



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL DE LA USC

Marcos  
Quintela Baluja

Tesis doctoral

DESARROLLO Y  
OPTIMIZACIÓN DE  
TECNOLOGIAS ÓMICAS PARA  
LA IDENTIFICACIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN DE  
BACTERIA ALTERANTES Y  
PATÓGENOS EN ALIMENTOS

Santiago de Compostela, 2022





TESIS DE DOCTORADO

**DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE  
TECNOLOGIAS ÓMICAS PARA LA  
IDENTIFICACIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN DE BACTERIA  
ALTERANTES Y PATÓGENOS EN  
ALIMENTOS**

Marcos Quintela Baluja

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INNOVACION EN SEGURIDAD Y TECNOLOGIAS ALIMENTARIAS

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO



2022



D./Dña. **Marcos Quintela Baluja**

Título de la tesis: **Desarrollo y optimización de tecnologías ómicas para la identificación y caracterización de bacterias alterantes y patógenos en alimentos**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela, a 26 de Octubre de 2022.**

**Firma electrónica**



## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Desarrollo y optimización de tecnologías ómicas para la  
identificación y caracterización de bacterias alterantes y  
patógenos en alimentos

D<sup>a</sup>. **María del Pilar Calo Mata**  
D. **Jorge Barros Velázquez**

INFORMA/N:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D. **Marcos Quintela Baluja**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de **COMPENDIO DE PUBLICACIONES**, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 31 de octubre de 2022



## **CONFLICTO DE INTERESES**

El alumno declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la Tesis Doctoral

## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral representa un tiempo cargado de momentos y decisiones que han marcado mi vida. Sin embargo, cuando uno mira atrás, recién ahí se da cuenta de que todo comenzó mucho antes. Por ello, esta Tesis Doctoral es producto de los sacrificios de mis padres Margarita Baluja Bermúdez y Ramón Quintela Carreira. Gracias Mamá por tu paciencia, por estar siempre a nuestro lado, y por no rendirte nunca por muy mal que nos tratara la vida.

Gracias a la otra madre de la casa, a mi amiga del instituto, mi novia en la universidad, mi pareja en la distancia, mi compañera de aventuras, mi esposa, y la madre de mi hija. Gracias Noelia, por acompañarme y apoyarme durante todo este viaje que se llama vida, y gracias por esta nueva etapa junto a Noa. Gracias Noa, porque, aunque hayas llegado al final de esta etapa, todo ha empezado a ser otra vez como un cuento.

David, gracias por ser como eres. Los años no han cambiado esa felicidad y esa tranquilidad que transmites, y espero que se me haya pegado un poco después de tantos años.

Karola, tres años en Lugo han dado para mucho. Gracias por ser mi mentora y mi amiga, gracias por permitirme conocer a gente como Giuliano, y al chiflado de Alfredo. Gracias por hacer de Lugo mi casa, por compartir amigos, y por tantos momentos inolvidables. La ciencia está bien, pero no hubiera sido lo mismo sin ti.

Conchi, gracias por hacerme sentir querido en el laboratorio, y por toda tu ayuda. Hemos pasado buenos momentos, y ojalá hubieran sido más. Gracias también a Mónica, Carolina, Carmen y Alicia por vuestra ayuda y cariño en el LHICA. Gracias a los internacionales del LHICA, especialmente a mis amigos de Egipto, Mohamed Alnakip y Mohamed Abouelnaga, con quién tanto he trabajado y tanto me he reído. Gracias Leo y Natalia por traer Argentina a Lugo, y por contagiar vuestra fuerza y alegría.

Gracias a Vanesa, Julio, Alberto, Lucia y Tere, por haber compartido una pasión que nos une, y una amistad que perdura. Vanesa, no siempre se alcanzan los objetivos siguiendo una línea recta, o eso espero.

Finalmente, quiero dar las gracias a mis directores de tesis, por su eterna paciencia, la cual ha hecho que este trabajo sea posible. Gracias Jorge y Pili por vuestro apoyo constante, vuestra dedicación y supervisión, por vuestras ideas y consejos, por transmitirme parte de vuestros conocimientos y por guiarme y animarme en la búsqueda de resultados. Gracias Pili por tu cercanía, y por enseñarme que un mundo competitivo como la academia, otra manera de hacer ciencia es posible. Gracias por no dejar que me rindiera, gracias por tu confianza, y gracias por haberme dado la oportunidad.



### **EU SON...**

Balbino. Un rapaz da aldea. Coma quen di, un ninguén. E ademais, pobre...

Vexo o mundo darredor de min e adoezo por entendolo.

Vexo sombras e luces, nubeiros que viaxan, lume, árbores.

¿Que é todo isto?

Ninguén me di, poño por caso, para que serven as estrelas,

nin onde morren os paxaros. Sei de certo que

moitísimos anos antes de nacer eu xa había

sol e penedos e fuxía a auga polo río.

E estou seguro de que todo seguirá igual despois de que eu morra.

Xose Neira Vilas





# 1 ÍNDICE

**1 ÍNDICE**

1 ÍNDICE..... 1

    1.1 Abreviaturas..... 3

    1.2 Lista de figuras ..... 6

    1.3 Lista de tablas ..... 7

2 RESUMEN ..... 9

3 INTRODUCCIÓN..... 13

    3.1 Introducción a la microbiología de los alimentos..... 13

    3.2 Microorganismos patógenos transmitidos por alimentos ..... 21

    3.3 Detección y caracterización de microorganismos en alimentos ..... 31

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ..... 43

    4.1 Hipótesis ..... 43

    4.2 Objetivos..... 44

5 HERRAMIENTAS METODOLÓGICAS ..... 47

    5.1 Materiales ..... 47

    5.2 Métodos ..... 50


6 TRABAJOS PUBLICADOS ..... 52

    6.1 Artículo 1 ..... 53



6.2 Artículo 2.....	54
6.3 Artículo 3.....	55
6.4 Artículo 4.....	56
7 DISCUSIÓN.....	58
7.1 Tecnologías proteómicas en microbiología de los alimentos.....	59
7.2 Técnicas genómicas en microbiología de los alimentos.....	67
8 CONCLUSIONES.....	76
8.1 Conclusiones generales.....	76
8.2 Conclusiones específicas.....	76
9 BIBLIOGRAFÍA.....	79

**1.1 ABREVIATURAS**

ACN	Acetonitrilo
ADN	esoxirribonucleico
aintI	Integrón antropogénico de clase 1
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos
ARN	Ácido ribonucleico
<i>atpA</i>	Subunidad $\alpha$ de la ATP sintetasa en bacterias
BAL	Bacterias ácido-lácticas
BHI	Brain-heart infusion media (Caldo de infusión de cerebro y corazón)
CCS	Ion collision cross-sectional area (Sección transversal de colisión de iones)
dNTPs	dideoxynucleótidos
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades)
<i>EcN</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
ESBL	Extended-spectrum beta-lactamases (Betalactamasas de espectro extendido)
ESI	Electrospray ionization (Ionización por electrospray)
ETA	Enfermedades transmitidas por los alimentos
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
GO	Gene Ontology (Ontología de genes)
	Generally Recognized as Safe

	(Generalmente reconocido como seguro)
HTS	High Throughput Sequencing (Secuenciación de alto rendimiento)
IT	Ionic trap (Trampa iónica)
Kb	Kilobase
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes (Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto)
LC	Liquid chromatography (Cromatografía líquida)
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass Spectrometry (Ionización/desorción por láser asistida por matriz)
Mb	Millones de bases
MRS	Medio De Man, Rogosa y Sharpe
MS	Mass spectrometry (Espectrometría de masas)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MWCO	Molecular weight cutoff (Peso molecular de corte)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica)
m/z	Relación masa/carga
OMS	Organización mundial de la salud
ONT	Oxford nanopore technology (Tecnología Oxford Nanopore)
PASEF	Parallel accumulation serial fragmentation

	(Acumulación paralela y fragmentación en serie)
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
<i>pheS</i>	Subunidad $\alpha$ de la fenilalanina-ARNt sintetasa en bacterias
PCA	Plate Count Agar (Agar de recuento en placa)
QPS	Qualified Presumption of Safety (Presunción cualificada de seguridad)
RAM	Resistencia antimicrobiana
<i>rpoA</i>	Subunidad $\alpha$ de la ARN polimerasa bacteriana
SNG	Secuenciación de nueva generación
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleótido único)
TFA	Trifluoroacetic acid (Ácido trifluoroacético)
Tims	Trapped Ion Mobility Spectrometry (Espectrometría de iones atrapados)
TOF	Time of flight (Tiempo de vuelo)
WGS	Whole genome sequencing (Secuenciación del genoma completo)

## 1.2 LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Número de bases (A) y secuencias (B) depositadas en la base de datos GenBank desde su comienzo en 1982. El número de bases se duplica cada 18 meses. Los genomas empezaron a depositarse en el año 2002. Datos obtenidos de [“https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics”](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics) .....20
- Figura 2: Representación de la cadena alimentaria con los principales puntos donde se pueden producir procesos de contaminación.....21
- Figura 3: Árbol filogenético sin raíz de las BAL, incluyendo géneros aerobios y anaerobios facultativos. Nota: Las distancias evolutivas son aproximadas. Figura adaptada de Axelsson & others, 2004 (RightsLink® 5480660578035) .....25
- Figura 4: Distribución de las especies del género *Enterococcus* en la naturaleza. El dendrograma muestra las relaciones filogenéticas. Las fuentes de aislamiento se indican para cada especie. Las cruces rojas en humanos representan las especies descritas en infecciones. Datos obtenidos de Lebreton et al., 2014.....26
- Figura 5: Clasificación de las bacteriocinas de BAL según la reciente clasificación de Alvarez-Sieiro et al., 2016. En gris con asterisco se encuentran las clases identificadas in silico. En el recuadro rojo se ve donde se encuentran los distintos tipos de bacteriocinas en la nueva clasificación, siendo la mayoría de Clase II. ....28
- Figura 6: Árbol filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de proteínas esenciales. El árbol contiene especies representativas del género *Klebsiella* y *Raoultella*, usándose *Shimwellia blattae* DSM 4481T como grupo externo. Las especies de *Raoultella* se han resaltado en azul (*R. terrigena*), naranja (*R. eléctrica*), verde (*R. planticola*), y amarillo (*R. ornithinolytica*). El árbol refleja

como Raoultella y Klebsiella forman un grupo monofilético. Datos obtenidos de Ma et al., 2021.....30

Figura 7: Esquema de los métodos para la identificación y caracterización de microorganismos. El empleo de las tecnologías ómicas ha permitido aumentar el espectro de estudios en la microbiología de los alimentos.....32

Figura 8: Línea temporal de las diferentes generaciones de secuenciación, resaltando las principales tecnologías, y características más importantes. ....35

Figura 9: Proceso de identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS. Se requieren de cuatro pasos: (1) cristalización de la muestra con la matriz, (2) desorción-ionización láser, (3) separación de las proteínas por tiempo de vuelo y detección, (4) producción de un perfil espectral, (5) comparación con una base de datos. ....39

Figura 10: Diagrama de la nueva generación de proteómica en cuatro dimensiones. ....41

**1.3 LISTA DE TABLAS**

Tabla 1: Principales agentes causales de ETA. Datos obtenidos del libro de la FDA: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. ....23

Tabla 2: Cepas bacterianas usadas en este estudio, su fuente, y principales metodologías empleadas para su identificación y caracterización.....49



## 2 RESUMEN

## 2 RESUMEN

Las mejoras en el saneamiento en la industria alimentaria, junto con la mejora de las condiciones de almacenamiento de los productos alimentarios, consiguieron reducir de manera significativa la carga de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), así como el deterioro de éstos. Sin embargo, la globalización ha generado redes de distribución más complejas y fragmentadas, que conllevan una mayor probabilidad de introducción y reemergencia de microorganismos alterantes y patógenos en alimentos.

Tradicionalmente, los agentes microbiológicos patógenos y alterantes en alimentos se han identificado mediante métodos de aislamiento, y consecuente caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica. Estos métodos son tediosos y precisan varios días para ser completados, por lo que no responden a las nuevas necesidades de una industria alimentaria global. Los nuevos desafíos en el control de la inocuidad alimentaria requieren de métodos de detección y caracterización precoz, no sólo para reducir la morbilidad y la mortalidad relativas a las ETA, sino también para evitar pérdidas económicas tanto al productor como al distribuidor de alimentos.

Por tanto, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido desarrollar y optimizar protocolos de identificación y caracterización de bacterias alterantes y patógenos en alimentos, usando tecnologías de última generación (ómicas). Específicamente, el trabajo se ha centrado en el género *Enterococcus* debido a su naturaleza dual. Por un lado, *Enterococcus spp.* son patógenos oportunistas de humanos, por otro lado, son un importante componente del microbiota intestinal, siendo también usados en la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados. Además, se ha trabajado con un patógeno emergente como *Raoultella*

*ornithinolytica*. Para ello se desarrollaron metodologías analíticas sensibles y precisas, basadas en la genómica y en la proteómica.

En el caso de *Enterococcus*, las especies de mayor relevancia en alimentos fueron identificadas mediante secuenciación de primera generación (secuenciación de Sanger) empleando el gen *16S ARNr* como diana. También se realizó un análisis del proteoma intracelular empleando espectrometría de masas (MS) MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz – tiempo de vuelo). Ambas estrategias se combinaron en este estudio con el fin de evaluar sus ventajas, limitaciones y complementariedad. MALDI-TOF MS permitió la identificación rápida y de bajo coste de las especies estudiadas.

El siguiente trabajo se centró en la identificación y caracterización de dos cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de carne envasada al vacío, productoras de péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal (bacteriocinas), y descritas como potencialmente probióticas. Para ello se secuenció el genoma completo mediante SNG, y el proteoma completo mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con el sistema TimsTOF Pro (espectrometría de iones atrapados - tiempo de vuelo). Estos métodos permitieron la caracterización completa de las cepas bacterianas, siendo especialmente relevante su caracterización, en menos de 24 h, mediante el análisis del proteoma. Además, el estudio del proteoma ha demostrado un gran potencial para determinar y optimizar las propiedades biotecnológicas de las bacterias ácido-lácticas (BAL) en la industria alimentaria.

Finalmente, se identificó y caracterizó una cepa de *R. ornithinolytica* resistente a diversos antibióticos mediante el uso de secuenciación de tercera generación. Los resultados obtenidos permitieron obtener las secuencias completas del cromosoma y de diez plásmidos. Esta

en la especie; así como la potencial producción de histamina, una amina biógena responsable de la intoxicación histamínica o escombriosis. La tecnología de secuenciación usada es portátil, y permite el análisis de los resultados en tiempo real, acelerando así la toma de decisiones.



## 3 INTRODUCCIÓN

## 3 INTRODUCCIÓN

### 3.1 INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

La microbiología de los alimentos se encarga del estudio de la composición microbiana y de los microorganismos que se encuentran en los alimentos. Por lo tanto, estudia el impacto positivo y negativo que cada microorganismo ejerce sobre los alimentos, y sobre la salud de aquellos que los consumen. La Microbiología de los Alimentos, como disciplina, nació a mediados del siglo XIX tras los trabajos de Louis Pasteur, en los que refutó definitivamente la “teoría de la generación espontánea” y desarrolló la “teoría germinal de las enfermedades infecciosas”, demostrando que todo ser vivo procede de otro ser vivo anterior. Además, Pasteur realizó descubrimientos en el deterioro y la preservación de los alimentos, entre los cuales se encuentra el tratamiento térmico para la eliminación de microorganismos indeseables y que es conocido como pasteurización. Años después, Robert Koch formuló los llamados postulados de Koch (R Koch, 1890), que representan la piedra angular de cualquier estudio sobre la etiología de una enfermedad y son una herramienta fundamental para poder establecer la relación causal entre un organismo específico y una enfermedad. Siendo, sin duda, un punto de inflexión en el estudio de las ETA.

La relación de los seres humanos y la microbiología de los alimentos existe incluso antes de que se conocieran la vida microscópica, observada por primera vez por Antonie van Leeuwenhoek mediante el uso de un microscopio en 1676 (animálculos). Hay considerable evidencia que sostiene que el consumo de alimentos fermentados, como la cerveza, el pan, el vino, el kéfir, el yogur, o el queso, entre otros, se han usado con fines nutricionales y terapéuticos desde el Neolítico (Ozen & Dinleyici, 2015). En dicha época, los seres humanos

agricultores y ganaderos. Estamos ante una transformación radical de la forma de vida, en la que aparece el excedente, la división social del trabajo y la propiedad privada. Pero también ante un cambio radical en la dieta que produjo cambios genéticos en la especie humana, permitiendo una mejor adaptación al entorno (Laland et al., 2010).

Mediante un proceso de aprendizaje de ensayo y error, el ser humano aprendió durante miles de años a cultivar y a domesticar animales, pero también a aprovechar las propiedades beneficiosas de los microorganismos para preservar, proteger, y mejorar los alimentos. La producción en masa de productos fermentados como pan y cerveza se remonta a los años 3000 y 4000 a. C., ya sea en los hornos de pan egipcios o en las cervecerías persas. Ya en la Edad Media, la producción de alimentos fermentados como el pan, la cerveza o el queso era realizado por artesanos y gremios organizados; cuyo aprendizaje ha pasado de generación en generación hasta nuestros días. Resulta difícil imaginar que la producción y conservación de alimentos mediante procesos de fermentación se haya producido sin conocer la existencia de los seres vivos implicados, o sin conocer y entender los distintos procesos de fermentación que fueron descubiertos durante el siglo XIX (Pasteur & Faulkner, 1879). Del mismo modo, otros métodos de conservación de los alimentos, como el secado, la salazón o el ahumado, ya se usaban hace miles de años, permitiendo el suministro uniforme de los alimentos a lo largo del año (Joardder & Masud, 2019).

La importancia de la alimentación en la salud se conoce desde hace miles de años. Así, Hipócrates en el siglo IV a. C. escribió: “Que la comida sea tu alimento y tu alimento, tu medicina” en un claro reconocimiento a la alimentación funcional. En el año 76 a. C., el historiador romano Plinio describió el uso de leches fermentadas en el tratamiento de las gastroenteritis, siendo el primer registro escrito de su uso para la mejora de la salud (Bottazzi, 1983). Sin embargo, no es hasta principios del siglo XX cuando Elie Metchnikoff dio los

## INTRODUCCIÓN

primeros pasos en las investigaciones de los probióticos (Metchnikoff, 1907). Metchnikoff observó que la longevidad de los habitantes de las aldeas rurales en Bulgaria estaba relacionada con el consumo habitual de leche fermentada, y postuló que las bacterias intestinales generaban una autointoxicación que envenenaba nuestro organismo y que la acidificación de este a través de los bacilos ácidos que contienen los yogures podría contribuir a mantener la salud y a prolongar la vida.

El término probiótico fue acuñado por primera vez por Roy Fuller en 1989 (Fuller, 1989), siendo su definición refinada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el año 2002 (WHO/FAO, 2002). Los probióticos, por tanto, son “microorganismos vivos, que administrados en concentraciones adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedador”. Los trabajos de Metchnikoff derivaron en el uso de las bacterias ácido-lácticas (BAL) y bifidobacterias en productos alimentarios para la promoción de la salud intestinal y la prevención de enfermedades. Así, en 1935 Minoru Shirota desarrolló la primera bebida probiótica comercial llamada Yakult, que contiene *Lacticaseibacillus casei*. Desde entonces, el mercado de productos probióticos no ha parado de crecer alcanzando los 65.9 billones de dólares americanos en 2022 (Markets & Markets, 2020). El empleo de probióticos en la práctica clínica también se introdujo a principios del siglo XX, incluso antes del descubrimiento de los antibióticos por Alexander Fleming en 1928 (Fleming, 1944). Alfred Nissle descubrió la actividad antagonista de la cepa *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) contra bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal. *EcN* fue aislada durante la Primera Guerra Mundial de las heces de un soldado alemán que no había desarrollado diarrea infecciosa, convirtiéndose en una de las cepas bacterianas más estudiadas y siendo comercializada hasta la actualidad en preparaciones probióticas como Mutaflor® (Sonnenborn, 2016).

Nissle estaba interesado en las propiedades antagonistas de EcN y no centró sus investigaciones en las sustancias bioquímicas responsables de las mismas. Por lo tanto, no fue hasta 1925 cuando los trabajos de André Gratia llevaron al descubrimiento de las bacteriocinas. Gratia observó efectos antagonistas entre cepas de *E. coli*, los cuales eran producidos por la colicina V. Pocos años después, se aisló la bacteriocina nisina producida por *Lactococcus lactis* (Rogers & Whittier, 1928), siendo purificada y comercializada como Nisaplin® en la década de 1950 (Mattick et al., 1947), y posteriormente aprobado su uso en alimentos en Estados Unidos en la década de 1960. El empleo de la nisina se ha aprobado recientemente en la Unión Europea como conservante en la elaboración de quesos (EFSA, 2017). El término bacteriocina se introdujo en 1953 (Jacob et al., 1953), definiéndose como “proteínas antibacterianas altamente específicas, que son producidas por ciertas cepas bacterianas y activas contra otras cepas de la misma especie”. El amensalismo debido a la presencia de bacterias probióticas, es causado por la producción de bacteriocinas, pero también a i) la producción de otros compuestos inhibidores como los ácidos, ii) la competición por los nutrientes, iii) la inmunoestimulación del hospedador contra los patógenos, y/o iv) la competición por los sitios de unión (Patterson & Burkholder, 2003).

