*, mediante la aplicación de numerosas medidas entre las que se encuentran la limitación de uso de productos crudos como el huevo, el desarrollo de planes de control y vigilancia y el uso de vacunas para ganado. Sin embargo, y como ya se ha descrito, este patógeno sigue siendo una de las principales causas de enfermedad alimentaria. Por todo ello, es necesario seguir investigando sobre la fisiología de este microorganismo, en particular aquellos aspectos de relevancia para su supervivencia frente a las nuevas herramientas de control e inactivación que se están desarrollando frente al mismo, como la radiación UV (Fau, 2021).

2. Justificación y objetivos.

La tecnología luz ultravioleta (UV-C) es una técnica emergente en la conservación de alimentos, ya que permite la inactivación de microorganismos presentes en estos productos, sin comprometer su calidad organoléptica y valor nutricional. No obstante, su integración en procesos industriales requiere conocimiento de los mecanismos de resistencia microbiana frente a esta tecnología, que permitirán la optimización de dichos tratamientos.

Por todo ello, el objetivo principal de este trabajo es progresar en la identificación de genes de *Salmonella* involucrados en la resistencia a la radiación UV.

Para alcanzar este objetivo principal, se definieron los siguientes objetivos parciales:

- Poner a punto de una metodología que permita, de forma precisa y reproducible, estudiar la resistencia microbiana a la radiación ultravioleta en formato placa multipocillo.
- Evaluar la resistencia de mutantes isogénicos de *Salmonella* Typhimurium 14028s a la radiación UV utilizando dicha metodología.
- Validar los resultados obtenidos e identificar las modificaciones genéticas (mutaciones) responsables de los cambios de resistencia observados.

3. Metodología.

3.1. Microorganismos.

Los ensayos se llevaron a cabo con la cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo; CECT 4594) y con la placa 156_157_kan de la colección de mutantes isogénicos de *S. Typhimurium* 14028s SGD (Single Gene Deletion) (Porwollick et al., 2014) suministrada por BEI Resources (Manassas, Virginia, E.E.U.U.). Estos mutantes se han generado mediante la delección dirigida de unos 3700 genes no esenciales de esta cepa, que han sido reemplazados por un cassette de resistencia a kanamicina procedente del plásmido pCLF4.

3.2. Medios de cultivo.

- Triptone Soya Agar (TSA) de Oxoid (Basingstoke; Hampshire, Reino Unido), se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y se suplementó con extracto de levadura (EL) al 0,6% en peso seco para favorecer el crecimiento de las bacterias. Es un medio sólido que se empleó para favorecer el crecimiento de las células de *Salmonella*, haciendo siembras por agotamiento.
- Triptone Soya Broth (TSB) también de Oxoid suplementado con EL al 0,6%, que fue el medio utilizado para la obtención de cultivos bacterianos
- Tampón citrato-fosfato McIlvaine (MCI) de pH 7,0 (Dawson et al., 1974). Este se utilizó para hacer diluciones y como medio de tratamiento en los ensayos de aplicación de UV.

Los medios se preparaban, y tras ser distribuidos en los frascos de vidrio, se esterilizaban (121°C/ 20 minutos) en un autoclave Presoclave III 80 (Selecta; Abrera, Barcelona, España). Tras la esterilización, se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso. El medio sólido (TSA-EL), antes de ser utilizado, se fundió (105°C/20 min) y tras ser enfriado hasta 50°C se distribuyó en placas de Petri en condiciones de esterilidad.

3.3. Obtención de cultivos.

Los cultivos de mutantes de *S. Typhimurium* 14028s pertenecientes a la colección para el cribado se realizaron utilizando placas de 96 pocillos con fondo plano (Thermo Scientific, Roskilde, Dinamarca), manteniendo la disposición original. De esta forma, en cada pocillo se cultivó de manera individual un mutante y se identificaron con el número de placa y la posición para acceder a la información de cada uno de ellos en la documentación de la colección. Los mutantes

se cultivaron en 100 μ l de TSB-EL suplementado con kanamicina 60 μ g/ml. Se inocularon en el medio a partir de la placa crioconservada y se incubaron durante 24 horas a 37°C en una estufa estática. Tras ello, se inoculó 1 μ l de este cultivo en 99 μ l del mismo medio y se incubó de nuevo durante 24 horas a 37°C.

Para los cultivos que se usaron para la adaptación metodológica (ver más abajo) se partió de un criovial de *S. Typhimurium* 14028s que se encontraba almacenado a -80°C. En primer lugar, se sembró por agotamiento en una placa de TSA-EL que se incubó durante 24 horas en una estufa estática modelo Incubig (Selecta; Abrera, España) a 37°C. Posteriormente, se inoculó una colonia de *Salmonella* de la placa de TSA-EL en un frasco de 10 ml de TSB-EL, que se incubó en la misma estufa estática durante 24 horas a 37°C obteniéndose así el denominado pre-cultivo. Las suspensiones de trabajo (cultivos) se obtuvieron tras inocular un frasco con 10 ml de TSB-EL con una dilución 1/100 del pre-cultivo e incubar dicha suspensión durante 24 horas a 37°C.

Para los cultivos de los cuatro mutantes seleccionados, se partió de la placa 156_157_kan de la colección de mutantes isogénicos de *S. Typhimurium* 14028s, cada mutante se encontraba en su pocillo correspondiente. Primero, se inoculó cada uno de ellos en 10 ml de TSB-EL suplementado con kan. A continuación, se incubaron durante 24 horas a 37°C y se obtuvo el pre-cultivo. Tras el estufaje, se trasladó a otro frasco de 10 ml con una dilución 1/100 y se volvió a incubar durante 24 horas a 37°C. Así es como se obtuvo el cultivo de los mutantes.

3.4. Equipo para la aplicación de tratamientos por luz UV-C.

El equipo de luz UV-C utilizado en este Trabajo Fin de Grado es una instalación de diseño “flexible” que puede albergar de una a cuatro lámparas UV-C de 32 W (modelo VL-208G, Vilber, París, Francia) que pueden disponerse tanto vertical como horizontalmente. El equipo cuenta también con un sistema de refrigeración compuesto por dos extractores ubicados a los laterales de la cámara. En este Trabajo Fin de Grado, se utilizaron dos lámparas dispuestas en horizontal, a una altura de 11,2 cm de la muestra. Además, se utilizó un soporte donde se colocaba la muestra de una altura de 7,8 cm de la base del equipo. Para la caracterización de este equipo, se usó un radiómetro (UVP, LLC, Upland, CA) capaz de medir la irradiancia (mW/cm^2) siempre colocado en la misma posición y a una distancia de 11,2 cm de las lámparas.

