



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

---



## **Resumen**

El desarrollo de nuevos procesos y/o técnicas de descontaminación y conservación resulta clave para los productos de la pesca dado su corta vida útil, lo que limita su distribución y comercialización y, por lo tanto, disminuye su consumo.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la aplicación de dos tecnologías no térmicas, los ultrasonidos y la luz ultravioleta C, durante el lavado de los filetes de merluza con objeto de reducir su carga microbiana y así conseguir alargar su vida útil.

La hipótesis de trabajo es que la aplicación “conjunta” de ultrasonidos y luz UV podría resultar útil para la descontaminación de los filetes de merluza ya que los ultrasonidos, debido a su capacidad para mejorar los procesos de transferencia de masa, liberarían al agua de lavado los microorganismos presentes en la superficie del pescado, siendo estos microorganismos inactivados por la acción de la luz UV.

Para estudiar esta hipótesis, se han realizado diferentes ensayos en los que filetes de merluza han sido sometidos a un lavado asistido por las dos tecnologías, bien por separado, o bien en conjunto y utilizándose diferentes configuraciones (aplicación simultánea o sucesiva).

Los resultados obtenidos en cuanto a la descontaminación de los filetes de merluza indican que, en las condiciones estudiadas, se consiguió reducir, como mucho, entre 0,5 y 1 ciclo logarítmico la carga microbiana de dichos filetes, sin embargo, en la mayoría de los casos estas reducciones no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Por otra parte, la aplicación de luz UV para la descontaminación del agua de lavado sí se probó efectiva ya que los tratamientos estudiados consiguieron reducir hasta 4 ciclos logarítmicos de distintas especies microbianas y a caudales de hasta 60 L/h. Los resultados obtenidos indican que, si bien la aplicación de US y luz UV resultó útil para reducir la carga microbiana, la liberación de microorganismos de la superficie del pescado era progresiva lo que limita la utilidad de los diseños desarrollados, requiriéndose nuevas investigaciones al respecto.

## **Abstract**

The development of new processes and/or decontamination and conservation techniques is key for fishing products due to their short shelf-life, which limits their distribution and commercialization and, therefore, decreases their consumption.

The objective of the present work is to evaluate the effect of the application of two non-thermal technologies, ultrasounds and ultraviolet light C, during the washing of hake fillets in order to reduce their microbial load and thus extend their shelf-life.

The working hypothesis is that the "conjunct" application of ultrasound and UV light could be useful for the decontamination of hake fillets since ultrasound, due to its ability to improve mass transfer processes, would release the washing water the microorganisms present on the surface of the fish, being these microorganisms inactivated by the action of UV light.

To study this hypothesis, different tests have performed in which hake fillets have been subjected to a washing assisted by the two technologies, either separately or together and using different configurations (simultaneous or successive application).

The results obtained regarding the decontamination of hake fillets indicate that, under the conditions studied, it was possible to reduce, at most, between 0.5 and 1 logarithmic cycle the microbial load of these fillets, however, in most of the cases these reductions were not statistically significant ( $p > 0.05$ ). On the other hand, the application of UV light for the decontamination of the washing water was proven effective since the treatments studied managed to reduce up to 4 logarithmic cycles of different microbial species and at flow rates of up to 60 L / h. The obtained results indicate that, although the application of US and UV light was useful to reduce the microbial load, the release of microorganisms from the surface of the fish was progressive which limits the usefulness of the designs developed, requiring further research in this regard.

## Índice

1. Introducción .....	1
1.1. Luz ultravioleta .....	3
1.2. Ultrasonidos .....	7
2. Justificación y objetivos .....	10
3. Material y métodos.....	11
3.1. Toma de muestras y análisis microbiológicos.....	12
3.2. Tratamientos aplicados .....	16
3.2.1. Evaluación de la aplicación ultrasonidos en filetes de merluza .....	16
3.2.2. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta y ultrasonidos en filetes de merluza .....	17
3.3. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta y ultrasonidos en filetes de merluza con un sistema de recirculación.....	18
3.4. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta en serie y ultrasonidos en filetes de merluza con un sistema de recirculación .....	19
3.5. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta en serie y en la superficie del baño ultrasónico con un sistema de recirculación.....	22
3.6. Análisis estadístico de los resultados .....	23
4. Resultados y discusión .....	23
4.1.1. Evaluación de la aplicación ultrasonidos en filetes de merluza .....	23
4.2. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta y ultrasonidos en filetes de merluza .....	26
4.3. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta y ultrasonidos en filetes de merluza con un sistema de recirculación.....	30

4.4. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta en serie y ultrasonidos en filetes de merluza con un sistema de recirculación .....	31
5. Conclusiones .....	43
6. Bibliografía.....	44

## 1. Introducción

El pescado tiene una gran importancia tanto a nivel económico como de consumo. Tanto es así que, en el año 2016, en España se consumieron 25,49 kg por persona y año, suponiendo un valor total cercano a los 9 millones de euros. El pescado fresco se situó como el de mayor importancia con prácticamente la mitad del consumo de pescado total (11,54 kg por persona y año). Es de destacar que el mayor canal de venta de pescado son los supermercados y/o autoservicios, coincidiendo a su vez con el menor precio medio (€/kg) del mismo (MAPAMA, 2017). Los beneficios del consumo de pescado sobre la salud cardiovascular han sido ampliamente demostrados, debido al contenido en ácidos grasos omega 3, así como otros nutrientes característicos de este tipo de productos (He *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Chowdhury *et al.*, 2012). A pesar de estos efectos positivos para la salud, el consumo de pescado sigue siendo menor respecto al de la carne, que en España se sitúa en 50,13 kg por persona y año en 2016; es decir, el doble que de pescado (MAPAMA, 2017).

Por otra parte, los consumidores buscan que en los productos procesados la presenten la mayor similitud posible al alimento fresco, con todo lo que ello conlleva, tanto organolépticamente como nutricionalmente. Los microorganismos presentes en el pescado, junto con los que se puedan incorporar durante el proceso de fileteado y preparación en bandejas, son los principales responsables del deterioro de este producto en fresco, produciendo malos olores y sabores (Ozer and Demirci, 2006). No obstante, no se debe olvidar que el pescado además de por los microorganismos, el pescado puede sufrir alteraciones debido a la autólisis enzimática y la oxidación lipídica.

El crecimiento microbiano y su metabolismo conduce a la producción de aminas, sulfuros, ácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos y cetonas, sustancias que generan olores desagradables, limitando la comercialización del producto (Gram *et al.*, 2002). En este sentido, es necesario señalar que la composición de la microbiota del pescado en origen depende de la calidad microbiológica del agua donde viva y de las condiciones de captura. Esta microbiota evoluciona a lo largo de las diferentes etapas de procesado y distribución, además de depender en gran medida de la temperatura y atmósfera de almacenamiento. Por otro lado, en los últimos años se ha introducido el concepto de organismo específico del deterioro “specific spoilage organism” (SSO), que ayuda a comprender el mecanismo de actuación de estos microorganismos sobre el pescado. Se trata de bacterias presentes

en el producto, que normalmente constituyen una pequeña fracción de la microbiota en pescados y mariscos recientemente procesados, pero que de forma rápida producen olores y sabores desagradables asociados con el deterioro (Gram y Dalgaard, 2002).

Es por acción de estos microorganismos por los que la vida útil del pescado es relativamente corta por lo que cualquier estrategia que permita ralentizar su desarrollo o que conduzca a su eliminación resultaría de gran interés. La disminución de la temperatura ha sido durante las últimas décadas la tecnología más utilizada para conseguir alargar la vida útil de los alimentos incluido el pescado. Uno de los problemas derivados de esta tecnología es que las propiedades sensoriales de los productos pesqueros se alteran con mayor facilidad que las de la mayoría de otros productos alimenticios, incluso a temperaturas de refrigeración/congelación. Por ello, resulta especialmente interesante buscar métodos para reducir la carga bacteriana, especialmente aquella presente en la superficie, de forma previa a la refrigeración/congelación del producto.

Tecnologías como el calor, tan ampliamente utilizadas con el fin de reducir la carga microbiana, no se pueden aplicar a muchos productos frescos (como el pescado), debido al cambio que producen en sus propiedades organolépticas y nutricionales (Mañás y Pagán, 2005). Esto ha hecho que desde los años 80 del siglo pasado se estén estudiando y empezando a aplicar nuevas tecnologías como los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje, ultrasonidos, radiaciones ionizantes, etc. como potenciales sustitutas de estas tecnologías “tradicionales” (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003). Además, la aplicación de estas tecnologías implicaría un menor coste energético, y tendrían un menor impacto medioambiental, lo que las hace especialmente interesantes para las industrias alimentarias (Boye y Arcand, 2013). En el caso concreto del pescado, son diversos los estudios sobre la aplicación de estas nuevas tecnologías aplicadas por sí solas o en combinación con procesos tradicionales con el fin de reducir la carga microbiana del pescado fresco o procesado (Ozer y Demirci, 2006; Pedrós-Garrido *et al.*, 2017). En este trabajo, se va a evaluar las posibilidades que ofrece el uso de ultrasonidos como coadyuvante del proceso de lavado de filetes de pescado, y de la luz UV-C tanto con el mismo fin, como para higienizar el agua de lavado utilizado en dicho proceso de lavado.

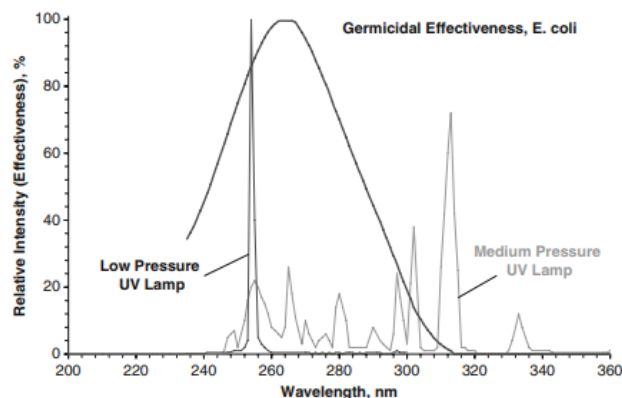
Es por ello que a continuación se presenta un breve resumen del estado del arte de ambas tecnologías, principalmente centrado en su mecanismo de acción y sus aplicaciones.



## 1.1.Luz ultravioleta

Tradicionalmente, la radiación ultravioleta (UV) ha sido utilizada como higienizante del aire, superficies y agua. La industria alimentaria ha mostrado un interés creciente para su aplicación sobre productos líquidos y la superficie de alimentos sólidos. La radiación UV es una tecnología emergente no térmica y presenta una serie de ventajas tales como que permite la inactivación de microorganismos contaminantes y patógenos, sin apenas producir pérdidas de la calidad nutritiva y sensorial, no conociéndose efectos tóxicos producidos por este tipo de tratamientos, y siendo además su consumo energético bajo en comparación con otras tecnologías (Kowalski, 2009).

La luz UV se encuentra en el rango de 200 a 400nm del espectro electromagnético, dividiéndose en tres regiones: UV de onda corta (UV-C), de 200 a 280nm; UV de onda media (UV-B), de 280 a 320nm; y UV de onda larga (UV-A), de 320 a 400nm. Los efectos de la luz ultravioleta sobre el material genético son los principales responsables de la inactivación microbiana, aunque puede ser dañados otros componentes celulares. La luz UV-C, producida por lámparas de baja presión de mercurio, es la que tiene un mayor efecto germicida, puesto que su máxima emisión se produce a longitudes de onda (260 a 265 nm) próximas a la de absorción por el DNA (254 nm) (Figura 1). Los mecanismos de inactivación de la luz UV se basan en las lesiones producidas sobre el material genético en función del tipo de radiación aplicada (UV-C, UV-B o UV-A). En el caso de los UV-C, estos inducen la formación de fotoproductos debido a la absorción de fotones por los ácidos nucleicos pirimidínicos y púricos, como la formación de dímeros de timina (López-Malo y Palou, 2005; Kowalski, 2009).



**Figura 1.** Eficiencia germicida de longitudes de onda del UV, comparando lámparas de alta y baja presión con la efectividad germicida para *E. coli* (Kowalski, 2009).

Hay numerosos factores que determinan la eficacia de la luz UV para inactivar microorganismos (Tabla 1), tanto de procesado, como relativos a las características del propio microorganismo, como relativos a las características del producto a tratar (Gayán, Condón y Álvarez, 2014a). En el caso de los factores de procesado, se incluirían la longitud de onda de emisión (como ya se ha explicado) y la dosis de luz UV aplicada. De forma general, cuanto mayor sea la dosis aplicada, mayor será el efecto de la luz UV. En este punto es necesario destacar que la dosis aplicada estará muy condicionada por cómo se aplique el tratamiento y, sobre todo, el tipo de alimentos a tratar, lo que a su vez condicionará el sistema o equipo utilizado para aplicarlo. De forma general, los equipos más utilizados para la higienización en la industrias alimentarias independientemente de la aplicación son las lámparas de mercurio de baja presión (low-pressure, LP) y media presión (mid-pressure, MP) y las lámparas de luz pulsada de xenón, más conocida como pulsos de luz UV (pulsed UV light, PUV) (Kowalski, 2009).

En cuanto a los factores tanto intrínsecos (especie, cepa, etc.) como extrínsecos (fase de crecimiento, temperatura, etc.) de los microorganismos y, de forma general, todos ellos afectan en menor medida a la resistencia a la luz UV que frente a otras tecnologías como el calor (Gayán, Condón y Álvarez, 2014a). Por ello, en este trabajo estos factores apenas han sido objeto de estudio, salvo en el caso de la influencia del género microbiano.

Finalmente, el producto a tratar es el que determina en mayor medida la eficacia letal de la luz UV-C. El ejemplo más claro de este fenómeno es que en el caso de los alimentos sólidos la luz no penetra en el interior del producto, viéndose el efecto de la luz UV limitado a la desinfección de la superficie. Adicionalmente, la efectividad de la luz UV-C para este propósito también depende del tipo de alimento, así como de la disposición y número de lámparas empleadas. Así, las superficies de los alimentos presentan (o pueden presentar) irregularidades y asperezas a nivel microscópico, creando sombras y hendeduras ofreciendo protección a los microorganismos frente a la exposición de luz UV (Yaun *et al.*, 2004). Debido a esto, la luz UV-C es más eficaz para la desinfección de superficies lisas debido a la incidencia directa de la luz. La utilización de luz UV a dosis de  $0,4 \text{ J/cm}^2$  para el tratamiento de superficies de alimentos inoculadas con un cóctel de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, y *Staphylococcus aureus* condujo a , reducciones de aproximadamente  $0,5 \text{ log UFC/g}$  en carne cruda y pollo hasta  $4 \text{ log UFC/g}$  en tomates, mientras que, tras el mismo tratamiento, ningún patógeno se recuperó en superficies de acero inoxidable (Sommers, Sites y Musgrove, 2010). De las

misma forma un tratamiento de UV a 1 J/cm<sup>2</sup> inactiva aproximadamente 0,5 ciclos logarítmicos de *Francisella tularensis* Utah-112 inoculada en pechugas de pollo, filete de ternera, y filetes de pescado, 1,9 ciclos en salchichas tipo Frankfurt y bratwurst, y más de 4 ciclos en exudados de estos productos alimenticios depositados en láminas de acero inoxidable (H. Sommers *et al.*, 2012).

Process parameters	Microbial characteristics		Product parameters
Dose (c)	Intrinsic factors		pH
Wavelength (c)	Type (c)	Cell wall thickness	$a_w$
	Specie (b)	Cell size	Absorption coefficient (c)
	Strain (c)	Pigmentation	Turbidity (b)
		DNA molecule (size, composition, compaction)	
	Extrinsic factors	Efficiency of repair mechanisms	
		Membrane fluidity	
		Growth phase (b)	
		Growing conditions	Medium composition (a)
			Temperature
		Stresses	Oxidative shock (a)
			Acid shock (b)
			Basic shock (a)
			Osmotic shock
			Heat/IR shock (c)
	Starvation stress (b)		
	Visible light (b)		
	Recovery conditions	UV (homologous protection)	
		Medium composition (a)	
		LHR (a)	
		Photoreactivation (c)	

**Tabla 1.** Clasificación de los factores de influencia en la resistencia de los microorganismos a la luz UV. Las letras de la “a” a la “c” indica la relevancia de cada factor (a- ninguna; b- relevante; c- muy relevante) (Gayán, Condón y Álvarez, 2014a).

También hay datos publicados sobre el efecto de la luz UV en filetes de salmón utilizando sólo lámparas de luz UV o en combinación con otras tecnologías como los ultrasonidos o agua ionizada (Ozer y Demirci, 2006; Mikš-Krajnik *et al.*, 2017).

observándose efectos aditivos de los distintos tratamientos aplicados. Recientemente, Pedrós-Garrido *et al.*, (2017) han determinado una reducción de la carga microbiana de filetes de salmón de hasta una unidad logarítmica aplicando tratamientos de 90 segundos con lámparas de mercurio de baja presión de 95W a una distancia de 6 cm.