La habilidad para cultivar y aislar microorganismos fue crucial en el desarrollo de la microbiología. Para ello fue necesario la creación de medios artificiales, siendo Pasteur el primero en desarrollar un medio de cultivo líquido reproducible en 1860 (Collard & Collard, 1976). Sin embargo, los medios líquidos dificultaban el aislamiento de cultivos puros, por lo que Koch, basándose en los métodos de Schroeter (Schroeter, 1872) reportó por primera vez el uso de agar-agar en medios de cultivo sólidos. Este avance permitió a Koch desarrollar sus postulados, aislando por primera vez *Bacillus anthracis*, lo que supuso un punto de inflexión en el control de las enfermedades infecciosas (Robert Koch, 1882). Otro descubrimiento

## INTRODUCCIÓN

importante fue el de las esporas de resistencia, descubiertas por Cohn en 1876, al investigar porqué el tratamiento térmico a 100 °C no era suficiente para eliminar las bacterias, cuando temperaturas más bajas eran suficientes para eliminar otros seres vivos (Cohn, 1876). A partir de este momento, empezó el desarrollo de medios de cultivo selectivos y diferenciales, permitiendo el aislamiento y caracterización de los microorganismos.

Los avances en microscopía, genética y bioquímica a mediados del siglo XX, significaron el inicio de la microbiología moderna. Uno de los principales avances se produjo cuando Oswald Avery, con la colaboración de Colin MacLeod y Maclyn McCarty, demostró que el principio transformante de los experimentos de Frederick Griffith (Griffith, 1928) era el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Avery et al., 1944). Este descubrimiento fue la primera demostración científica de que el ADN era el transmisor de la información genética, describiéndose en 1953 su estructura con los trabajos de Rosalind Franklin, James Watson y Francis Crick (Crick & Watson, 1953; Franklin, 1953). Pocos años después, Matthew Meselson y Franklin Stahl usando *E. coli* describieron el método de replicación del ADN (Meselson & Stahl, 1958).

Las décadas de 1970 y 1980 fueron fundamentales en el desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular, naciendo la tecnología del ADN recombinante y la ingeniería genética. Además, en la década de 1970, Pierre Janin inventó el índice de perfil analítico, que permitió identificar bacterias de relevancia clínica en función de diversas pruebas bioquímicas y que actualmente es comercializado por la empresa bioMérieux (Smith et al., 1972). En 1981 Walt Hill reportó la detección de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) mediante hibridación con sondas marcadas radioactivamente, resaltando, además, su potencial uso en alimentos (Hill, 1981). Dos años más tarde, Kary Mullis concibió la idea de la reacción en cadena de la polimerasa, la cual se ha extendido a todos los ámbitos de la biología molecular y ha permitido la detección,

cuantificación y caracterización de microorganismos de manera más rápida, y con una alta especificidad.

En 1965 Robert Holley, empleando una técnica similar a las que se usaban para secuenciar proteínas, descifró la primera secuencia de una molécula de ADN (Holley et al., 1965). Un trabajo de siete años para descifrar 76 bases del ARNt-alanina de levadura. Poco tiempo después, el grupo de Frederick Sanger desarrolló un método de secuenciación con dideoxinucleótidos, que sirven como terminadores de la reacción, y con el que consiguieron secuenciar el genoma del bacteriófago Phi-X174 (Sanger et al., 1977). La automatización de la secuenciación de Sanger (secuenciación de primera generación) se introdujo años más tarde, completándose el primer genoma bacteriano (*Haemophilus influenzae*) en 1995 (Fleischmann et al., 1995).

La secuenciación de segunda generación o secuenciación de nueva generación (SNG) se introdujo en el año 2005 por 454 Life Sciences. SNG es una secuenciación masiva y paralela capaz de generar millones de lecturas por carrera de secuenciación, lo que contrasta con la primera generación, que puede producir sólo 96 lecturas por carrera. SNG ha sufrido un proceso de evolución, cerrando 454 Life Sciences en 2013 e irrumpiendo tecnologías más competitivas, como las comercializadas por Illumina Technologies desde 2008, o la tecnología Ion Torrent de Thermo Fisher Scientific, que salió al mercado en 2010. En los últimos años, ha emergido la tercera generación de secuenciadores que permiten la secuenciación a tiempo real de una única hebra de ADN, eliminando la necesidad de una amplificación previa, necesaria en la primera y segunda generación de secuenciadores, y obteniendo tamaños de lectura mucho más grandes. Actualmente, existen en el mercado plataformas de tercera generación de las compañías Pacific Biosciences desde el año 2011, y Oxford Nanopore Technologies desde

## INTRODUCCIÓN

Los métodos tradicionales de identificación y caracterización de microorganismos en alimentos requieren de un cultivo previo, siendo actualmente los métodos estándar (Bhunja, 2014). Sin embargo, aunque estos métodos no son complejos y su coste no es elevado, son métodos laboriosos que requieren distintos pasos, y su sensibilidad sigue siendo limitada. Por tanto, se precisa de dos o tres días para la obtención de resultados, siendo generalmente necesarias pruebas adicionales como test bioquímicos, test moleculares, o el uso de la espectrometría de masas para confirmar el patógeno, o el microorganismo de interés (Ellis et al., 2018).

La tecnología de secuenciación ha mejorado drásticamente, disminuyendo los tiempos de detección y caracterización de los microorganismos, así como ha mejorado la consistencia de los resultados. El avance es tal, que hoy en día es posible la secuenciación en tiempo real en un teléfono inteligente (Raza & Qazi, 2019). El aumento de la accesibilidad, así como la reducción de los costes de las plataformas de secuenciación, hace que nos encontremos en un proceso de transición, pasando del uso de métodos tradicionales, a una era genómica y postgenómica en la microbiología de los alimentos. La Comisión Europea por medio de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha comenzado a trabajar en la implementación de las tecnologías de secuenciación para la detección y control de potenciales riesgos microbiológicos con un enfoque multi-país (EFSA, 2019, 2021). La ambición de la Comisión Europea sigue una estrategia de “Una Salud” integrando los esfuerzos de distintas agencias. Así, la EFSA, ha creado recientemente un sistema de análisis genómico para patógenos alimentarios, capaz de interactuar con el sistema de tipado molecular del Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) (EFSA, 2022).

El avance continuo de las tecnologías de secuenciación masiva ha permitido aumentar la cobertura de secuenciación de todo el genoma y desarrollar herramientas eficientes de análisis de datos, a la vez que se ha reducido rápidamente el coste. Pero también, el incremento del

número de genomas en las bases de datos, duplicándose cada 18 meses el número de bases en GenBank desde 1982 (Figura 1), ha supuesto un punto de inflexión para la proteómica. Este aumento de los datos genómicos ha permitido extender las bases de datos de proteínas. Además, la optimización de las técnicas de separación de proteínas, y la introducción de nuevos métodos de ionización en espectrometrías de masas (MS), han sido clave para el estudio del proteoma microbiano a gran escala.

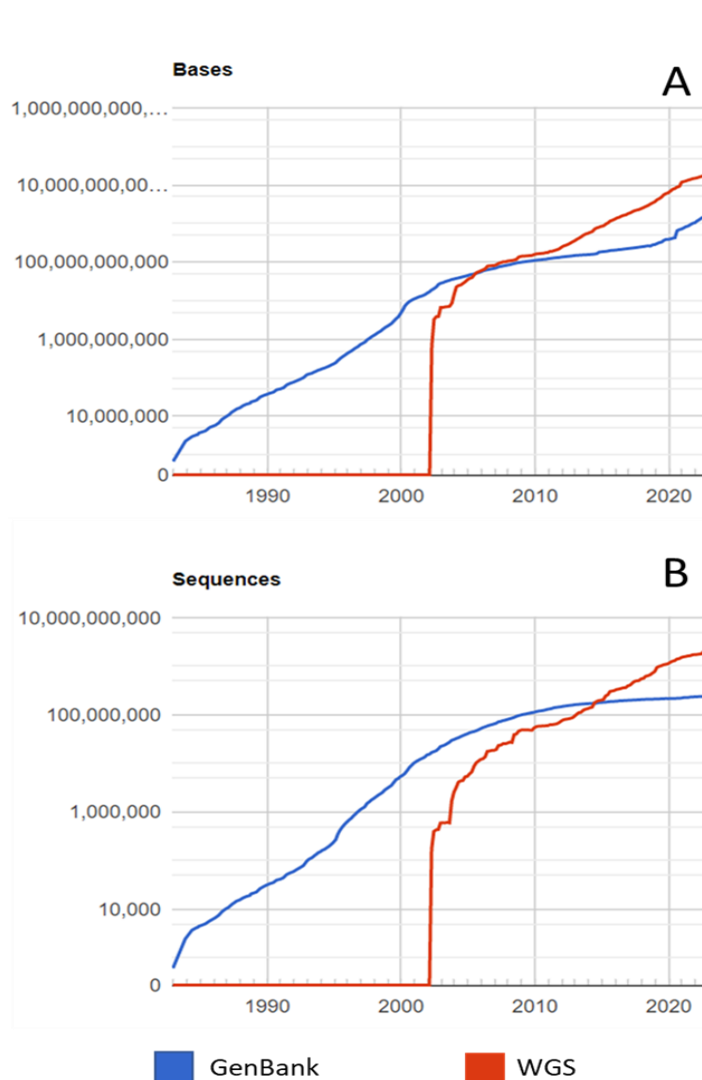


Figura 1: Número de bases (A) y secuencias (B) depositadas en la base de datos GenBank desde su comienzo en 1982. El número de bases se duplica cada 18 meses. Los genomas empezaron a depositarse en el año 2002. Datos obtenidos de "<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics>".

### 3.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

Las ETA afectan generalmente al tracto gastrointestinal y son causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados. La contaminación de los alimentos puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimentaria, existiendo diversas fuentes de contaminación en todas las etapas. Estamos hablando de un fenómeno complejo en el que la contaminación ambiental a través del agua, el suelo o el aire juegan un papel importante.

La contaminación en la industria alimentaria debe considerarse como un hecho accidental, producto de la existencia de condiciones higiénicas inadecuadas durante los procesos de producción y preparación (Figura 2). Por lo tanto, la industria alimentaria tiene que garantizar que los riesgos microbiológicos se eliminan o minimizan en la medida en que no puedan causar daño a la salud humana. Para ello, los riesgos microbiológicos deben incluirse en los sistemas preventivos de gestión de la inocuidad de los alimentos de aplicación a toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria a la distribución minorista. Estos sistemas se aplican a nivel global, y son los Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC).

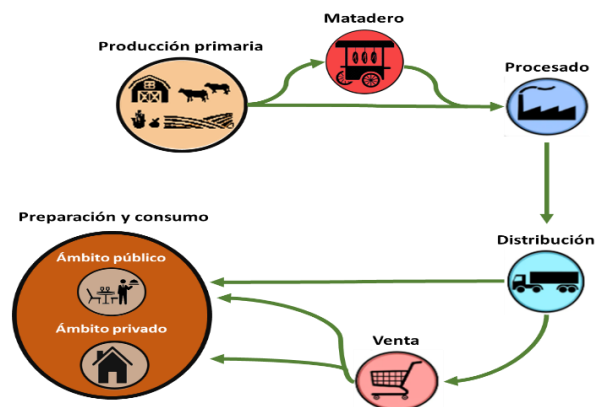


Figura 2: Representación de la cadena alimentaria con los principales puntos donde se pueden producir procesos de contaminación.

a los agentes bacterianos. El desarrollo de una ETA requiere que co-ocurrán diversos factores como i) la presencia del agente causante de la ETA; ii) un vector alimentario; iii) que el agente causante sea capaz de sobrevivir, replicarse, o producir toxinas, y iv) se produzca una ingesta suficiente para causar la ETA.

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha publicado el manual de las ETA, con los principales agentes causales (Tabla 1), así como sus principales características, hábitats, y principales síntomas y complicaciones de las enfermedades que producen (FDA, 2017). Algunos de los microorganismos reportados sólo producen cuadros clínicos graves en pacientes con el sistema inmune comprometido, pacientes en edad pediátrica o pacientes en edades avanzadas. De manera importante, el reciente incremento de la resistencia antimicrobiana (RAM), junto con el uso masivo de antimicrobianos en la medicina veterinaria, ha puesto en alerta a las autoridades sanitarias debido al potencial de la cadena alimentaria para su diseminación (FSAI, 2015; HCWH, 2017). De hecho, muchas de las bacterias implicadas en ETA forman parte de la lista de bacterias de la OMS para las que el desarrollo de nuevos antibióticos es necesario de manera urgente (WHO, 2017).

La inocuidad y la calidad de los alimentos es un área que cobra cada vez más importancia en salud pública debido a la emergencia y reemergencia de las ETA a nivel global. Las mejoras en el saneamiento en la industria alimentaria, así como la mejora de las condiciones de almacenamiento de los productos alimentarios, consiguieron reducir de manera significativa la carga de las ETA. Sin embargo, la globalización ha generado redes de distribución más complejas y fragmentadas, que conllevan una mayor probabilidad de introducción o reemergencia de nuevos patógenos, así como de nuevos hospedadores de las ETA (Keusch,

2013).

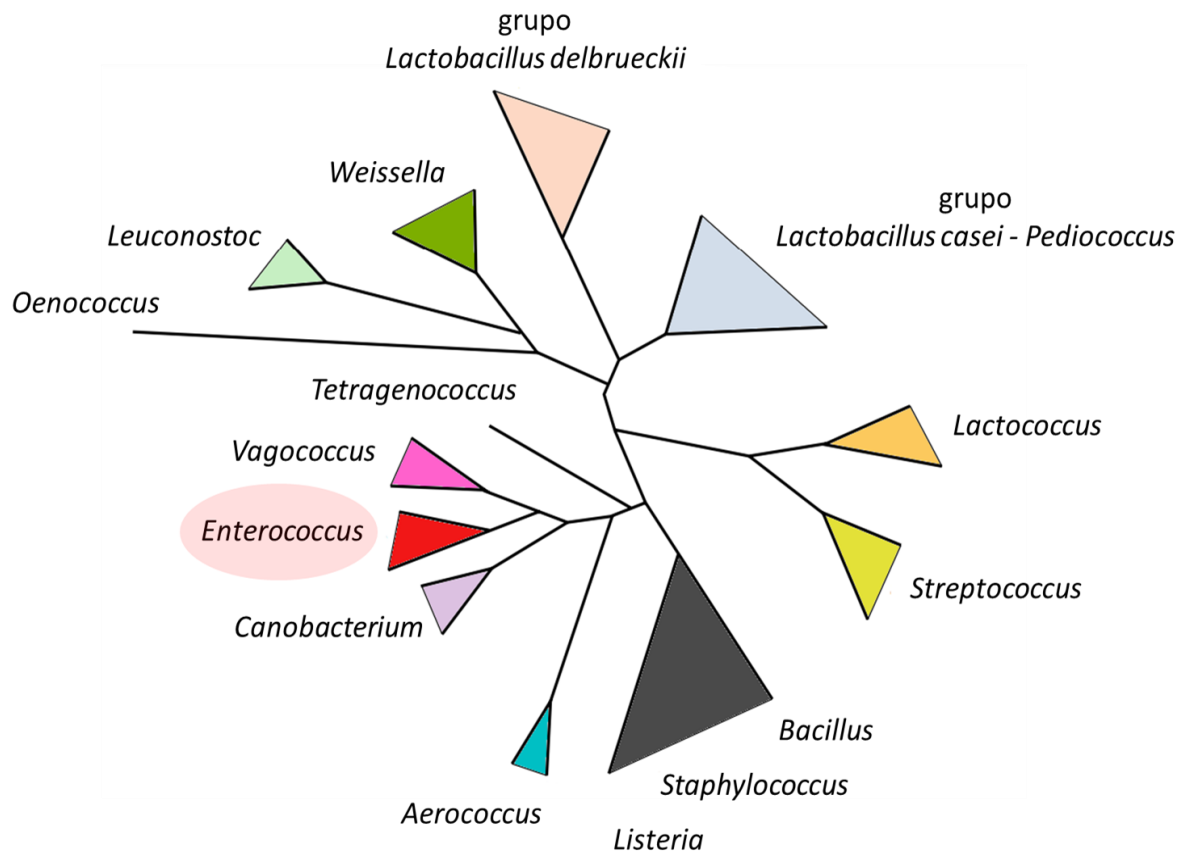
Bacterias patógenas		Protozoos y gusanos parásitos	Virus	Toxinas Naturales	Otros
Gram-negativas	Gram-positivas				
<i>Aeromonas hydrophila</i> y otras spp.	<i>Bacillus cereus</i> y otros <i>Bacillus</i> spp.	<i>Anisakis simplex</i> and related worms	Aichi virus	Aflatoxinas	Priones
<i>Brucella</i> spp.	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Astroviruses	Alcaloides pirrolizidínicos	
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Enteric adenoviruses	Ciguatoxinas	
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Hepatitis A virus	Escombrotóxina	
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Diphyllobothrium</i> spp.	Hepatitis E virus	Fitoheماغلوتينina	
<i>Cronobacter (Enterobacter sakazakii)</i> spp.	<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	Noroviruses	Gempilotoxinas	
<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eustrongylides</i> spp.	Parvoviruses	Grayanotoxinas	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Giardia lamblia</i>	Rotavirus	Peces venenosos	
<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Nanophyetus</i> spp.	Sapoviruses	Tetrodotóxina	
<i>Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC)</i>		<i>Taenia</i> spp.		Toxinas de las setas	
<i>Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC)</i>		<i>Toxoplasma gondii</i>		Veneno amnésico de los mariscos	
<i>Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC)</i>		<i>Trichinella</i> spp.		Veneno azaspirácidos de los mariscos	
<i>Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)</i>		<i>Trichuris trichiura</i>		Veneno diarreico de los mariscos	
<i>Francisella tularensis</i>				Veneno neurotóxico de los mariscos	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				Veneno paralizante de los mariscos	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>					
<i>Proteus</i> spp.					
<i>Providencia</i> spp.					
<i>Salmonella</i> spp.					
<i>Serratia</i> spp.					
<i>Shigella</i> spp.					
<i>Vibrio cholerae</i> Serogrupos no-O1 y no-O139					
<i>Vibrio cholerae</i> Serogrupos O1 y O139					
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>					
<i>Vibrio vulnificus</i>					
<i>Yersinia enterocolitica</i>					

Tabla 1: Principales agentes causales de ETA. Datos obtenidos del libro de la FDA: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition.

La morbilidad y la mortalidad de las ETA representa un riesgo de salud pública, pero también un freno al desarrollo socioeconómico a nivel mundial (Havelaar et al., 2015). El principal reto es cómo medimos la carga y la distribución de las ETA, y así favorecer decisiones y políticas públicas desde la evidencia técnica-científica. Actualmente, los datos obtenidos de las ETA sólo representan una fracción de las personas que enferman, ya que un gran número de ellas no requiere de atención médica, y por lo tanto, no son contabilizadas. En el año 2015 la OMS publicó las primeras estimaciones de la carga de las ETA atribuidas a 31 patógenos alimentarios (WHO, 2015). Los resultados mostraron que cada año, 1 de cada 10 personas enferma debido al consumo de alimentos contaminados, lo que se traduce en 600 millones de enfermos, 420 000 muertes y la pérdida de 33 millones de años de vida saludables.

### 3.2.1 Género *Enterococcus*

El género *Enterococcus* pertenece al grupo de las BAL (Figura 3); siendo cocos Gram positivos, no formadores de esporas, catalasa negativos y anaerobios facultativos; que pueden presentarse solos, en parejas o en cadenas cortas. La temperatura óptima de crecimiento es de 35-37 °C, pudiendo crecer algunas especies a 42 o incluso 45 °C y 10 °C (Vos et al., 2011). Las especies del género *Enterococcus* se clasificaron como *Streptococcus* grupo D de Lancefield hasta 1984, cuando los análisis de ADN genómicos revelaron que *Enterococcus spp.* están más relacionados con *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, y *Carnobacterium* que con *Streptococcus* (Schleifer & Kilpper-Balz, 1984). A partir de dicho trabajo, *Streptococcus* se dividió en los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*. Actualmente, el género *Enterococcus* cuenta con 62 especies (Parte et al., 2020), siendo *E. alishanensis* y *E. larvae* las últimas en ser descritas (Chung et al., 2022; Kim et al., 2022).