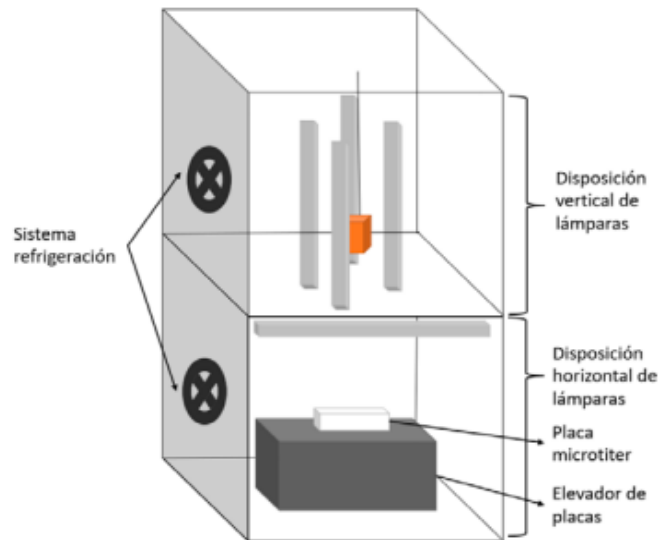


Figura 7: Esquema del equipo UV-C Facultad de Veterinaria. Zaragoza (Fau, 2021).

3.5. Tratamientos con luz UV.

Para aplicar los tratamientos de UV, los cultivos se diluyeron en una proporción 1/50 usando tampón MCI como diluyente. Todos los tratamientos se llevaron a cabo en placas multipocillo: de 96 pocillos para el cribado y de 24 pocillos para la puesta a punto y validación de los resultados del cribado y en sí. Dado que en la instalación usada la irradiancia era muy elevada la luz que llegaba a los pocillos se atenuó mediante la utilización de tapas de acrilato de vinilo (Thermo Scientific, Roskilde, Dinamarca).

Antes de aplicar los tratamientos y dado que las lámparas utilizadas necesitan de un periodo de pre-calentamiento para que se establezca su irradiancia, estas se encendieron de 20 a 25 minutos antes de aplicar los tratamientos. No obstante, antes de cada tratamiento se registró con un radiómetro la irradiancia (mW/cm^2) para comprobar que las condiciones de tratamiento eran siempre comparables.

Tras realizar los tratamientos, se realizan las diluciones correspondientes utilizando tampón McIlvaine antes de su siembra ($50 \mu\text{L}$) en placas de Petri. Estas se incubaron durante 24 horas a 37°C , trascurridas las cuales se procedió a obtener los recuentos.

3.6. Cribado de cepas.

Los cultivos en la placa de 96 pocillos obtenidos como se indica en el epígrafe 3.3 se diluyeron en tampón McIlvain pH7 1/10 en un volumen final de $200 \mu\text{L}$ utilizando otra placa que permita mantener el mismo formato. En esta placa se determinó la concentración inicial mediante la determinación de la absorbancia y la aplicación de la siguiente ecuación:

$$C = Abs * 10^9 - 8 * 10^7$$

Tras la determinación de la concentración se diluyó 1/5 en un volumen final de 40 µl siguiendo el mismo procedimiento y la placa se cubrió con dos tapas adhesivas de acrilato de vinilo (Thermo Scientific, Roskilde, Dinamarca)

La placa se trató en el equipo de luz UV durante 1 minuto y 27 segundos con una irradiancia de 0,43 mV/cm². Inmediatamente después 20 µl de cada uno de los pocillos fueron sembrados en superficie de manera individual en pocillos de placas de 24, en superficie de 1,9 cm² de TSA-EL kan 60 µg/ml. Este proceso se llevó a cabo en el interior de una campana de flujo laminar (Telstar, Terrasa, Barcelona, España) y las sembradas se dejaron secar en el interior de la campana durante 30 minutos. Estas placas se incubaron cubiertas con su tapa, en posición invertida y sin apilar para facilitar la ventilación e impedir la condensación en el agar, durante 24 horas a 37°C.

Siguiendo el mismo protocolo se obtuvieron 16 réplicas (cada día de ensayo) de la cepa parental, *S. Typhimurium* 14028s, si bien en ningún caso, ni en el cultivo en placa ni en la siembra en TSA-EL se suplementaron los medios con kanamicina. Sólo los mutantes pertenecientes a la colección presentan resistencia a este antibiótico debido a la sustitución del gen deleciónado por un cassette de resistencia.

3.7. Adaptación de la metodología para ensayos post-cribado.

Se llevó a cabo la puesta a punto de la metodología a utilizar tras el cribado de los mutantes, estableciendo las condiciones apropiadas para los fines del estudio (obtención de curvas de supervivencia a la radiación UV-C).

Esta puesta a punto consistió en:

- 1) La obtención de una curva de calibración absorbancia-concentración para cultivos líquidos. Para ello se hicieron diluciones (1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/10 y 1/20), de los cultivos de *Salmonella* Typhimurium 14028 utilizando MCI como diluyente. A continuación, se sembraron 50 µL de cada dilución en placas de Petri con TSA que se incubaron durante 24 horas a 37°C y se determinó en paralelo su a 600 nm usando un espectrofotómetro (Biochrom, Granada, España).
- 2) Una evaluación de la influencia del volumen (200-2000 µL) y el tiempo de tratamiento (15 seg-6 minutos) para así definir la metodología de trabajo. Además, se evaluaron dos protocolos de recogida de muestras de la instalación de UV-C. La primera consistió en retirar el volumen completo de muestra una vez alcanzado el tiempo de tratamiento

requerido mientras que la segunda consistía en cubrir los pocillos los pocillos ya tratados con tapas adhesivas de aluminio (VWR, Radnor, Pennsylvania, United States of America) que impiden el paso de la luz.

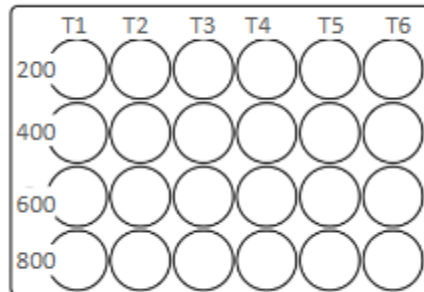


Figura 8. Placa 24 pocillos donde se realiza el tratamiento UV-C. Creado con PPW.