En el caso de los líquidos, se ha comprobado que cambios en el pH y en la actividad de agua ( $a_w$ ) apenas afectan en los tratamientos UV, lo que facilita la aplicación de esta tecnología a cualquier alimento líquido independientemente de estos factores (Gayán, Condón y Álvarez, 2014a). Sin embargo, las características ópticas de los productos determinan enormemente la eficacia letal de los UV, siendo principalmente la absorbancia y la turbidez del medio los parámetros más determinantes. Esto es debido a que la cantidad de fotones que inciden sobre el ADN de los microorganismos se ve reducido por las partículas presentes en el medio. El coeficiente de absorción ( $\alpha$ ) es considerado un buen indicador de la distancia de penetración de los UV, habiendo una relación entre  $\alpha$  y la eficacia letal UV (Koutchma, 2009). Por lo tanto, a una mayor turbidez y/o coeficiente de absorción, menor efecto de los UV sobre los microorganismos.

Independientemente de los factores que condicionan la eficacia letal de los UV, en la literatura no hay un consenso en cómo describir las cinéticas de inactivación, si bien en los primeros trabajos se ha descrito la inactivación microbiana con cinéticas de primer orden (Oteiza, Giannuzzi y Zaritzky, 2010; Pataro y Lyng, 2016), definiendo de forma similar a los tratamientos térmicos el parámetro  $D_{UV}$  como la dosis necesaria de luz UV-C para reducir la población microbiana un 90%. Sin embargo, normalmente los resultados obtenidos sufren desviaciones de la linealidad, observándose hombros, colas o ambos, en las gráficas de supervivencia (Sastry, Datta y Worobo, 2000). La aparición de hombros se ha asociado con la capacidad de reparación por parte de la célula de los daños generados en el ADN, produciéndose una muerte exponencial cuando los daños producidos por la luz UV-C exceden la capacidad de los mecanismos reparadores del ADN (Ganesan y Smith, 1968; López-Malo y Palou, 2005). En el caso de la formación de colas, se ha asociado a agregados celulares o subpoblaciones con una mayor resistencia a los UV, así como la asociación con diferentes partículas en medios líquidos (Mamane-Gravetz y Linden, 2005; Vélez-Colmenares, Acevedo y Nebot, 2011).

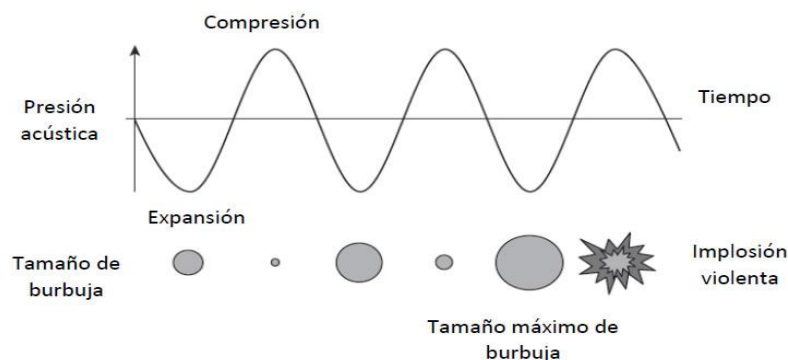
Dada la eficacia de esta tecnología en medios líquidos de bajo coeficiente de absorción, en los últimos años se han desarrollado numerosas aplicaciones en la industria

alimentaria sobre todo para el tratamiento de aguas, aunque también hay desarrollos para jarabes de glucosa y fructosa e incluso líquidos de mayor coeficiente de absorción como té o zumos (Keyser *et al.*, 2008; Mansor *et al.*, 2014; Islam *et al.*, 2016; Gunter-Ward *et al.*, 2018) en los que el producto se hace pasar por un reactor cilíndrico en cuyo interior se encuentra una o varias lámparas de luz UV-C. En el caso del tratamiento de agua la tecnología es muy eficaz utilizándose la luz UV como sistema de desinfección en lugar del cloro. En el caso de líquidos con partículas o con mayor viscosidad, se han desarrollado distintas instalaciones para aumentar la exposición del producto a la luz UV (Gayán, Condón y Álvarez, 2014b) así como distintos procesos combinados para aumentar la eficacia letal de la luz UV como es su aplicación a temperaturas subletales. Así por ejemplo, la inactivación de *Escherichia coli* por UV-C (13,5 J/mL) en zumo de naranja incrementó de 0,84 ciclos logarítmicos a 50 °C hasta más de 6 ciclos a 60 °C (Gayán *et al.*, 2012)

## 1.2.Ultrasonidos

Los ultrasonidos son ondas sonoras cuya frecuencia es superior a la perceptible por el oído humano (>16 kHz), denominándose de alta potencia (los más interesantes para las aplicaciones que se plantean) aquellos ultrasonidos con frecuencias comprendidas entre los 20 y 40 kHz.

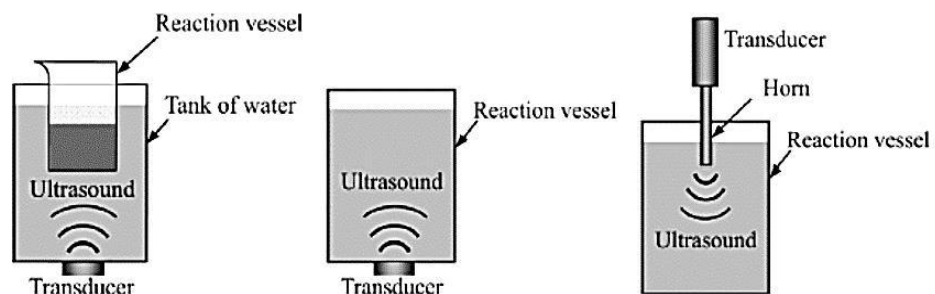
Los ultrasonidos generados se aplican sobre el sistema a tratar propagando las ondas a través de un medio líquido o gaseoso. Cuando los ultrasonidos se propagan en un medio líquido, se produce el fenómeno de cavitación que consiste en la formación, crecimiento y súbita implosión de burbujas de gas (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema del fenómeno de cavitación producido por los ultrasonidos (Salazar *et al.*, 2010).

Según consideraciones teóricas, se estima que en el punto de implosión se alcanzan presiones y temperaturas de alrededor de 100 MPa y 5000 °C. A pesar de ello no se observa un aumento importante de la temperatura del líquido pues se considera que, en el punto de la implosión, las velocidades de calentamiento y enfriamiento son del orden de  $10^{-9}$  °C/s (Suslick, 1994; Beckett y Hua, 2001). El resultado de la implosión es la generación de grandes fuerzas de cizalla en los puntos de cavitación, así como la denominada agitación acústica que son las responsables de los efectos biológicos de los ultrasonidos entre los que se incluye la inactivación de microorganismos (Chemat, Zill-e-Huma y Khan, 2011) . Cuando este colapso se produce en la interfase entre el líquido y un sólido se genera una corriente de líquido, conocido como “microjet”, que provoca un golpe en la superficie del sólido con una velocidad de unos 400 km/s (Swamy, Narayana y Misra, 2005; Hemwimol, Pavasant y Shotipruk, 2006) disminuyendo así el espesor de la capa límite del producto pudiendo mejorar procesos de transferencia de masa e incluso, en el caso de microorganismos, el despegue de estos, siendo este efecto aprovechado por ejemplo para la eliminación de biofilms de las superficies de equipos (Baumann, Martin y Feng, 2009).

Existen diferentes tipos de sistemas de aplicación de ultrasonidos de potencia en función del medio en el que se van a utilizar y de los efectos que se quieren producir en el mismo. Es fundamental conseguir un buen acople entre el sistema de aplicación y el medio para que el sistema sea eficiente, haciendo llegar así la mayor cantidad posible de energía a la muestra a tratar. Los principales sistemas comerciales de aplicación de ultrasonidos en medio líquido son los baños de ultrasonidos (sonicación indirecta) y los sistemas tipo sonda (sonicación directa) (Figura 3) (Ciudad Hidalgo, 2018).



**Figura 3.** Métodos principales de irradiación de los ultrasonidos: a) y b) indirecto y c) directo. (Ciudad Hidalgo, 2018)

Los baños de ultrasonidos constituyen quizás el sistema de generación de ultrasonidos indirecto más conocido y accesible en un laboratorio dado su bajo coste y fácil mantenimiento. Estos equipos consisten en un tanque al que uno o varios transductores (de 40-130 kHz habitualmente), de un material piezoeléctrico como una lámina de zirconato de titanio o en ocasiones cuarzo, han sido fijados, normalmente en la parte inferior. La muestra es sumergida en agua o en una disolución de forma que los ultrasonidos son irradiados a través del medio líquido (Povey y Mason, 1998). Si bien es un sistema muy extendido, su principal limitación es la falta de uniformidad del campo ultrasónico en todo el volumen tratado. Por el contrario, este aspecto no sucede con las sondas de ultrasonidos que permiten alcanzar elevadas intensidades de campo ultrasónicos, aunque su precio y sobre todo el pequeño volumen de tratamiento limitan su uso en determinadas aplicaciones.

Basándose en estos equipos y la cavitación conseguida, los ultrasonidos se están evaluando e incluso utilizando a nivel industrial para diversas aplicaciones. Por ejemplo, se ha observado que mejoran la mezcla, homogeneización y/o emulsificación de líquidos inmiscibles como sucede en el caso de la leche con su fase grasa (Wu, Hulbert y Mount, 2000) o en la elaboración de la mayonesa u otras salsas (Chandrapala *et al.*, 2012). En productos sólidos sumergidos en líquidos, aceleran los procesos de transferencia de masa como la extracción de componentes intracelulares de tejidos vegetales principalmente al líquido de extracción como azúcar de remolacha (Veress, Sebok y Suciú, 1995), saponinas de ginseng (Wu, Lin y Chau, 2001), isoflavonas de soja (Rostagno, Palma y Barroso, 2003), polifenoles, aminoácidos y cafeína del té verde (Xia, Shi y Wan, 2006), o la penetración de soluciones hipertónicas, como salmueras o soluciones de azúcares (Cárcel *et al.*, 2012) y la salida de agua de los alimentos (Mulet *et al.*, 2003), acelerando los procesos salazonado de carnes y quesos (Cárcel *et al.*, 2012) entre otros productos.

El uso de los ultrasonidos para la descontaminación de alimentos sólidos es un tema que se está estudiando y del que se disponen pocos datos, la mayor parte de ellos a escala de laboratorio y para productos de origen vegetal (Piyasena, Mohareb y McKellar, 2003; Bilek y Turantaş, 2013; Majid, Nayik y Nanda, 2015). No obstante, los ultrasonidos se han propuesto y/o evaluado como método de inactivación o descontaminación con resultados prometedores, tal y como demuestran los experimentos realizados por Lillard (1993) en los que determinó la reducción de *Salmonella Typhimurium* en pechuga de pollo de hasta 1-1,5 ciclos logarítmicos. De forma similar, el uso de los ultrasonidos se

ha propuesto como alternativa a la utilización de productos químicos para la descontaminación de vegetales, mediante la adaptación del equipo de ultrasonidos al propio tanque de lavado de dichos vegetales. En este caso, también se han observado resultados satisfactorios en varias materias vegetales como por ejemplo 4,4 log<sub>10</sub> UFC/g de reducción de *E. coli* O157:H7 en lechuga (Elizaquível *et al.*, 2012), y 0,6 log<sub>10</sub> UFC/g en el caso de la fresa para el recuento de células viables totales (Cao *et al.*, 2010).

Por ello, tal y como se deduce del caso de las industrias vegetales, los ultrasonidos serían una tecnología fácilmente implementable en la fase de lavado, y que, además presenta otras ventajas como que es considerada una de las “tecnologías verdes” más importantes de entre las utilizadas actualmente en el procesado de alimentos (Awad *et al.*, 2012). En el caso concreto de pescados, la descontaminación y la calidad tras un tratamiento ultrasónico apenas ha sido estudiada hasta la fecha. Recientemente, Pedrós-Garrido *et al.* (2017) observaron una reducción de la microbiota general de distintos filetes de pescado (merluza, salmón y bacalao) de hasta 0,5 UFC/g aplicando tratamientos de ultrasonidos de 30 kHz con tiempos de tratamiento de 40 minutos.

## 2. Justificación y objetivos

Hoy en día, la calidad higiénica de los productos alimenticios es de gran importancia para la industria alimentaria, pero sobre todo para el consumidor. Esto es de especial importancia en la industria pesquera en la que se demandan nuevos procesos o técnicas que permitan alargar la vida útil de sus productos mejorando su distribución y comercio y, por lo tanto, su consumo, reduciendo pérdidas de producto y creando así un modelo más sostenible. El pescado, así como sus productos procesados tales como los filetes envasados en atmósferas protectoras, son muy perecederos debido a la acción/crecimiento de los microorganismos presentes en ellos. Es por ello que cualquier estrategia o tecnología que permita controlar su desarrollo o reducir su concentración es de gran interés para este sector. La aplicación de ultrasonidos y/o luz UV-C podrían ser una estrategia interesante para alcanza dicho fin. No obstante, si bien existen algunos datos al respecto, son escasos (sino inexistentes) en el caso de filetes de merluza y apenas se ha investigado su aplicación combinada ni en condiciones que simulen su aplicación a nivel industrial. Es por ello que el objetivo del presente trabajo ha sido evaluar el efecto de la aplicación de estas tecnologías durante el la lavado de los filetes de merluza. Con



esta estrategia se pretende reducir la carga microbiana presente en los filetes, lo que resultaría en una mayor vida útil de los mismos.

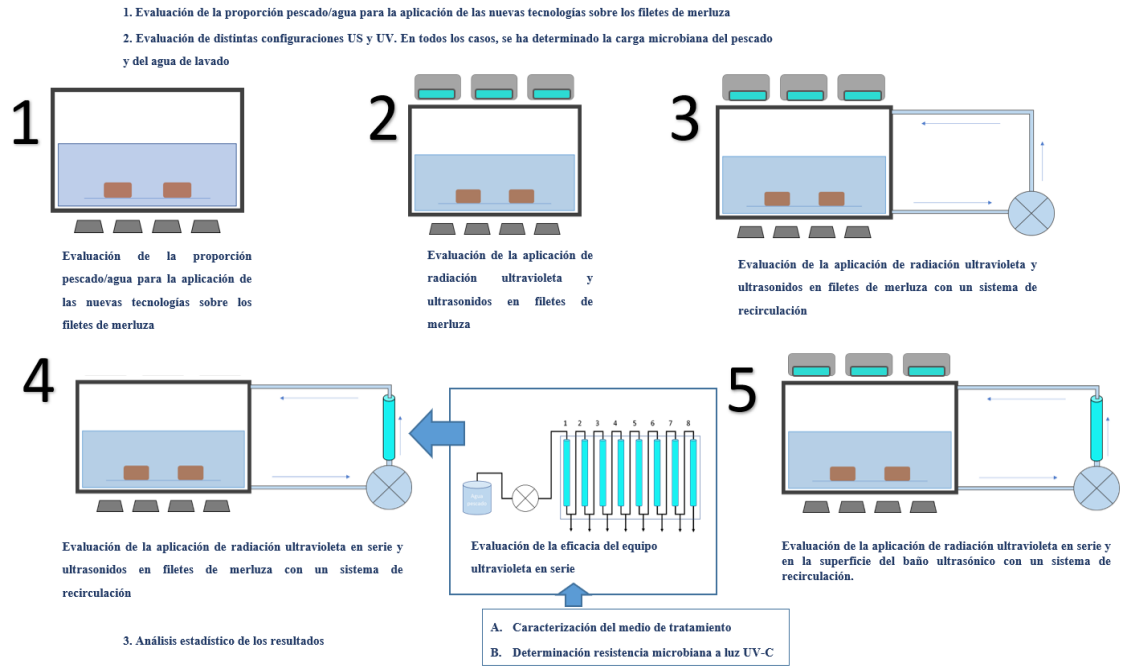
La hipótesis de trabajo es que la aplicación de ultrasonidos podría, por una parte, producir la inactivación de parte de la microbiota y, por la otra, liberar al agua de lavado de otro porcentaje de la población, como ya ha sido demostrado en trabajos anteriores (Artáiz, 2016). La radiación UV, por su parte, actuaría produciendo la inactivación microbiana tanto en la superficie de los filetes de merluza como en el agua de lavado, permitiendo su reutilización con el consiguiente ahorro de agua.

La consecución del objetivo planteado conllevará por tanto evaluar los efectos de ambas tecnologías de forma individual y combinada con el fin de comprobar si el proceso combinado presenta efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos. Esto permitirá diseñar y proponer un sistema que pudiera ser escalable a escala industrial y así dar respuesta a los objetivos planteados en el proyecto ECO-INNOVATIVE PROCESSING TECHNOLOGY FOR BETTER QUALITY AND SHELF LIFE OF FISH PRODUCTS-ULTRAFISH (H2020 Grant Agreement Number 767839).