**Figura 3:** Árbol filogenético sin raíz de las BAL, incluyendo géneros aerobios y anaerobios facultativos. Nota: Las distancias evolutivas son aproximadas. Figura adaptada de Axelsson & others, 2004 (RightsLink® 5480660578035)

Los enterococos son microorganismos ubicuos que se encuentran en agua, suelos, alimentos, y forman parte de la microbiota normal del hombre y otros animales, residiendo habitualmente en el tracto gastrointestinal (Figura 4). Su presencia en alimentos es considerada producto de una contaminación secundaria, debida a la contaminación fecal y/o ambiental, jugando un papel importante en el deterioro de los alimentos (Giraffa, 2002). Igualmente, existen cepas de enterococos que se utilizan de manera rutinaria como cultivos iniciadores o como probióticos en muchos productos alimentarios (Graham et al., 2020; Krawczyk et al., 2021), siendo especialmente importantes en productos cárnicos y lácteos (Giraffa, 2002).

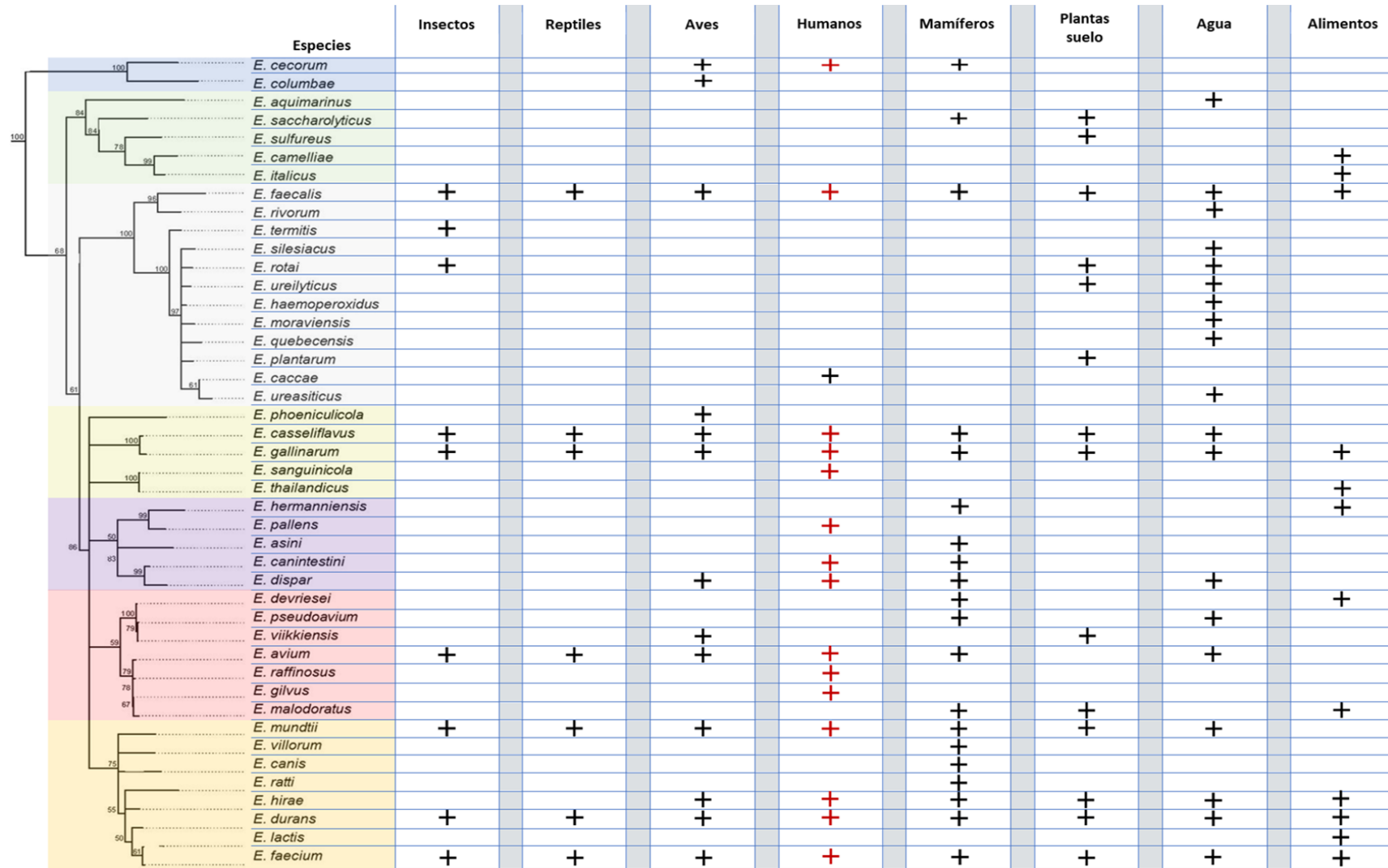


Figura 4: Distribución de las especies del género *Enterococcus* en la naturaleza. El dendrograma muestra las relaciones filogenéticas. Las fuentes de aislamiento se indican para cada especie. Las cruces rojas en humanos representan las especies descritas en infecciones. Datos obtenidos de Lebreton et al., 2014.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Enterococcus* se han considerado tradicionalmente patógenos de bajo riesgo. Sin embargo, en los últimos años han adquirido gran importancia en el ámbito clínico debido a su creciente asociación con diversas infecciones en humanos y animales (El-Zamkan & Mohamed, 2021; Hammerum, 2012; Oguttu et al., 2021; Rózańska et al., 2019; Santagati et al., 2012). Especialmente preocupante es el incremento de los genes de virulencia y RAM en *Enterococcus spp.*, así como su capacidad para adquirir y transferir estos genes (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2017; Van Tyne & Gilmore, 2014). Estos hechos hacen que existan dudas en el uso de cepas de *Enterococcus* en la industria alimentaria, no siendo “Generalmente reconocidos como seguros” (GRAS) por la FDA (GRAS Notices (fda.gov)), ni obteniendo el estatus de “Presunción cualificada de seguridad” (QPS) de la EFSA. Paradójicamente, el incremento de la RAM también ha atraído el interés en los enterococos, debido a su capacidad para producir bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos de origen ribosomal que actúan formando poros en la membrana celular de las bacterias, causándoles la apoptosis. Por tanto, las bacteriocinas podrían usarse como control sanitario en la industria alimentaria actuando contra bacterias alterantes y/o patógenos en alimentos (Almeida-Santos et al. 2021). Actualmente, las bacteriocinas se pueden clasificar en tres grupos (Figura 5) (Alvarez-Sieiro et al., 2016): i) la Clase I que incluye péptidos que sufren modificaciones postranscripcionales durante su biosíntesis y su tamaño es menor de 10 kDa; II) la Clase II formada por bacteriocinas no modificadas de menos de 10 kDa y iii) la Clase III constituida por bacteriocinas no modificadas mayores de 10 kDa (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Las bacteriocinas producidas por enterococos se denominan enterocinas, siendo péptidos termoestables con un peso molecular entre los 20-60 aminoácidos, y siendo estables a distintos valores de pH (Ben Braïek & Smaoui, 2019). La mayoría de las enterocinas pertenecen a la Clase II (Figura 5).

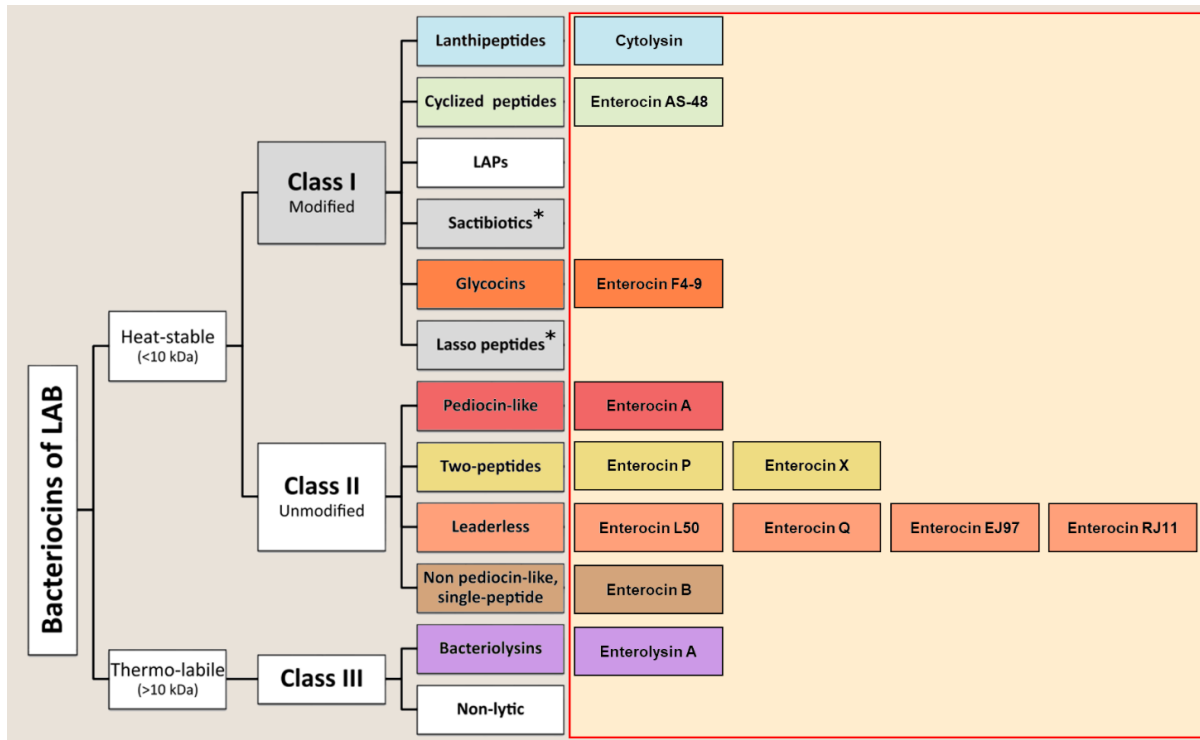


Figura 5: Clasificación de las bacteriocinas de BAL según la reciente clasificación de Alvarez-Sieiro et al., 2016. En gris con asterisco se encuentran las clases identificadas in silico. En el recuadro rojo se ve donde se encuentran los distintos tipos de bacteriocinas en la nueva clasificación, siendo la mayoría de Clase II.

La evaluación de los enterococos en el ámbito alimentario sigue siendo un desafío, principalmente por la falta de datos que determinen el tipo y la combinación de factores de virulencia necesarios para producir la enfermedad. En la actualidad, los métodos tradicionales en microbiología siguen siendo los más extendidos para la vigilancia de *Enterococcus spp.* Sin embargo, estos métodos requieren de varias pruebas fenotípicas y moleculares que pueden tardar varios días. En contraste, la disminución de los costes y el aumento de la calidad de la secuenciación de alto rendimiento (HTS) harán factible el uso de la secuenciación del genoma completo (WGS) de manera rutinaria.

### 3.2.2 Patógenos emergentes: *Raoultella ornithinolytica*

El género *Raoultella* se clasificó inicialmente como *Klebsiella spp.*, pero en el año 2001 el género *Klebsiella* sufrió una reclasificación basada en el análisis del gen *16S ARNr* y el gen *rpoB*, lo cual dio origen a tres especies del género *Raoultella*: *R. terrigena*, *R. planticola* y *R.*

## INTRODUCCIÓN

*ornithinolytica* (M Drancourt et al., 2001). En el año 2014 se describió una nueva especie, *R. eléctrica* (Kimura et al., 2014), por lo cual, el género está compuesto actualmente por cuatro especies (Parte et al., 2020). El género *Raoultella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está compuesto por bacilos gran-negativos, oxidasa negativos, anaerobios facultativos, encapsulados e inmóviles (Castillo-Macías et al., 2018). Estudios filogenéticos recientes han reportado que *Raoultella* y *Klebsiella* forman un grupo monofilético (Figura 6), por lo que proponen que *Raoultella* vuelva a incluirse en género *Klebsiella* (Hudson et al., 2014; Ma et al., 2021).

*R. ornithinolytica* es una bacteria que se encuentra normalmente en medios acuáticos y suelos, pero también ha sido aislada en insectos, peces, garrapatas y termitas (M Drancourt et al., 2001). Tradicionalmente, *R. ornithinolytica* no se ha considerado un patógeno humano, sin embargo, existe un número creciente de publicaciones que reflejan un incremento de las infecciones en el ámbito hospitalario (Bruder et al., 2016; Hajjar & Su, 2020). Este incremento se debe principalmente a las dificultades para su correcta identificación mediante métodos fenotípicos tradicionales, los cuales identifican *R. ornithinolytica* como *Klebsiella pneumonia* o *Klebsiella oxytoca* (Park et al., 2011). Es importante tener en cuenta que *R. ornithinolytica*, al igual que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, ha incrementado sus mecanismos de RAM en los últimos años, siendo especialmente preocupante la presencia de resistencias a antibióticos de última línea como los carbapenémicos o la colistina (Charlene Renee Jackson, 2019; X. Wang et al., 2019).

Los problemas en la identificación de *R. ornithinolytica* también se han extendido al ámbito de la higiene de los alimentos, donde *R. ornithinolytica* también produce aminas biógenas como la putrescina o la histamina. Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados que se localizan

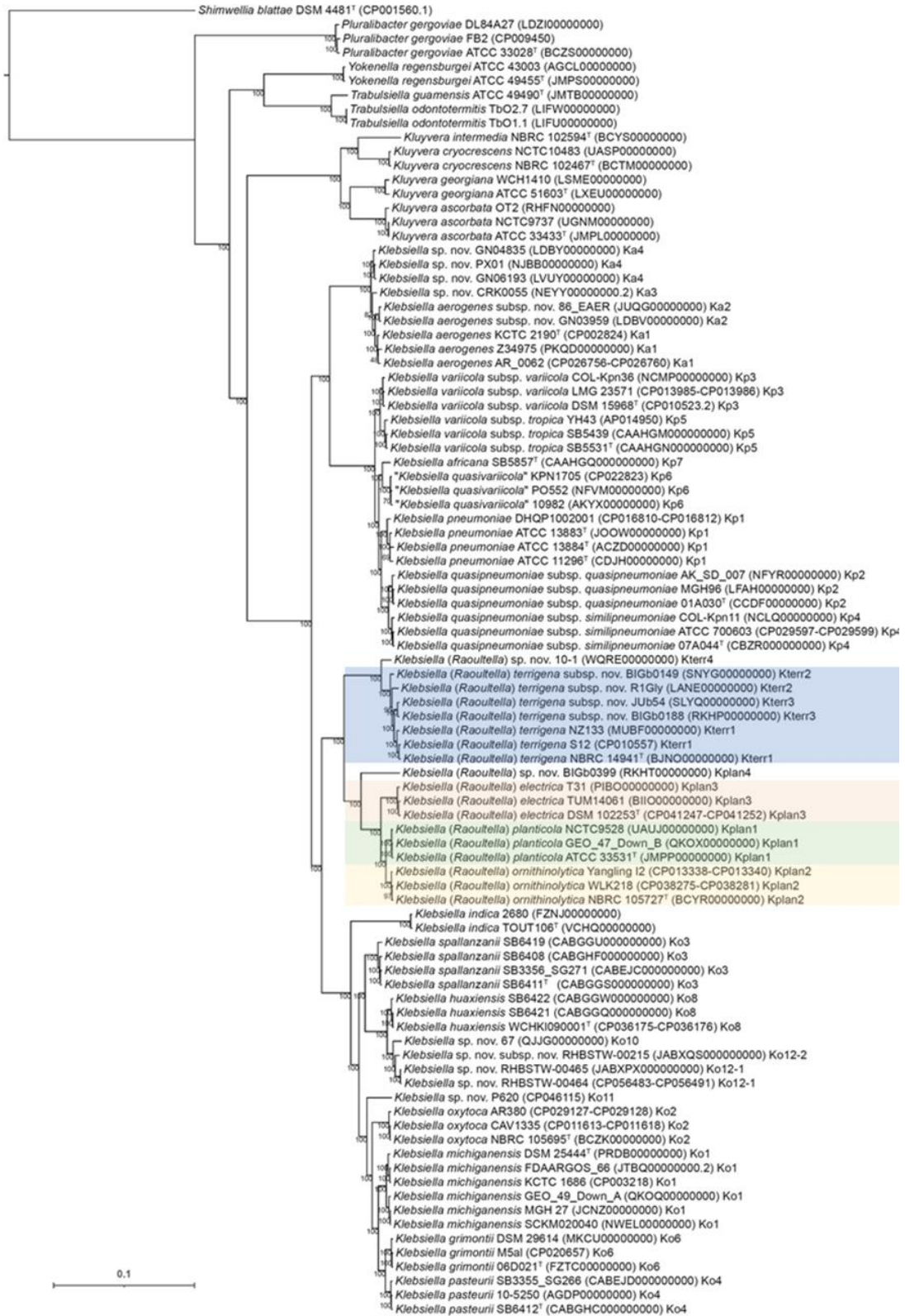


Figura 6: Árbol filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de proteínas esenciales. El árbol contiene especies representativas del género *Klebsiella* y *Raoultella*, usándose *Shimwellia blattae* DSM 4481<sup>T</sup> como grupo externo. Las especies de *Raoultella* se han resaltado en azul (*R. terrigena*), naranja (*R. electrica*), verde (*R. planticola*), y amarillo (*R. ornithinolytica*). El árbol refleja como *Raoultella* y *Klebsiella* forman un grupo monofilético. Datos obtenidos de Ma et al., 2021.

en alimentos y bebidas fermentados por bacterias lácticas, que en altos niveles pueden tener efectos negativos. Las mejoras en la identificación de *R. ornithinolytica* han hecho que en los últimos años se haya incrementado el número de publicaciones relacionadas con intoxicaciones por histamina en humanos, debidas al consumo de alimentos, principalmente pescados escombridos (escómbridos) (Lee et al., 2013; Maifreni et al., 2013; Oktariani et al., 2022; Sabry et al., 2019). También es importante resaltar el aumento del número de estudios relacionados con la presencia de *R. ornithinolytica* resistente a antibióticos en productos vegetales, relacionados con el uso de aguas recuperadas en la agricultura (Luo et al., 2017; Manageiro et al., 2020).

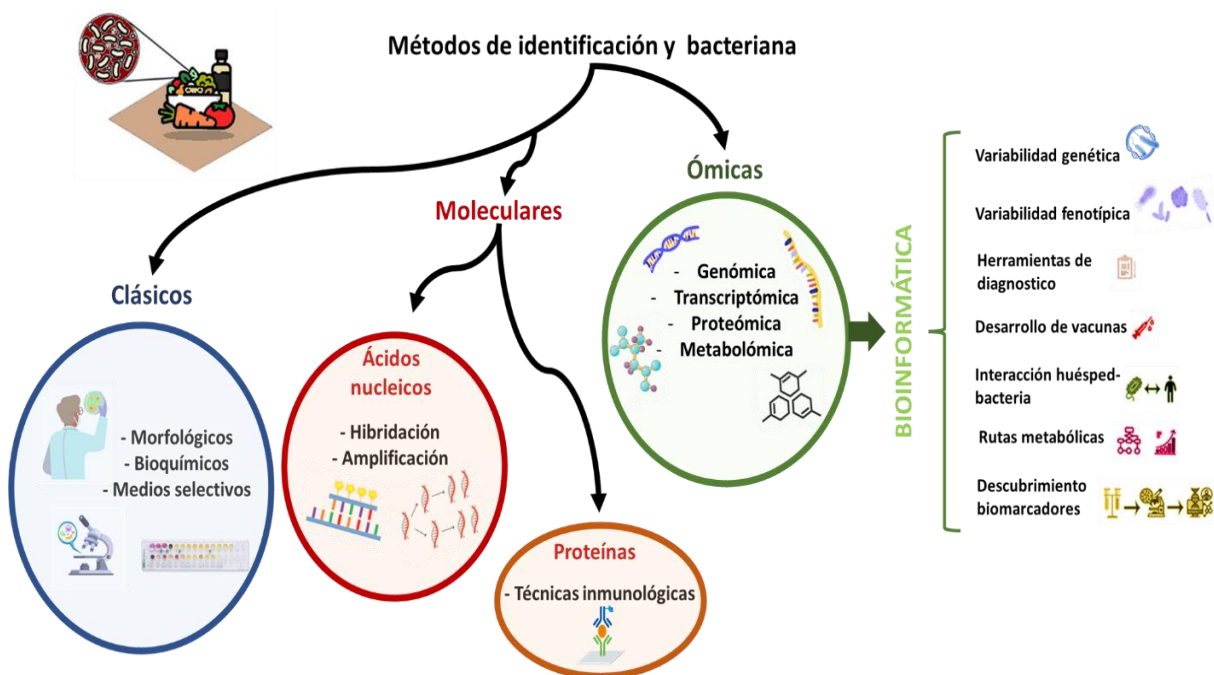
El papel de *R. ornithinolytica* como patógeno emergente, y su capacidad natural para producir intoxicaciones debidas a la producción de aminas biógenas, hace necesaria la implementación de métodos universales que nos permitan obtener un perfil completo de los aislados. La ubicuidad de *R. ornithinolytica* hace necesaria una vigilancia epidemiológica amplia, abarcando sistemas acuáticos, productos alimentarios, y ambientes hospitalarios. De especial importancia es la identificación de cepas resistentes a antibióticos de última línea, no solo en ambientes hospitalarios, sino también en productos alimentarios que se consumen frescos y sin ningún procesamiento térmico.