3.8. Validación de los resultados del cribado.

Aquellas cepas/clones que, de acuerdo al cribado, mostraron una resistencia diferente a la parental se seleccionaron para su posterior verificación. En el marco de este Trabajo Fin de Grado las cepas que se comprobaron/validaron fueron las correspondientes a los pocillos D3, F4, F5 y G3 de la placa 156_157 de la colección, como se describirá con más detalle en resultados y discusión.

3.9. Identificación/verificación de los genes delecionados en las cepas con diferente resistencia a la radiación UV-C mediante PCR.

Para la identificación/verificación de la identidad de los mutantes se llevó a cabo una PCR a partir de las colonias (colony PCR). La polimerasa utilizada fue la NZYtaq II 2× Green Master Mix (Nzytech, Lisboa, Portugal) y los cebadores utilizados fueron los que se incluyen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores utilizados con la secuencia de ADN de interés.

D3- <i>fdhD</i> F	GCAATATACTGTCTGAAGAAGTCC
D3- <i>fdhD</i> R	CGATTAACCGCTGCGGAT
F4- <i>trxA</i> F	CCTGTGGAGTTATATATGAGCG
F4- <i>trxA</i> R	CCAGATTGGCGTCGAGAA

Para llevar a cabo las amplificaciones se descongeló la enzima y se adicionó agua. A continuación, se añadieron los siguientes componentes en este orden: agua libre de nucleasas, NZYtaq II 2× Green Master Mix, primers y la colonia microbiana con ADN, y se llevó a ebullición.

A continuación, se mezclaron los componentes y se realizó la PCR de las cuatro muestras con los parámetros indicados en la Tabla 2.

Tabla 2: Parámetros para realizar la PCR. Adaptado de Ficha técnica Nyztech.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	30 s	35
Alineamiento	52°C	30 s	
Elongación	72°C	30 s	
Elongación final	72°C	10 min	1

La desnaturalización se llevó a cabo a temperaturas de 96°C durante 30 segundos, con el objetivo de separar las cadenas de ADN para proporcionar los moldes de ADN del siguiente paso, el alineamiento. Aquí es donde se produjo la disminución de la temperatura hasta los 52°C para que los cebadores puedan unirse a sus secuencias complementarias en el molde de ADN de cadena sencilla. A continuación, se llevó a cabo la elongación, donde aumentó la temperatura a 72°C durante 30 segundos. Este ciclo se repitió 35 veces.

Todo este proceso se llevó a cabo en el equipo Veritri™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientist; Waltham, Massachusetts, USA).

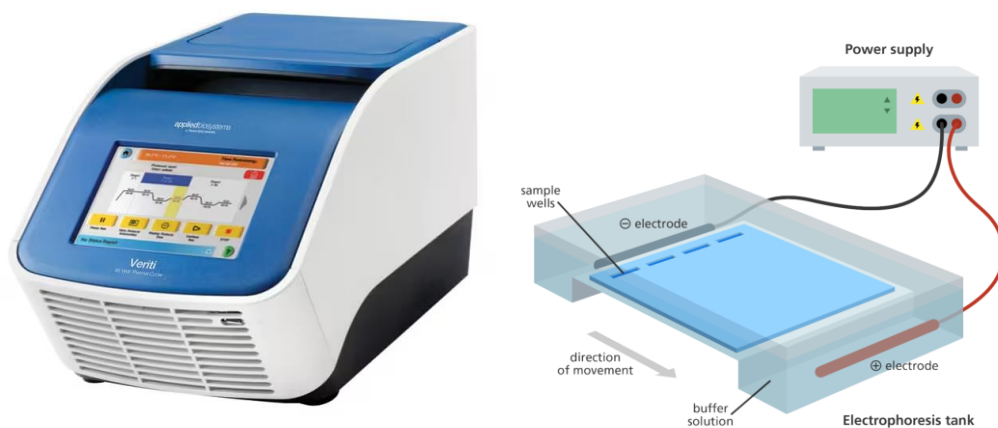


Figura 9. Equipos para llevar a cabo la PCR (Termociclador y electroforesis).

Tras realizar la PCR, se procedió a realizar una electroforesis en un gel de agarosa, que previamente se preparó y se cargó con las diferentes muestras (un marcador de peso molecular y dos controles negativos (uno para D3 y otro para F4)) que posteriormente se fotografió con el

equipo Gel DOC EZ Imager (Biorad, Hercules, California, USA) para poder visualizar los resultados.

3.10. Número de réplicas, regresión lineal y tratamiento estadístico.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado salvo en el caso del cribado ($n=1$). El ajuste al modelo lineal, la representación de datos y el tratamiento estadístico (t-de student) se llevaron a cabo usando Microsoft Excel (Microsoft, Albuquerque, Nuevo México, EEUU) y/o Graph Pad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, U.S.A.).

4. Resultados y discusión.

Una de las estrategias más habituales para el estudio de los mecanismos de resistencia microbianos frente a los diferentes agentes/estreses es el uso de mutantes con deleciones en genes específicos (mutantes knock-out). En este escenario, las colecciones de mutantes isogénicos constituyen una herramienta especialmente útil e interesante para abordar este tipo de estudios (Steffen et al., 2014). En 2014, el grupo del Profesor McClelland publicó la colección de mutantes de eliminación de un sólo gen (SGD) collection *Salmonella* 14028s, que contiene 3517 mutantes en los que se ha reemplazado un sólo gen por un casete que contiene un gen de resistencia a la kanamicina (KanR). Una placa de las que forman parte de esta colección es la que fue objeto de estudio en este TFG.

No obstante, para poder abordar el estudio de estas colecciones completas es necesario desarrollar una metodología de trabajo robusta y sencilla que permita reducir el tiempo y material de trabajo sin que eso condicione la validez de los resultados obtenidos. Este fue el objetivo de la primera parte de este TFG.