### 3. Material y métodos

En este trabajo, se van a evaluar diferentes tecnologías, ultrasonidos y radiación UV-C, de forma individual y combinada en distintas configuraciones para el lavado de filetes de merluza evaluando para ello su carga microbiana, así como la del agua de lavado. La Figura 4 muestra un esquema de las pruebas realizadas, así como de las distintas configuraciones testadas. Tanto esta sección como la de “Resultados y discusión” se desarrollarán siguiendo este esquema.

En todos los experimentos, se utilizaron filetes de merluza nacional (*Merluccius merluccius*) suministrados por la empresa Scanfisk Seafood, S.L. con piel o sin ella, según el estudio. La zona de captura de la merluza utilizada para este estudio fue el Mar Cantábrico (zona FAO 27). Los filetes tenían un peso aproximado de 400 a 800 gramos cada uno. El medio de lavado de los filetes de pescado era agua destilada MiliQ esterilizada en autoclave 121°C y adicionada con un 0,9% de NaCl (Panreac, Barcelona, España).

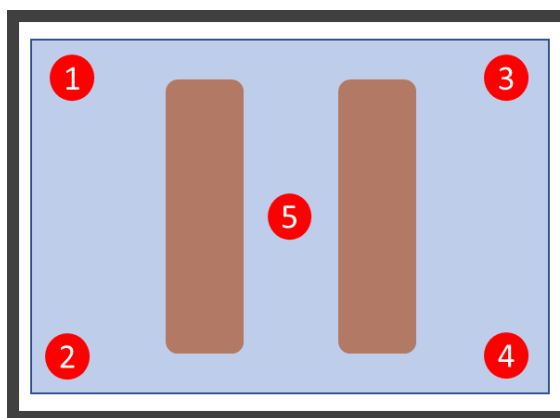


**Figura 4.** Esquema de las pruebas realizadas y configuraciones testadas en el presente trabajo.

### 3.1. Toma de muestras y análisis microbiológicos.

Para la cuantificación de la microbiota contaminante general (aerobios mesófilos y psicrótofos), del pescado, así como de los grupos microbianos especificados en la Tabla 3 tanto de las muestras control y tratadas, se obtuvieron muestras de 10 g de merluza a partir de los filetes. Estas muestras se sumergieron en 90 mL de agua de peptona tamponada (APT; Oxoid, Hampshire, England) con un 0,85% de NaCl (Panreac, Barcelona, España) y se homogeneizaron en un Stomacher 400 Circulator (Seward, Worthing, Reino Unido) durante 30 segundos a 230 rpm. A partir de este homogeneizado se realizaron las diluciones decimales correspondientes en APT+0,85 % de NaCl y se sembraron las placas -previamente preparadas- mediante homogeneización en superficie utilizando asas de Drigalsky estériles.

En el caso del agua de lavado, tras introducir los filetes de pescado en el agua antes de aplicar ultrasonidos o luz ultravioleta y tras los correspondientes tratamientos, se tomaban 5 mL de agua de diferentes puntos del baño de ultrasonidos tal y como se muestra en la Figura 5. Tras las correspondientes diluciones decimales en APT+0,85 % de NaCl, se sembraron en placas de forma similar a como ya se ha explicado para las muestras de pescado.



**Figura 5.** Esquema de los puntos de los cuales se obtenían las muestras del agua de tratamiento

Una vez sembradas, las placas se incubaron en las condiciones que se describen en la Tabla 2 para la cuantificación de los diferentes grupos microbianos. La tabla incluye la temperatura y tiempo de incubación, así como el tipo de atmósfera (aeróbica o anaeróbica) y de siembra (en superficie o en masa).

En el caso de la microbiota aerobia mesófila, si bien procedimiento habitual para su determinación debería haber sido según describe la ISO 4833-2:2013 consistente en la inoculación de la muestra en “Plate Count Agar” (PCA), la extensión en superficie e incubación a 30 °C, en este trabajo y en base a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Artáiz, 2016) y los trabajos de autores como Broekaert *et al.*, (2011) se ha utilizado el agar Long y Hammer (LH), que se preparó según Broekaert *et al.*, (2011), ya que, en ocasiones, el recuento en PCA infravalora el recuento microbiológico. El agar LH se utiliza normalmente para recuperar los microorganismos de origen marino debido a la inclusión de hasta un 1% de NaCl ya que los principales SSO del pescado requieren un alto contenido en solio y otros iones para crecer (Farmer y Hickman-Brenner, 2006).

Cuando se indique, se cuantificaron distintos grupos microbianos utilizando los medios de cultivo y condiciones descritos en la Tabla 2.

En determinadas pruebas, concretamente en los estudios sobre la resistencia microbiana a la luz UV-C en el agua de lavado, el agua se contaminó con distintos microorganismos pertenecientes a los géneros *Salmonella* (*S. typhimurium* cepa SL1344), *Listeria* (*L. monocytogenes* cepa CECT 5672) y *Photobacterium* (*Photobacterium* P513) preparando un cultivo puro según se describe a continuación. En todos los casos, con un

asa de siembra se tomaba una muestra del correspondiente criovial almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se inoculaba en 50 mL de caldo TSB (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) junto con un 0,6% de extracto de levadura (EL) (Oxoid, Hants, Reino Unido) para *Salmonella* y *Listeria*, caldo LH para *Photobacterium*, procediendo a su incubación con agitación durante 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  para *Salmonella* y *Listeria*, y durante 3-4 días a  $15^{\circ}\text{C}$  en el caso de *Photobacterium*, alcanzándose concentraciones finales de  $2 \cdot 10^9$ ,  $10^8$  y  $10^6$  UFC/mL, respectivamente.. Una vez preparadas las suspensiones, se adicionaron a 600 mL de agua de lavado 1 mL del cultivo de *Salmonella* SL1344, 10 mL del de *Listeria* CECT5672 y 10 mL del de *Photobacterium* P513, logrando concentraciones de  $3 \cdot 10^6$ ,  $1,6 \cdot 10^6$  y  $3,6 \cdot 10^4$  UFC/mL, respectivamente. Señalar que como se quería determinar el efecto de la luz UV-C en las condiciones de menor eficacia de la tecnología (elevado coeficiente de absorción y turbidez), el agua de lavado utilizada para las pruebas correspondía a la resultante tras un proceso de lavado de filetes de pescado tras 2 minutos de tratamiento aplicando ultrasonidos de 25 kHz y 100% potencia. Para evitar resultados erróneos, el agua se esterilizó haciéndola pasar repetidas veces por la instalación de luz ultravioleta comprobando ausencia de microorganismos antes de su contaminación con las bacterias objeto de estudio. Una vez realizados los tratamientos, se tomaban muestras de 0,1 mL y se sembraban en superficie como ya se ha descrito en agar Xylose-Lysine-Desoxycholate (XLD) (Oxoid, Hants, Reino Unido), agar selectivo para PALCAM-*Listeria* (base) según van Netten *et al.*, (1989) para microbiología (PALCAM) (Oxoid, Hants, Reino Unido) y agar LH, respectivamente, para *Salmonella*, *Listeria* y *Photobacterium*, y se incubaron a las mismas temperaturas y tiempos que los utilizados para obtener el cultivo puro. Cuando se indica, se cuantificó la presencia de *Photobacterium* en el pescado antes y después de un tratamiento de lavado asistido con ultrasonidos y luz UV-C mediante la técnica de qPCR puesta a punto en el grupo de investigación de “Nuevas tecnologías de procesado de los alimentos” junto con la empresa Alkizvetek S.L. según se describe en Calero (2018). De forma resumida el DNA fue purificado a partir de 0,1 mL del homogeneizado de pescado en Agua de Peptona Tamponada + 0,85 % de NaCl con un kit de extracción Maxwell 16 Lev Blood DNA (Promega, Madison, EEUU) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El DNA extraído se utilizó para cuantificar mediante qPCR de *P. phosphoreum*. Esta se llevó a cabo utilizando el Real-GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison) y los cebadores descritos en Macé *et al.*, (2013). Los ensayos de qPCR se realizaron en un sistema CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) usando un protocolo de 5 minutos at  $94^{\circ}$  para la activación

de la GoTaq, seguidos de 44 ciclos de 94°C/10 segundos + 55 °C/40 segundos para la hibridación, elongación y medida de fluorescencia. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo por triplicado.

La concentración de *P.phosphoreum* en pescado se determinó utilizando la siguiente ecuación:  $\text{LogNt} = -2,309\text{Ct} + 38,15$ .

Agar	Temperatura (°C)	Tiempo (h:horas; d:días)	Atmósfera	Tipo siembra	Microorganismos recuperados
LH <sup>1</sup>	25	48-72 h	Aerobiosis	Superficie	Aerobios mesófilos
LH	25	48-72 h	Anaerobiosis	Superficie	Anaerobios mesófilos
LH	7	7 d	Aerobiosis	Superficie	Aerobios psicrótrofos
LH	7	7 d	Anaerobiosis	Superficie	Anaerobios psicrótrofos
VRBG <sup>2</sup>	37	48 h	Aerobiosis	Superficie	Enterobacterias
Agar Hierro <sup>3</sup>	25	3-4 d	Aerobiosis	Superficie	<i>Shewanella</i>
GSP <sup>4</sup>	25	24-48 h	Aerobiosis	Superficie	Aeromonas y Pseudomonas
LH	7	7 d	Anaerobiosis	Superficie	<i>Photobacterium</i>

**Tabla 2.** Métodos de cultivo y condiciones para la determinación de los distintos grupos microbianos. <sup>1</sup> Broekaert et al., (2011). <sup>2</sup>Violeta Rojo y Bilis Glucosa Agar (VRBG) (Oxoid, Basingstoke, UK), <sup>3</sup>Agar hierro (Lingby) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). <sup>4</sup>Glutamate Starch Phenol Red Agar (Oxoid, Basingstoke, UK).

## 3.2. Tratamientos aplicados

Como ya se ha indicado, se han aplicado tratamientos de lavado utilizando dos tecnologías: ultrasonidos (US) y luz UV-C aplicados de forma individual y combinada en distintas configuraciones. A continuación, se describen las distintas instalaciones utilizadas desde la más sencilla a la más compleja.

### 3.2.1. Evaluación de la aplicación ultrasonidos en filetes de merluza

Para los tratamientos de US, se utilizó un baño ultrasónico Transsonic TI-H (Elma GmbH & Co, Singen, Alemania) de 10 L de capacidad y 200 W. Este equipo consta de 4 transductores, situados en la base, permitiendo trabajar en dos modos diferentes, “normal” y “degas”. En el modo “normal” los US se aplican de forma continua, mientras que en la función “degas”, los US se discontinuamente aplicando 3 pulsos por segundo. Por otro lado, el equipo permite aplicar US a frecuencias de 30 y 130 kHz a distintas intensidades de potencia desde 0 al 100%.

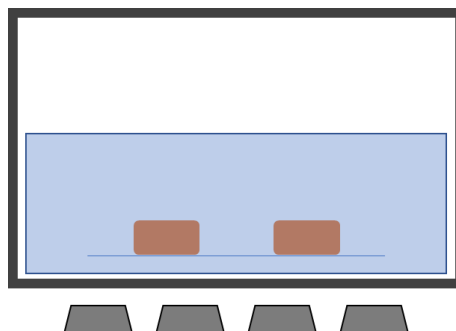
Los tratamientos de US aplicados se basaron en un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación en el que se determinó que un tratamiento de 35 kHz y 200 W a una potencia del 100% en modo “degas” durante 2 minutos permitió la máxima reducción (alrededor de 1 ciclo  $\log_{10}$ ) de la carga microbiana (Artáiz, 2016), con el menor gasto energético y menor incremento de temperatura del agua de lavado. Cuando el protocolo fue en modo “normal” la inactivación fue ligeramente superior de alrededor de 1,2 ciclos logarítmicos.

Se realizó una prueba preliminar con el fin de determinar la posible influencia en los resultados del uso de distintas proporciones de merluza y agua de lavado. De este modo, se evaluaron proporciones 1:3, 1:16 y 1:100 utilizando un volumen total de 1,6 L:

- Agua 1200 mL, merluza 400 g (proporción 1/3).
- Agua 1500 mL, merluza 100 g (proporción 1/16).
- Agua 1584 mL, merluza 16 g (proporción 1/100).

El medio de tratamiento consistió en una disolución de agua + 0,9% NaCl estéril a una temperatura inicial de 4 °C. Todo el sistema se introducía en una cámara de refrigeración a 4 °C para mantener la temperatura constante durante todo el experimento.

Para los experimentos, los filetes de pescado se disponían en la base del baño según se muestra en la Figura 6. Con el fin de evitar que los microorganismos posiblemente liberados quedasen pegados al filete, estos se colocaban sobre una rejilla dejando un espacio de unos 0,5 cm entre el filete y el fondo del baño. Cuando se indica, esta rejilla no se utilizó.

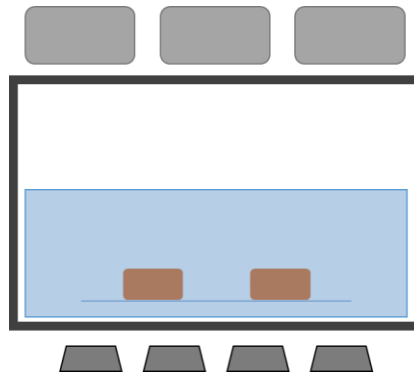


**Figura 6.** Esquema baño ultrasónico, en el que se puede ver los filetes de merluza en el medio de tratamiento.

### 3.2.2. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta y ultrasonidos en filetes de merluza

Con el fin de determinar si los microorganismos que se liberaban al medio al actuar los US podían ser inactivados inmediatamente tras su liberación, se aplicó luz UV-C, mediante unas lámparas dispuestas sobre el baño de ultrasonidos tal y como se muestra en la Figura 7. Las lámparas tienen una potencia de 8 W cada una, lo que supone un total de 24 J/s sobre la superficie del medio, encontrándose a 14 cm de la misma. Para que las lámparas otorguen esta potencia es necesario su encendido al menos 30 minutos antes. La dosis aplicada a esa distancia, se midió con un radiómetro (UVP UVX Radiometer: UVX-25 Sensor, Fischer Scientific, Madrid, España)

Se aplicaron tratamientos de US y US al mismo tiempo que luz UV-C durante 2 minutos. De igual manera que en el experimento anterior, el tratamiento de ultrasonidos se realizó con el mismo baño a 35kHz al 100% de intensidad en modo ‘degas’. Cuando se aplicaron los US y UV-C simultáneamente, una vez sumergido los filetes de pescado se encendían simultáneamente los US y las lámparas de UV-C. Para estas pruebas, se trabajó con una proporción agua:merluza 1:3 (1200 g agua y 400 g de pescado) siendo las proporciones que mejor se adecuaban a la aplicación de las nuevas tecnologías a aplicar.



**Figura 7.** Esquema baño ultrasónico, junto con la disposición de las lámparas UV, en el que se puede ver los filetes de merluza en el medio de tratamiento.

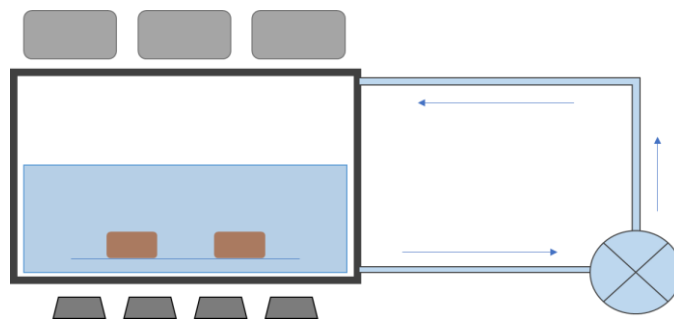
Con el fin de discernir el efecto de la luz UV-C individualmente, se estudió su eficacia letal aplicando tratamientos de luz UV-C durante 1, 3 y 5 minutos sobre 10 g de filetes de merluza, sin medio de tratamiento, utilizando la misma configuración mostrada en la Figura 10. También se evaluó la posible influencia de la presencia de piel en los filetes tratando durante 3 minutos trozos de merluza (10 g) con y sin piel.

### 3.3. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta y ultrasonidos en filetes de merluza con un sistema de recirculación

Debido a que, en la configuración anterior, algunos microorganismos podrían quedar depositados en el baño, se hizo circular el agua del sistema mediante una bomba peristáltica (Ismatec, Eco-line VC-380, Wertheim, Alemania) a un caudal de 12 L/h. Para conocer el caudal al que trabaja la bomba según la potencia asignada (valores numéricos del 01 al 99) el equipo fue caracterizado determinando la relación entre los valores numéricos de control de la bomba y el caudal proporcionado (datos no mostrados). Mediante la incorporación de la bomba al sistema, se logra la renovación del agua haciéndola pasar del fondo a la superficie, tal y cómo se puede observar en la Figura 8. Con ello, se pretendió que el máximo volumen de agua posible se viera afectado por la radiación UV-C.

La metodología a emplear es idéntica a las anteriores, aunque en este caso en el tratamiento denominado ‘control’ no se aplicaba tecnología alguna, únicamente la recirculación producida por la utilización de la bomba. Mientras que en el denominado ‘US+UV recirculación’ se empleaban tanto los ultrasonidos como la radiación UV-C durante los 2 minutos de tratamiento.