### **3.3 DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS**

El control de la inocuidad y la calidad de los alimentos hace necesario controlar y minimizar los riesgos microbiológicos, utilizando para ello métodos sensibles y rápidos que permitan identificar los microorganismos patógenos, o alterantes de los alimentos Figura 7. Así, en la última década, el diagnóstico molecular ha experimentado una importancia creciente,

desplazando a las metodologías clásicas, basadas en las propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.

Las técnicas moleculares, basadas en el uso de ácidos nucleicos y proteínas, han demostrado una alta eficiencia en la detección temprana de microorganismos a un bajo coste, sin embargo, la información generada sigue siendo limitada dada la idiosincrasia del mercado alimentario internacional. El brote epidémico de la infección por *Escherichia coli* O104/H4 en 2011 en Alemania (Burger, 2012), fue un claro ejemplo de la necesidad de nuevos enfoques en la evaluación y seguimiento de riesgos microbiológicos, y un punto de inflexión para la integración de la genómica en la vigilancia epidemiológica de patógenos transmitidos por los alimentos.



**Figura 7: Esquema de los métodos para la identificación y caracterización de microorganismos. El empleo de las tecnologías ómicas ha permitido aumentar el espectro de estudios en la microbiología de los alimentos.**

En los últimos años, se han mejorado las tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos, optimizado las técnicas de separación de proteínas, e introduciendo nuevos métodos de ionización en MS. El desarrollo de estas tecnologías ha permitido el desarrollo de la foodómica, que es una disciplina con un enfoque holístico, que abarca herramientas ómicas que incluyen la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica Figura 7. La alimentómica se definió

en 2009 como "una disciplina que estudia los dominios de la alimentación y la nutrición mediante la aplicación e integración de tecnologías avanzadas (ómicas) para mejorar el bienestar, la salud y el conocimiento del consumidor" (Cifuentes, 2009).

Las tecnologías ómicas permiten generar una gran cantidad de datos, permitiendo la identificación y caracterización completa de los microorganismos en alimentos. Esto supera las deficiencias de los métodos de subtipificación molecular, mejorando la detección y caracterización de brotes de bacterias transmitidas por los alimentos. Las limitaciones actuales en el ámbito de la alimentómica se centran en el desarrollo de herramientas bioinformáticas de alto rendimiento, que faciliten la adopción e integración de enfoques ómicos en la inocuidad de los alimentos. De igual importancia, es la necesidad de desarrollar y establecer las directrices para su uso en la vigilancia epidemiológica de las ETA.

Existe una gran diversidad de métodos convencionales para la detección e identificación de microorganismos en alimentos. Sin embargo, en esta Tesis Doctoral nos centraremos en técnicas y estrategias emergentes que además de la detección e identificación, permitan la caracterización de los microorganismos en alimentos.

### **3.3.1 Métodos genómicos**

Los métodos basados en el análisis de los ácidos nucleicos se han extendido en todos los ámbitos, y han permitido la detección, cuantificación y caracterización de microorganismos de manera más rápida, y con una alta especificidad. El descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis & Faloona, 1987) y sus variantes, representaron un salto cualitativo en la detección y cuantificación de patógenos en los laboratorios de microbiología, debido a su especificidad y sensibilidad (Umesha & Manukumar, 2018). Se ha producido, por

requerir de una sospecha etiológica previa, hecho que la diferencia de las técnicas de secuenciación masiva.

La secuenciación del ADN incluye un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es conocer la secuencia exacta (orden) de los nucleótidos que lo conforman. Por lo tanto, permite leer el código genético, que contiene información imprescindible del desarrollo y funcionamiento de los organismos biológicos. De manera general, existen dos estrategias en la aplicación de la secuenciación: i) las estrategias de secuenciación dirigida a zonas determinadas del genoma, lo cual permite la identificación de microorganismos usando regiones universalmente presentes como el gen *16S ARNr* en bacterias; y ii) las estrategias no dirigidas o metagenómicas que secuencian todo el ADN de una muestra o de un microorganismo, lo que permite estudiar las características asociadas como los mecanismos de RAM o factores de virulencia.

En los últimos 20 años se han producido numerosos cambios en las tecnologías de secuenciación (Figura 8), siendo el más importante el paso de la secuenciación de un fragmento de ADN (secuenciación de primera generación), a la secuenciación masiva en paralelo que permite generar millones de lecturas (secuenciación de segunda generación), y reducir significativamente los costes de secuenciación. Sin embargo, la secuenciación de segunda generación requiere de una amplificación previa, y es incapaz de secuenciar fragmentos de más de ~0.5 Kb. Carencias que han sido solventadas con la secuenciación de tercera generación.

La secuenciación de Sanger se basa en la polimerización del ADN y el uso de dideoxinucleótidos (dNTPs) que sirven como terminadores de la reacción. El método actual es una modificación de la PCR con dNTPs marcados con fluoróforos, y se resuelve mediante una



**Figura 8:** Línea temporal de las diferentes generaciones de secuenciación, resaltando las principales tecnologías, y características más importantes.

### 3.3.1.1 Identificación bacteriana mediante secuenciación de Sanger

La secuenciación de Sanger se basa en la polimerización del ADN y el uso de dNTPs que sirven como terminadores de la reacción. El método actual es una modificación de la PCR con dNTPs marcados con fluoróforos, y se resuelve mediante una electroforesis capilar (Shendure et al., 2017). La automatización de la secuenciación Sanger supuso una revolución en el campo de la genética humana, actuando como catalizador de proyectos tan ambiciosos para la época como el Proyecto Genoma Humano (Collins et al., 2003). A pesar de la irrupción de las nuevas generaciones de secuenciación, la secuenciación Sanger continúa siendo utilizada para la identificación taxonómica de aislados microbiológicos mediante la secuenciación del gen *16S rRNA*.

### 3.3.1.2 Identificación y caracterización bacteriana mediante secuenciación Illumina

La secuenciación de segunda generación, como la secuenciación Illumina, permite llevar a cabo de manera simultánea millones de reacciones de secuenciación en paralelo a un precio asequible y en un tiempo relativamente corto (Shendure et al., 2017). A diferencia de la secuenciación Sanger, Illumina permite la secuenciación de millones de fragmentos muy cortos que pueden asignarse a cada una de las muestras que se analizan simultáneamente, mediante la preparación de unas librerías etiquetadas (multiplexado) que se inmovilizan sobre una matriz bidimensional. A continuación, se produce una amplificación in vitro de los fragmentos mediante una amplificación puente. Finalmente, se produce la secuenciación por síntesis, en donde se incorporan de manera secuencial y reversible nucleótidos marcados con fluoróforos distintos, cuya señal es captada y traducida a nucleótidos. La principal limitación de la secuenciación de segunda generación es que es incapaz de generar secuencias de gran tamaño, por lo cual no siempre es posible resolver el genoma completo de un microorganismo, especialmente cuando contienen un número elevado de secuencias repetitivas (Treangen & Salzberg, 2012).

### 3.3.1.3 Identificación y caracterización bacteriana mediante Tecnología Oxford Nanopore (ONT)

En los últimos años ha irrumpido la secuenciación de tercera generación, que permite generar secuencias de gran tamaño. En este caso, no se requiere la fragmentación ni la amplificación de molécula de ADN antes de la secuenciación. Además, ONT es una tecnología de secuenciación completamente diferente a las anteriores, ya que la determinación de la secuencia se basa en la medición de los cambios de corriente eléctrica entre las dos caras de la membrana en la que se encuentra inmovilizado un poro (Loman & Watson, 2015). La mayor ventaja de esta tecnología radica en su miniaturización y en la producción de datos en tiempo real. La principal limitación es que produce secuencias con valores de calidad inferiores a los de otras plataformas, pero esto

puede ser solventado mediante su combinación con datos procedentes de secuenciación de segunda generación.

### 3.3.2 Métodos proteómicos

Los métodos clásicos de identificación de especies bacterianas basados en proteínas, tanto en el área de la medicina como en la microbiología de los alimentos, se han basado en técnicas inmunológicas. El fundamento general de esta técnica es el reconocimiento de la unión antígeno-anticuerpo, existiendo una amplia gama de métodos, pero siendo el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la técnica más extendida.

Los ensayos ELISA conjugan un anticuerpo específico con una enzima que, en presencia del sustrato adecuado, genera color, lo que permite detectar y cuantificar el antígeno. Existen diversos kits comerciales como el de Bioline para la detección de *Salmonella spp.* en alimentos (Bolton et al., 2000); o los kits Solus de PerkinElmer para la detección de *Listeria spp.* (Tonner et al., 2019), *Salmonella spp.* (Higgins et al., 2019) y *E. coli* O157 (Burger, 2012). También se ha desarrollado el ensayo de fluorescencia ligado a enzimas (ELFA), el cual es similar a ELISA, pero la detección se realiza por fluorescencia, lo cual la hace más sensible. ELISA y ELFA han sido automatizados en plataformas de alto rendimiento como el sistema VIDAS® (BioMerieux).

En los últimos años, se ha iniciado el desarrollo de la proteómica que se encarga de estudiar la composición, estructura y función de las proteínas, así como las relaciones entre las proteínas. El conjunto de las proteínas presentes en una célula, que están codificadas en el genoma, es lo que se conoce como proteoma. Estos estudios se realizan mediante MS, que se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, los cuales son separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ), y finalmente son detectados por un dispositivo adecuado. El descubrimiento de las técnicas de ionización suaves como el electrospray (ESI)

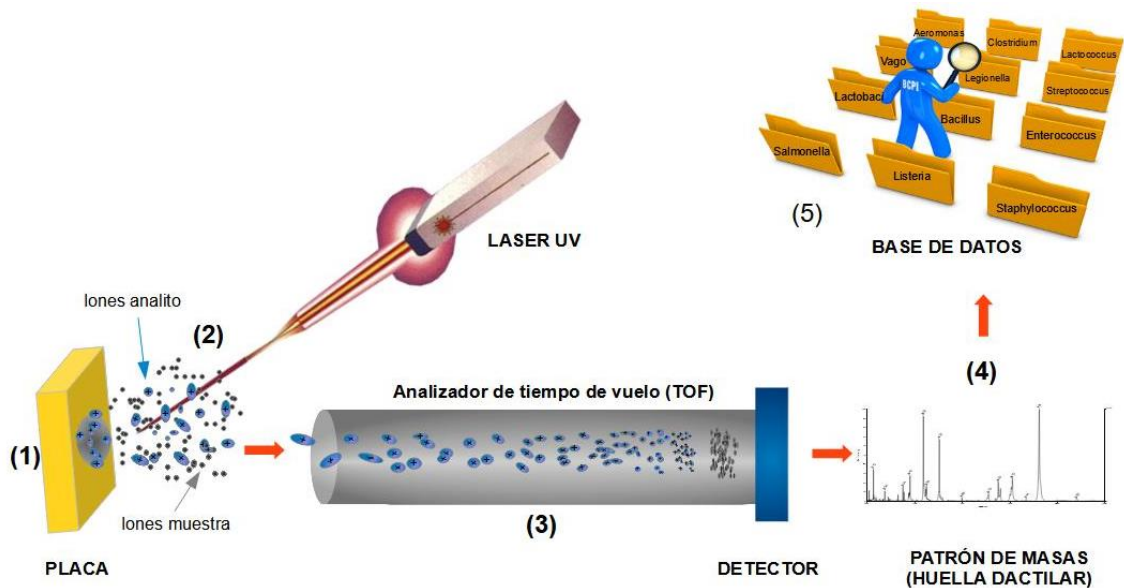
(Yamashita & Fenn, 1984) y la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) (Karas et al., 1987) permitieron el estudio mediante MS de moléculas que, como las proteínas y los péptidos, resultaban imposibles de ionizar o volatilizar sin ser destruidas o deterioradas debido a su tamaño y polaridad. A continuación, se exponen con más detalle las técnicas de MS utilizados en esta Tesis Doctoral.

### 3.3.2.1 Identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS

La técnica MALDI-TOF MS es un método simple, rápido, y de bajo coste para la identificación bacteriana en comparación con las técnicas tradicionales (Quintela-Baluja et al., 2014; Seng et al., 2009). Los extractos proteicos, o una pequeña cantidad de biomasa bacteriana, se mezclan con una matriz en solución, dejando que se evaporen los solventes en los pocillos de una placa de acero, lo cual produce una cristalización de la matriz juntamente con las moléculas de la muestra (**Figura 9**, paso 1).

La función de la matriz es proteger la muestra, ya que absorbe la energía aplicada con un láser de nitrógeno (radiación UV de 337 nm). Así, el calor producido da lugar a la vaporización y formación de iones de la matriz que transfieren la energía por colisión a las moléculas de la muestra, produciéndose una nube densa de iones de la matriz y la muestra (**Figura 9**, paso 2).

A continuación, se aceleran los iones aplicando un campo eléctrico, y se separan en función de su relación  $m/z$  en un analizador TOF, donde los iones más pequeños y con mayor carga llegan antes al detector que los iones con menor carga y mayor masa (**Figura 9**, paso 3) (Van Baar, 2000). El resultado es un patrón de masas único para cada cepa bacteriana (perfil espectral) (**Figura 9**, paso 4), que debe ser comparado con una base de datos de perfiles espectrales conocidos, para la identificación del perfil con mayor similitud (**Figura 9**, paso 5).



**Figura 9: Proceso de identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS. Se requieren de cuatro pasos: (1) cristalización de la muestra con la matriz, (2) desorción-ionización láser, (3) separación de las proteínas por tiempo de vuelo y detección, (4) producción de un perfil espectral, (5) comparación con una base de datos.**

### 3.3.2.2 Identificación y caracterización bacteriana mediante TimsTOF

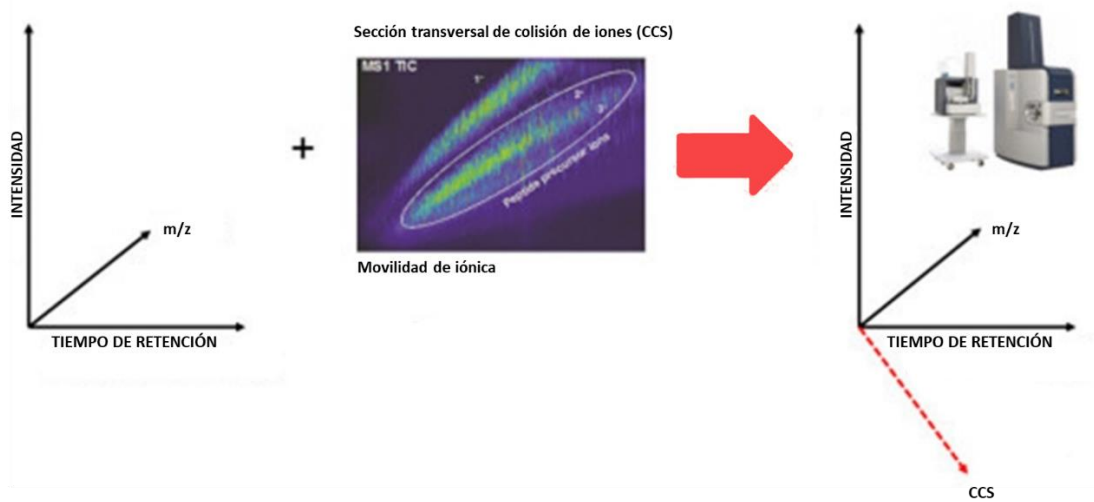
La técnica MALDI-TOF MS se ha convertido en un método de referencia para la identificación de microorganismos en los laboratorios de diagnóstico clínico e inocuidad de los alimentos (Quintela-Baluja et al., 2013; Senthil et al., 2021). Sin embargo, MALDI-TOF MS presenta limitaciones a la hora de proporcionar información adicional de los aislados, como el perfil de RAM o virulencia, así como para identificar características fenotípicas de interés en la industria alimentaria. Por lo tanto, en los últimos años ha aumentado el interés en métodos que permitan la caracterización completa de las cepas bacterianas, lo que ha llevado al desarrollo de la proteómica shotgun, que permite la secuenciación de todas las proteínas expresadas por un organismo (proteoma) (Cheng et al., 2016).

Los sistemas ESI-MS/MS acoplados a cromatografía líquida (LC-ESI-MS/MS), son los más adecuados para el análisis de proteomas. En primer lugar, se extraen las proteínas de cepas bacterianas puras (proteoma) o directamente de la muestra (meta-proteoma). A continuación, se utiliza una enzima que digiere las proteínas, habitualmente la tripsina, para trocear las

proteínas en trozos pequeños denominados péptidos. Los péptidos se separan mediante cromatografía líquida acoplada a la ionización por electrospray. A medida que los péptidos eluyen de la columna, se van ionizando y pasan al espectrómetro de masas. Allí, los iones de los péptidos se van separando en una trampa iónica (IT) y detectando en función de su relación  $m/z$ . Los péptidos quedan atrapados en una cámara en la que se produce una segunda fragmentación mediante procesos de colisión inducida. Posteriormente, los iones fragmento son analizados en un segundo analizador, dando lugar a espectros de fragmentación que contienen la información que permite identificar y cuantificar los péptidos. Finalmente, los datos obtenidos se analizan mediante herramientas informáticas que permite identificar y cuantificar las proteínas de la muestra.

Recientemente, se ha producido una transición de una proteómica de tres dimensiones (LC-ESI-MS/MS) a una proteómica de cuatro dimensiones (Figura 10). En la proteómica de tres dimensiones, el tiempo de retención en la LC es la primera dimensión, la segunda es la masa medida ( $m/z$ ), y la tercera dimensión es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). timsTOF Pro (espectrometría de iones atrapados - tiempo de vuelo) añade una cuarta dimensión, la separación de iones en fase gaseosa atendiendo a la sección transversal de colisión de iones (CCS). La cuarta dimensión permite resolver muestras complejas, ya que permite la identificación de los péptidos con igual  $m/z$  que co-eluyen de la LC. Además, el sistema timsTOF Pro incluye la tecnología de acumulación paralela y fragmentación en serie (PASEF), que permite almacenar varios iones precursores en paralelo que luego pueden fragmentarse en serie, aumentando significativamente la velocidad de secuenciación. La proteómica en cuatro dimensiones permite por primera vez una proteómica ultrasensible y una cuantificación relativa de proteínas con un alto rendimiento, con un nivel de robustez sin precedentes.

## INTRODUCCIÓN



**Figura 10:** Diagrama de la nueva generación de proteómica en cuatro dimensiones.



## **4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 4.1 HIPÓTESIS

La globalización ha generado redes de distribución más complejas y fragmentadas, que conllevan una mayor probabilidad de introducción y reemergencia de microorganismos alterantes y patógenos en alimentos. Sin embargo, los métodos tradicionales de control microbiológico en alimentos son tediosos y precisan varios días para ser completados, por lo que no responden a las nuevas necesidades de una industria alimentaria global. La detección y caracterización precoz de microorganismos en alimentos es un desafío, que reducirá la morbimortalidad relativa a las ETA y evitará pérdidas económicas tanto al productor como al distribuidor de alimentos.

Esta tesis doctoral profundizará en el uso de tecnologías ómicas como la genómica y la proteómica para la identificación y caracterización de los microorganismos en alimentos. Además, aporta aspectos novedosos relacionados con la utilización de nuevas técnicas de diagnóstico como la secuenciación del genoma bacteriano con dispositivos portátiles, o el empleo del espectrómetro de masas de nueva generación TimsTOF MS (proteómica en cuatro dimensiones) para el estudio del proteoma de microorganismos en alimentos. En esta tesis se ha integrado el análisis de las distintas ómicas, obteniéndose resultados robustos en menos de 24 h.

## 4.2 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

### 4.2.1 Objetivo general

Esta tesis tiene como objetivo central el desarrollo y optimización de tecnologías ómicas, específicamente la genómica y la proteómica, para la identificación y caracterización rápida de microorganismos patógenos y alterantes en alimentos.