4.1. Cribado de mutantes sensibles a la radiación UV-C.

Como se puede observar en la Figura 10, en la que se muestra la distribución de los ciclos logarítmicos de inactivación obtenidos para cada pocillo y los controles tras el tratamiento en la placa 156_157_kan, se obtuvo una distribución heterogénea de la inactivación por luz UV en función del pocillo/mutante, pero también para las réplicas de la cepa parental. En la Figura 10 también se observa la presencia de mutantes que se inactivaron menos que el promedio de la cepa parental, pero también una gran parte que se inactivó en mayor proporción que esta.

Lo primero es un reflejo tanto de la variabilidad biológica intrínseca al trabajo con microorganismos y la relativa a la metodología utilizada. Por ello, a la hora de hacer la segunda afirmación habría que ser más cautos, pues si se obtuvieran más réplicas de cada uno de los pocillos probablemente se obtuviera una distribución de resistencias similar a los de la cepa parental. A la vista de todo ello se optó por una aproximación “conservadora” y se estableció un umbral de 5,26 ciclos de inactivación para seleccionar los mutantes con los que continuar con el post-cribado, en este caso con mutaciones que sensibilizantes frente a la luz UV-C. En cualquier caso, antes de proceder a él, se tuvo que poner a punto la metodología para el mismo.

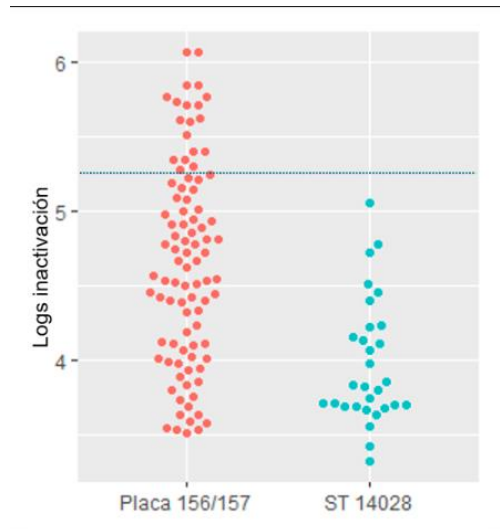


Figura 10. Distribución de los niveles inactivación obtenidos en el cribado de los mutantes en comparación con la cepa parental.

4.2. Adaptación de la metodología para los ensayos de post-cribado.

4.2.1. Obtención de una recta de calibración concentración-absorbancia para media la concentración inicial de *Salmonella*

De forma análoga a como se había hecho previamente en el grupo de investigación para los cultivos en placa multipocillo, se procedió a obtener una curva de calibración para estimar la concentración de las diferentes cepas de *Salmonella* crecidas en botes. Para ello se procedió como se indica en Material y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 11 que incluye la ecuación obtenida.

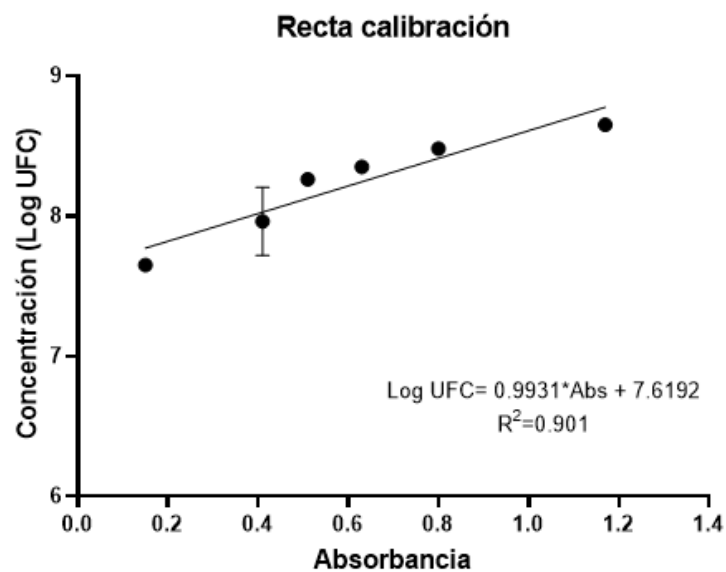


Figura 11: Curva patrón de concentración (Log (conc) de *Salmonella*) vs absorbancia medida a 600 nm.

4.2.2. Optimización de las condiciones de tratamiento: volumen y tiempo de tratamiento.

A continuación, se llevaron a cabo una serie de ensayos para determinar la influencia del volumen y el tiempo de tratamiento en la inactivación de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (cepa parental). Para ello se realizaron ensayos con diferentes volúmenes (0,2-2 mL por pocillo), tiempos de tratamiento (15-360 segundos) y usando dos metodologías para poder obtener curvas de inactivación por UV-C en una misma placa multipocillo.

El primer método consistió en retirar la placa del equipo de tratamiento por UV-C, extraer la muestra tratada en ambiente de esterilidad y volver a introducir la placa en el equipo para seguir tratando las muestras del resto de pocillos, ya que el efecto de la luz UV-C es, al menos en un principio, aditivo. Cuando finalizaba el primer tiempo de tratamiento, por ejemplo 15 segundos, se extrajo con una pipeta una cantidad establecida de cada pocillo (150 μ L), se trasladó a su eppendorf correspondiente (previamente identificado) y se volvió a tratar con el segundo tiempo establecido.

El segundo método consistía en, tras cada tiempo de tratamiento, adherir una tapa adhesiva de aluminio encima de los pocillos que no debían recibir más radiación. Esto implicaba que las curvas de inactivación eran más sencillas y rápidas de obtener. Como inconveniente, estaba el riesgo de que el pocillo tapado siguiera recibiendo algo de dosis a través de las paredes del pocillo que eran transparentes (aunque de un plástico poco permeable a la luz UV-C).

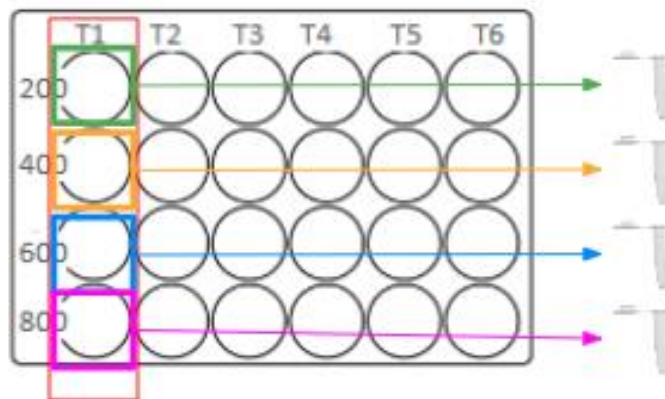


Figura 12. Metodología de extracción a seguir con método 1. Elaborado con PPW.

Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras 13 y 14 y la Tabla 3 en las que se incluyen los valores D determinados mediante regresión lineal. De hecho, esta es una observación relevante que se puede hacer, que independientemente de las condiciones ensayadas la cinética de inactivación de *Salmonella* por radiación UV-C fue en todos los casos

lineal. Señalar que el ajuste de las rectas fue bueno en todos los casos con un R^2 de al menos 0,92.

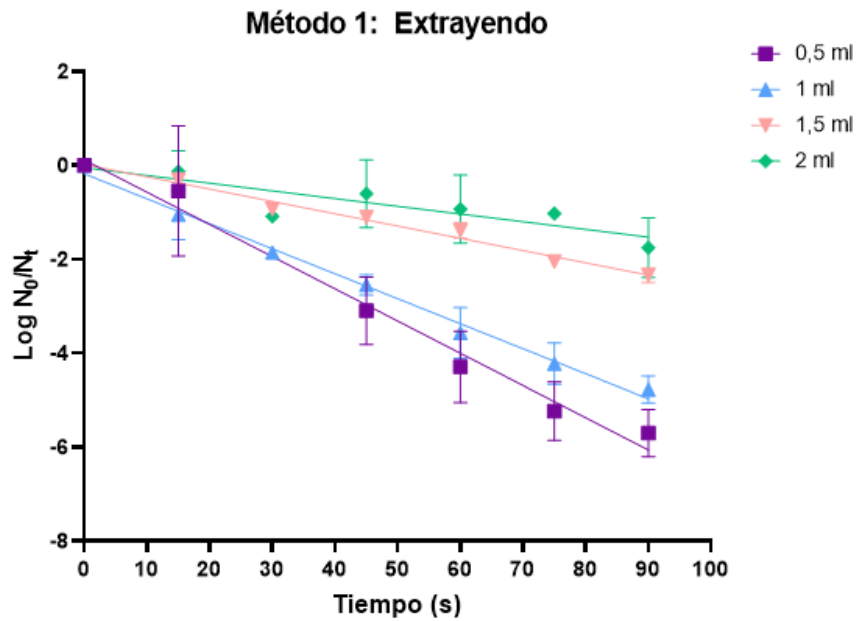


Figura 13: Curvas de supervivencia de *S. Typhimurium* 14028s frente a la luz UV-C en diferentes condiciones de tratamiento usando el Método 1 (parando el tratamiento y extrayendo la muestra).

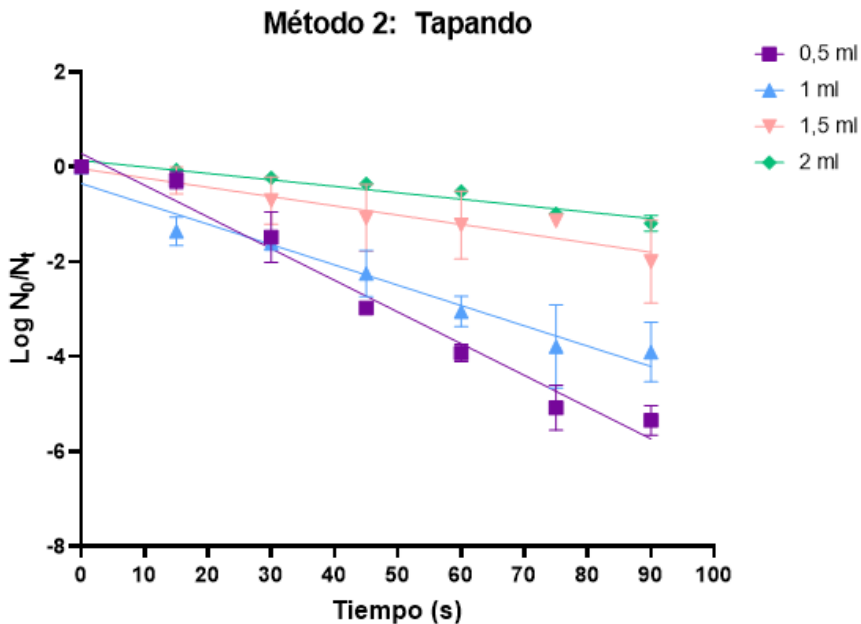


Figura 14: Curvas de supervivencia de *S. Typhimurium* 14028s frente a la luz UV-C en diferentes condiciones de tratamiento usando el Método 2 (tapando con tapa de aluminio tras el tratamiento en UV-C).

Como se puede observar en las Figuras 13 y 14, y se deduce de la Tabla 3, el aumento en el volumen tratado resultó en un aumento de la resistencia (y consecuentemente del valor D). Los datos también indican que para volúmenes superiores a 1 ml la inactivación usando la metodología del tapado fue siempre inferior que con el método de la “extracción” lo que indicaría que no había problemas de “sobretreatamiento” a través de las paredes de los pocillos. Esto, junto a la mayor facilidad de manejo asociado, hizo que seleccionáramos esta metodología para los estudios de post-cribado.

Tabla 3. Valor D y desviación estándar calculadas para *S. Typhimurium* 14028s usando cada una de las condiciones ensayadas.

		V1 (500µL)	V2 (1000µL)	V3 (1500µL)	V4 (2000µL)
Método 1: Extrayendo	Valor D (s)	14,58	18,79	38,17	60,98
	Desvest	2,40	1,73	0,86	0,60
Método 2: Tapando con aluminio	Valor D (s)	14,97	23,31	51,28	73,53
	Desvest	2,19	1,41	0,66	0,46

Dado que los mutantes/clones a verificar eran en todos los casos más sensibles que la cepa parental se seleccionó el volumen de 1,5 ml en el que el nivel de inactivación no supero los dos ciclos logarítmicos. La curva de inactivación de referencia, la de la cepa parental (*S. Typhimurium* 14028s), se presenta en la Figura 15.

