

# Qualitat microbiològica dels **productes vegetals frescos** mínimament processats i desenvolupament de tecnologies de bioconservació mitjançant bacteris de l'àcid làctic

*RESUM: L'escenari actual de la seguretat dels aliments està condicionat per la implementació de noves tecnologies de conservació suaus i de mínim processament, els nous aliments, les restriccions en el perfil toxicològic dels actuals conservadors químics i la prohibició/limitació dràstica dels antibiòtics, i, com a conseqüència, per l'aparició de nous patògens emergents o la potenciació d'alguns existents. Els bioconservadors sorgeixen en aquest context amb fortes expectatives, atès que es tracta de microorganismes segurs que provenen dels aliments, compostos químics d'origen natural —pèptids i proteïnes antimicrobians, extractes botànics, enzims— i compostos sintètics basats en estructures naturals, però menys tòxics i més eficients, com els pèptids antimicrobians. Entre els bioconservadors, els bacteris làctics han mostrat grans expectatives d'aplicació sobretot en productes carnis crus curats, en fruites i verdures fresques i, en especial, en productes de quarta gamma, així com en mètodes per reduir la càrrega microbiana de patògens en subproductes alimentaris abans del seu processament. El nostre laboratori ha realitzat un extens estudi de la qualitat microbiològica de fruites i verdures fresques i de productes mínimament processats —quarta gamma— i ha detectat baixos nivells, però significatius, de *Salmonella* sp., *E. coli* i *Listeria* spp., incloent-hi *L. monocytogenes*. Ha estat per això que vam endegar un projecte consistent a desenvolupar aplicacions de bacteris làctics (BAL) obtinguts d'aquests productes com a bioconservadors. Els BAL van ser abundants en els productes de quarta gamma, en especial en llavors germinades. Es van obtenir diverses soques, sobretot de *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Weissella*, productores de bacteriocines amb una activitat significativa per al control de *L. monocytogenes* en pomes i enciam processat. Altres soques han estat efectives en la inhibició de podridures fúngiques en postcollita causades per *Penicillium expansum*.*

PARAULES CLAU: bioconservadors, bactericides, bacteris làctics.

**EMILI MONTESINOS, ROSALIA TRIAS,  
LLUÍS BAÑERAS, JESÚS FRANCÉS,  
JORDI CABREFIGA, ANNA  
BONATERRA I ESTHER BADOSA**  
Universitat de Girona. Parc Científic  
i Tecnològic de la Creueta. Centre  
de Noves Tecnologies  
Alimentàries (CeNTA-UdG)  
A. e. emilio.montesinos@udg.edu

## Microbiological quality of ready-to-eat fresh fruit and vegetables and development of technologies of biopreservation by means of lactic acid bacteria

*SUMMARY: Food safety today is conditioned by the implementation of new technologies for food preservation based on mild treatments and minimum process, novel foods, severe restrictions in the toxicologic profile of chemical preservatives, and the drastic limitation/prohibition of antibiotics, and as a consequence, by the new emerging pathogens or by the increase of classical food-borne pathogens. Biopreservatives appear within this context with strong expectations, because they are safe microorganisms often isolated from foods, chemical compounds of natural origin – antimicrobial peptides and proteins, botanical extracts, enzymes- and synthetic compounds based on natural structures, but less toxic and more efficient, like the antimicrobial peptides. Among the microbial biopreservatives, lactic acid bacteria have shown great possibilities in the preservation of cured meat products, ready to eat fresh fruit and vegetables, as well as to decrease microbial spoilage in food byproducts before processing for valorization. Our laboratory has performed an extensive survey of the microbiological quality of fresh fruit and vegetables, and of ready-to-eat products, and have detected low levels, but significant of Salmonella sp., E. coli and Listeria spp., including L. monocytogenes, in retail markets and supermarkets of Catalonia. Due to this reason, we started a project consisting of developing application of lactic acid bacteria (LAB) obtained from these products, as biopreservatives. LAB were abundant in ready-to-eat fresh fruits and vegetables, specially in germinated seeds. From these products we obtained strains of Leuconostoc, Lactobacillus and Weissella, producing bacteriocins and with a significant activity of control of L. monocytogenes in fresh apple and cut salad. Other strains were effective in the inhibition of fungal rot during postharvest caused by Penicillium expansum.*