### 4.2.2 Objetivos específicos

- I. Identificar las principales especies de *Enterococcus* aisladas de alimentos. Para ello se recurrirá a la secuenciación de primera generación del gen *16S ARNr*, procediendo asimismo a la definición de biomarcadores proteicos para su identificación rápida mediante MALDI-TOF MS.
- II. Identificar y caracterizar específicamente *Enterococcus faecium* potencialmente probióticos. Dicho objetivo se abordará mediante la SNG del genoma completo.
- III. Desarrollar un método para la caracterización rápida de *Enterococcus faecium* potencialmente probióticos. Para ello se recurrirá a la espectrometría de masas de última generación TimsTOF MS.
- IV. Identificar y caracterizar de manera rápida el patógeno emergente *R. ornithinolytica*. Dicho objetivo se abordará mediante la secuenciación del genoma completo con tecnologías de segunda y tercera generación.

Estos objetivos se han abordado en las cuatro publicaciones que constituyen esta Tesis

Doctoral:

- **Artículo 1:** “*Quintela-Baluja, M.*, Böhme, K., Fernández-No, I. C., Morandi, S., Alnakip, M. E., Caamaño-Antelo, S., ... & Calo-Mata, P. (2013). Characterization of different food-isolated Enterococcus strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 34(15), 2240-2250. <https://doi.org/10.1002/elps.201200699>”.

**OBJETIVO 1.**

- **Artículo 2:** “*Quintela-Baluja, M.*, Jobling, K., Graham, D. W., Alnakip, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2022). Draft Genome Sequences of Two Bacteriocin-Producing Enterococcus faecium Strains Isolated from Nonfermented Animal Foods in Spain. *Microbiology Resource Announcements*, e00866-22. <https://doi.org/10.1128/mra.00866-22>”. **OBJETIVO 2.**

- **Artículo 3:** “*Quintela-Baluja, M.*, Jobling, K., Graham, D. W., Tabraiz, S., Shamurad, B., Alnakip, M., ... & Calo-Mata, P. (2022). Rapid Proteomic Characterization of Bacteriocin-Producing Enterococcus faecium Strains from Foodstuffs. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 13830. <https://doi.org/10.3390/ijms232213830>”.

**OBJETIVO 3.**

- **Artículo 4:** “*Quintela-Baluja, M.*, Jobling, K., Graham, D. W., Alnakip, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2022). Near-Complete Genome Sequence of Raoultella ornithinolytica Strain MQB-Silv-108 Carrying Uncommon ESBLs Like *blaBEL* Gene. *Microbiology Resource Announcements*, e.01012-22. <https://doi.org/10.1128/mra.01012-22>”. **OBJETIVO 4.**



## **5 HERRAMIENTAS**

# **METODOLÓGICAS**

## 5 HERRAMIENTAS METODOLÓGICAS

Esta Tesis Doctoral se centra en desarrollar y optimizar protocolos de identificación y caracterización de bacterias alterantes y patógenos en alimentos usando tecnologías ómicas. En este apartado se resumen los principales materiales y herramientas metodológicas empleadas en la misma, y en el capítulo referente a cada uno de los trabajos publicados se describirán más en detalle los métodos analíticos utilizados en cada uno de ellos.

### 5.1 MATERIALES

#### 5.1.1 Materiales de laboratorio

Los reactivos, solventes y demás equipamiento de laboratorio empleado es el propio de un laboratorio de Microbiología Molecular. Los principales materiales e instrumentación usados en el aislamiento y recuperación de las cepas bacterianas, y en la preparación de las muestras, fue:

##### 5.1.1.1 Medios de cultivo

- Caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) (BD, Le Pont de Claix, Francia).
- Agar de recuento en placa (PCA) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).
- Caldo De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).
- chromID™ betalactamasas de espectro extendido (ESBL) (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia).
- Agar Luria Bertani (LB) (Pro-Lab Diagnostics, Cheshire, Reino Unido).

##### 5.1.1.2 Kits de extracción de ADN

- DNeasy Tissue minikit (Qiagen, Valencia, España).
- QIAamp DNA minikit (Qiagen, Hilden, Alemania).

#### 5.1.1.3 Kits de secuenciación de ADN

- Secuenciación de Sanger: BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos).
- Secuenciación Illumina: Nextera XT library prep kit (Illumina, San Diego, Estados Unidos).
- Secuenciación ONT: SQK-LSK108 kit (ONT, Oxford, Reino Unido).

#### 5.1.1.4 Reactivos para la extracción de proteínas

- Acetonitrilo (ACN) (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido trifluoroacético (TFA) (Acros organics, NJ, Estados Unidos).
- Phenol (Sigma Aldrich, Poole, Reino Unido)

### 5.1.2 Instrumentos analíticos

#### 5.1.2.1 Secuenciación de ADN

- Secuenciación de Sanger: plataforma ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos).
- Secuenciación Illumina: plataforma HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, Estados Unidos).
- Secuenciación ONT: Plataforma MinION (ONT, Oxford, Reino Unido).

#### 5.1.2.2 Espectrometría de masas

- MALDI-TOF MS: Plataforma Voyager-DE MALDI-TOF (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos).
- TimsTOF: Plataforma timsTOF Pro (Bruker, Bremen, Alemania)

### 5.1.3 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en esta Tesis Doctoral representan las especies *E. faecium*, *E. faecalis*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus sanguinicola*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus garvieae*, *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium*

## HERRAMIENTAS METODOLÓGICAS

*maltaromaticum*, *Vagococcus salmoninarum*, y *R. ornithinolytica*. En la **Tabla 2** se recogen las distintas cepas, junto a las principales metodologías empleadas para su identificación y/o caracterización.

Códig+A1:H25o	Especie	Origen	MALDI-TOF MS	timsTOF Pro	Secuenciación Sanger	Secuenciación Illumina	Secuenciación ONT
LHICA_28.4	<i>E. faecium</i>	Carne					
LHICA_34.5	<i>E. faecium</i>	Carne					
LHICA_34.6	<i>E. faecium</i>	Carne					
LHICA_35.1	<i>E. faecium</i>	Carne					
LHICA_40.4	<i>E. faecium</i>	Carne					
CECT_410	<i>E. faecium</i>	Carne					
ISPA_FRP2	<i>E. faecium</i>	Lácteo					
ISPA_GO7	<i>E. faecium</i>	Lácteo					
ISPA_GO10	<i>E. faecium</i>	Lácteo					
ISPA_ID114	<i>E. faecium</i>	Lácteo					
CECT_4102	<i>E. faecium</i>	Salchicha					
CECT_4932	<i>E. faecium</i>	Lácteo					
LHICA_28.4	<i>E. faecium</i>	Carne					
LHICA_40.4	<i>E. faecium</i>	Carne					
LHICA_4.1	<i>E. faecalis</i>	Carne					
LHICA_11	<i>E. faecalis</i>	Carne					
LHICA_21.6	<i>E. faecalis</i>	Carne					
LHICA_37.6	<i>E. faecalis</i>	Carne					
LHICA_53.1	<i>E. faecalis</i>	Carne					
ISPA_10	<i>E. faecalis</i>	Lácteo					
ISPA_88	<i>E. faecalis</i>	Lácteo					
ISPA_89	<i>E. faecalis</i>	Lácteo					
ISPA_ID119	<i>E. faecalis</i>	Lácteo					
ISPA_148	<i>E. faecalis</i>	Lácteo					
ISPA_Mora_13	<i>E. faecalis</i>	Lácteo					
CECT_4039	<i>E. faecalis</i>	Lácteo					
CECT_407	<i>E. faecalis</i>	Lácteo					
LMG_21841	<i>E. gilvus</i>	Clinico					
LMG_13600	<i>E. gilvus</i>	Clinico					
CECT_972	<i>E. mundtii</i>	Suelo					
LHICA_RL35	<i>E. mundtii</i>	Lácteo					
LHICA_5	<i>E. sanguinicola</i>	Lácteo					
LHICA_8	<i>E. sanguinicola</i>	Lácteo					
LMG_12905	<i>E. malodoratus</i>	Lácteo					
CECT_970	<i>E. gallinarum</i>	Carne					
CECT_969	<i>E. casseliflavus</i>	Vegetales					
CECT_411	<i>E. durans</i>	Lácteo					
CECT_279	<i>E. hirae</i>	Unknown					
LMG_11482	<i>L. pseudomesenteroides</i>	Unknown					
LMG_6908	<i>L. mesenteroides</i>	Unknown					
CECT_4531	<i>Lc garvieae</i>	Unknown					
LHICA_32	<i>Lc garvieae</i>	Unknown					
CECT_4016	<i>Cb. divergens</i>	Unknown					
CECT_4020	<i>Cb. maltaromaticum</i>	Unknown					
CECT_5810	<i>V. salmoninarum</i>	Unknown					
CECT_5811	<i>V. salmoninarum</i>	Unknown					
MQB_Silv_108	<i>R. ornithinolytica</i>	Efluente EDAR					

**Tabla 2: Cepas bacterianas usadas en este estudio, su fuente, y principales metodologías empleadas para su identificación y caracterización.**

## 5.2 MÉTODOS

La metodología aplicada en los trabajos incluidos en esta Tesis Doctoral consta, básicamente, de los elementos comunes mencionados a continuación.

### 5.2.1 Recuperación y propagación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas fueron recuperadas en distintos medios de cultivo y condiciones, atendiendo a sus requerimientos nutricionales y microambientales. A continuación, se propagaron para la obtención de biomasa suficiente para la extracción de proteínas y/o ácidos nucleicos utilizando los protocolos escritos en los distintos artículos que componen esta Tesis Doctoral.

### 5.2.2 Análisis instrumental

El análisis de las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante técnicas genómicas y proteómicas. En el caso de la secuenciación del ADN, se realizó una secuenciación dirigida para la obtención de la secuencia del gen *16S rRNA* que permitió identificar las cepas bacterianas. Además, se usaron tecnologías de segunda y tercera generación de secuenciación para la caracterización de tres cepas bacterianas. Por otra parte, para el estudio del proteoma se utilizó MALDI-TOF MS para la identificación de las cepas bacterianas, siendo caracterizadas dos cepas mediante proteómica de cuatro dimensiones (timsTOF Pro).

### 5.2.3 Análisis bioinformático

Los análisis genómicos y proteómicos se realizaron mediante el uso de software y bases de datos abiertas. Los principales lenguajes de programación empleados fueron Python y Java, usando R para la comparación de los datos genómicos y proteómicos. Los resultados obtenidos fueron depositados en bases de datos abiertas como SpectraBank (Böhme et al., 2012) y PRIDE (Reisinger et al., 2015), en el caso del proteoma; y el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de Estados Unidos, en el caso de los genomas (Kitts et al., 2016).



## **6 TRABAJOS PUBLICADOS**

## 6 TRABAJOS PUBLICADOS

A continuación, se exponen las publicaciones que constituyen esta Tesis Doctoral:

- **Artículo 1:** “*Quintela-Baluja, M.*, Böhme, K., Fernández-No, I. C., Morandi, S., Alnakip, M. E., Caamaño-Antelo, S., ... & Calo-Mata, P. (2013). Characterization of different food-isolated Enterococcus strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. Electrophoresis, 34(15), 2240-2250. <https://doi.org/10.1002/elps.201200699>”.
- **Artículo 2:** “*Quintela-Baluja, M.*, Jobling, K., Graham, D. W., Alnakip, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2022). Draft Genome Sequences of Two Bacteriocin-Producing Enterococcus faecium Strains Isolated from Nonfermented Animal Foods in Spain. Microbiology Resource Announcements, e00866-22. <https://doi.org/10.1128/mra.00866-22>”
- **Artículo 3:** “*Quintela-Baluja, M.*, Jobling, K., Graham, D. W., Tabraiz, S., Shamurad, B., Alnakip, M., ... & Calo-Mata, P. (2022). Rapid Proteomic Characterization of Bacteriocin-Producing Enterococcus faecium Strains from Foodstuffs. International Journal of Molecular Sciences, 23(22), 13830. <https://doi.org/10.3390/ijms232213830>”
- **Artículo 4:** “*Quintela-Baluja, M.*, Jobling, K., Graham, D. W., Alnakip, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2022). Near-Complete Genome Sequence of Raoultella ornithinolytica Strain MQB-Silv-108 Carrying Uncommon ESBLs Like *blaBEL* Gene. Microbiology Resource Announcements, e.01012-22. <https://doi.org/10.1128/mra.01012-22>”

## 6.1 ARTÍCULO 1

<https://doi.org/10.1002/elps.201200699>

Título	Characterization of different food-isolated <i>Enterococcus</i> strains by MALDI-TOF mass fingerprinting	
Autores	Marcos Quintela-Baluja <sup>1</sup> , Karola Böhme <sup>1</sup> , Inmaculada C. Fernández-No <sup>1</sup> , Stefano Morandi <sup>2</sup> , Mohammed E. Alnakip <sup>1</sup> , Sonia Caamaño-Antelo <sup>1</sup> , Jorge Barros-Velázquez <sup>1</sup> , Pilar Calo-Mata <sup>1</sup>	
Afiliaciones	<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain <sup>2</sup> Institute of Sciences of Food Production (ISPA-CNR), Milan, Italy	
Año	2013	
Revista	Electrophoresis	
Volumen	34, 2240–2250	
Editorial	Wiley-VCH Verlag	
eISSN/ISSN/ISBN	01730835, 15222683	
DOI	<a href="https://doi.org/10.1002/elps.201200699">https://doi.org/10.1002/elps.201200699</a>	
Contribución del doctorando	Desarrollo y validación del método analítico, Análisis y procesamiento de muestras, Análisis de datos, Redacción del borrador del artículo.	
Indicadores de calidad	Factor de Impacto	3.595
	Ranking Revista	Q2 (Biochemical research methods)
Número de Licencia RightsLink®	5415430048967	

## 6.2 ARTICULO 2

<https://doi.org/10.1128/mra.00866-22>

Titulo		Draft Genome Sequences of Two Bacteriocin-Producing <i>Enterococcus faecium</i> Strains Isolated from Nonfermented Animal Foods in Spain
Autores		Marcos Quintela-Baluja <sup>1</sup> , Kelly Jobling <sup>2</sup> , David W. Graham <sup>2</sup> , Mohammed Alnakip <sup>3</sup> , Karola Böhme <sup>1</sup> , Jorge Barros-Velázquez <sup>1</sup> , Pilar Calo-Mata, <sup>1</sup>
Afiliaciones		<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain <sup>2</sup> School of Engineering, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom <sup>3</sup> Department of Food Control, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, Al Sharqiyah, Egypt
Año		2022
Revista		Microbiology Resource Announcements
Volumen		NA
Editorial		NA
eISSN/ISSN/ISBN		2576-098X
DOI		<a href="https://doi.org/10.1128/mra.00866-22">https://doi.org/10.1128/mra.00866-22</a>
Contribución del doctorando		Desarrollo y validación del método analítico, Análisis y procesamiento de muestras, Análisis de datos, Redacción del borrador del artículo.
Indicadores de calidad	Factor de Impacto	0.89
	Ranking Revista	Q3 (Immunology and Microbiology)
Licencia		<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">CC BY 4.0</a>

## 6.3 ARTÍCULO 3

<https://doi.org/10.3390/ijms232213830>

Título	Rapid Proteomic Characterization of Bacteriocin-Producing <i>Enterococcus faecium</i> Strains from foodstuffs on a timsTOF Pro Instrument	
Autores	Marcos Quintela-Baluja <sup>1</sup> , Kelly Jobling <sup>2</sup> , David W. Graham <sup>2</sup> , Shamas Tabraiz <sup>3</sup> , Burhan Shamurad <sup>4</sup> , Mohammed Alnakip <sup>5</sup> , Karola Böhme <sup>1</sup> , Jorge Barros-Velázquez <sup>1</sup> , Mónica Carrera <sup>6</sup> Pilar Calo-Mata <sup>1</sup>	
Afiliaciones	<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain <sup>2</sup> School of Engineering, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom <sup>3</sup> School of Natural and Applied Sciences, Canterbury Christ Church University, Canterbury, United Kingdom <sup>4</sup> UDE Engineering LTD, Newcastle upon Tyne, UK <sup>5</sup> Department of Food Control, Faculty of Veterinary Medicine, Zagazig University, Al Sharqiyah, Egypt <sup>6</sup> Department of Food Technology, Spanish National Research Council (CSIC), Marine Research Institute (IIM), 36208 Vigo, Spain	
Año	2022	
Revista	International Journal of Molecular Sciences	
Volumen	NA	
Editorial	Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)	
eISSN/ISSN/ISBN	14220067, 16616596	
DOI	<a href="https://doi.org/10.3390/ijms232213830">https://doi.org/10.3390/ijms232213830</a>	
Contribución del doctorando	Desarrollo y validación del método analítico, Análisis y procesamiento de muestras, Análisis de datos, Redacción del borrador del artículo.	
Indicadores de calidad	Factor de Impacto	6.01
	Ranking Revista	Q2 (Molecular Biology)
Licencia	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">CC BY 4.0</a>	

## 6.4 ARTÍCULO 4

<https://doi.org/10.1128/mra.01012-22>

Título	Near-Complete Genome Sequence of <i>Raoultella ornithinolytica</i> Strain MQB-Silv-108 Carrying Uncommon ESBLs Like <i>bla</i> BEL Gene	
Autores	Marcos Quintela-Baluja <sup>1</sup> , Kelly Jobling <sup>2</sup> , David W. Graham <sup>2</sup> , Mariano Gomez-Lopez <sup>3</sup> , Jesus L. Romalde <sup>4,5</sup> , Jorge Barros-Velázquez <sup>1</sup> , Pilar Calo-Mata <sup>1</sup>	
Afiliaciones	<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, School of Veterinary Sciences, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain <sup>2</sup> School of Engineering, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom <sup>3</sup> UDE Engineering LTD, Newcastle upon Tyne, UK <sup>4</sup> Department of Microbiology and Parasitology, CIBUS-Faculty of Biology, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain. <sup>5</sup> CRETUS, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain	
Año	2022	
Revista	Microbiology Resource Announcements	
Volumen	NA	
Editorial	Wiley-VCH Verlag	
eISSN/ISSN/ISBN	2576-098X	
DOI	<a href="https://doi.org/10.1128/mra.01012-22">https://doi.org/10.1128/mra.01012-22</a>	
Contribución del doctorando	Desarrollo y validación del método analítico, Análisis y procesamiento de muestras, Análisis de datos, Redacción del borrador del artículo.	
Indicadores de calidad	Factor de Impacto	0.89
	Ranking Revista	Q3 (Immunology and Microbiology)
Licencia	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">CC BY 4.0</a>	



## 7 DISCUSIÓN

## 7 DISCUSIÓN

En el mundo globalizado en el que vivimos, no sólo las personas, sino también los alimentos, viajan más rápido y más lejos. Las redes de distribución de la cadena alimentaria se han hecho más complejas y fragmentadas, cruzando muchas fronteras nacionales y requiriendo un mayor número de procesos desde la producción hasta su consumo. Además de la creciente complejidad de la cadena alimentaria, el suministro global de alimentos ha aumentado significativamente en los últimos años, así como la disponibilidad de productos mínima y altamente procesados.

La internacionalización y fragmentación de la cadena alimentaria conlleva una mayor probabilidad de introducción y/o reemergencia de nuevos patógenos, así como de nuevos hospedadores de las ETA (Keusch, 2013). Por lo tanto, nos encontramos ante un nuevo reto para los sistemas de vigilancia y salud pública; en un mundo en el que los grupos más susceptibles a las ETA, como los ancianos y los niños, están en aumento (Chan, 2014). La detección y caracterización precoz de microorganismos en alimentos es un desafío, que reducirá la morbimortalidad relativa a las ETA y evitará pérdidas económicas tanto al productor como al distribuidor de alimentos.

Como se ha ido comentando a lo largo de esta Tesis Doctoral, las tecnologías ómicas están llamadas a desempeñar un papel fundamental en la detección y rastreo de microorganismos patógenos y alterantes de alimentos hasta su origen, con una rapidez no vista hasta el momento. A continuación, se realizará una discusión general de los trabajos que forman parte de esta Tesis Doctoral. En la misma se discutirán las distintas tecnologías ómicas usadas, el tipo de datos obtenidos, y las ventajas y limitaciones de las mismas.

## 7.1 TECNOLOGÍAS PROTEÓMICAS EN MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

La optimización de las técnicas de separación de proteínas, y la introducción de nuevos métodos de ionización en MS a finales de la década de 1980 (Ytterberg et al., 2010) han sido clave para el estudio del proteoma microbiano a gran escala. Además, el avance continuo de las tecnologías de secuenciación masiva ha producido un incremento del número de genomas, que ha permitido extender las bases de datos de proteínas, proporcionando una plataforma para los estudios de proteómica a gran escala. En esta Tesis Doctoral se han empleado las tecnologías más avanzadas de MS, para la detección y caracterización de microorganismos en alimentos.

### 7.1.1 Identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS. El género *Enterococcus*

El aumento de la incidencia de *Enterococcus spp.* en el ámbito clínico y su presencia en la cadena alimentaria hace necesario el desarrollo de métodos rápidos, sensibles y automatizados que permitan la identificación de las cepas patógenas y/o alterantes de alimentos. Los métodos clásicos basados en la caracterización fenotípica y bioquímica de los aislados no son efectivos, llevando a una identificación errónea, incluso al nivel de género (Kirschner et al., 2001; Massa et al., 2007; Winston et al., 2004).