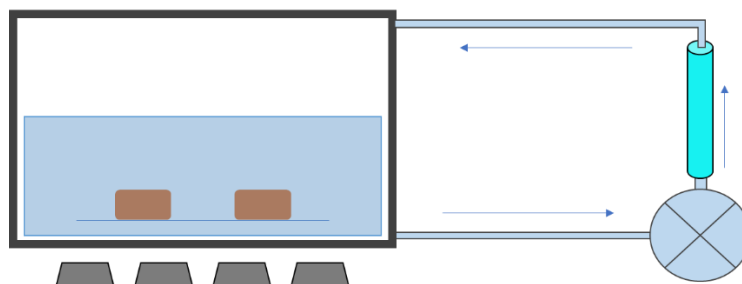




**Figura 8.** Esquema baño ultrasónico, junto con la disposición de las lámparas UV, y la inclusión de la bomba peristáltica, en el que se puede ver los filetes de merluza en el medio de tratamiento.

### 3.4. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta en serie y ultrasonidos en filetes de merluza con un sistema de recirculación

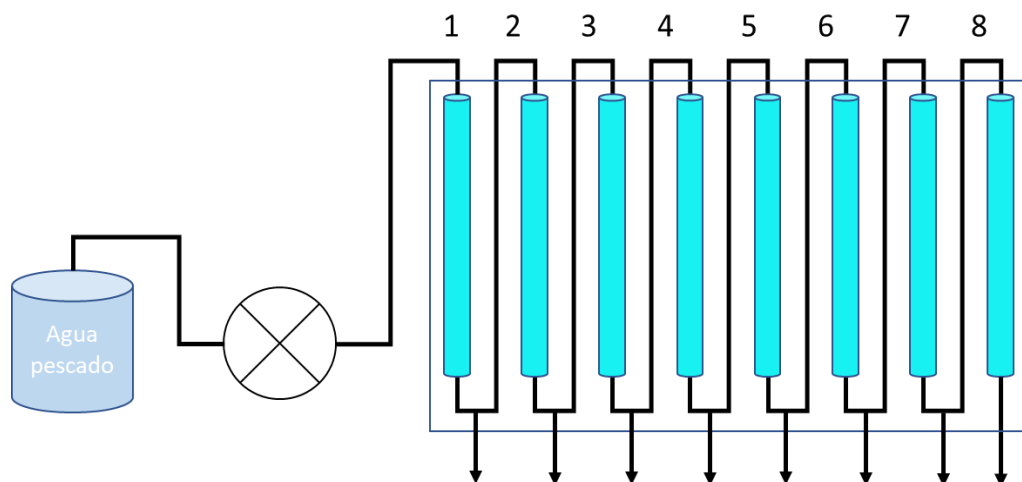
Con el fin de garantizar que todo el volumen de agua recibiera la dosis de luz UV-C adecuada para conseguir la completa inactivación de los microorganismos presentes en el agua de lavado y volverla a utilizar en el proceso de lavado, el agua se hizo circular por un equipo disponible en el grupo de investigación que aplica luz UV-C a líquidos en flujo continuo (Gayán *et al.*, 2011) según se muestra en la Figura 9. En este caso, los caudales utilizados por la bomba fueron de 8,5 L/h y de 62 L/h. La metodología utilizada fue igual a la de las configuraciones anteriores aplicando tratamientos de 2 minutos de US y luz UV-C. Se consideró como tratamiento ‘control’ aquel en el que no se utilizaron estas tecnologías durante los 2 minutos del tratamiento. Debido al volumen muerto (0,6 L) del equipo de luz UV-C, el volumen de agua destilada utilizada fue de 1,8 L. Esto se realizó para mantener las proporciones establecidas con anterioridad en el baño de ultrasonidos entre el agua y el pescado. Tras aplicar los tratamientos, se tomará la muestra de igual manera que en los experimentos anteriores.



**Figura 9.** Esquema de la disposición del baño de ultrasonidos junto con el equipo de lámparas UV en serie.

Previamente a la utilización del sistema en continuo de luz UV-C, fue necesario realizar una serie de caracterizaciones tanto del agua de lavado que condiciona la eficacia letal de la tecnología (coeficiente de absorción y turbidez) así como determinar la dosis de luz UV-C necesaria para garantizar la completa inactivación de los microorganismos liberados al agua así como de otros microorganismos de interés en este sector como pueden ser *Salmonella*, *Listeria* y *Photobacterium*, que una vez cultivados, se adicionaron al agua de lavado.

El equipo de luz UV-C consiste en 8 lámparas de luz UV-C (TUV (WT5, Philips Ibérica, Madrid, España) rodeadas cada una por un cilindro de cuarzo y colocadas en el interior de un tubo de vidrio (reactor) dejando un paso de 2,5 mm para tratar el agua. Los 8 reactores están inmersos en un baño de agua de 90 L para proteger al operario de la luz UV-C, entre otras funciones. El agua de lavado se impulsa con una bomba peristáltica (Ismatec, Eco-line VC-380, Wertheim, Alemania) para hacer circular el medio de tratamiento, tal y como se puede ver en la Figura 10. Tras cada reactor, hay una válvula que permite la toma de muestras del agua tratada.



**Figura 10.** Esquema de la disposición de las 8 lámparas UV, el medio de tratamiento y la bomba utilizada.

Para la caracterización del agua de lavado, así como de la resistencia a la luz UV-C de su microbiota, se utilizó la resultante de haber introducido durante 2 minutos filetes de pescado en la proporción 1:3 habiendo aplicado un tratamiento de US (35 kHz, 200 W, 100%). Se determinó el coeficiente de absorción, la turbidez y el pH según describe (Gayán *et al.*, 2011). En el caso del coeficiente de absorción ( $\alpha$ ), se midió la absorbancia

del agua de lavado a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 254 nm en un espectrofotómetro (Unicam Limited, Cambridge, Reino Unido) utilizando cubetas de 1, 2 y 10 mm de paso óptico (d). A partir de los resultados obtenidos, se representaron gráficamente el paso óptico utilizado, frente a la absorbancia obtenida a 254 nm; siendo la pendiente de la curva obtenida el coeficiente de absorción.

Para determinar la turbidez del medio se utilizó un turbidímetro (Hanna Instrument, Szeged, Hungary). Previamente se calibró el instrumento siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras su calibración y puesta a punto, 10 mL de agua de lavado eran introducidos en los frascos utilizados para la medición. El resultado obtenido de la muestra se expresaba en Unidades Nefelométricas de turbidez (Nephelometric Turbidity Unit, NTU). Finalmente, para la medición del pH se utilizó un pHmetro (Crison Instrument, Barcelona, Spain).

Para evaluar la resistencia a la luz UV-C de los microorganismos presentes en el agua de lavado, el agua se hacía pasar por el equipo anteriormente descrito a un caudal de 8,5 L/h. Tras cada reactor, se extrajo de cada una de las lámparas un volumen aproximado de 5mL, en tubos estériles realizando posteriormente los análisis microbiológicos pertinentes.

Previamente, y entre tratamientos, para utilizar el equipo era necesaria una limpieza exhaustiva para evitar cualquier fuente de contaminación de la muestra. Por ello se utilizaba isopropanol diluido al 50% junto con agua destilada, con un volumen total de 4,5 L, realizando sucesivos ciclos de lavado en los que las lámparas también se encontraban encendidas aprovechando así el efecto germicida de las mismas. Tras ello y para eliminar los posibles residuos de isopropanol que pudieran afectar a la muestra, se realizaba un lavado con 5 L de agua destilada. En este caso, el caudal de la bomba era de 62 L/h

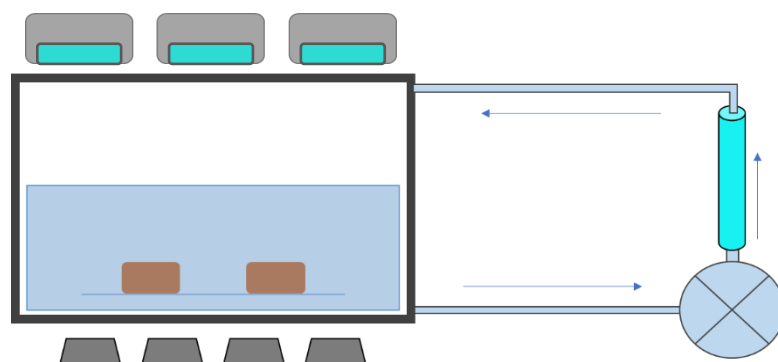
Para evaluar la resistencia a la luz UV-C de otros microorganismos de interés en este sector como pueden ser *Salmonella*, *Listeria* y *Photobacterium*, estos microorganismos (*Salmonella* SL1344, *Listeria* CECT5672 y *Photobacterium* P513) se cultivaron individualmente como ya se ha descrito y se adicionaron a 600 mL de agua de lavado 1 mL del cultivo de *Salmonella* SL1344, 10 mL del de *Listeria* CECT5672 y 10 mL del de *Photobacterium* P513, logrando concentraciones de  $3 \cdot 10^6$ ,  $1,6 \cdot 10^6$  y  $3,6 \cdot 10^4$

UFC/mL, respectivamente. Igual que en el procedimiento anterior, el agua contaminada se impulsó con un caudal de 8,5 L/h. De cada lámpara se extrajeron 5mL aproximadamente, realizando la siembra en superficie en los medios especificados en el apartado 3.1.

### 3.5. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta en serie y en la superficie del baño ultrasónico con un sistema de recirculación.

Una vez analizados los tratamientos anteriores, se quiso evaluar el efecto de descontaminación de la radiación UV tanto sobre el agua de lavado como en la superficie del pescado, tal y como se esquematiza en la figura 11. En este caso el caudal utilizado fue de 62 L/h con el fin de crear la máxima turbulencia posible con la instalación posible del agua de lavado.

El tiempo de tratamiento total fue de 16 minutos en los que se aplicaban ambas tecnologías (UV y US) simultáneamente o tan solo 2 minutos de US. En el caso del tratamiento ‘control’ únicamente la bomba se encontraba en funcionamiento. De igual manera que en el tratamiento anterior se utilizaron un total de 1,8 L de medio de tratamiento (agua destilada esterilizada + 0,9% NaCl) y 400g de filetes de merluza. A intervalos regulares de tiempo (2 minutos en el caso del agua y 4 minutos para el pescado) se tomaron muestras del agua (unos 5 mL) que volvía al baño de US tras haber pasado por la instalación de luz UV y de los filetes de pescado (10 g) de los que se realizó el análisis microbiológico para psicrófilos y mesófilos aerobios. También se hicieron recuentos específicamente mediante qPCR de *Photobacterium* de las muestras de pescado.



**Figura 11.** Esquema de la disposición del baño de ultrasonidos junto con el equipo de UV en serie y las lámparas UV sobre el baño.

### 3.6. Análisis estadístico de los resultados

Se realizaron análisis estadísticos t-Student y de varianza (One-way Anova) con los valores de las variables cuantitativas trabajadas en este estudio y, además, se realizaron pruebas de Tukey para conocer las diferencias entre valores con un nivel de significancia del 95% de confiabilidad, empleando el programa GraphPad Prism® 5 para Windows (GraphPad Prism Software 2007).

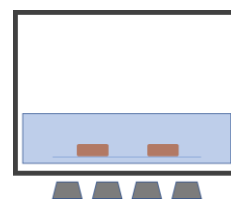
## 4. Resultados y discusión

En este trabajo, se han evaluado diferentes maneras de aplicar las tecnologías de ultrasonidos y radiación ultravioleta tanto de manera independiente como conjunta con el objetivo de reducir la carga microbiana de filetes de merluza. La hipótesis que se plantea es que al aplicar ultrasonidos se produciría una liberación de los microorganismos al medio que posteriormente serían inactivados por la radiación UV-C -o incluso por los propios ultrasonidos-. Además, también podría producirse la inactivación de una parte de los microorganismos de la superficie de los filetes de merluza, esto dependiendo del modo de aplicar la luz UV-C, y de la intensidad de la cavitación generada por los ultrasonidos, Es decir, el efecto de los US y la luz UV-C además de reducir la carga microbiana del pescado, lo que permitiría prolongar la vida útil del producto, eliminaría los microorganismos del agua de lavado, favoreciendo su reutilización, lo que supondrá en ambos casos un ahorro económico sin perder de vista una mayor sostenibilidad medioambiental.

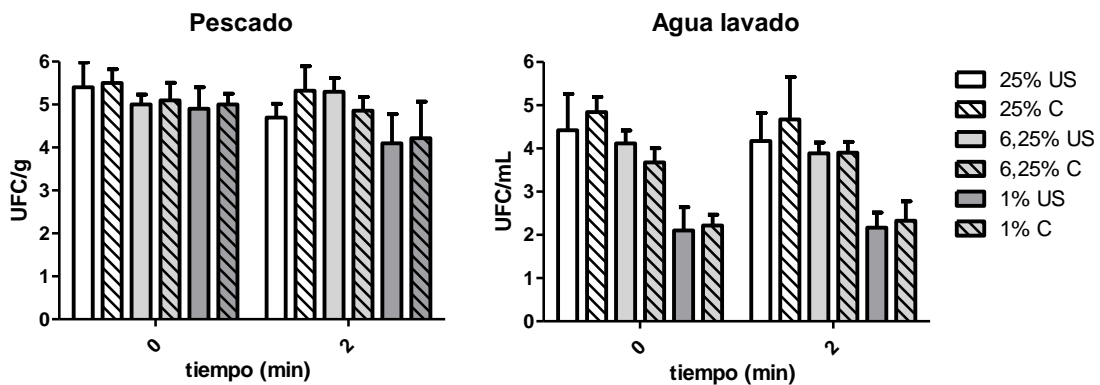
Para abordar dicho estudio y determinar la eficacia letal del proceso combinado se ha evaluado el efecto individual de cada una de las tecnologías, así como de distintas configuraciones con el fin de obtener datos que permitan evaluar la posibilidad de su implementación a mayor escala, planta piloto e incluso industrial. Así, en un primer estudio, se evaluará el lavado de filetes de merluza mediante la aplicación de ultrasonidos para posteriormente introducir la tecnología de la luz UV-C en distintas configuraciones.

#### 4.1.1. Evaluación de la aplicación ultrasonidos en filetes de merluza

Inicialmente, se hizo un estudio preliminar sobre la influencia de la proporción pescado:agua utilizada en la eficacia letal del proceso para así establecer una metodología estándar de trabajo para

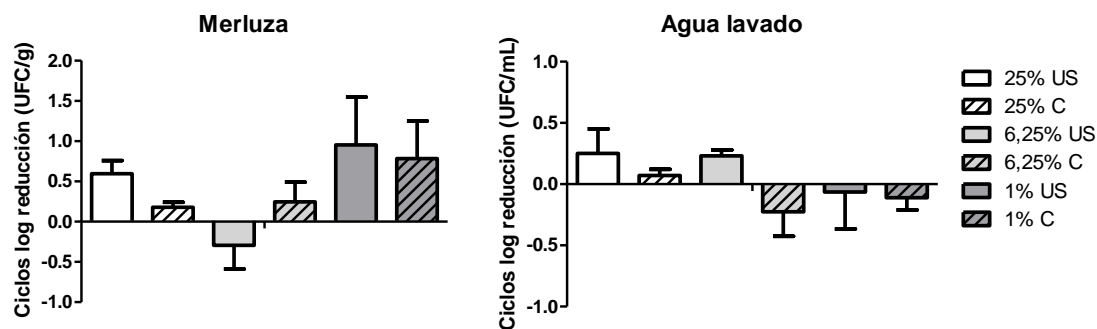


el resto de investigaciones. La Figura 12 muestra los recuentos obtenidos tanto en el pescado como en el agua de lavado inmediatamente tras su inmersión en agua así como tras 2 minutos de aplicación o no de ultrasonidos (35 kHz, 200 W, 100%, modo “degas”) utilizando distintas proporciones pescado:agua; 1:100 (1%), 1:16 (6,25%) y 1:4 (25%). Como se observa, la carga microbiana del pescado estuvo entorno a las 5 unidades logarítmicas por gramo, recuentos que se reducían de forma en todos los casos tras 2 minutos de lavado. En el caso del agua, por la propia inmersión del pescado en el agua de lavado (tiempo 0 en la gráfica del agua de lavado), una parte de la población pasaba al agua.



**Figura 12.** Recuento de los microorganismos (m.o.) (aerobios psicrótrofos) tanto en el agua como en el pescado a las diferentes proporciones y condiciones analizadas, 1, 6,25 y 25% con (US) o sin aplicación (C) de US.

Con el fin de mostrar con mayor claridad el efecto del lavado, se han calculado los ciclos logarítmicos de reducción tanto en el pescado como en el agua tras 2 minutos de lavado (Figura 13). Como muestran las Figuras, se pueden observar distintos comportamientos dependiendo del tipo de proporción detectándose en la mayoría de los casos reducciones de la carga microbiana en el pescado así como incrementos (valores negativos de los ciclos de reducción) en los recuentos, especialmente en el agua de lavado. En el caso de la proporción 25%, los US reducirían alrededor de 0,7 unidades logarítmicas y el efecto de dilución produciría una reducción de 0,1-0,3 (control); es decir, en realidad los US estarían produciendo en el pescado una reducción de 0,4-0,6 ciclos logarítmicos. En el caso del agua, los ultrasonidos podrían estar produciendo algo de muerte ya que se observa una reducción de unos 0,3 unidades logarítmicas y apenas no hay variación de los recuentos en el proceso control.