**KEYWORDS:** biopreservatives, food-borne pathogens, bacteriocins, lactic acid bacteria.

### INTRODUCCIÓ

**E**ls microorganismes són responsables de transformacions dels aliments amb valor afegit, com els productes carnis i de la pesca curats —embotits crus curats, pernil, anxoves—, els lactis fermentats —iogurt, formatges, quefir—, les begudes alcohòliques —vi, cervesa— i els productes de fleca i pastisseria —pa, pizza. També són causants de processos de deteriorament, principalment podridures —en productes vegetals— i acidificació —en productes d'origen animal—, i són vectors de microorganismes patògens com virus, bacteris i paràsits, que en alguns casos poden multiplicar-se en l'aliment i constituir greus infeccions de transmissió alimentària. Finalment, alguns microorganismes

produïxen toxines —micotoxines, toxines bacterianes o ficotoxines.

A banda dels problemes clàssics associats a la seguretat dels aliments, les noves tendències pel que fa als canvis en els hàbits alimentaris dels consumidors, la demanda de productes frescos mínimament processats amb tecnologies de conservació suaus i els nous aliments i ingredients alimentaris estan configurant un nou escenari en el qual el principal problema són els patògens emergents de transmissió alimentària o la potenciació d'alguns existents. Aquest escenari està essent agreujat per les restriccions en el perfil toxicològic dels conservadors i la prohibició dels antibiòtics —resistència transferible—, que sovint comporten una manca o una menor eficàcia en el control de patògens.

### QUALITAT MICROBIOLÒGICA DELS PRODUCTES VEGETALS FRESCOS I MÍNIMAMENT PROCESSATS

És en aquest nou escenari que prosperen els productes vegetals frescos trossejats, mínimament processats i envasats, llestos per al seu consum directe, la denominada *quarta gamma*. Aquesta indústria, ja consolidada en diversos països, com els Estats Units, el Canadà i el Japó, es troba en ràpid desenvolupament al nostre país. Però, amb el desenvolupament d'aquesta indústria, han aparegut nous problemes de seguretat alimentària associats a la contaminació microbiana (Ngyen-The i Carlin, 1994).