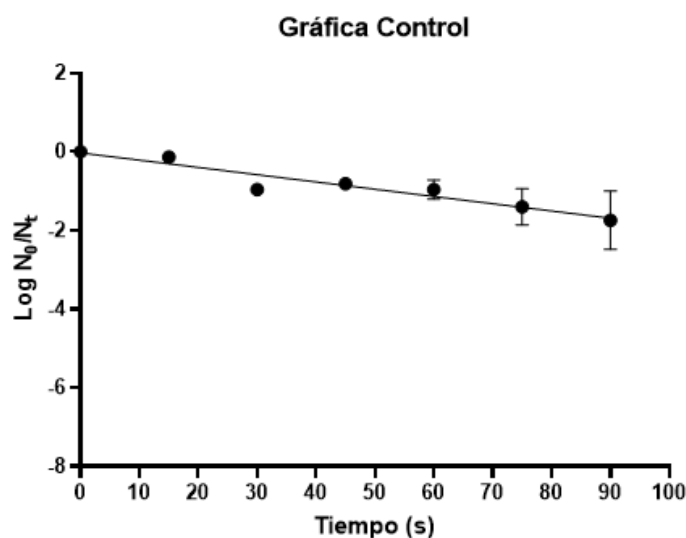


Figura 15. Gráfica de supervivencia de *S. Typhimurium* 14028s frente a la luz UV-C (pocillos de 1,5 mL de volumen y tapando dichos pocillos con film de aluminio).

4.3. Validación de los resultados del cribado: resistencia a la luz UV-C mutantes sensibles a la radiación UV-C.

A la vista de los resultados descritos en la sección 4.1 se seleccionaron los siguientes pocillos/mutantes para proceder a validar los resultados del cribado, correspondientes a los más sensibles: D3, F4, F5 y G3. Para estas cepas se obtuvieron las curvas de inactivación que se incluyen en la Figura 16 y se calculó su valor D (Tabla 4). Para su cálculo se hizo una regresión lineal que tuvo un R^2 superior a 0,8539.

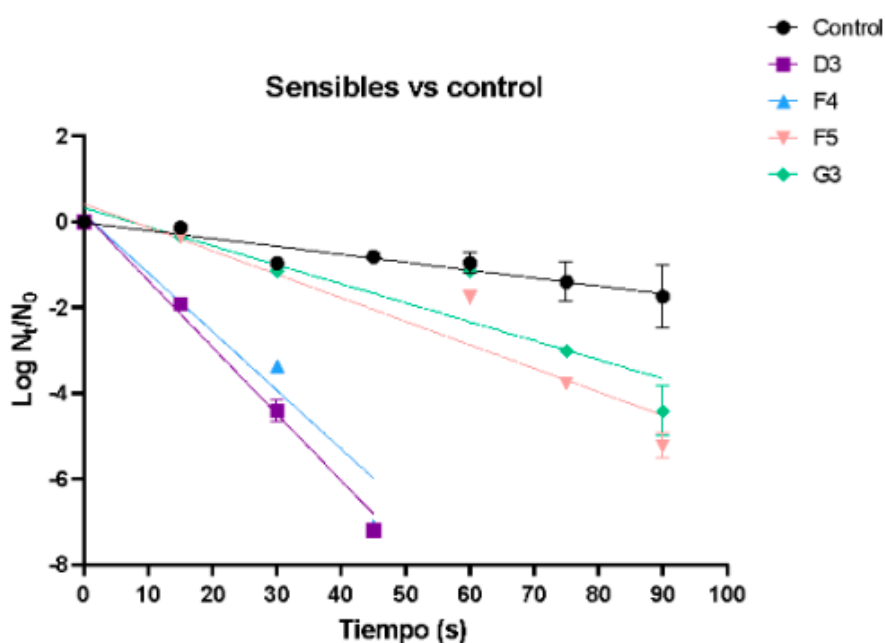


Figura 16. Curvas de supervivencia de *Salmonella* Typhimurium mutantes de los pocillos D3, F4, F5 y G3 frente a la luz UV-C, en comparación con el control.

Tabla 4. Valores D y desviaciones estándar calculados para la cepa parental y los 4 mutantes estudiados.

	Control	D3	F4	F5	G3
Valor D	54,05 s	6,22 s	6,42 s	18,21 s	22,57 s
Desvest	0,63	3,12	3,00	2,24	1,70

Como se deduce de las curvas y los valores D de la tabla los 4 mutantes ensayados presentaron una resistencia a la luz UV-C significativamente menor ($p < 0,05$) que la parental, particularmente las cepas/mutantes correspondientes a los pocillos D3 y F4, y por eso estos se seleccionaron para caracterizar/verificar el gen deleciónado en las mismas.

4.4. Caracterización de los mutantes: PCR.

El resultado de la PCR desarrollada según se indica en Material y Métodos se incluye en la Figura 17.

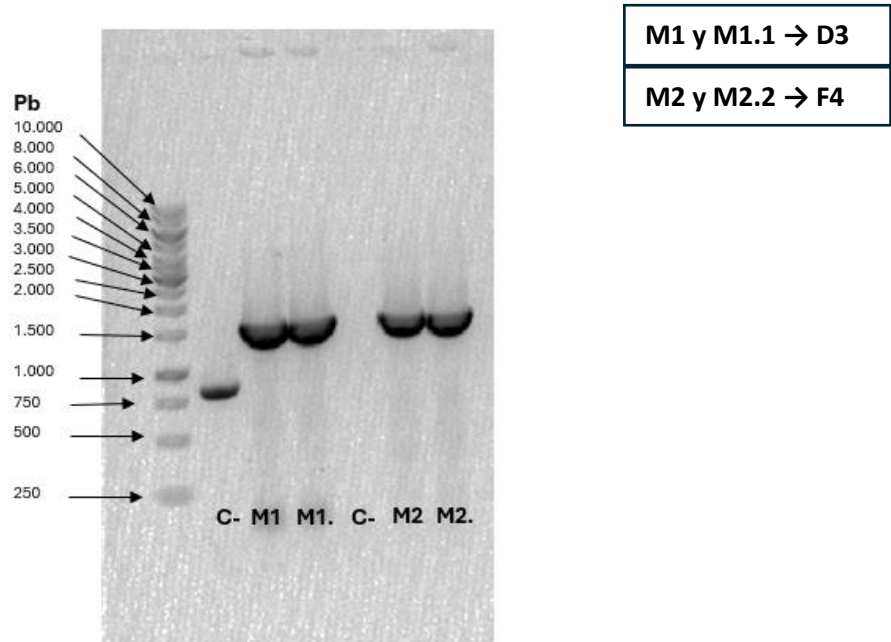


Figura 17. Resultados de la PCR para la verificación de la identidad de los mutantes. Fotografía obtenida con el equipo Gel Doc EZ Imager.