**Figura 13.** Ciclos logarítmicos de reducción de la población microbiana tanto en el agua como en el pescado a las diferentes proporciones y condiciones analizadas, 1, 6,25 y 25% con (US) o sin aplicación (C) de US tras 2 minutos de tratamiento.

En el caso de la proporción 1:16 (6,25%), al aplicar ultrasonidos una parte de la población microbiana pasaría al agua que recontaminaría el pescado, de ahí que no se detecte reducción sino incluso un pequeño incremento de su carga microbiana (valores negativos de los ciclos de reducción), si bien otra pequeña parte podría morir por efecto de los ultrasonidos al igual que en el caso anterior. En la muestra control, pasarían microorganismos al agua de lavado produciendo una pequeña reducción de la carga microbiana por efecto dilución, aumentando la cocentración de micrororganismos en el agua que sería cada vez mayor conforme aumentaba el tiempo de ahí que no se detecte reducción e incluso incremento. Es decir, en esta etapa se estaría dando simultáneamente al aplicar US un paso de micrororganismos del pescado al agua, una ligera inactivación por parte de los US, pero no significativa estadísticamente y una posible recontaminación del pescado.

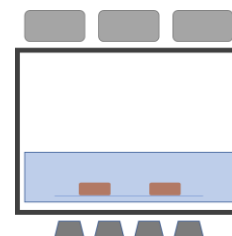
Finalmente, en la proporción 1:100, se ve un claro efecto de dilución al sumergir el pescado en el agua no detectándose ningún tipo de inactivación ni en el pescado ni en el agua por el efecto de los ultrasonidos. Es decir, estaría predominado el efecto diluación sobre la posible inactivación microbiana. Como se observa, al trabajar con tan poca cantidad de producto con respecto al agua, se reduce la carga microbiana del pescado alrededor de 0,8 unidades logarítmicas independientemente de que se utilicen US o no. Estos resultados explicarían algunos de los datos publicados en la literatura sobre la reducción de la carga microbiana en pruebas similares en los que se utilizaban proporciones similares a esta última utilizando o no ultrasonidos aplicando tiempos de tratamiento de hasta 45 minutos (Pedrós-Garrido *et al.*, 2017).

En resumen, se puede determinar que al aplicar ultrasonidos en una proporción 1:4 se estarían consiguiendo una reducción de 0,4 a 0,6 ciclos logarítmicos en el pescado por efecto de los ultrasonidos junto con unos 0,1 a 0,3 log por el paso de microorganismos del pescado al agua. En el caso de la proporción 1:16, aparentemente, el pescado se recontaminaría siendo mayor esta recontaminación al aplicar ultrasonidos. Y en la 1:100, de nuevo se detecta una reducción microbiana de unos 0,8 log similar al utilizar US o no debido al efecto dilución. Para próximas investigaciones, se va a utilizar la proporción 1:4 que permitirá tener un recuento suficientemente elevado de microorganismos a la vez que minimizar los efectos de dilución descritos cuando se trabaja con pequeñas cantidades de pescado y evaluar el posible efecto de los ultrasonidos.

Los resultados aquí mostrados al utilizar distintas proporciones pescado:agua también indicarían que desde un punto de vista de aplicación industrial, la utilización de grandes volúmenes de agua permitiría reducir la carga microbiana del pescado, pero supondrían un enorme impacto medioambiental. Es por ello que la posibilidad de utilizar los ultrasonidos así como un sistema como la luz UV-C que permita consumir menor cantidad de agua así como reaprovecharla resulta de gran interés para su aplicación. Es por ello que el siguiente paso fue evaluar el efecto combinado de la utilización de US y luz UV-C en el proceso de lavado.

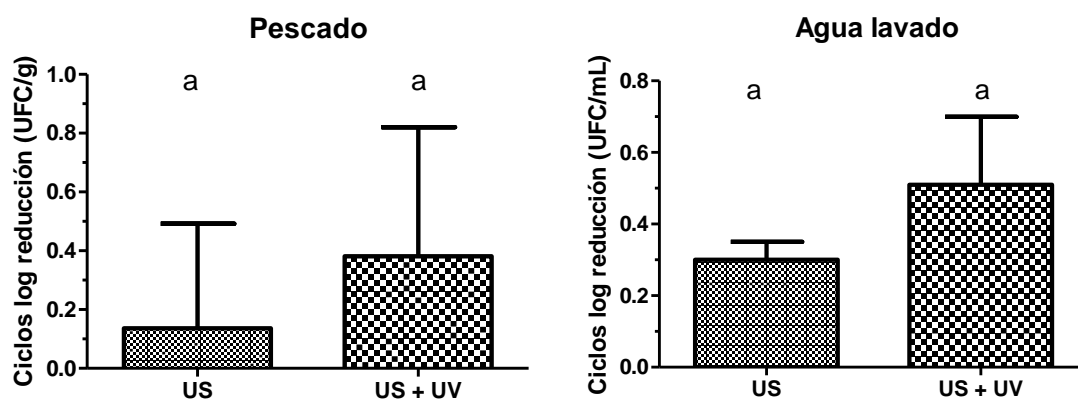
#### 4.2. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta y ultrasonidos en filetes de merluza

La Figura 14 muestra los ciclos logarítmicos de reducción de la población microbiana de los filetes de pescado sometidos a un lavado de 2 minutos asistido con US (35 kHz, 200 W, 100%, modo “degas”) y utilizando o no luz UV-C aplicada sobre el agua del baño, así como de los microorganismos en el agua de lavado. Como se observa, no se encuentran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los resultados obtenidos al introducir la radiación UV-C o sin introducirla ni en el pescado ni en el agua de lavado, si bien siempre que se utilizó la luz UV-C se detectó una mayor reducción de la carga microbiana, detectándose en algunas réplicas hasta una reducción de 0,8 ciclos logarítmicos al combinar ambas tecnologías tanto en el pescado como en el agua. La ausencia de diferencias estadísticamente significativas podría deberse en parte a la variabilidad en los recuentos detectados en la materia prima. Por





otro lado, la escasa inactivación observada con los ultrasonidos en el pescado podría también verse enmascarada por el efecto dilución descrito anteriormente.



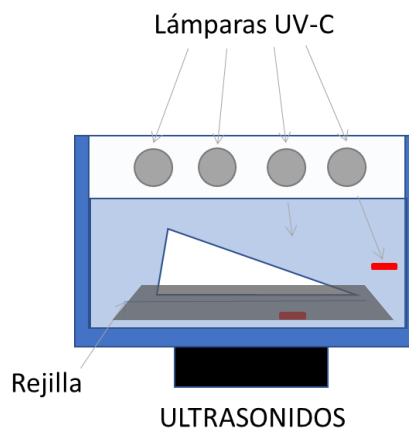
**Figura 14.** Ciclos logarítmicos de reducción de la población microbiana tanto en el agua como en el pescado tras un lavado de 1 minutos aplicando o no US y luz UV-C.

Con el fin de determinar el efecto individual de cada tecnología, se evaluó la letalidad de la luz UV-C por sí solo aplicando utilizando la misma configuración que en el caso anterior, pero sin añadir agua al baño de ultrasonidos y sin utilizar estos, manteniendo de esta forma la distancia entre la fuente de luz UV-C y el pescado (14 cm). En este caso, no se detectó variación en los recuentos obteniendo unos recuentos entorno a los 5,7 UFC/g similar a lo observado en pruebas anteriores. Es decir, según estos resultados, la aplicación de luz UV-C al pescado sumergido en agua resultó ligeramente más eficaz que su aplicación en seco. Este mayor efecto de la luz UV-C al aplicarse en agua ya ha sido anteriormente descrito en la literatura (Gouma *et al.*, 2016)).

En el caso de la inactivación en el agua de lavado, resultados anteriores realizados en el grupo de investigación en condiciones similares, pero sin aplicar ultrasonidos, mostraron niveles de inactivación entre 0,2 y 0,4 unidades logarítmicas en el pescado, similar a lo observado en este trabajo.

En resumen, de este estudio podría concluirse que el lavado asistido por US y luz UV-C podría permitir reducir la carga microbiana en el mejor de los casos hasta 0,8 ciclos logarítmicos siendo la luz UV-C responsable de unos 0,4 ciclos logarítmicos, utilizando la mayor cantidad de pescado y la mínima de agua de las investigadas (1:4). Resultados similares han sido obtenidos por Mikš-Krajnik *et al.* (2017) en filetes de salmón al aplicar

un proceso combinado de radiación UV + US alcanzándose reducciones de hasta 1 ciclo logarítmico, si bien también se destaca la gran importancia del efecto de la materia prima ya que puede presentar gran variabilidad en los resultados obtenidos.



**Figura 15.** Esquema del posible efecto sombra a la luz UV-C de los filetes de pescado sobre los microorganismos liberados al agua de lavado.

Si bien se ha observado un cierto efecto de la luz UV-C en la reducción de la carga microbiana del agua de lavado, el nivel de inactivación conseguido es muy inferior al esperado al utilizar esta tecnología en el agua de lavado (Gayán *et al.*, 2012). Si bien el coeficiente de absorción y turbidez van incrementando con el tiempo de lavado como se mostrará posteriormente, los valores de estos parámetros no justifican la escasa inactivación. Esta limitada eficacia letal de la luz UV-C en agua podría deberse a que parte de los microorganismos liberados al agua quedarían ubicados debajo de los filetes de pescado impidiendo el acceso de los fotones de luz UV-C a los microorganismos liberados por efecto sombra del propio pescado (Figura 15). Es por ello que con el fin de confirmar este efecto, se evaluó por una parte la eficacia letal del lavado eliminando la rejilla sobre la que se colocaban los filetes de pescado aplicando los US en modo “degas” así como “normal” debiéndose observar una mayor eliminación de los microorganismos y un posible mayor efecto de la luz ultravioleta.

Las Figuras 16 y 17 muestran los ciclos logarítmicos de reducción en el pescado, así como en el agua de lavado al aplicar US en modo “degas” (Figura X) y “normal” (Figura X+1) sin el uso de rejilla, aplicando a la vez luz UV-C. Como se observa, la aplicación de solo US produciría la salida de microorganismos al agua de lavado, pero recontaminarían los filetes de pescado siendo mayor este efecto en el modo “normal”

donde la aplicación de los US es continua. Por el contrario, la utilización de luz UV-C produciría la muerte de los microorganismos que se fueran liberando al agua así como de parte de los depositados de nuevo en la superficie del pescado, detectándose hasta más de 1 log de inactivación en el modo normal si se considera la inactivación observada al aplicar US y luz UV-C (unos 0,5 ciclos logarítmicos) más el incremento de la carga microbiana del pescado (unos 0,5 ciclos logarítmicos) cuando solo se utilizan los US. En cualquier caso, y posiblemente debido a la variabilidad en las cargas iniciales del pescado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al aplicar una y otra tecnología.

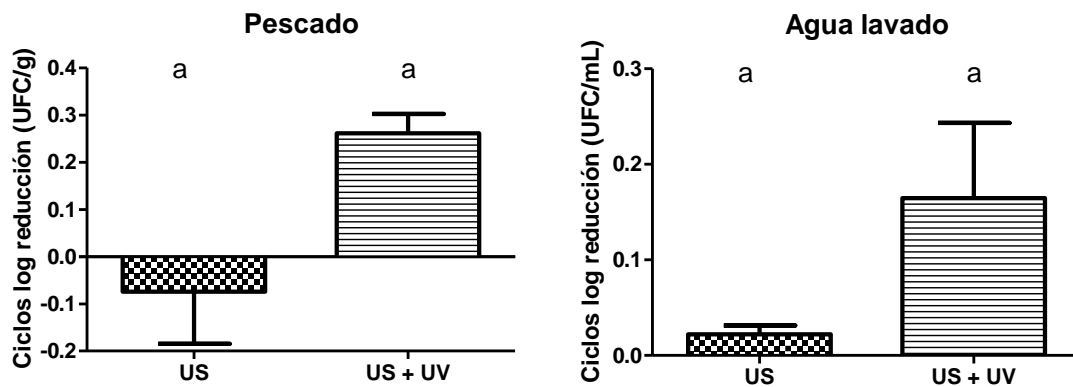
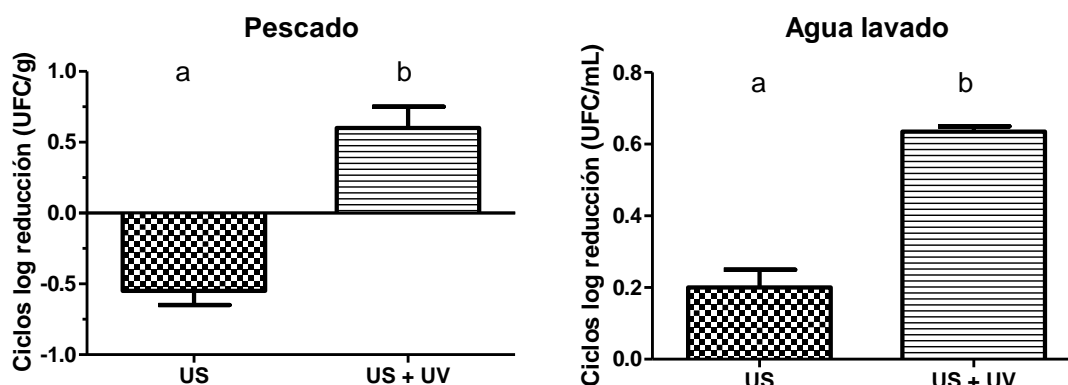


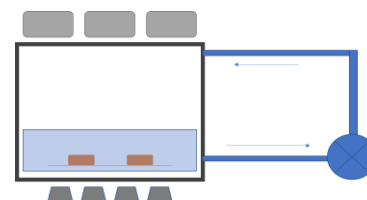
Figura 16. Ciclos logarítmicos de reducción de la población microbiana tanto en el agua como en el pescado tras un lavado de 2 minutos aplicando o no US en modo “degas” y luz UV-C colocando el pescado en el fono del baño de US sin uso de rejilla.

Según estos resultados, parece claro que la presencia de rejilla sobre la que se colocan los filetes de pescado es necesaria para reducir la posible recontaminación de los filetes de pescado con los microorganismos liberados, así como tratar de arrastrar dichos microorganismos con un sistema más eficiente para que no se produzca efecto sombra al aplicar luz UV-C y aumentando la eficacia letal de esta tecnología. Es por ello que en la siguiente configuración se introdujo un sistema de recirculación del agua de lavado haciendo que esta circule por la instalación y los microorganismos en suspensión reciban la correspondiente dosis de luz UV-C, manteniendo el efecto de la luz UV-C sobre los microorganismos presentes en la superficie del pescado.



**Figura 17.** Ciclos logarítmicos de reducción de la población microbiana tanto en el agua como en el pescado tras un lavado de 2 minutos aplicando o no US en modo “normal” y luz UV-C colocando el pescado en el fono del baño de US sin uso de rejilla.

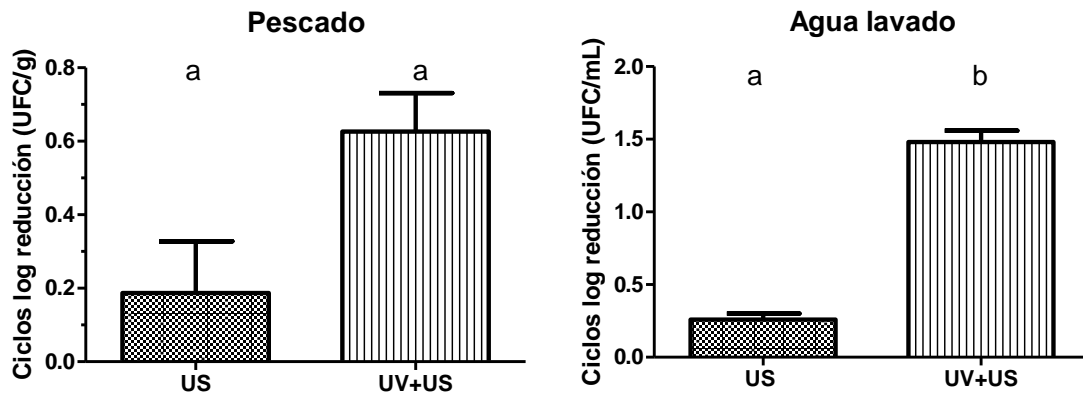
#### 4.3. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta y ultrasonidos en filetes de merluza con un sistema de recirculación



La Figura 18 muestra los ciclos logarítmicos de inactivación de la población presente en el pescado, así como del agua de lavado recirculada mediante un sistema de impulsión al aplicar US, utilizando o no luz UV-C. De nuevo, el efecto de los ultrasonidos tanto en el agua de lavado como sobre el pescado fue similar a lo observado (aproximadamente 0,3 ciclos de reducción en ambos casos); sin embargo, cuando se aplicó luz UV-C la eficacia letal del proceso combinado incrementó notablemente al recircular el agua alcanzándose hasta 1,5 ciclos logarítmicos de inactivación en el agua de lavado. Si bien este efecto fue destacable, no repercutió en una mayor reducción de la carga microbiana de los filetes de pescado no detectándose incluso diferencias estadísticamente significativas entre el proceso US y US+UV.