La secuenciación del gen *16S ARNr* es el método más utilizado en la actualidad para la identificación de las especies bacterianas. Sin embargo, este gen presenta una alta similitud entre especies próximas, por lo cual no es posible la discriminación de éstas. Por ejemplo, en el caso del género *Enterococcus* no es posible diferenciar *E. faecium* de *E. mundtii*, *E. durans* o *E. hirae*. Tampoco es posible diferenciar *E. gallinarum* de *E. casseliflavus* (**Artículo 1**). En estos casos es posible emplear otros genes constitutivos, siendo propuestos por diversos autores los genes *rpoA* (subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa bacteriana), *pheS* (subunidad  $\alpha$  de la fenilalanina-ARNt sintetasa en bacterias), *atpA* (subunidad  $\alpha$  de la ATP sintetasa en bacterias) o la región intergénica ARNr 16-23S (Michel Drancourt et al., 2004; Homan et al., 2002; Naser

et al., 2005; Sheng et al., 2007). La secuenciación de arrays de genes mediante secuenciación de Sanger no es efectiva desde el punto de vista del coste, ni del tiempo requerido. Por otra parte, se han reportado distintas PCR multiplex para la identificación de *Enterococcus spp.*; sin embargo, el número de especies que son capaces de discriminar sigue siendo limitado (Charlene R. Jackson et al., 2004; Lehner et al., 2005).

El uso de MALDI-TOF MS en esta Tesis Doctoral permitió discriminar las diez especies de *Enterococcus* estudiadas, y diferenciarlas de las seis especies de BAL usadas como grupo externo. Por lo tanto, el análisis de los extractos proteicos mediante MALDI-TOF MS ha mostrado un mayor poder de discriminación que la secuenciación del gen *16S ARNr* (**Artículo 1**). Adicionalmente, los resultados obtenidos permitieron obtener biomarcadores a nivel de género y especie; encontrándose también ligeras variaciones en los espectros de las mismas especies, que podrían estar relacionadas con el origen de los aislados y, por lo tanto, definiendo distintos ecotipos.

Resultados similares han sido reportados en la literatura científica en el estudio de otras especies microbianas en la industria agroalimentaria. Alnakip et al. empleó MALDI-TOF MS en la identificación de diez especies de *Streptococcus* causantes de la mastitis en bovinos. MALDI-TOF MS fue capaz de discriminar entre subespecies como *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* y *Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae* (Alnakip et al., 2020).

Fernández-No et al. 2010 demostró la utilidad de MALDI-TOF MS para identificar las principales especies bacterianas productoras de histamina en alimentos (Fernández-No et al., 2010). Entre las cuales se encuentran *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella planticola*, *Proteus vulgaris*, *Photobacterium phosphoreum*, *Lactobacillus sp 30A* y *Staphylococcus xylosum*.

Böhme et al. estudió bacterias Gram positivas aisladas de productos marinos contaminados, entre las cuales había cepas de *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, y *Carnobacterium spp.* MALDI-TOF MS fue capaz de identificar las distintas especies, e incluso discriminó *Bacillus licheniformes* de otras especies de *Bacillus*, lo cual no fue posible mediante la secuenciación del gen *16S ARNr* (Böhme et al., 2011). Un año más tarde, Böhme et al. crearon una base de datos abierta para depositar espectros de MALDI-TOF MS de interés para la industria agroalimentaria. Esta base de datos incluye los espectros y la lista de masas representativa de cada cepa bacteriana. La base de datos cuenta actualmente con información de más de 70 especies bacterianas (["http://www.spectrabank.org"](http://www.spectrabank.org))(Böhme et al., 2012).

MALDI-TOF MS no sólo se ha usado en la industria agroalimentaria para la identificación de bacterias. Quero et al. generaron una base de datos de 618 cepas de hongos filamentosos pertenecientes a 136 especies alterantes de alimentos (Quéro et al., 2019), mostrando MALDI-TOF MS su capacidad para discriminar entre distintas especies, o incluso entre cepas que difieren solo en dos nucleótidos en la secuencia del gen *18S ARNr*. MALDI-TOF MS también se ha empleado para la identificación y caracterización de levaduras (Moothoo-Padayachie et al., 2013; Usbeck et al., 2013), microalgas (Barbano et al., 2015), parásitos o insectos (Murugaiyan & Roesler, 2017).

MALDI-TOF MS ha demostrado ser un método i) simple, ii) sensible, iii) preciso, iv) rápido y v) con un coste reducido. Los resultados obtenidos en el análisis de *Enterococcus spp.* aislados en alimentos muestran un mayor poder de discriminación que la secuenciación del gen *16S ARNr*, lo cual ha sido también reportado en otras especies bacterianas. El potencial de MALDI-TOF MS para la identificación de bacterias, hongos, levaduras, microalgas, parásitos e insectos en alimentos, ha producido un incremento en su uso en la industria alimentaria. Sin embargo,

las bases de datos actuales tienen que expandirse para incluir un número mayor de

microorganismos asociados con los alimentos y el medioambiente. Del mismo modo, las bases de datos deben ser públicas y accesibles a un número mayor de usuarios e investigadores.

### **7.1.2 Caracterización de bacterias mediante identificación masiva de proteínas. *Enterococcus* con potencial probiótico.**

Los *Enterococcus* se han considerado tradicionalmente patógenos de bajo riesgo. Sin embargo, el creciente aumento de enterococos multirresistentes y su habilidad para adquirir y transferir genes de virulencia y RAM, aumenta la incertidumbre en su empleo en la industria alimentaria. El género *Enterococcus* es el grupo más controvertido de las BAL, siendo una parte importante de la microbiota de los alimentos. Sin embargo, su presencia en alimentos es considerada producto de la contaminación fecal y/o ambiental, jugando un papel relevante en el deterioro de los mismos (Giraffa, 2002). Igualmente, existen cepas de enterococos que se utilizan de manera rutinaria como cultivos iniciadores o como probióticos en muchos productos alimentarios (Graham et al., 2020; Krawczyk et al., 2021).

*E. faecium* es la especie más importante de *Enterococcus* en la fermentación y deterioro de los alimentos, pero también se ha empleado durante más de dos décadas como probiótico sin describirse ningún efecto adverso (Byappanahalli et al., 2012). Sin embargo, los datos muestran claramente cómo *E. faecium* se ha convertido en los últimos años en uno de los mayores agentes causantes de infecciones nosocomiales, cuestionándose su uso como probiótico (Van Tyne & Gilmore, 2014). La evaluación del riesgo de los enterococos es un reto, debido principalmente a la falta de conocimiento de las combinaciones de los genes de virulencia y de RAM necesarios para causar una enfermedad. Es fundamental tener en cuenta que la evaluación del riesgo de *Enterococcus spp.* en la industria alimentaria no sólo depende de su identificación taxonómica, sino que es necesario una caracterización completa de rasgos relacionados con la RAM, virulencia, potencial biotecnológico, o funcionalidad probiótica, entre otros.

Los análisis proteómicos por MS permiten determinar de manera simultánea la composición taxonómica y la funcionalidad de los microorganismos en el ámbito clínico, ambiental, o en las aplicaciones de carácter biotecnológico. Como se vio en el apartado anterior, MALDI-TOF MS ha revolucionado el ámbito de la identificación de los microorganismos, de manera rápida y a un coste reducido. Sin embargo, MALDI-TOF MS no es capaz de proporcionar información adicional para la realización de un análisis de riesgo. Si bien es cierto que existe un número creciente de publicaciones que describen el uso de MALDI-TOF MS para la determinación de la RAM, esta información es parcial, y se basa mayoritariamente en estudios dirigidos de degradación (Hrabák et al., 2011; Yoon & Jeong, 2021), y no en la identificación de los mecanismos de resistencia en los perfiles proteicos.

La necesidad de obtener y caracterizar el proteoma completo de una muestra biológica, en nuestro caso microorganismos, ha incrementado los esfuerzos para el desarrollo de tecnologías avanzadas. Por tanto, en la última década se ha desarrollado lo que se conoce como proteómica shotgun, que sirve para identificar y caracterizar más de una proteína a la vez. La idea de la proteómica shotgun es digerir el proteoma completo sin separar las proteínas, y analizar los resultados de la digestión por MS. Esto también es llamado proteómica Bottom-Up (de abajo hacia arriba), porque se identifican las proteínas a partir del análisis de los péptidos. La proteómica Top-Down (de arriba hacia abajo), se centra exclusivamente en la caracterización e identificación de proteínas intactas a partir del análisis por MS de las mismas, sin necesidad de recurrir al análisis de sus péptidos.

Calo-Mata et al. fue la primera en reportar el uso de la proteómica Bottom-Up para la detección de microorganismos patógenos en alimentos (Calo-Mata et al., 2016). En dicho estudio se usó

LC-ESI-MS/MS para caracterizar *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Listeria spp.*, o *Salmonella spp.*, entre otros. Esta técnica ha sido empleada posteriormente para la

caracterización de *Bacillus cereus* (Pfrunder et al., 2016), *Staphylococcus aureus* (Carrera et al., 2017), *Streptococcus spp.* (Abril et al., 2020), *Listeria spp.* (Abril et al., 2021) o *Enterococcus spp.* (Abril et al., 2022).

Esta Tesis Doctoral ha generado avances en la caracterización microbiana mediante el uso de la proteómica Bottom-Up (**Artículo 3**):

- i) En primer lugar, se ha empleado una metodología universal y robusta para la extracción y digestión de proteínas, con un tiempo estimado de alrededor de ocho horas (Heyer et al., 2019). Esto ha permitido reducir los tiempos de estos procesos, en comparación con la metodología utilizada en estudios anteriores y propuesta por Calo-Mata et al. (Calo-Mata et al., 2016).
- ii) En segundo lugar, se ha producido una transición de una proteómica de tres dimensiones (LC-ESI-MS/MS) a una proteómica de cuatro dimensiones. En la proteómica de tres dimensiones, el tiempo de retención en la LC es la primera dimensión, la segunda es la masa medida ( $m/z$ ), y la tercera dimensión es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). timsTOF Pro añade una cuarta dimensión, la separación de iones en fase gaseosa (tims). La cuarta dimensión permite resolver muestras complejas, ya que permite la identificación de los péptidos con igual  $m/z$  que co-eluyen de la LC. Además, el sistema timsTOF Pro incluye la tecnología PASEF, aumentando la velocidad de secuenciación hasta 100 Hz. La proteómica en cuatro dimensiones permite por primera vez una proteómica ultrasensible y una cuantificación relativa de proteínas con un alto rendimiento, con un nivel de robustez sin precedentes.
- iii) Por último, en esta Tesis Doctoral se han secuenciado los genomas de las cepas de *E. faecium* potencialmente probióticas. Los datos obtenidos no sólo han permitido

realizar un estudio genómico (**Artículo 2**), sino que han sido usados para construir las bases de datos de proteínas con la que se han identificado los péptidos secuenciados con el sistema timsTOF Pro (**Artículo 3**). Esto permite mejorar la caracterización del proteoma.

La metodología desarrollada en esta Tesis Doctoral ha permitido la caracterización del proteoma de cepas de *E. faecium* productoras de bacteriocinas, con potencial para ser empleadas como probióticos. Un factor importante en la microbiología de los alimentos es el tiempo, requiriendo nuestra propuesta menos de 24 horas desde que se inicia la extracción hasta que se finaliza el análisis de los resultados. Además, el uso del sistema timsTOF Pro aumentó la resolución de proteínas más de cien veces al comparar los resultados con los obtenidos en estudios anteriores (Abril et al., 2020, 2021, 2022).

El sistema TimsTOF Pro generó 167.232 (LHICA 28.4) y 166.761 (LHICA 40.4) espectros, siendo identificados ~25 % en ambas cepas. Un total de 7.137 péptidos únicos fueron identificados en la cepa LHICA 28.4, correspondiendo a 1.148 genes codificantes de proteínas en su genoma. Resultados similares se obtuvieron para la cepa LHICA 40.4, en la que se identificaron 6.700 péptidos únicos, pertenecientes a 1.117 genes codificantes de proteínas en el genoma. La anotación funcional con términos GO (ontología de genes) (Carbon et al., 2021) demostró la validez del método de extracción, ya que se obtuvieron proteínas pertenecientes a distintos compartimentos celulares como el citoplasma, la membrana plasmática, o los ribosomas, entre otros. Los proteomas también fueron anotados con los términos KEGG (Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) (Kanehisa et al., 2004), lo cual permitió obtener 22 rutas metabólicas completas en ambas cepas, mayoritariamente relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y proteínas.

Los proteomas obtenidos fueron capaces de explicar los fenotipos de RAM reportados por Hosseini et al. (Hosseini et al., 2009), cuantificándose las proteínas que confieren RAM a betalactámicos, fosfomicina, macrólidos y sulfonamidas. Además, se detectaron mecanismos de RAM que no fueron analizados anteriormente, cuantificándose proteínas que confieren RAM a fluoroquinolonas y aminoglucósidos.

Hosseini et al. realizó un cribado mediante PCR para detectar enterocinas en cepas de *Enterococcus spp.* aisladas de alimentos, identificando la enterocina P en las cepas LHICA 28.4 y LHICA 40.4. El análisis genómico mostró que ambas cepas codifican una gran diversidad de bacteriocinas (**Artículo 2**), concretamente LHICA 28.4 codifica 14 bacteriocinas, mientras que LHICA 40.4 codifica 7 bacteriocinas. A pesar de ello, el análisis del proteoma sólo identificó dos bacteriocinas en LHICA 28.4, la Mundticin KS y la Lactococcin 972. Una de las posibles explicaciones es que la extracción de las proteínas se efectuó directamente en filtros con un peso molecular de corte (MWCO) de 10 KDa, siendo el peso molecular de la mayoría de las bacteriocinas no detectadas <10 KDa. Por lo tanto, es posible que las bacteriocinas se hayan eliminado durante la extracción, siendo necesario reducir el MWCO de los filtros durante esta etapa.

La caracterización de las cepas de *E. faecium* mediante la proteómica de cuatro dimensiones muestra el potencial de esta metodología para expandir las propiedades metabólicas de las BAL en la industria alimentaria. Por ejemplo, las BAL pueden degradar macromoléculas y transformar sustancias con sabores indeseables en los alimentos; pero también pueden producir ácidos grasos de cadena corta, aminos biógenos, bacteriocinas, vitaminas, y exopolisacáridos durante su metabolismo. El abanico de posibilidades funcionales de las BAL (Y. Wang et al., 2021), hace que la pregunta que tiene que hacerse la industria alimentaria no sea si una bacteria puede o no realizar una función determinada, sino cómo podemos controlar dicha función de

manera eficiente. En este trabajo (**Artículo 3**) se reporta por primera vez la cuantificación de cerca de la mitad de las proteínas codificadas en el genoma bacteriano, reforzando la idea de que esta nueva metodología puede ser el standard para determinar y optimizar las propiedades biotecnológicas de las BAL en la industria alimentaria.

## 7.2 TÉCNICAS GENÓMICAS EN MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

La tecnología de secuenciación ha sufrido muchos cambios en los últimos 20 años, siendo el cambio más grande el paso de la secuenciación de una única hebra de ADN, a la secuenciación en paralelo de millones de secuencias o fragmentos de ADN. Las mejoras en las tecnologías de secuenciación en relación con los datos generados, la precisión, y la velocidad de se han definido como la primera, segunda y tercera generación de secuenciación.

En esta Tesis Doctoral se han usado las tres generaciones de tecnologías de secuenciación de ADN. La primera generación (secuenciación de Sanger) se empleó para la identificación de cepas de *Enterococcus* aisladas en alimentos, utilizando el gen *16S ARNr* como diana (**Artículo 1**). El siguiente trabajo se centró en la identificación y caracterización de dos cepas de *E. faecium* productoras de bacteriocinas, descritas como potencialmente probióticas. Para ello se secuenció el genoma completo mediante SNG (**Artículo 2**). Finalmente, se identificó y caracterizó una cepa multirresistente de *R. ornithinolytica* mediante el uso de secuenciación de segunda y tercera generación.

### 7.2.1 Identificación bacteriana mediante secuenciación de primera generación. El género *Enterococcus*

La secuenciación de primera generación (secuenciación de Sanger) se basa en la incorporación selectiva de didesoxinucleótidos que terminan la cadena por la ADN polimerasa durante la replicación del ADN in vitro (Sanger et al., 1977). Es una técnica cara que consume mucho tiempo si se tiene en cuenta la cantidad de datos producidos. El primer genoma completo de una bacteria que se secuenció con esta tecnología fue el de *Haemophilus influenza* en 1995, el

cual tiene un tamaño de 1.83 Mb. En la actualidad, la secuenciación de un genoma de tamaño similar con tecnología Sanger tendría un coste de más de 10.000 euros. Por lo tanto, el empleo de la tecnología Sanger ha quedado restringido a la secuenciación de regiones específicas, como es el caso de los marcadores filogenéticos.

El gen *16S ARNr* se considera como un marcador filogenético universal en microbiología. Sin embargo, la utilización de este gen puede presentar ciertas desventajas debido a que se es tan conservado que no permite distinguir con precisión entre algunas especies bacterianas. Esto se ha observado en la identificación de *Enterococcus spp.* en esta Tesis (**Artículo 1**). En este sentido, varios trabajos propusieron la secuenciación de otros genes constitutivos en *Enterococcus* como *rpoA*, *pheS*, *atpA* o la región intergénica ARNr 16-23S (Michel Drancourt et al., 2004; Homan et al., 2002; Naser et al., 2005; Sheng et al., 2007). La idoneidad de estos genes varía entre especies bacterianas, por lo que su empleo no puede ser universal en la identificación de bacterias.

En la actualidad, el método más extendido para la identificación y tipificación en microbiología es la tipificación multilocus de secuencias (MLST) (Maiden et al., 1998), que identifica las especies microbianas mediante la secuenciación de primera generación de fragmentos de varios genes constitutivos (normalmente siete). A continuación, las secuencias obtenidas se comparan con las depositadas en las bases de datos, para obtener el serotipo (ST) de la cepa. Una de las bases de datos más extendidas es la PubMLST ("<http://pubmlst.org>") (Jolley et al., 2018), que contiene información de más de 100 especies bacterianas. Sin embargo, la disminución de los costes y el aumento de la calidad de la HTS hará factible el uso de la WGS, desplazando, por tanto, la MLST, y permitiendo la implementación de la MLST de genoma central (cgMLST) (Larsen et al., 2012; van Schaik & Willems, 2010).

### 7.2.2 Identificación y caracterización bacteriana mediante SNG. *Enterococcus* con potencial probiótico

La secuenciación de segunda generación o SNG es un conjunto de tecnologías diseñadas para analizar una gran cantidad de ADN de forma masiva y paralela, produciendo millones de lecturas por carrera de secuenciación. Esto contrasta con la secuenciación de primera generación que sólo genera 96 lecturas por carrera. SNG reduce significativamente el tiempo de secuenciación y el coste por base secuenciada, permitiendo obtener un volumen grande de información por carrera.

La SNG está liderada actualmente por la tecnología Illumina (secuenciación por síntesis), que permite secuenciar los fragmentos de ADN por los dos extremos. Inicialmente, la tecnología Illumina sólo permitía secuenciar fragmentos de 2 x 35 y 2 x 70 pb, pero en la actualidad se pueden secuenciar fragmentos de 2 x 250 y 2 x 300 pb. Además, se ha pasado de 1 Gb a 16 Tb de información obtenida por carrera (<https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>). El coste comercial de la secuenciación Illumina se encuentra actualmente en ~90 euros por millón de lecturas 2 x 250 pb (0.5 Gb de datos), lo que supondría un coste de ~65 euros para un genoma como el de *H. influenza* con una cobertura 100x. Esto contrasta con la estimación de ~10.000 euros necesarios para la secuenciación de primera generación.

La naturaleza dual de *Enterococcus*, presentando propiedades beneficiosas, pero también actuando como patógenos nosocomiales, hace necesario verificar la inocuidad de nuevas cepas probióticas. Sin embargo, esta evaluación no puede ser simple, ya que los enterococos contienen una gran diversidad de genes de virulencia y RAM en su pan-genoma (EFSA, 2008). Por esta razón, es necesario realizar una evaluación integral de las cepas de *Enterococcus* con potencial probiótico.