En la figura se puede observar: en el primer carril el marcador de peso molecular, que es un estándar de referencia que contiene fragmentos de ADN de longitudes conocidas. En el segundo carril (el control negativo de D3) encontramos una banda que podría indicar la dimerización y amplificación de ADN, o bien, una contaminación en la preparación de la muestra, si bien no se corresponde con el fragmento que se esperaba amplificar y por tanto es inespecífico. El tercer y cuarto carril están cargados con el mutante D3 en dos muestras distintas (M1 y M1.1). En el quinto carril encontramos el control negativo de F4 y el sexto y séptimo carril están cargados con el mutante F4 en dos muestras distintas (M2 y M2.2).

A sabiendas de que el tamaño del inserto completo en los mutantes es de unas 1500 pb, podemos concluir que los fragmentos de ADN amplificados corresponden al ADN de los mutantes. Se ha amplificado una sección de 1500 pb que incluye el cassette de resistencia de 800 pb y unas 350 pb no codificantes en ambos extremos hasta cada uno de los “primer site” con los que se realizó el inserto en *S. Typhimurium*. Además, hay que señalar que la capacidad de esta PCR para identificar/distinguir los mutantes viene dada por los cebadores utilizados. Así, se han empleado cebadores que forman parte del gen que se ha delecionado, ya que cada uno de ellos conserva 40 nucleótidos en cada extremo y que flanquean los “primer site” del inserto.

Es por esto que presentan el mismo tamaño los productos de las PCRs pero verifican la inserción del cassette en el sitio específico de cada uno de dichos genes.

En relación a los genes delecionados en cada uno de estos mutantes señalar que estos serían *trxA* en el caso del pocillo D3 y *fdhD* en el caso del pocillo F4.

Según indica el estudio de (Peters, et al., 2010) el gen *trxA* codifica para tiorredoxina 1, una pequeña proteína con actividad disulfuro reductasa, que cataliza reacciones redox de disulfuro de tiol en diversas proteínas sustrato. Las tiorredoxinas actúan como antioxidantes en la defensa contra el estrés oxidativo. Que su deleción conduzca a una sensibilización de *Salmonella* sugiere que la luz UV-C podría estar generando daños oxidativos en *Salmonella* aunque estudios previos sugieren que la contribución del daño oxidativo a la inactivación de *Salmonella* por luz UV-C sería marginal o reducida (Gayán et al., 2012). Serían necesarios nuevos estudios para aclarar este punto.

Por otra parte, mucho menos se conoce acerca del gen *fdhD* que codifica componentes no estructurales del complejo FDHN/O pero necesarios para que este sea funcional (Paveglio et al., 1988; Schlindwein et al., 1990). No obstante, según el estudio (Crouch et al., 2005) este gen/complejo estaría involucrado en la resistencia a diferentes estreses, lo que podría explicar los resultados obtenidos en este estudio.

5. Conclusiones

De los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Grado se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La supervivencia de *Salmonella* frente a la luz UV depende de muchos factores, entre los que se cuenta el tiempo y el volumen de tratamiento, pero también la forma de aplicación de los tratamientos.
- La metodología previamente puesta a punto en el grupo y la desarrollada en este TFG permite identificar genes de *Salmonella* relacionados con la resistencia de *Salmonella* a la luz UV-C.
- La delección de los genes *trxA* y *fdhD* conduciría a un descenso en la resistencia de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 frente a la radiación UV-C.

Conclusions

From the results obtained in this Final Degree Project, the following conclusions can be drawn:

- The survival of *Salmonella* under UV light depends on many factors, including treatment time and volume, as well as the method of application of the treatments.
- The methodology previously established by the group and developed in this project allows the identification of *Salmonella* genes related to UV-C light resistance.
- The deletion of the genes *trxA* and *fdhD* would lead to a decrease in the resistance of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 to UV-C radiation.

6. Valoración personal

Realizar mi TFG sobre la identificación de genes no-esenciales involucrados en la resistencia a la radiación UV-C de *Salmonella* ha sido un desafío que me ha aportado profundizar en un tema muy actual como las tecnologías emergentes de procesamiento de los alimentos.

A nivel personal, me siento muy satisfecha de haber profundizado en este tema por mi interés previo en *Salmonella* y porque ha sido muy gratificante aprender a trabajar en un laboratorio de investigación de la mano de mis directores, quienes me han facilitado, enseñado y ayudado en cada una de las etapas de este trabajo.

Además, he podido cumplir con los objetivos planteados y los resultados obtenidos han sido muy satisfactorios.

También, gracias a este Trabajo Fin de Grado, he podido afianzar muchos de los conocimientos y competencias adquiridos durante la carrera, aplicándolos de manera práctica y profundizando en áreas específicas de la investigación científica.

Como conclusión, realizar este TFG ha sido una experiencia enriquecedora que ha contribuido significativamente a mi desarrollo académico y personal.

7. Bibliografía

Bolton, J.R. y Cotton, C.A. (2008). *The Ultraviolet Disinfection Handbook*. Disponible en: [The Ultraviolet Disinfection Handbook - sample Chapter \(awwa.org\)](http://www.awwa.org) [Consultado 04-02-2024].

Casp Vanaclocha, A. and Abril Requena, J. (2003). *Procesos de conservación de alimentos*. (2ª ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa.

Carrillo Inungaray, M.L. y Reyes Munguía, A. (2013) "Vida útil de los alimentos / Lifetime food", *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 2(3), p. 32. doi: 10.23913/ciba.v2i3.20.

Cebrián, G y Condón S. (2011). "Nuevas tecnologías de conservación y su aplicación a la industria alimentaria", en Instituto Tomás Pascual Sanz, U. de B. (ed.). *Los retos actuales de la industria alimentaria*, pp. 51-72.

Crawford L.M, Ruff E.H. (1996). "A review of the safety of cold pasteurization through irradiation". *Food Control*, 7(2):87-97. Doi: 10.1016/0956-7135(96)00004-7.

Crouch M.L, Backer L.A, Baang I, Tanabe H, Oullette A.J and Fang F.C. (2005). "The alternative sigma factor σ is required for resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to antimicrobial peptides". *Molecular Microbiology*, 56 (3), pp 789-799. Doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04578.