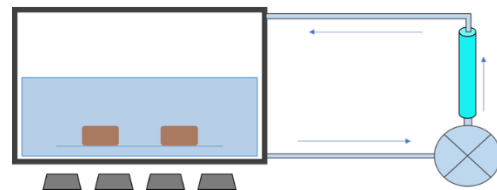
Los resultados mostrados en esta parte del estudio muestran por tanto que la mayor exposición de los microorganismos a la luz UV-C mejora notablemente su eficacia, pero aun así está alejada de la que se puede conseguir en agua o en líquidos de bajo coeficiente de absorción en donde se ha conseguido inactivar más de 5 ciclos logarítmicos por mL de *Escherichia coli* con dosis inferiores a 10 J/mL y a temperatura ambiente tratada en tampón McIlvaine de pH 7 y coeficiente de absorción de 6,3 cm<sup>-1</sup> (Gayán *et al.*, 2011). Es por ello que con la finalidad de aumentar la letalidad de la luz UV-C para conseguir la

máxima higienización del agua de lavado, se rediseñó la instalación para hacer circular el agua de lavado por una instalación de luz UV-C que dispone de lámparas en serie desde el baño de US para retornar una vez higienizada a dicho baño.



*Figura 18. Ciclos logarítmicos de inactivación de la población microbiana tanto en el agua como en el pescado tras un lavado de 2 minutos aplicando o no US y luz UV-C recirculando el agua de lavado.*

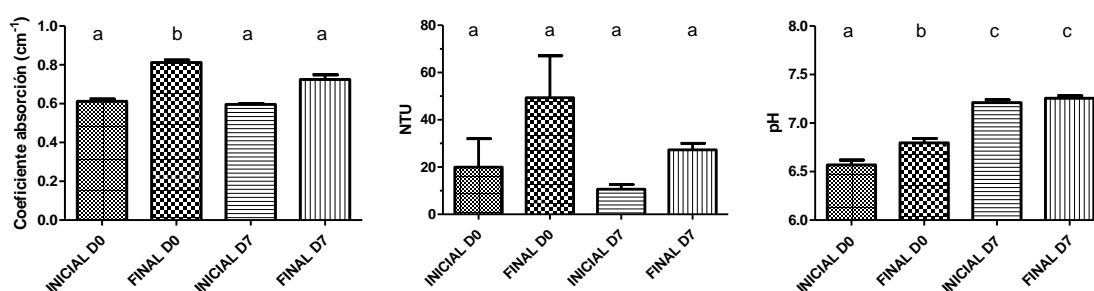
#### 4.4. Evaluación de la aplicación de radiación ultravioleta en serie y ultrasonidos en filetes de merluza con un sistema de recirculación



Con el fin de mejorar la higienización el agua de lavado, al baño de US se acopló una instalación de luz UV-C disponible en el grupo de investigación y descrita en el apartado Material y métodos (Gayán, Condón y Álvarez, 2014). No obstante, y de forma previa a evaluar la eficacia en el lavado de incorporar este dispositivo, se determinó la eficacia letal de la luz UV-C con dicha instalación en la descontaminación del agua de lavado con el fin de determinar la dosis de luz UV-C necesaria para conseguir un determinado nivel de inactivación del microorganismo correspondiente. Debido a que las características ópticas del medio condicionan en gran medida la eficacia letal de la luz UV-C, fue necesario caracterizar el agua de lavado en base a la turbidez y el coeficiente de absorción ( $\alpha$ ). Para ello, se determinaron estos parámetros tanto en el agua a tiempo 0 tras la inmersión de los filetes de pescado, así como tras los 2 minutos de lavado utilizando los US.

Con el fin de evaluar el efecto en las peores condiciones posibles, también se evaluaron estos parámetros en agua en la que se había sumergido pescado con 7 días de almacenamiento a 4°C. Los resultados de la caracterización de estos parámetros se muestran en la Figura 19 donde además se ha incluido el pH del agua. Como se observa tanto en el coeficiente de absorción como en la turbidez, las variaciones de estos parámetros por el lavado con US de 2 minutos aumentaron ligeramente no viéndose afectado que se utilice un pescado fresco o almacenado. Los valores observados de coeficiente de absorción ( $0,8 \text{ cm}^{-1}$ ) en el peor de los casos fueron similares a los observados por Gayán *et al.* (2011) en agua adicionada con tartracina en los que se conseguía más de 5 reducciones decimales de *E. coli* con dosis de 10 J/mL, y son muy inferiores a los otros líquidos como el zumo de manzana recién exprimido ( $25,9 \text{ cm}^{-1}$ ) o el de naranja ( $47,9 \text{ cm}^{-1}$ ).

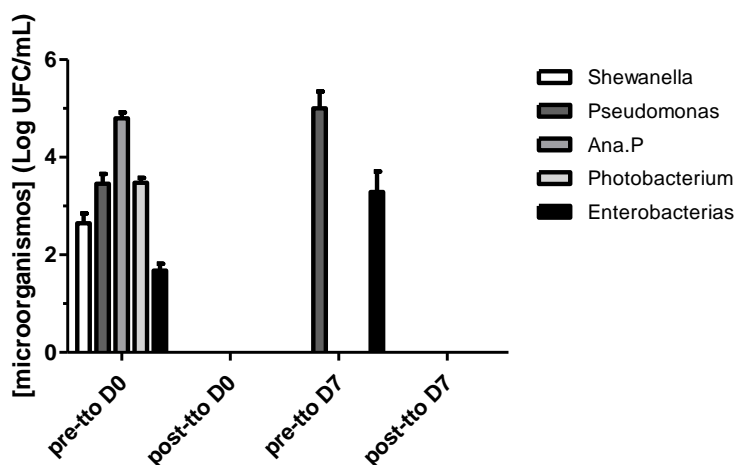
En el caso de la turbidez los valores obtenidos son notablemente inferiores a los de otros productos desde 972 NTU para el zumo de manzana fresco hasta los 3759 NTU para el zumo de naranja (Koutchma, Parisi y Patazca, 2007). El pH del agua sí que varió significativamente; sin embargo este es un parámetro que apenas afecta en la eficacia letal del proceso (Gayán *et al.*, 2011). Es decir, en base a los datos obtenidos, la eficacia letal de la luz UV-C debería ser elevada.



**Figura 19.** Valores de coeficiente de absorción, turbidez (en NTU) y pH del agua de lavado a tiempo 0 y tras 2 minutos de tratamiento de US utilizando pescado fresco y almacenado a 4°C durante 7 días.

La Figura 20 muestra la concentración de los distintos grupos microbianos investigados en el agua de lavado obtenida tras la inmersión de pescado fresco (D0) y de pescado almacenado a 4°C en refrigeración (D7), antes y después del tratamiento de luz UV-C (tras pasar por toda la instalación donde se aplica una dosis máxima de 27,1 J/mL

con un caudal de 8,5 l/h). Como se observa, tanto para las muestras del día 0 como para las del día 7 no se detectaron microorganismos tras el tratamiento de luz UV-C indicando la notable eficacia letal de la dosis aplicada permitiendo reducir hasta 5 unidades logarítmicas por mililitro de agua tratada.

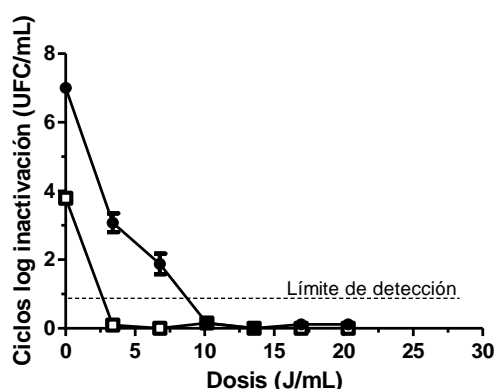


**Figura 20.** Concentración microbiana de los distintos grupos microbianos investigados en el agua de lavado antes y después del tratamiento de luz UV-C partiendo de pescado fresco y tras 7 días de almacenamiento a 4°C. Ana. P.: anaerobios psicrófilos.

Si bien estos resultados indicarían que el sistema presenta una eficacia letal notable, se desconoce la dosis necesaria para conseguir un determinado nivel de inactivación microbiana. Es por ello que se hizo un estudio más detallado con el fin de determinar la resistencia a luz UV-C de la microbiota presente en el agua de lavado. La Figura 21 muestra los ciclos logarítmicos de inactivación de la microbiota psicrotrófica del agua de lavado de filetes de merluza frescos y tras 7 días de almacenamiento en refrigeración tratados con luz UV-C. Como se observa, la cinética de inactivación fue exponencial en ambos casos obteniéndose una completa inactivación con dosis de 12,5 J/mL en el agua más contaminada (7 días). Lógicamente, la carga inicial fue superior en el caso del agua de lavado procedente del pescado con 7 días de almacenamiento. Esta circunstancia junto con los mayores valores de coeficiente de absorción y turbidez del agua sería los responsables de la ligera mayor resistencia de los microorganismos tratados en el agua de lavado del pescado con 7 días de almacenamiento: 1,56 J/mL de valor  $D_{UV}$  (dosis de luz UV-C necesaria para reducir la población microbiana un 90%) frente a 0,96 J/mL para la microbiota del agua procedente del lavado del pescado fresco. Es decir, de

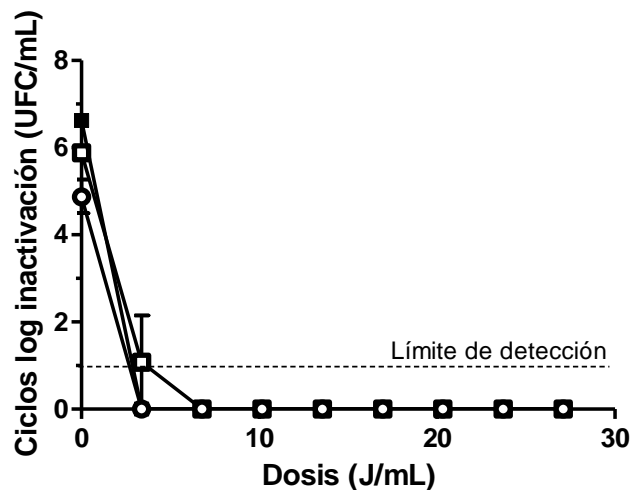
poder comparar la resistencia de ambas poblaciones en un mismo medio y a una misma concentración, el valor  $D_{UV}$  sería muy similar independientemente del tiempo de almacenamiento del pescado. Estos resultados son de gran interés ya que permiten conocer la resistencia a la luz UV-C en el agua de lavado de la microbiota procedente de filetes de merluza que sería en el peor de los casos de 1,56 J/mL (o 11 segundos de tratamiento en la instalación con un caudal de 8,5 L/h). Estos resultados justificarían la ausencia de recuentos en el agua de lavado mostrados en la Figura anterior tras su paso por todas las lámparas de la instalación.

De forma similar al estudio de la resistencia a la luz UV-C de la microbiota del agua de lavado, se evaluó el efecto de la luz UV-C en grupos bacterianos que presentan cierto interés en la seguridad alimentaria y vida útil del pescado y agua de lavado como podrían ser *Salmonella*, *Listeria*, y *Photobacterium*. La Figura 22 las gráficas de supervivencia de los tres microorganismos tratados mediante luz UV-C en agua obtenida tras 2 minutos de lavado asistido con US de filetes de merluza. Como se observa, la cinética de muerte de los tres microorganismos fue exponencial, mostrando una resistencia la luz UV muy similar entre ellos e incluso a la microbiota general anteriormente descrita. Así se determinaron unos valores  $D_{UV}$  de 0,69 J/mL para *Photobacterium*, 0,51 J/mL para *Listeria*, y de 1,15 J/mL para *Salmonella*. Es decir, con el paso del agua de lavado por la instalación (27,1 J/mL) al caudal de estudio (8,5 l/h) se conseguiría inactivar hasta 23 UFC/mL de *Salmonella* y 17 UFC/mL de la microbiota del pescado.



**Figura 21.** Gráficas de supervivencia de la microbiota (aerobios psicrótrofos) del agua de lavado partiendo de pescado fresco (□) y tras 7 días de almacenamiento a 4°C (●) tras tratamientos de luz UV-C.



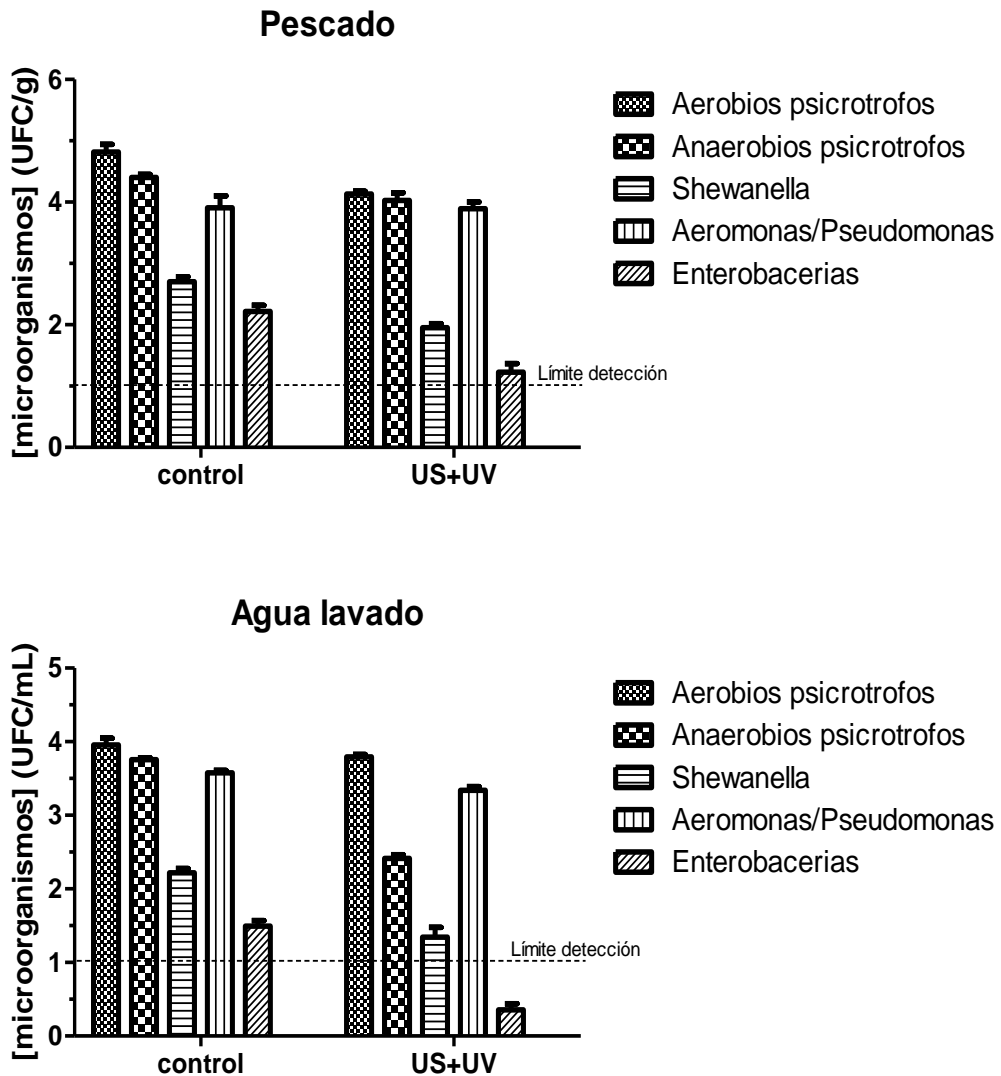


**Figura 22.** Gráficas de supervivencia de ‘*Salmonella*’ SL1344 (□), ‘*Listeria*’ CECT5672 (■) y ‘*Photobacterium*’ P513 (○) tratados mediante luz UV-C en agua obtenida tras 2 minutos de lavado asistido con US de filetes de merluza.

Una vez determinada la eficacia letal de la luz UV-C con la instalación disponible, se evaluó su aplicación en el proceso de lavado con el fin de ir eliminando los microorganismos que se fueran liberando al medio desde los filetes de pescad al aplicar o no ultrasonidos. La incorporación de este sistema sería de interés para el ahorro de costes relacionados con el consumo de agua, así como para reducir el impacto medioambiental de la introducción de un sistema de lavado al permitir la reutilización del agua.