En esta Tesis Doctoral se evaluaron mediante WGS las cepas de *E. faecium* LHICA 28.4 y LHICA 40.4 originalmente aisladas de carne refrigerada de vacuno envasada al vacío (Hosseini et al., 2009) (**Artículo 2 y Artículo 3**). Hosseini et al. efectuaron una evaluación de las cepas, las cuales fueron capaces de inhibir el crecimiento de cepas de *B. cereus*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Listeria monocytogenes* y *S. aureus*. Además, LHICA 28.4 y LHICA 40.4 fueron capaces de sobrevivir a pH 3.0 en presencia de sales biliares (pancreatina y pepsina), mostraron buenas propiedades de adhesión, y fueron sensibles a diversos antimicrobianos de relevancia clínica. La secuenciación del gen *16S ARNr* las identificó como *E. faecium* (GenBank DQ867126.1 y FJ416484.1), detectándose la presencia del gen de la enterocina P en un cribado PCR para la detección de bacteriocinas clase IIa (Arlindo et al., 2006; Hosseini et al., 2009).

Las cepas LHICA 28.4 y 40.4 fueron secuenciadas en la plataforma Illumina HiSeq 2500 (Illumina, USA). El ensamblado *de novo* de los genomas generó 148 (LHICA 28.4) y 99 (LHICA 40.4) contigs, con un  $N_{50}$  de 34.752 y 67.635 pb, respectivamente. El tamaño de los ensamblados fue de 2,8 Mb para ambas cepas, codificando 2.872 (LHICA 28.4) y 2.882 (LHICA 40.4) genes. La anotación de genes de RAM mostró que ambas cepas son potencialmente resistentes a betalactámicos, fosfomicina, macrólidos, sulfonamidas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. También se han detectado genes que confieren resistencia a distintos metales, y en el caso de LHICA 28.4 un gen relacionado con la resistencia térmica. Ambas cepas presentaron factores de virulencia, la mayoría asociados con la adhesión. En cuanto a las bacteriocinas, se han detectado 14 genes de bacteriocinas en LHICA 28.4, y siete genes de bacteriocinas en LHICA 40.4.

Las relaciones filogenéticas de LHICA 28.4 y LHICA 40.4 con otros *E. faecium* fueron estudiadas en detalle (**Artículo 4**). Para ello, se estudió el pan-genoma de 812 genomas de *E.*

*faecium* aislados de i) *Homo sapiens* (n = 485), animales (n = 235), productos lácteos (n = 56), ambientes clínicos (n = 23), alimentos (n = 7), muestras ambientales (n = 7), y las cepas LHICA 28.4 y LHICA 40.4. A continuación, se calcularon dos árboles filogenéticos, el primero basado en los perfiles de presencia/ausencia de genes en cada cepa en relación con todos los genes del pan-genoma, y el segundo basado en la variación alélica de los genes centrales presentes en  $\geq 95$  % de los genomas. Así, el primer árbol refleja la similitud respecto al contenido del pan-genoma, y el segundo árbol la similitud de las secuencias de los genes centrales. El pan-genoma de los *E. faecium* estudiados está formado por 12.532 genes, contando todos los genomas con 1.467 genes en común (genoma central estricto) y 1.916 genes presentes en  $\geq 95$  % y  $< 100$  % de los genomas (genoma central relajado). En ambos árboles las cepas LHICA 28.4 y LHICA 40.4 se agruparon con las cepas de *E. faecium* aisladas de productos lácteos, descartando, por lo tanto, su asociación con aislados clínicos.

El análisis integral de las cepas con potencial probiótico LHICA 28.4 y LHICA 40.4 confirma que pueden ser usadas como aditivos en productos de alimentación animal, de acuerdo con las recomendaciones de la EFSA y un estudio reciente de Freitas et al. (EFSA, 2012; Freitas et al., 2018). La EFSA dice que las cepas de *Enterococcus* deben ser susceptibles a ampicilina (CMI  $\leq 2$  mg/L) y no presentar los genes codificantes de los factores de virulencia *ISI6* (aumenta la plasticidad del genoma), *hylEfm* (glucosidasa), y *esp* (proteína de superficie implicada en la adhesión).

### **7.2.3 Identificación y caracterización bacteriana mediante secuenciación de tercera generación. *Raoultella ornithinolytica* como patógeno emergente**

La secuenciación de tercera generación ha emergido en los últimos años, eliminando la necesidad de amplificación previa por PCR y realizando la secuenciación a partir de una única molécula de ADN. El resultado son secuencias de ADN más largas, que facilitan el ensamblado posterior y amplían el abanico de aplicaciones, ya que permiten detectar alteraciones en la

estructura de los cromosomas o de los plásmidos. Existen actualmente distintas tecnologías de secuenciación de tercera generación. En esta Tesis Doctoral se ha usado ONT, concretamente la plataforma MinION (ONT, UK), que es un equipo de secuenciación miniaturizado, portátil, capaz de producir resultados en tiempo real, y con un tamaño inferior al de un teléfono inteligente.

ONT es una tecnología de secuenciación totalmente diferente, ya que es capaz de secuenciar moléculas de ADN individuales a medida que atraviesan los nanoporos biológicos (Loman & Watson, 2015). Se aprovecha de los perfiles de corriente eléctrica que genera cada molécula (en este caso nucleótidos) al pasar a través de un poro en una membrana a cuyos lados hay establecido un diferencial de voltaje (Clarke et al., 2009; Feng et al., 2015). Una de las principales limitaciones de la secuenciación ONT, es que tiene una tasa de error más alta en comparación con la SNG, como la tecnología Illumina (Laver et al., 2015). Sin embargo, las plataformas ONT tienen las ventajas de ser dispositivos portátiles de uso sencillo, permitiendo la secuenciación en tiempo real de fragmentos de ADN largos, con alta sensibilidad, y un coste reducido.

El papel de *R. ornithinolytica* como patógeno emergente, y su capacidad natural para producir intoxicaciones debidas a la producción de aminas biógenas, hace necesaria la implementación de métodos universales que nos permitan obtener un perfil completo de los aislados. Como se ha visto en el apartado anterior, la SNG permite la identificación y caracterización de microorganismos; además de determinar el ST, la posición filogenética, o incluso el origen de los brotes epidémicos. Sin embargo, existen limitaciones para su implementación en la industria alimentaria debido al elevado coste, al tamaño de las plataformas de secuenciación, y a la incapacidad del análisis en tiempo real (Allard et al., 2018).

En esta Tesis Doctoral se identificó y caracterizó mediante secuenciación de segunda (Illumina) y tercera generación (ONT) la cepa multirresistente de *R. ornithinolytica* MQB\_Silv\_108, aislada en el efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales en el noroeste de España (**Artículo 4**). MQB\_Silv\_108 fue aislada en el medio ChromID de betalactamasas de espectro extendido a 37 °C durante 14 h. La cepa fue identificada mediante MALDI-TOF MS; y mostró resistencia a aminoglucósidos, aminopenicilinas, fluoroquinolonas y carbapenémicos. Un cribado mediante PCR reveló la presencia de los genes de resistencia *bla<sub>OXA</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, y *bla<sub>TEM</sub>*, y del integrón antropogénico de clase 1 (*aint1*).

Se siguieron tres estrategias diferentes para el ensamblado del genoma. La primera usó sólo las lecturas producidas por Illumina, mientras que la segunda utilizó sólo las lecturas ONT, utilizando la tercera estrategia ambas lecturas en un ensamblado híbrido. El ensamblado híbrido produjo los mejores resultados, siendo capaz de obtener la secuencia completa del cromosoma y de 10 plásmidos. El tamaño del genoma es 6,3 Mb, codificando 6.075 genes. La anotación de genes de RAM identificó 13 genes distintos que confieren resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, fenicoles, sulfonamidas, trimetoprima, fosfomicina, y desinfectantes. La secuenciación ONT permitió obtener secuencias de fragmentos de ADN largos, y así, identificar dos nuevos *aintI* y un nuevo integrón clase III. De manera importante, uno de los *aintI* (número de acceso integrall In531) contiene un casete array de genes de RAM con el gen *bla<sub>BEL</sub>* (*bla<sub>BEL-1</sub>* – *bla<sub>BEL-1</sub>* – *dfrB6* – *cmlA1v*), mientras que el integrón clase III contiene un casete array de RAM con el gen *bla<sub>OXA-101</sub>* (*bla<sub>OXA-101</sub>* – *aacA4*) (número de acceso integrall In3-24). Finalmente, la anotación del genoma determinó que MQB\_Silv\_108 es una cepa potencialmente productora de histamina y putrescina.

La secuenciación de tercera generación ha demostrado un gran potencial para la identificación y caracterización de microorganismos en alimentos. En este sentido, la secuenciación de

fragmentos grandes de ADN permite detectar alteraciones en el genoma, describiéndose en MQB\_Silv\_108 tres nuevos casetes genéticos con genes de RAM, dos de los cuales se asocian a la resistencia a betalactámicos. Un estudio reciente consiguió usar con éxito la secuenciación de tercera generación (ONT), junto con la SNG (Illumina), para investigar un brote producido por *E. coli* O157:H7 (Greig et al., 2021). Greig et al. fueron capaces de atribuir el origen del brote identificando las alteraciones en el genoma de los bacteriófagos insertados en el genoma de *E. coli* O157:H7, lo que fue posible, mediante el uso de la secuenciación de tercera generación.

El uso de ONT ha sufrido un crecimiento exponencial en los últimos años, existiendo un número creciente de estudios acerca de sus potenciales usos en microbiología de los alimentos (Azinheiro et al., 2021; González-Escalona et al., 2019; Yang et al., 2020). Sin embargo, existen algunas limitaciones, que sin duda serán solventadas en los próximos años. Así, la tercera generación de secuenciadores posee una tasa de error mayor que los secuenciadores de segunda generación (Loman & Pallen, 2015), requiriéndose una mayor cobertura de secuenciación y, por lo tanto, un mayor coste, para obtener las secuencias consenso necesarias para la detección de polimorfismos de nucleótido único (SNP), o inserciones y deleciones en el genoma (Jagadeesan et al., 2019). Una de las estrategias actuales, es la de combinar datos de secuenciación de segunda y tercera generación en ensamblados híbridos, lo que las hace en la actualidad, tecnologías complementarias.



## 8 CONCLUSIONES

## 8 CONCLUSIONES

### 8.1 CONCLUSIONES GENERALES

Las tecnologías ómicas se han convertido en herramientas eficaces para la identificación y caracterización de microorganismos en el ámbito clínico. Esta Tesis Doctoral ha determinado el potencial en microbiología de los alimentos de las tecnologías genómicas y proteómicas más avanzadas, las cuales permiten obtener una caracterización completa de los microorganismos, reduciendo el tiempo necesario de análisis. Es de esperar, que el coste de dichas tecnologías siga disminuyendo en los próximos años, por lo que se espera que su uso se extienda a la industria alimentaria. Una de las limitaciones actuales es la falta de profesionales capacitados para analizar e interpretar los datos, para que los mismos puedan ser traducidos en acciones por parte de la industria o las autoridades competentes. Considerando las distintas partes de esta Tesis Doctoral, es importante destacar las conclusiones obtenidas de una forma más pormenorizada, por lo que a continuación se enumeran conclusiones específicas correspondientes a cada uno de los capítulos que constituyen esta Tesis Doctoral.

### 8.2 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

La espectrometría de masas MALDI-TOF es una herramienta sensible y rápida para la detección e identificación de las principales especies de *Enterococcus*, proporcionando espectros y listas de masas característicos de cada especie bacteriana. El estudio filoproteómico realizado mostró un agrupamiento microbiano idóneo, siendo confirmado por los resultados obtenidos en el análisis filogenético basado en el gen *16S ARNr*.

La secuenciación de segunda generación ha permitido la caracterización completa de dos cepas de *E. faecium* productoras de bacteriocinas y potencialmente probióticas. Ambas cepas codifican múltiples bacteriocinas, genes de virulencia y RAM. Las cepas cumplen con los requisitos de la EFSA para su uso como probióticos en alimentación animal.

El empleo de la proteómica de cuatro dimensiones (timsTOF) ha mostrado un gran potencial para la caracterización de cepas de interés en la industria alimentaria. El protocolo que se ha usado ha permitido la caracterización de dos cepas de *E. faecium* potencialmente probióticas en menos de 24h. Además, los resultados obtenidos han permitido obtener 22 rutas metabólicas completas en ambas cepas, lo cual resalta el potencial de esta metodología para determinar y optimizar las propiedades biotecnológicas de las BAL en la industria alimentaria.

La secuenciación de tercera generación, concretamente ONT, ha permitido obtener el genoma completo de una cepa multirresistente de *R. ornithinolytica*. La secuenciación de fragmentos grandes mediante ONT mejora el ensamblado de las regiones repetitivas del genoma, lo que es importante para determinar el contexto genético de estructuras como los integrones. Aunque ONT tiene una tasa de error más alta que la secuenciación de segunda generación, cuenta con plataformas portátiles y miniaturizadas, capaces de producir resultados en tiempo real.



## 9 BIBLIOGRAFÍA

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Abril, A. G., Carrera, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P., Sánchez-Pérez, A., & Villa, T. G.** (2021). Proteomic characterization of antibiotic resistance in listeria and production of antimicrobial and virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158141>
- Abril, A. G., Carrera, M., Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Rama, J. L. R., Calo-Mata, P., Sánchez-Pérez, A., & Villa, T. G.** (2020). Proteomic characterization of antibiotic resistance, and production of antimicrobial and virulence factors in streptococcus species associated with bovine mastitis. Could enzybiotics represent novel therapeutic agents against these pathogens? *Antibiotics*, 9(6), 1–24. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060302>
- Abril, A. G., Quintela-Baluja, M., Villa, G., Calo-Mata, P., Barros-velázquez, J., Villa, T. G., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J., & Carrera, M.** (2022). Proteomic Characterization of Virulence Factors and Related Proteins in Enterococcus Strains from Dairy and Fermented Food Products. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10971. <https://doi.org/10.3390/ijms231810971>
- Allard, M. W., Bell, R., Ferreira, C. M., Gonzalez-Escalona, N., Hoffmann, M., Muruvanda, T., Ottesen, A., Ramachandran, P., Reed, E., Sharma, S., Stevens, E., Timme, R., Zheng, J., & Brown, E. W.** (2018). Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.002>
- Alnakip, M. E. A., Rhouma, N. R., Abd-Elfatah, E. N., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Bayoumi, M. A., Abdelhafez, M. M., Taboada-Rodríguez, A., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J.** (2020). Discrimination of major and minor streptococci incriminated in bovine mastitis by MALDI-TOF MS fingerprinting and 16S rRNA gene sequencing. *Research in Veterinary Science*, 132(July), 426–438. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.027>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P.** (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*,

100(7), 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>

- Arlindo, S., Calo, P., Franco, C., Prado, M., Cepeda, A., & Barros-Velázquez, J.** (2006). Single nucleotide polymorphism analysis of the enterocin P structural gene of *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(12), 1229–1238. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600178>
- Avery, O. T., Macleod, C. M., & McCarty, M.** (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *Journal of Experimental Medicine*, 79(2), 137–158. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>
- Axelsson, L.** (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker-*, 139, 1–66.
- Azinhairo, S., Roumani, F., Carvalho, J., Prado, M., & Garrido-Maestu, A.** (2021). Suitability of the MinION long read sequencer for semi-targeted detection of foodborne pathogens. *Analytica Chimica Acta*, 1184, 339051. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339051>
- Barbano, D., Diaz, R., Zhang, L., Sandrin, T., Gerken, H., & Dempster, T.** (2015). Rapid characterization of microalgae and microalgae mixtures using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *PLoS ONE*, 10(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135337>
- Ben Braïek, O., & Smaoui, S.** (2019). Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed Research International*, 2019, 5938210. <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>
- Bhunja, A. K.** (2014). One day to one hour: How quickly can foodborne pathogens be detected? *Future Microbiology*, 9(8), 935–946. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.61>
- Böhme, K., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Cañas, B., & Calo-Mata, P.** (2011). Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 32(21), 2951–2965. <https://doi.org/10.1002/elps.201100217>

- Böhme, K., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Cañas, B., & Calo-Mata, P.** (2012). SpectraBank: An open access tool for rapid microbial identification by MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis*, 33(14), 2138–2142. <https://doi.org/10.1002/elps.201200074>
- Bolton, F. J., Fritz, E., Poynton, S., & Jensen, T.** (2000). Rapid enzyme-linked immunoassay for detection of Salmonella in food and feed products: Performance testing program. *Journal of AOAC International*, 83(2), 299–303. <https://doi.org/10.1093/jaoac/83.2.299>
- Bottazzi, V.** (1983). Other fermented dairy products. *Biotechnology. Volume 5. Food and Feed Production with Microorganisms*, 315–363.
- Bruder, N., Martin, C., Paganelli, F., Bernit, E., Patrice, Y., Treut, L., Thomas, P., Papazian, L., Raoult, D., Stein, A., Seng, P., Boushab, B. M. B. M., Romain, F., Gouriet, F., Bruder, N., Martin, C., Paganelli, F., Bernit, E., Treut, Y. P. L. Y. P. Le, ... Stein, A.** (2016). Emerging role of Raoultella ornithinolytica in human infections: A series of cases and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, 45, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.014>
- Burger, R.** (2012). *EHEC O104: H4 in Germany 2011: Large outbreak of bloody diarrhea and haemolytic uraemic syndrome by Shiga toxin-producing E. coli via contaminated food.*
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J.** (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 685–706. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00023-12>
- Calo-Mata, P., Carrera, M., Böhme, K., Caamaño-Antelo, S., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., & Cañas, B.** (2016). Novel Peptide Biomarker Discovery for Detection and Identification of Bacterial Pathogens by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000296>
- Carbon, S., Douglass, E., Good, B. M., Unni, D. R., Harris, N. L., Mungall, C. J., Basu, S., Chisholm, R. L., Dodson, R. J., Hartline, E., Fey, P., Thomas, P. D., Albou, L. P., Ebert, D., Kesling, M. J., Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Mushayahama, T., ... Elser, J.** (2021). The Gene Ontology resource: Enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D325–D334. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1113>

- Carrera, M., Böhme, K., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., & Calo-Mata, P.** (2017). Characterization of foodborne strains of *Staphylococcus aureus* by shotgun proteomics: Functional networks, virulence factors and species-specific peptide biomarkers. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02458>
- Castillo-Macías, A., Flores-Aréchiga, A., Llaca-Díaz, J., Pérez-Chávez, F., & Néstor, C.-V.** (2018). Microbiología del género *Raoultella*, características clínicas y dificultades para su diagnóstico. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 56(81), 486–490.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., & Łaniewska-Trokenheim, Ł.** (2017). Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.026>
- Chan, M.** (2014). Food safety must accompany food and nutrition security. *The Lancet*, 384(9958), 1910–1911. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62037-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62037-7)
- Cheng, K., Chui, H., Domish, L., Hernandez, D., & Wang, G.** (2016). Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics - Clinical Applications*, 10(4), 346–357. <https://doi.org/10.1002/prca.201500086>
- Chung, J., Otaguro, M., Yanagida, F., Wu, H., Chang, Y., Lee, Y.-S., & Chen, Y.** (2022). *Enterococcus alishanensis* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from fresh coffee beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(2), 5255.
- Cifuentes, A.** (2009). Food analysis and foodomics. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7109. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.018>
- Clarke, J., Wu, H.-C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S., & Bayley, H.** (2009). Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology*, 4(4), 265–270.
- Cohn, F.** (1876). Untersuchungen über Bacteien. IV. *Beitrag Zur Biologie Der Pflanzen.*, 2, 249–276.
- Collard, P. J., & Collard, P.** (1976). *The development of microbiology*. CUP Archive.