D'Aoust, J.Y. (1989). "Salmonella" En M. P. Doyle (Ed.), *Foodborne bacterial pathogens*, (pp 327-445). New York: M. Dekker, Inc.

Darré M, Vicente A.R, Cisneros-Zevallos y Artés-Hernández, F. (2022). "Postharvest Ultraviolet Radiation in Fruit and Vegetables: Applications and Factors Modulating Its Efficacy on Bioactive Compounds and Microbial Growth". *Foods*, 11 (5), pp. 653. Doi: 10.3390/foods11050653

Delorme M.M, Guimaraes J, Coutinho N.M, Balthazar C, Rocha R, Silva R, Margalho L.P, Pimentel T.C, Silva M.C, Freitas M.Q, Granato D, Sant'Ana A, Duart M.C and Cruz A. (2020). "Ultraviolet radiation: An interesting technology to preserve quality and safety of milk and dairy foods". *Trends in Food Science & Technology*, 102, pp. 146-154. Doi: 10.1016/j.tifs.2020.06.001.

Diesler K, Golombek P, Kromm L and Scharfenberger-Schmeer. (2019). "UV-C treatment of grape must: Microbial inactivation, toxicological considerations and influence on chemical and sensory properties of white wine", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, pp. 291-304. doi: 10.1016/J.IFSET.2019.01.005.

Dunn JE, Clark RW, Asmus JF, Pearlman JS, Boyer K, Painchaud F. et al. (1991). *Methods for preservation of foodstuffs*. US patent number 5034235.

EFSA (European Food Safety Authority). (2023). "The European Union one Health 2022 Zoonoses Report". *EFSA Journal* 1831-4732. Doi: 10.2903/j.efsa.2023.8442.

Fau García, E. (2021). *Identificación de genes involucrados en la resistencia a la luz UV en Salmonella Typhimurium*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza (UNIZAR).

Fernández-Martín F, Fernández P, Carballo J, Jiménez Colmenero F. (1997). "Pressure/Heat Combinations on Pork Meat Batters: Protein Thermal Behavior and Product Rheological Properties". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 45:4, pp. 440-5. Doi: 10.1021/jf9702297.

FDA. (2020). "Ultraviolet (UV) Radiation" | FDA. Disponible en: <https://www.fda.gov/radiation-emitting-products/tanning/ultraviolet-uv-radiation#1> [Consultado 03-03-2024].

Gayán E., Serrano M.J., Raso J., Álvarez I. y Condón S. (2012). "Inactivation of Salmonella enterica by UV-C Light Alone and in Combination with Mild Temperatures", *Appl Environ Microbiol*, 78 (23) pp. 8353-8361. Doi: 10.1128/AEM.02010-12.

Gouma, M. et al. (2020) "Pasteurization of carrot juice by combining UV-C and mild heat: Impact on shelf-life and quality compared to conventional thermal treatment". Doi: 10.1016/j.ifset.2020.102362.

Guillén, S. (2022). *Estudio de las relaciones entre resistencia al estrés, capacidad de crecimiento y virulencia en el género Salmonella*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza (UNIZAR)

Herrero, A. y Romero de Avila, M. (2006). "Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas", *Revista Médica Universidad de Navarra*, 50, pp. 71-74. Doi: 10.15581/021.50.7633.

Hinds, L.M., O'Donnell C.P., Akhter M. and Tiwari B.K. (2019). "Principles and mechanisms of ultraviolet light emitting diode technology for food industry applications", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 56, pp. 102-153. Doi: 10.1016/j.ifset.2019.04.006.

Huang, R. y Chen, H. (2018). "Evaluation of inactivating Salmonella on iceberg lettuce shreds with washing process in combination with pulsed light, ultrasound and chlorine", *International Journal of Food Microbiology*, 285, pp. 144-151. Doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2018.08.024.

- Jajere, S. M. (2019). "A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance". *Veterinary World*, 12(4), 504-521. Doi:10.14202/vetworld.2019.504-521
- Jobling S. (2004). "Improving starch for food and industrial applications". *Current Opinion in Plant Biology*; 7, pp. 210-8. Doi: 10.1016/j.pbi.2003.12.001
- Koutchma, T. (2009). "Advances in Ultraviolet Light Technology for Non-thermal Processing of Liquid Foods", *Food and Bioprocess Technology* 2:2, 2(2), pp. 138- 155. Doi: 10.1007/S11947-008-0178-3.
- Lacivita, V. et al. (2016). "Surface UV-C light treatments to prolong the shelf-life of Fiordilatte cheese". doi: 10.1016/j.ifset.2016.06.010.
- Laroussi, M. (2005). "Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and State-of-the-Art", *Plasma Processes and Polymers*, 2(5), pp. 391-400. Doi: 10.1002/PPAP.200400078.
- Laroussi, M. y Leipold, F. (2004). "Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure", *International Journal of Mass Spectrometry*, 233(1-3), pp. 81-86. Doi: 10.1016/J.IJMS.2003.11.016.
- Laroussi, M., Mendis, D.A. y Rosenberg, M. (2003). "Plasma interaction with microbes", *New Journal of Physics*, 5(1), p. 41. Doi: 10.1088/1367-2630/5/1/341.
- Morcillo, G., Cortés, E., García, J.L. (2011). *Bioteología y Alimentación*. Madrid, España: Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED).
- Patterson M.F. (2005). "Microbiology of pressure-treated foods". *Appl Microbiol*, 98:1400-1409.
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D.G., y Elliott, P.H. (2010). "Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of Salmonella in low-moisture foods". *Journal of Food Protection*, 73(10), 1919-1936. Doi:10.4315/0362-028x-73.10.1919
- Raso J. and Barbosa-Cánovas G.V. (2003). "Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques", *Critical reviews in food science and nutrition*, 43(3), pp. 265-285. Doi: 10.1080/10408690390826527.
- Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RNVE). (2023). "Informe epidemiológico sobre la situación de la Salmonelosis en España. Año 2022". Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.

Steffen Porwollik, et al. (2014). "Defined Single-Gene and Multi-Gene Deletion Mutant Collections in *Salmonella enterica* sv Typhimurium", *PLoS ONE* 9(7): e99820. Doi: 10.1371/journal.pone.0099820

Zimmerman U, Pilwat G, Riemann F. (1974). "Dielectric Breakdown of Cell Membranes", *National Library of Medicine*, 14(11), pp. 881-889. Doi: 10.1016/S0006-3495(74)85956-4