Para ello, se evaluó la posible reducción de la carga microbiana de diferentes grupos microbianos tras el lavado de filetes de merluza asistido por ultrasonidos durante 2 minutos, de igual forma a como se ha realizado en apartado anteriores, pero recirculando el agua de lavado haciéndola pasar por la instalación de luz UV-C a un caudal de 12 l/h. Como se observa en la Figura 23, la carga microbiana del pescado se redujo prácticamente en todos los grupos microbianos investigados salvo en el caso de *Aeromonas/Pseudomonas*. En el caso de la flora total (aerobios psicrótrofos), la reducción fue similar a la observada en otras configuraciones en las que se aplicó luz UV-C y US simultáneamente, alrededor de 0,6-0,7 unidades logarítmicas. Más específicamente, se redujeron alrededor de 0,4, 0,8 y 1,0 ciclos logarítmicos de anaerobios psicrótrofos, *Shewanella* y Enterobacterias, respectivamente. Es de destacar la reducción de 1 unidad logarítmica (podría ser superior ya que se está en el límite de detección de la técnica

microbiológica detectándose en placa menos de 10 UFC/placa) de Enterobacterias que serían especialmente sensibles al tratamiento de US principalmente en base a resultados anteriores obtenidos por el grupo de investigación.



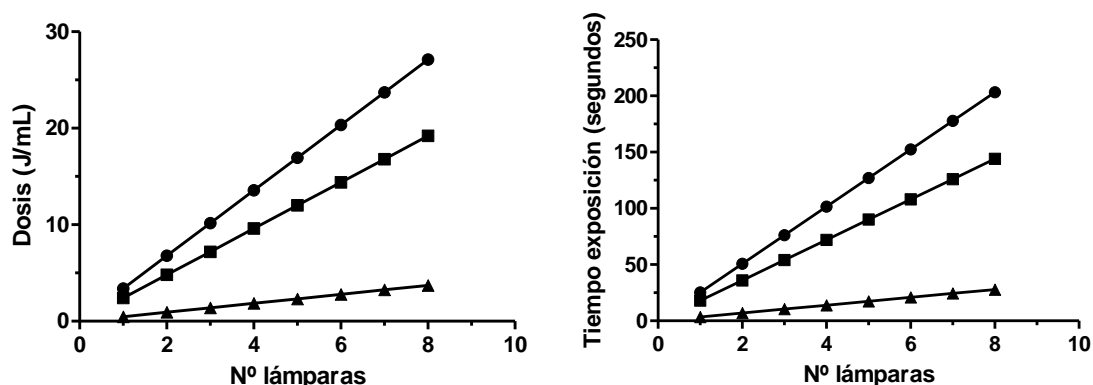
**Figura 23.** Concentración de microorganismos en el pescado (UFC/g) y en el agua de lavado (UFC/mL), obtenida tras 2 minutos de tratamiento.

En el caso del agua de lavado, si bien se redujo la carga microbiana no se eliminó completamente la presencia de microorganismos. Esta circunstancia se debe a que teniendo en cuenta el volumen muerto de la instalación de luz UV-C, así como el caudal utilizado (12 L/h), no es posible renovar el agua de lavado en los 2 minutos de duración del tratamiento. Serían necesarios unos 8 minutos para la completa renovación, de ahí que se haya detectado una reducción de la carga microbiana, pero no su completa inactivación.

Es por ello que se planteó realizar una nueva prueba esta vez aumentando el caudal al máximo que permitía la instalación de luz UV-C: 62 L/h. Con este caudal, en 2 minutos prácticamente se conseguiría renovar el agua de todo el baño y la del agua contenida en la instalación de luz UV-C (1,6 minutos son requeridos para la total renovación del agua). Sin embargo, al aumentar el caudal, el tiempo de exposición de los microorganismos a la luz UV-C se reduce de forma proporcional al aumento del caudal por lo que los ciclos logarítmicos que se pueden reducir por el paso a través de la instalación disminuyen. La Figura 24 muestra la relación entre el número de lámparas de la instalación con la dosis que se aplica (J/mL) con cada lámpara (izquierda) y el tiempo de exposición (derecha) a los tres caudales investigados. Considerando estos datos así como las dosis máxima (3,7 J/mL) que se pueden aplicar a 62 L/h y los tiempos de exposición máximos (27,9 segundos) mostrados en la figura anterior y tomando como referencia el valor  $D_{UV}$  determinado anteriormente para la microbiota presente en el agua de lavado (1,56 J/mL o 11 segundos de exposición), en el mejor de los casos se conseguiría reducir unos 2,5 ciclos logarítmicos que es insuficiente para conseguir la completa reducción de la carga microbiana total que hay en el agua de lavado ( $10^4$ - $10^5$  UFC/mL, lo que, teniendo en cuenta que el volumen de agua utilizado es de 1200 mL, resultaría en aproximadamente entre 7 y 8 unidades logarítmicas de microorganismos). Es decir que para conseguir la total inactivación de la microbiota del agua, o se aumenta el tiempo de exposición del agua o la dosis. Para calcular el tiempo de tratamiento, se puede realizar fácilmente de forma similar al cálculo del tiempo de esterilización ( $F_t$ ) en el tratamiento de conservas. Así, conociendo el  $D_{UV}$  (en dosis o tiempo de exposición) a aplicar y los ciclos logarítmicos a reducir, el tiempo de tratamiento será:

$$F_D = D_{UV} \cdot \text{Ciclos logarítmicos de reducción}$$

siendo los ciclos logarítmicos a reducir la cantidad de microorganismos presentes en el agua de lavado que como se ha estimado sería entre 7 y 8 unidades logarítmicas y el  $D_{UV}$  unos 11 segundos tomando como referencia la resistencia de la microbiota más resistente a la luz UV-C determinado anteriormente. Por lo tanto, el tiempo de exposición será entre 77 y 88 segundos. Se necesitará por tanto unos 2 minutos para conseguir la completa inactivación de la flora presente en el agua de lavado.

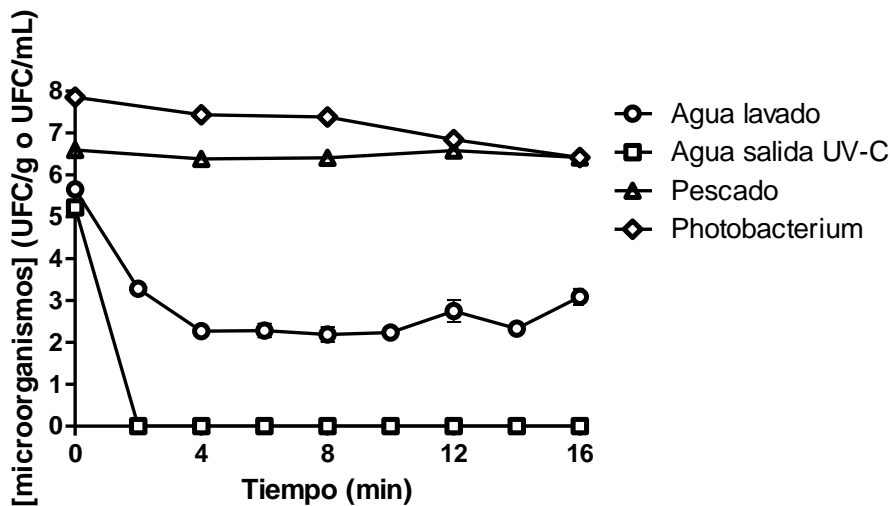


**Figura 24.** Relación entre el número de lámparas de la instalación de luz UV-C con la dosis y el tiempo de exposición a cada uno de los caudales investigados: 8,5 (●), 12 (■) y 62 L/h (▲).

Es por ello que se realizó un último ensayo con el fin de evaluar el potencial del proceso con la instalación diseñada realizando un lavado en el baño de ultrasonidos de 2 minutos, pero manteniendo la renovación del agua de lavado a través de la instalación de luz UV-C durante 16 minutos con el fin de dar oportunidad a que el agua se renueve varias veces (unas 8 veces) y evaluar la posible reducción de la carga microbiana considerando que en una renovación se consiguen reducir 2,5 unidades logarítmicas. Es decir, para reducir 7-8 ciclos logarítmicos, se requieren unas 3 renovaciones del agua. La Figura 25 muestra los recuentos del pescado tratado por el proceso de lavado diseñado, la del agua del lavado y la del agua a la salida de la instalación de luz UV-C. Se han incluido los recuentos de *Photobacterium* determinados en las mismas muestras de pescado mediante la técnica de qPCR puesta a punto por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado el trabajo. Los datos a tiempo 0 corresponden a los recuentos una vez sumergidos los filetes de pescado en el agua y circulando el agua con las luces UV-C apagadas y sin aplicar US. Se tomaba la muestra del pescado y del agua y era entonces cuando se activaban los US y la luz UV-C. Indicar que en esta prueba también se colocaron las lámparas de luz UV-C sobre el baño de ultrasonidos.

Considerando que la carga microbiana del pescado sin tratar resultó de  $7,1 \pm 0,1$  UFC/g (mucho más elevado que en anteriores pruebas), el tratamiento redujo la carga microbiana en unos 0,6 ciclos logarítmicos resultado algo inferior a las pruebas anteriormente realizadas. Esto quizás sea debido a la carga excesivamente elevada de los

filetes de pescado. Sería interesante repetir las pruebas partiendo de filetes de pescado con una menor carga microbiana. Lo que sí se observa claramente es la eficacia letal de la instalación de luz UV-C eliminando completamente la microbiota del agua de lavado coincidiendo con los cálculos anteriormente indicados sobre la completa eliminación de la carga microbiana en 2 minutos de tratamiento. Esa eliminación de los microorganismos al pasar por la instalación de luz UV-C permitiría reducir la carga microbiana del agua hasta una concentración de 2,2 UFC/mL que ya no disminuye indicando que continuamente se estarían desprendiendo microorganismos de la superficie del pescado, alrededor de 200.000 cada 2 minutos ( $10^{2.2} * 1200$  mL agua), que comparado con la carga microbiana del pescado resulta insuficiente para observarse una reducción de la carga microbiana.



**Figura 25.** Evolución de la concentración de microorganismos (aerobios psicrótrofos) en el pescado, en el agua de lavado en el baño de US y en el agua de lavado a la salida del sistema de luz UV-C tras la aplicación de 2 minutos de lavado asistido con US (35 kHz, 200 W, 100%, modo “degas”) y la recirculación del agua por la instalación durante 16 minutos. Se incluyen también los recuentos en pescado de *Photobacterium* realizado por qPCR.

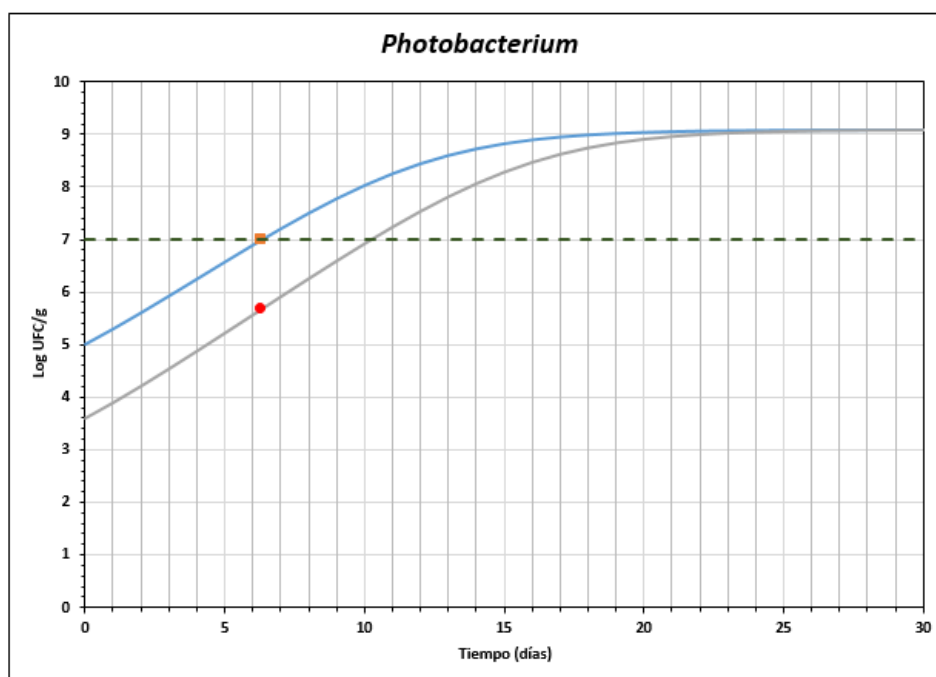
Por otro lado, hay que indicar que existe un desajuste entre la carga microbiana del pescado (aerobios psicrótrofos) con los recuentos de *Photobacterium* determinados por qPCR. Ello podría deberse al tiempo transcurrido entre toma de muestra y siembra para la realización de los recuentos microbiológicos tradicionales en placa y el tiempo de almacenamiento de la muestra en congelación para guardar las muestras antes de hacer la

qPCR. Según el “Decision support system (DSS)” desarrollado en el grupo de investigación que permite estimar la concentración de microorganismos Anaerobios y Aerobios Mesófilos, *Shewanella* y *Photobacterium*, se determinó que, en 2 h a temperatura ambiente, la carga de este *Photobacterium*, que resultó el microorganismo con mayor tasa de crecimiento de los contaminantes en filetes de merluza, podría aumentar desde 6,5 UFC/g hasta los recuentos detectados con qPCR (7,8 UFC/g). Independientemente de este desajuste, lo que se observa es que, si bien los recuentos de aerobios psicrótrofos del pescado no se reducen a lo largo del tiempo, los de *Photobacterium* disminuyen alrededor de 0,4 ciclos logarítmicos cada 4 minutos, consiguiéndose en el estudio una reducción de estos microorganismos de 1,4 unidades logarítmicas en 16 minutos, pudiéndose ser incluso superior esa reducción de continuar el estudio, pero sería un aspecto a evaluar con mayor profundidad. En cualquier caso, este es un resultado que debería ser confirmado con nuevos ensayos.

Estos resultados estarían en la línea de los ya mostrados en este estudio sobre la reducción de grupo específicos de microorganismos como sucedía con, por ejemplo, *Shewanella* o las Enterobacterias entre otros. Por otro lado, estos resultados indicarían que a la hora de reutilizar el agua de lavado y con el fin de reducir la carga microbiana, sería fundamental aumentar el volumen de agua por cantidad de pescado para obtener resultados de reducción de la carga microbiana de 1 unidad logarítmica. Según se mostraba en el primer estudio sobre la influencia de la proporción agua:pescado, sería necesario alcanzar proporciones elevadas (alrededor de 100:1) o algo menores en el caso de utilizar ultrasonidos, algo que con el equipamiento disponible no ha sido posible demostrar.

Por otra parte, considerando el potencial de reducir hasta 1,4 ciclos logarítmicos la carga de *Photobacterium*, el o principal alterante de los filetes de merluza almacenado en atmósfera modificada enriquecida en CO<sub>2</sub> (AM), con la prueba realizada y asumiendo que la carga microbiana inicial fuera menor (en el trabajo la carga media de los filetes era de unas 5 UFC/g), manteniéndose la eficacia letal del procesado, se podría conseguir que la vida útil de los filetes de merluza almacenado en AM fuera mayor. De nuevo utilizando el DSS, considerando una carga inicial de 10<sup>5</sup> UFC/gr y aplicando el proceso de lavado anteriormente descrito, que podría reducir la carga microbiana de *Photobacterium* a 10<sup>3,6</sup> UFC/g, la vida útil de los filetes de merluza almacenada en AM (50:50 N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) a 4°C

tomándose como concentración máxima de este microorganismos como limitante para su consumo de  $10^7$  UFC/g podría pasar de unos 6 días a 10 días (Figura 26).



**Figura 26.** Crecimiento de *Photobacterium* a 4°C en merluza almacenada en AM (50:50 N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) estimado con el programa DSS desarrollado por el grupo de Nuevas Tecnologías de Procesado de Alimentos en base al proyecto europeo Ultrafish N° 767839 ([ultrafish.eu](http://ultrafish.eu)) partiendo de una concentración inicial de  $10^5$  UFC/g y  $10^{3,6}$  UFC/g.