- Collins, F. S., Morgan, M., & Patrinos, A.** (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*, *300*(5617), 286–290.
- Crick, F., & Watson, J.** (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 737–738.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., & Rousselier, P.** (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*, 925–932.
- Drancourt, Michel, Roux, V., Fournier, P. E., & Raoult, D.** (2004). rpoB Gene Sequence-Based Identification of Aerobic Gram-Positive Cocci of the Genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(2), 497–504. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.497-504.2004>
- EFSA.** (2008). Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard—Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA Journal*, *6*(8), 765.
- EFSA.** (2012). Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA Journal*, *10*(5), 1–10. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2682>
- EFSA.** (2017). Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. *EFSA Journal*, *15*(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5063>
- EFSA.** (2019). *Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation , source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms n. 17*(October). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5898>
- EFSA.** (2021). EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain. *EFSA*, *19*(March), 1–15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6506>
- EFSA.** (2022). Guidelines for reporting Whole Genome Sequencing-based typing data through the EFSA One Health WGS System. In *EFSA*. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.en->

- El-Zamkan, M. A., & Mohamed, H. M. A.** (2021). Antimicrobial resistance, virulence genes and biofilm formation in *Enterococcus* species isolated from milk of sheep and goat with subclinical mastitis. *PLoS ONE*, *16*(11 November), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259584>
- Ellis, D. I., Muhamadali, H., Chisanga, M., & Goodacre, R.** (2018). Omics methods for the detection of foodborne pathogens. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (Issue September). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21793-9>
- FDA.** (2017). *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00148-1>
- Feng, Y., Zhang, Y., Ying, C., Wang, D., & Du, C.** (2015). Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *13*(1), 4–16.
- Fernández-No, I. C., Böhme, K., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., & Calomata, P.** (2010). Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, *31*(6), 1116–1127. <https://doi.org/10.1002/elps.200900591>
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L. I., Glodek, A., ... Venter, J. C.** (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, *269*(5223), 496–512. <https://doi.org/10.1126/science.7542800>
- Fleming, A.** (1944). The discovery of penicillin. *British Medical Bulletin*, *2*(1), 4–5.
- Franklin, R. E.** (1953). Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 740–741. <https://doi.org/10.1038/nature01396>
- Freitas, A. R., Tedim, A. P., Novais, C., Coque, T. M., & Peixe, L.** (2018). Distribution of putative virulence markers in *Enterococcus faecium*: towards a safety profile review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*, 306–319. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx387>

- Fuller, R.** (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378.
- Giraffa, G.** (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 163–171. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(02\)00094-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(02)00094-3)
- González-Escalona, N., Allard, M. A., Brown, E. W., Sharma, S., & Hoffmann, M.** (2019). Nanopore sequencing for fast determination of plasmids, phages, virulence markers, and antimicrobial resistance genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 14(7), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220494>
- Graham, K., Stack, H., & Rea, R.** (2020). Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(22), 3836–3861. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1709800>
- Greig, D. R., Jenkins, C., Gharbia, S. E., & Dallman, T. J.** (2021). Analysis of a small outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 using long-read sequencing. *Microbial Genomics*, 7(3). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000545>
- Griffith, B. Y. F.** (1928). The Significance of pneumococcal types. Occurrence of a Variety of Serological Types in the Sputum from an individual case of pneumonia. *Journal of Hygiene*, 27(2), 113–159.
- Hajjar, R., & Su, S.** (2020). Raoultella ornithinolytica : Emergence and Resistance. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1091–1104.
- Hammerum, A. M.** (2012). Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), 619–625. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03829.x>
- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F. J., Devleeschauwer, B., Adegoke, G. O., Afshari, R., Alasfoor, D., ... Zeilmaier, M.** (2015). World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Medicine*, 12(12), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>

- HCWH.** (2017). *Food pathways to antimicrobial resistance: a call for international action. Policy overview.* [https://noharm-europe.org/sites/default/files/documents-files/5017/2017-09-26\\_AMR\\_in\\_Food\\_Policy\\_Overview\\_FINAL.pdf](https://noharm-europe.org/sites/default/files/documents-files/5017/2017-09-26_AMR_in_Food_Policy_Overview_FINAL.pdf)
- Heyer, R., Schallert, K., Büdel, A., Zoun, R., Dorl, S., Behne, A., Kohrs, F., Püttker, S., Siewert, C., Muth, T., Saake, G., Reichl, U., & Benndorf, D.** (2019). A robust and universal metaproteomics workflow for research studies and routine diagnostics within 24 h using phenol extraction, fasp digest, and the metaproteome analyzer. *Frontiers in Microbiology*, *10*(AUG), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01883>
- Higgins, D., Urquhart, H., Kelly, S., Illingworth, S., Perera, N., Bastin, B., Bird, P., Agin, M. J., & Goins, D.** (2019). Validation of solus one Salmonella from select food matrixes and stainless-steel and plastic environmental surfaces. *Journal of AOAC International*, *102*(4), 1145–1161. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0345>
- Hill, W. E.** (1981). DNA hybridization method for detecting enterotoxigenic Escherichia coli in human isolates and its possible application to food samples. *Journal of Food Safety*, *3*(4), 233–247.
- Holley, R. W., Evererr, G. A., Madisom, J. T., & Zamir, A.** (1965). Nucleotide Sequences in the Yeast Alanine Transfer Ribonucleic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, *240*, 2122–2128. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)97435-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)97435-1)
- Homan, W. L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., Van Embden, J. D. A., & Willems, R. J. L.** (2002). Multilocus sequence typing scheme for Enterococcus faecium. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(6), 1963–1971. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.1963-1971.2002>
- Hosseini, S. V., Arlindo, S., Böhme, K., Fernández-No, C., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J.** (2009). Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing Enterococcus faecium strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology*, *107*(4), 1392–1403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04327.x>
- Hrabák, J., Walková, R., Študentová, V., Chudáčková, E., & Bergerová, T.** (2011). Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(9), 3222–3227.

<https://doi.org/10.1128/JCM.00984-11>

- Hudson, C. M., Bent, Z. W., Meagher, R. J., & Williams, K. P.** (2014). Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099209>
- Jackson, Charlene R., Fedorka-Cray, P. J., & Barrett, J. B.** (2004). Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3558–3565. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3558-3565.2004>
- Jackson, Charlene Renee.** (2019). *Emergence of NDM-1- and CTX-M-3- Producing Raoultella ornithinolytica in Human Gut Microbiota Bacterial Isolation and Identification*. 10(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02678>
- Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A., & Wollman, E.** (1953). Definition of some terms relative to lysogeny. *Annales de l'Institut Pasteur*, 84(1), 222–224.
- Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M. W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., Chaffron, S., Van Der Vossen, J., Tang, S., Katase, M., McClure, P., Kimura, B., Ching Chai, L., Chapman, J., & Grant, K.** (2019). The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food Microbiology*, 79(October 2018), 96–115. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.005>
- Joardder, M. U. H., & Masud, M. H.** (2019). A Brief History of Food Preservation. In *Food Preservation in Developing Countries: Challenges and Solutions*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-11530-2>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J.** (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. *Wellcome Open Research*, 3(0), 1–20. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., & Hattori, M.** (2004). The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research*, 32(DATABASE ISS.). <https://doi.org/10.1093/nar/gkh063>
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., & Hillenkamp, F.** (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry*

*and Ion Processes*, 78, 53–68.

- Keusch, G. T.** (2013). Perspectives in Foodborne Illness. *Infectious Disease Clinics of North America*, 27, 501–515.
- Kim, S.-M., Byeon, Y.-S., Yang, H. L., Kim, I. S., & Lee, S. D.** (2022). *Vagococcus allomyrinae* sp. nov. and *Enterococcus larvae* sp. nov., isolated from larvae of *Allomyrina dichotoma*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(5), 5382.
- Kimura, Z. I., Chung, K. M., Itoh, H., Hiraishi, A., & Okabe, S.** (2014). *Raoultella electrica* sp. nov., isolated from anodic biofilms of a glucose-fed microbial fuel cell. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 4), 1384–1388. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058826-0>
- Kirschner, C., Maquelin, K., Pina, P., Ngo Thi, N. A., Choo-Smith, L.-P., Sockalingum, G. D., Sandt, C., Ami, D., Orsini, F., Doglia, S. M., & others.** (2001). Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), 1763–1770.
- Kitts, P. A., Church, D. M., Thibaud-Nissen, F., Choi, J., Hem, V., Sapojnikov, V., Smith, R. G., Tatusova, T., Xiang, C., Zherikov, A., DiCuccio, M., Murphy, T. D., Pruitt, K. D., & Kimchi, A.** (2016). Assembly: A resource for assembled genomes at NCBI. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D73–D80. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1226>
- Koch, R.** (1890). Report of address at 10th International Medical Congress, Berlin, August 4, 1890. *Dtsch. Med. Wochenschr*, 16, 756–757.
- Koch, Robert.** (1882). *Ueber die Aetiologie der Tuberculose*. JF Bergman.
- Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., & Michalik, M.** (2021). The many faces of enterococcus spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen. *Microorganisms*, 9(9), 1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
- Laland, K. N., Odling-Smee, J., & Myles, S.** (2010). How culture shaped the human genome: Bringing genetics and the human sciences together. *Nature Reviews Genetics*, 11(2), 137–148. <https://doi.org/10.1038/nrg2734>

- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, L., Jelsbak, L., Sicheritz-pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O.** (2012). *Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria*. 1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Laver, T., Harrison, J., O'Neill, P. A., Moore, K., Farbos, A., Paszkiewicz, K., & Studholme, D. J.** (2015). Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.02.001>
- Lebreton, F., Willems, R. J. L., & Gilmore, M. S.** (2014). Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]*.
- Lee, Y. C., Lin, C. M., Huang, C. Y., Huang, Y. L., Chen, H. C., Huang, T. C., & Tsai, Y. H.** (2013). Determination and frying loss of histamine in striped marlin fillets implicated in a foodborne poisoning. *Journal of Food Protection*, 76(5), 860–866. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-298>
- Lehner, A., Loy, A., Behr, T., Gaenge, H., Ludwig, W., Wagner, M., & Schleifer, K. H.** (2005). Oligonucleotide microarray for identification of Enterococcus species. *FEMS Microbiology Letters*, 246(1), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.002>
- Linscott, A. J.** (2011). Food-Borne Illnesses. *Clinical Microbiology Newsletter*, 33(6), 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.02.004>
- Loman, N. J., & Pallen, M. J.** (2015). Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 787–794. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3565>
- Loman, N. J., & Watson, M.** (2015). Successful test launch for nanopore sequencing. *Nature Methods*, 12(4), 303–304.
- Luo, J., Yao, X., Lv, L., Doi, Y., Huang, X., & Huang, S.** (2017). Emergence of *mcr-1* in *Raoultella ornithinolytica* and *Escherichia coli* Isolates from Retail Vegetables in China. *61*(10), 1–4.
- Ma, Y., Wu, X., Li, S., Tang, L., Chen, M., & An, Q.** (2021). Proposal for reunification of the genus *Raoultella* with the genus *Klebsiella* and reclassification of *Raoultella electrica*

as *Klebsiella electrica* comb. nov. *Research in Microbiology*, 172(6), 103851.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103851>

**Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., & Spratt, B. G.** (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3140–3145.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>

**Maifreni, M., Frigo, F., Bartolomeoli, I., Innocente, N., Biasutti, M., & Marino, M.** (2013). Identification of the Enterobacteriaceae in Montasio cheese and assessment of their amino acid decarboxylase activity. *Journal of Dairy Research*, 80(1), 122–127.  
<https://doi.org/10.1017/S002202991200074X>

**Manageiro, V., Jones-dias, D., Ferreira, E., & Caniça, M.** (2020). Plasmid-mediated colistin resistance (Mcr-1) in *Escherichia coli* from non-imported fresh vegetables for human consumption in Portugal. *Microorganisms*, 8(3), 4–10.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8030429>

**Markets, & Markets.** (2020). *Probiotics market by application (functional food & beverages (dairy products, non-dairy beverages, infant formula, cereals], dietary supplements, feed), ingredient (bacteria, yeast), form (dry, liquid), end user, and region—global forecast to 2026.* <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69.html>

**Massa, R., Bantar, C., Lopardo, H., Vay, C., & Gutkind, G.** (2007). Los perfiles de proteínas totales son útiles para distinguir especies de enterococos recuperados de muestras clínicas. *Revista Argentina de Microbiología*, 39(4), 199–203.

**Mattick, A. T. R., Hirsch, A., & others.** (1947). Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 5, 5–8.

**Meselson, M., & Stahl, F. W.** (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 44(7), 671–682.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.44.7.671>

- Metchnikoff, E.** (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. W. Heinemann, London, 161–183.
- Moothoo-Padayachie, A., Kandappa, H. R., Krishna, S. B. N., Maier, T., & Govender, P.** (2013). Biotyping *Saccharomyces cerevisiae* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *European Food Research and Technology*, 236(2), 351–364. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1898-1>
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in enzymology* (Vol. 155, pp. 335–350). Elsevier.
- Murugaiyan, J., & Roesler, U.** (2017). MALDI-TOF MS profiling-advances in species identification of pests, Parasites, and Vectors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAY). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00184>
- Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., & Swings, J.** (2005). Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 151(7), 2141–2150. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27840-0>
- Oguttu, J. W., Qekwana, D. N., & Odoi, A.** (2021). Prevalence and Predictors of Antimicrobial Resistance Among *Enterococcus* spp. From Dogs Presented at a Veterinary Teaching Hospital, South Africa. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(589439). <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.589439>
- Oktariani, A. F., Ramona, Y., Sudaryatma, P. E., Ayu, I., Meliana, M., & Shetty, K.** (2022). Role of Marine Bacterial Contaminants in Histamine Formation in Seafood Products : A Review. *Microorganisms*, 10, 1–14.
- Ozen, M., & Dinleyici, E. C.** (2015). The history of probiotics: The untold story. *Beneficial Microbes*, 6(2), 159–165. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0103>
- Park, J. S., Hong, K. H., Lee, H. J., Choi, S. H., Song, S. H., Song, K., Kim, H. Bin, Park, K. U., Song, J., & Kim, E.** (2011). Evaluation of three phenotypic identification systems for clinical isolates of *Raoultella ornithinolytica*. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 492–499. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.020768-0>

- Parte, A. C., Carbasse, J. S., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M.** (2020). List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- Pasteur, L., & Faulkner, F.** (1879). *Studies on fermentation: the diseases of beer, their causes, and the means of preventing them*. Kraus Reprint.
- Patterson, J. A., & Burkholder, K. M.** (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82(4), 627–631. <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.627>
- Pfrunder, S., Grossmann, J., Hunziker, P., Brunisholz, R., Gekenidis, M. T., & Drissner, D.** (2016). Bacillus cereus Group-Type Strain-Specific Diagnostic Peptides. *Journal of Proteome Research*, 15(9), 3098–3107. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00216>
- Quéro, L., Girard, V., Pawtowski, A., Tréguer, S., Weill, A., Arend, S., Cellière, B., Polsinelli, S., Monnin, V., van Belkum, A., Vasseur, V., Nodet, P., & Mounier, J.** (2019). Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. *Food Microbiology*, 81, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.001>
- Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I. ., Morandi, S., Alnakip, M., Caamaño-Antelo, S., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P.** (2013). Characterization of different food-isolated Enterococcus strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 34(15), 2240–2250. <https://doi.org/10.1002/elps.201200699>
- Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I. C., Alnakip, M. E., Caamano, S., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P.** (2014). MALDI-TOF mass spectrometry, a rapid and reliable method for the identification of bacterial species in food-microbiology laboratories. *Nov. Food Preserv. Microb. Assess. Tech*, 353–385.
- Raza, K., & Qazi, S.** (2019). Nanopore sequencing technology and Internet of living things: A big hope for U-healthcare. In *Sensors for Health Monitoring*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819361-7.00005-1>
- Reisinger, F., Del-Toro, N., Ternent, T., Hermjakob, H., & Vizcaíno, J. A.** (2015). Introducing the PRIDE Archive RESTful web services. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W599–W604. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv382>

- Rogers, L. A., & Whittier, E. O.** (1928). Limiting Factors in the Lactic Fermentation. *Journal of Bacteriology*, 16(4), 211–229. <https://doi.org/10.1128/jb.16.4.211-229.1928>
- Rózańska, H., Lewtak-Pilat, A., Kubajka, M., & Weiner, M.** (2019). Occurrence of enterococci in mastitic cow's milk and their antimicrobial resistance. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 63(1), 93–97. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0014>
- Sabry, M. A., Mansour, H. A. A., Ashour, R. M., & Hamza, E.** (2019). Histamine-Producing Bacteria and Histamine Induction in Retail Sardine and Mackerel from Fish Markets in Egypt. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1–7. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2616>
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Iii, C. A. H., Slocombe, P. M., & Smith, M.** (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA. *Nature*, 265, 687–695.
- Santagati, M., Campanile, F., & Stefani, S.** (2012). Genomic diversification of enterococci in hosts: The role of the mobilome. *Frontiers in Microbiology*, 3(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00095>
- Schleifer, K. H., & Kilpper-Balz, R.** (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(1), 31–34. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-1-31>
- Schroeter, J.** (1872). Ueber einige durch Bacterien gebildete Pigmente. *Beiträge Zur Biologie Der Pflanzen*, 1(2), 109–126.
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., Scola, B. La, Fournier, P. E., Rolain, J. M., & Raoult, D.** (2009). Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543–551. <https://doi.org/10.1086/600885>
- Senthil, A. S. P., Hemavathy, K. R. V, Kamalesh, S. J. R., Yaashikaa, S. S. P. R., & Deoxynivalenol, D. O. N.** (2021). Methods of detection of food - borne pathogens : a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), 189–207. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01072-z>
- Shendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A.,**

- & Waterston, R. H.** (2017). DNA sequencing at 40: Past, present and future. *Nature*, 550(7676). <https://doi.org/10.1038/nature24286>
- Sheng, K. T., Lee, J. T., Vanechoutte, M., Hung, M. C., & Tsung, C. C.** (2007). Identification of species of Abiotrophia, Enterococcus, Granulicatella and Streptococcus by sequence analysis of the ribosomal 16S-23S intergenic spacer region. *Journal of Medical Microbiology*, 56(4), 504–513. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47027-0>
- Smith, P. B., Tomfohrde, K. M., Rhoden, D. L., & Balows, A.** (1972). API system: a multitube micromethod for identification of Enterobacteriaceae. *Applied Microbiology*, 24(3), 449–452.
- Sonnenborn, U.** (2016). Escherichia coli strain Nissle 1917-from bench to bedside and back: History of a special Escherichia coli strain with probiotic properties. *FEMS Microbiology Letters*, 363(19), 1–6. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw212>
- Tonner, E., Kelly, S., Illingworth, S., Perera, N., Chen, Y., Brodsky, M., Salfinger, Y., Bastin, B., Bird, P., Joseph Benzinger, M., Agin, J., & Goins, D.** (2019). Evaluation of the solus one Listeria method for the detection of Listeria species on environmental surfaces. *Journal of AOAC International*, 102(2), 570–579. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0199>
- Treangen, T. J., & Salzberg, S. L.** (2012). Repetitive DNA and next-generation sequencing: Computational challenges and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 13(1), 36–46. <https://doi.org/10.1038/nrg3117>
- Umesha, S., & Manukumar, H. M.** (2018). Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 84–104. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126701>
- Usbeck, J. C., Kern, C. C., Vogel, R. F., & Behr, J.** (2013). Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in response to varying growth conditions. *Food Microbiology*, 36(2), 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.004>

- Van Baar, B. L. M.** (2000). Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(2), 193–219. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00036-4)
- van Schaik, W., & Willems, R. J. L.** (2010). Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(6), 527–532. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03201.x>
- Van Tyne, D., & Gilmore, M. S.** (2014). Friend turned foe: Evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annual Review of Microbiology*, 68(66), 337–356. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113003>
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B.** (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Wang, Z., Wang, Y., Zhang, S., & Shen, Z.** (2019). Emergence of colistin resistance gene *mcr-8* and its variant in *raoultella ornithinolytica*. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00228>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W.** (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(May), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- WHO/FAO.** (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: Joint FAO/WHO Working Group Report. London, Ontario, Canada. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. <https://doi.org/10.5772/63646>
- WHO.** (2015). *Who estimates the global burden of foodborne diseases*. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-27769-6\\_3884-1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-27769-6_3884-1)
- WHO.** (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. In *WHO*.
- Winston, L. G., Pang, S., Haller, B. L., Wong, M., Chambers III, H. F., & Perdreau-Remington, F.** (2004). API 20 strep identification system may incorrectly speciate enterococci with low level resistance to vancomycin. *Diagnostic Microbiology and*

*Infectious Disease*, 48(4), 287–288.

- Yamashita, M., & Fenn, J. B.** (1984). Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry*, 88(20), 4451–4459. <https://doi.org/10.1021/j150664a002>
- Yang, M., Cousineau, A., Liu, X., Luo, Y., Sun, D., Li, S., Gu, T., Sun, L., Dillow, H., Lepine, J., Xu, M., & Zhang, B.** (2020). Direct Metatranscriptome RNA-seq and Multiplex RT-PCR Amplicon Sequencing on Nanopore MinION – Promising Strategies for Multiplex Identification of Viable Pathogens in Food. *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00514>
- Yoon, E. J., & Jeong, S. H.** (2021). Maldi-tof mass spectrometry technology as a tool for the rapid diagnosis of antimicrobial resistance in bacteria. *Antibiotics*, 10(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080982>
- Ytterberg, A. J., Dunsmore, J., Lomeli, S. H., Thevis, M., Xie, Y., Loo, R. R. O., & Loo, J. A.** (2010). The role of mass spectrometry for peptide, protein, and proteome characterization. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, 683–721.





La globalización del suministro de alimentos y el aumento de la complejidad de la cadena alimentaria requiere de nuevos métodos para la detección de bacterias alterantes y patógenos alimentarios. Estas metodologías deben ser rápidas, debido a la corta vida útil de un rango amplio de productos alimentarios; de bajo coste y sencillas, para su implementación global.

Además, deben estar dirigidas no solo a garantizar la inocuidad de los alimentos, sino a la detección y caracterización precoz de microorganismos contaminantes, evitando así importantes pérdidas económicas tanto al productor como al distribuidor. Por tanto, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido desarrollar y optimizar protocolos de identificación y caracterización de bacterias alterantes y patógenos en alimentos, usando tecnologías ómicas.