Siendo menos optimista, considerando la mayor reducción de la carga microbiana observada en las pruebas realizadas en este trabajo y que se resumen en la Tabla 3 que fue de alrededor de 0,8 UFC/g, la vida útil de los filetes de merluza almacenados en AM (50:50 N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) a 4°C se incrementaría en 2 días (Tabla 4). Para estos cálculos, se ha utilizado de nuevo la herramienta DSS tomando como concentración inicial y límite de  $10^5$  y  $10^7$  UFC/g, respectivamente, de cualquiera de los grupos microbianos disponibles en el software. Habría que reevaluar realmente estas concentraciones iniciales y máximas para hacer unos cálculos más reales. Sería de gran interés evaluar si realmente el proceso de lavado desarrollado permitiría prolongar la vida útil los días establecidos con el fin de validar los resultados. Esta evaluación no debería limitarse únicamente a la carga microbiana sino también habría que tener en cuenta la calidad sensorial del producto. Habría que señalar que tratamientos de ultrasonidos incluso más prolongados que los aquí

aplicados, en filetes de merluza o bacalao no afectaron a la calidad sensorial (Antunes, comunicación personal)-

	<b>PESCADO</b>	<b>AGUA</b>
<b>Efecto dilución</b>	0,1-0,3	0
<b>US</b>	0,4-0,5	0,3
<b>UV al aire</b>	0	-
<b>UV en agua</b>	0,2-0,4	2,5 (62 L/h) - 7 (8,5 L/h)
<b>US+UV estático</b>	0,4-0,8	0,6-0,7
<b>US+UV recirculación</b>	0,6-0,7	1,5
<b>US+UV serie (2')</b>		
<b>Aerobios Psicrotrofos</b>	0,4	0,2
<b>Anaerobios Psicritrofos</b>	0	1,3
<i>Shewanella</i>	0	0,85
<i>Aeromonas/Pseudomonas</i>	0	0,1
<b>Enterobacterias</b>	0,4	1,1
<b>US+UV serie (2' US/UV+ 16' UV)</b>	0,5-0,8	3,4
<i>Photobacterium</i>	1,4	

**Tabla 3.** Ciclos logarítmicos de reducción de la microbiota de filetes de merluza y agua de lavado con las distintas configuraciones evaluadas.



	<b>CONTROL</b>	<b>LAVADO US+UV</b>
<i>Photobacterium</i>	6,3	8,6
<i>Shewanella</i>	6,5	8,5
<b>Anaerobios psicrotófos</b>	6,7	8,7
<b>Aerobios mesófilos</b>	7,8	10,3

**Tabla 4.** Vida útil en días de filetes de merluza almacenados en AM (50:50 N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>) a 4°C lavados o no (“CONTROL”) con el proceso desarrollado US+UV.

## 5. Conclusiones

Las principales conclusiones obtenidas de este trabajo han sido las siguientes:

- El trabajar con materias primas, en este caso filetes de merluza, resulta complejo ya que la concentración bacteriana inicial es variable, así como el comportamiento del producto frente a la aplicación de las tecnologías.
- En la mayoría de las pruebas realizadas, no ha sido posible establecer diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en cuanto a la reducción de microorganismos en los filetes de merluza, posiblemente por la gran variabilidad en la carga microbiana de la materia prima. En el mejor de los casos, se podría llegar a reducir 0,8 unidades logarítmicas con un tratamiento de ultrasonidos de 2 minutos (35 kHz, 200 W, 100%, modo “degas”) con y sin recirculación del agua del agua de lavado, aplicando luz UV-C hasta dosis de 27 J/mL. Esta reducción de la carga microbiana podría permitir prolongar la vida útil de los filetes de merluza en su almacenamiento en AM a 4°C entre 2 y 4 días.
- La utilización de radiación UV-C se ha demostrado eficaz en la descontaminación del agua de lavado entre 2,5 y 7 unidades logarítmicas dependiendo del caudal de agua utilizado (8,5 a 62 L/h), siendo de interés para una posible reutilización del agua, lo que supondría una mejora en costes y sostenibilidad en la industria.

## 6. Bibliografía

- Artáiz, Á. (2016) *Mejora de la conservación de los productos de la pesca mediante el desarrollo de modelos predictivos y la aplicación de nuevas tecnologías de conservación de los alimentos*. Universidad de Zaragoza.
- Awad, T. S. *et al.* (2012) ‘Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review’, *Food Research International*. Elsevier B.V., 48(2), pp. 410–427. doi: 10.1016/j.foodres.2012.05.004.
- Baumann, A. R., Martin, S. E. and Feng, H. (2009) *Removal of Listeria monocytogenes Biofilms from Stainless Steel by Use of Ultrasound and Ozone MATERIALS AND METHODS, Journal of Food Protection*.
- Beckett, M. A. and Hua, I. (2001) ‘Impact of Ultrasonic Frequency on Aqueous Sonoluminescence and Sonochemistry’, *The Journal of Physical Chemistry A*, 105(15), pp. 3796–3802. doi: 10.1021/jp003226x.
- Bilek, S. E. and Turantaş, F. (2013) ‘Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review’, *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, 166(1), pp. 155–162. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2013.06.028.
- Boye, J. I. and Arcand, Y. (2013) ‘Current Trends in Green Technologies in Food Production and Processing’, *Food Engineering Reviews*. doi: 10.1007/s12393-012-9062-z.
- Broekaert, K. *et al.* (2011) ‘Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media’, *Food Microbiology*, 28(6), pp. 1162–1169. doi: 10.1016/j.fm.2011.03.009.
- Calero, S. (2018) *Aplicación de técnicas moleculares al estudio de la vida útil de filetes de plicación de técnicas moleculares al estudio de la vida útil de filetes de merluza conservados en atmósferas modificadas*. Universidad de Zaragoza.
- Cao, S. *et al.* (2010) ‘Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest’, *Food Control*. Elsevier, 21(4), pp. 529–

532. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2009.08.002.

Cárcel, J. A. *et al.* (2012) 'Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound', *Journal of Food Engineering*. Elsevier, 110(2), pp. 200–207. doi: 10.1016/J.JFOODENG.2011.05.038.

Chandrapala, J. *et al.* (2012) 'Ultrasonics in food processing – Food quality assurance and food safety', *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier, 26(2), pp. 88–98. doi: 10.1016/J.TIFS.2012.01.010.

Chemat, F., Zill-e-Huma and Khan, M. K. (2011) 'Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction', *Ultrasonics Sonochemistry*. Elsevier, 18(4), pp. 813–835. doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2010.11.023.

Chowdhury, R. *et al.* (2012) 'Association between fish consumption, long chain omega 3 fatty acids, and risk of cerebrovascular disease: systematic review and meta-analysis.', *BMJ (Clinical research ed.)*. British Medical Journal Publishing Group, 345, p. e6698. doi: 10.1136/BMJ.E6698.

Ciudad Hidalgo, S. (2018) *Aplicación de ultrasonidos en el cocinado de alimentos*. Universidad de Zaragoza.

Elizaquível, P. *et al.* (2012) 'Application of propidium monoazide-qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of Escherichia coli O157:H7 in fresh-cut vegetable wash water', *Food Microbiology*. Academic Press, 30(1), pp. 316–320. doi: 10.1016/J.FM.2011.10.008.

Farmer, J. J. and Hickman-Brenner, F. W. (2006) 'The Genera Vibrio and Photobacterium', in *The Prokaryotes*. Springer New York, pp. 508–563. doi: 10.1007/0-387-30746-X\_18.

Ganesan, A. K. and Smith, K. C. (1968) 'Recovery of recombination deficient mutants of Escherichia coli K-12 from ultraviolet irradiation.', *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 33, pp. 235–242. doi: 10.1101/SQB.1968.033.01.027.

Gayán, E. *et al.* (2011) 'UV-C inactivation of Escherichia coli at different temperatures', *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Elsevier, 12(4), pp. 531–541.

doi: 10.1016/J.IFSET.2011.07.008.

- Gayán, E. *et al.* (2012) ‘Combining ultraviolet light and mild temperatures for the inactivation of *Escherichia coli* in orange juice’, *Journal of Food Engineering*. Elsevier, 113(4), pp. 598–605. doi: 10.1016/J.JFOODENG.2012.07.018.
- Gayán, E., Condón, S. and Álvarez, I. (2014a) ‘Biological Aspects in Food Preservation by Ultraviolet Light: A Review’, *Food and Bioprocess Technology*. doi: 10.1007/s11947-013-1168-7.
- Gayán, E., Condón, S. and Álvarez, I. (2014b) ‘Continuous-Flow UV Liquid Food Pasteurization: Engineering Aspects’, *Food and Bioprocess Technology*. Springer US, 7(10), pp. 2813–2827. doi: 10.1007/s11947-014-1267-0.
- Gouma, M. *et al.* (2016) ‘The use of UV light for food preservation: An overview’, in Pataro, G. and Ling, J. (eds) *High Intensity Pulsed Light in Processing and Preservation of Foods*. New York: Nova Science Publishers, Inc., pp. 1–41.
- Gram, L. *et al.* (2002) ‘Food spoilage--interactions between food spoilage bacteria.’, *International journal of food microbiology*, 78(1–2), pp. 79–97.
- Gram, L. and Dalgaard, P. (2002) ‘Fish spoilage bacteria--problems and solutions.’, *Current opinion in biotechnology*, 13(3), pp. 262–6.
- Gunter-Ward, D. M. *et al.* (2018) ‘Efficacy of ultraviolet (UV-C) light in reducing foodborne pathogens and model viruses in skim milk’, *Journal of Food Processing and Preservation*. doi: 10.1111/jfpp.13485.
- H. Sommers, C. *et al.* (2012) ‘Inactivation of *Francisella tularensis* Utah-112 on Food and Food Contact Surfaces by Ultraviolet Light’, *Journal of Food Processing & Technology*. OMICS International, 01(S11), p. doi: 10.4172/2157-7110.S11-002.
- He, K. *et al.* (2004) ‘Accumulated Evidence on Fish Consumption and Coronary Heart Disease Mortality: A Meta-Analysis of Cohort Studies’, *Circulation*, 109(22), pp. 2705–2711. doi: 10.1161/01.CIR.0000132503.19410.6B.
- Hemwimol, S., Pavasant, P. and Shotipruk, A. (2006) ‘Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*’, *Ultrasonics Sonochemistry*.

- Elsevier, 13(6), pp. 543–548. doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2005.09.009.
- Islam, M. S. *et al.* (2016) ‘UV-C irradiation as an alternative disinfection technique: Study of its effect on polyphenols and antioxidant activity of apple juice’, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. doi: 10.1016/j.ifset.2016.02.009.
- Keyser, M. *et al.* (2008) ‘Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice’, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. doi: 10.1016/j.ifset.2007.09.002.
- Koutchma, T. (2009) ‘Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods’, *Food and Bioprocess Technology*. doi: 10.1007/s11947-008-0178-3.
- Koutchma, T., Parisi, B. and Patazca, E. (2007) ‘Validation of UV coiled tube reactor for fresh juices’, *Journal of Environmental Engineering and Science*, 6(3), pp. 319–328. doi: 10.1139/s06-058.
- Kowalski, W. J. (2009) *Ultraviolet germicidal irradiation handbook : UVGI for air and surface disinfection*. Springer-Verlag.
- LILLARD, H. S. (1993) ‘Bactericidal Effect of Chlorine on Attached Salmonellae With and Without Sonification’, *Journal of Food Protection*. International Association for Food Protection , 56(8), pp. 716–717. doi: 10.4315/0362-028X-56.8.716.
- López-Malo, A. and Palou, E. (2005) ‘Ultraviolet light and food preservation’, in Barbosa-Cánovas, G. V., Tapia, M. S., and Cano, M. P. (eds) *Novel food processing technologies*. Madrid: CRC Press, pp. 405–421.
- Macé, E. S. *et al.* (2013) ‘Whole-genome sequencing reveals untapped genetic potential in Africa’s indigenous cereal crop sorghum’, *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4(1). doi: 10.1038/ncomms3320.
- Majid, I., Nayik, G. A. and Nanda, V. (2015) ‘Ultrasonication and food technology: A review’, *Cogent Food & Agriculture*. Edited by F. Yildiz. Cogent, 1(1). doi: 10.1080/23311932.2015.1071022.
- Mamane-Gravetz, H. and Linden, K. G. (2005) ‘Relationship between physiochemical

- properties, aggregation and u.v. inactivation of isolated indigenous spores in water’, *Journal of Applied Microbiology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 98(2), pp. 351–363. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02455.x.
- Mañas, P. and Pagán, R. (2005) ‘Microbial inactivation by new technologies of food preservation’, in *Journal of Applied Microbiology*. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02561.x.
- Mansor, A. *et al.* (2014) ‘Efficacy of Ultraviolet Radiation as Non-thermal Treatment for the Inactivation of Salmonella Typhimurium TISTR 292 in Pineapple Fruit Juice’, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. doi: 10.1016/j.aaspro.2014.11.025.
- MAPAMA (2017) *Informe del consumo de alimentación en España 2016*. Madrid. Available at: [www.mapama.gob.es](http://www.mapama.gob.es).
- Mikš-Krajnik, M. *et al.* (2017) ‘Inactivation of *Listeria monocytogenes* and natural microbiota on raw salmon fillets using acidic electrolyzed water, ultraviolet light or/and ultrasounds’, *Food Control*. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.11.033.
- Mulet, A. *et al.* (2003) ‘New Food Drying Technologies - Use of Ultrasound’, *Food Science and Technology International*, 9(3), pp. 215–221. doi: 10.1177/1082013203034641.
- van Netten, P. *et al.* (1989) ‘Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp.’, *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, 8(4), pp. 299–316. doi: 10.1016/0168-1605(89)90001-9.
- Oteiza, J. M., Giannuzzi, L. and Zaritzky, N. (2010) ‘Ultraviolet treatment of orange juice to inactivate *E. coli* O157:H7 as affected by native microflora’, *Food and Bioprocess Technology*, 3(4), pp. 603–614. doi: 10.1007/s11947-009-0194-y.
- Ozer, N. P. and Demirci, A. (2006) ‘Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment’, *International Journal of Food Science and Technology*. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.01071.x.

- Pataro, G. and Lyng, J. (eds) (2016) *High intensity pulsed light in processing and preservation of foods, Food science and technology*. New York: Hauppauge, New York : Nova Science Publishers, Inc., 2016.
- Pedros-Garrido, S. *et al.* (2017) ‘Assessment of high intensity ultrasound for surface decontamination of salmon (*S. salar*), mackerel (*S. scombrus*), cod (*G. morhua*) and hake (*M. merluccius*) fillets, and its impact on fish quality’, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41, pp. 64–70. doi: 10.1016/j.ifset.2017.02.006.
- Piyasena, P., Mohareb, E. and McKellar, R. C. (2003) ‘Inactivation of microbes using ultrasound: a review.’, *International journal of food microbiology*, 87(3), pp. 207–16.
- Povey, M. J. W. (Malcolm J. W. . and Mason, T. J. (1998) *Ultrasound in food processing*. Blackie Academic & Professional.
- Raso, J. and Barbosa-Cánovas, G. V. (2003) ‘Nonthermal Preservation of Foods Using Combined Processing Techniques’, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. doi: 10.1080/10408690390826527.
- Rostagno, M. A., Palma, M. and Barroso, C. G. (2003) ‘Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones’, *Journal of Chromatography A*. Elsevier, 1012(2), pp. 119–128. doi: 10.1016/S0021-9673(03)01184-1.
- Salazar, J. *et al.* (2010) ‘Effect of Ultrasound on Food Processing’, in Ahmed, J. *et al.* (eds) *Novel food processing: effects on rheological and functional properties*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, pp. 65–83.
- Sastry, S. K., Datta, A. K. and Worobo, R. W. (2000) ‘Ultraviolet Light’, *Journal of Food Science*. Wiley/Blackwell (10.1111), 65, pp. 90–92. doi: 10.1111/j.1750-3841.2000.tb00623.x.
- Sommers, C. H., Sites, J. E. and Musgrove, M. (2010) ‘ULTRAVIOLET LIGHT (254 NM) INACTIVATION OF PATHOGENS ON FOODS AND STAINLESS STEEL SURFACES’, *Journal of Food Safety*. John Wiley & Sons, Ltd, 30(2), pp. 470–479. doi: 10.1111/j.1745-4565.2010.00220.x.

- Suslick, K. S. (1994) 'The chemistry of ultrasound', in *Encyclopaedia Britannica*. Chicago, pp. 138–155.
- Swamy, K. M., Narayana, K. L. and Misra, V. N. (2005) 'Bioleaching with ultrasound', *Ultrasonics Sonochemistry*. Elsevier, 12(4), pp. 301–306. doi: 10.1016/J.ULTSONCH.2004.01.035.
- Vélez-Colmenares, J. J., Acevedo, A. and Nebot, E. (2011) 'Effect of recirculation and initial concentration of microorganisms on the disinfection kinetics of *Escherichia coli*', *Desalination*, 280(1–3), pp. 20–26. doi: 10.1016/j.desal.2011.06.041.
- Veress, E., Sebok, M. P. and Suciú, T. (1995) 'The effect of the ultrasound action on the physiological parameters of suga...: AlcorZe', *Novenytermeles*, 44(1), pp. 55–61.
- Wang, C. *et al.* (2006) 'n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not  $\alpha$ -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(1), pp. 5–17. doi: 10.1093/ajcn/84.1.5.
- Wu, H., Hulbert, G. J. and Mount, J. R. (2000) 'Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter', *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(3), pp. 211–218. doi: 10.1016/S1466-8564(00)00020-5.
- Wu, J., Lin, L. and Chau, F. (2001) 'Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells', *Ultrasonics Sonochemistry*. Elsevier, 8(4), pp. 347–352. doi: 10.1016/S1350-4177(01)00066-9.
- Xia, T., Shi, S. and Wan, X. (2006) 'Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion', *Journal of Food Engineering*. Elsevier, 74(4), pp. 557–560. doi: 10.1016/J.JFOODENG.2005.03.043.
- Yaun, B. R. *et al.* (2004) 'Inhibition of pathogens on fresh produce by ultraviolet energy', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, 90(1), pp. 1–8. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00158-2.