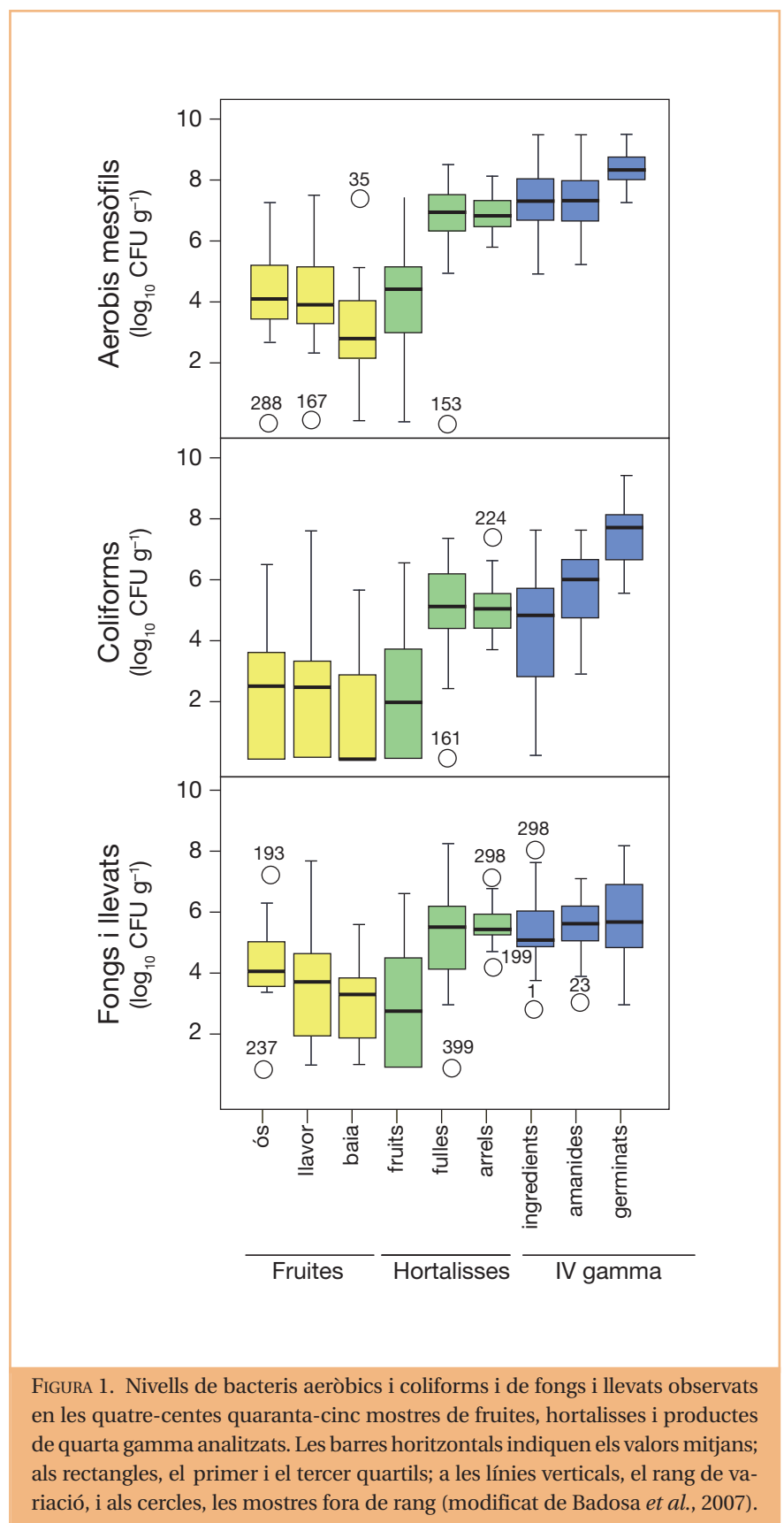
La fruita i les hortalisses contenen els nutrients necessaris per suportar un ràpid creixement de

bacteris com *E. coli*, *Listeria* i *Salmonella* (Beuchat, 1996, 2002).

Les barreres físiques naturals externes, com la pela o epidermis, que impedeix el contacte dels microorganismes amb els teixits i els fluids intracel·lulars, poden ser la causa de la baixa presència d'aquests bacteris en productes frescos no processats. Però, en ocasions, en els fruits o les verdures manipulats—ferides, cops, talls, etc.— o trossejats, aquesta barrera es deteriora. Així, s'ha demostrat que *E. coli* O157:H7 i *Listeria monocytogenes* poden créixer exponencialment en vint-i-quatre o quaranta-vuit hores adquirint nivells poblacionals del voltant de  $10^7$  ufc/ferida en fruits inoculats o llescats de poma (Beuchat i Brackett, 1990) o en enciam trossejat (Trias *et al.*, 2008).

Encara que els casos de toxiinfeccions per consum de fruita i hortalisses fresques són molt inferiors als associats al consum de productes d'origen animal, se n'està registrant un increment significatiu en els darrers anys. Han estat descrites toxiinfeccions causades per *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp. i paràsits com *Cyclospora cayentanensis* o virus de l'hepatitis A i norovirus. Maduixes, meló cantaloup, tomàquets, cebes verdes, herbes fresques i productes de quarta gamma, com germinats, espinacs trossejats, enciams i fins i tot suc de taronja i poma no pasteuritzats han estat clarament identificats com a responsables de dinou brots que van afectar dos mil dos-cents seixanta-quatre casos entre els anys 1991 i 2006 al Canadà (CFIA), i vuit brots que van afectar milers de casos entre els anys 1996 i 2007 als Estats Units. A Europa no existeixen dades per a productes vegetals, però hi ha estadístiques que indiquen que un total d'entre l'1,2 i el 3,4 % de la població pateix cada any toxiinfeccions alimentàries, i es calcula que la meitat d'aquestes pot ser per consum de productes d'origen vegetal.

Han estat ben documentades toxiinfeccions enterohemorràgiques associades al consum de suc de



poma fresc no pasteuritzat contaminat amb *Escherichia coli* O157:H7, amb *Listeria monocytogenes* i amb *Salmonella* spp. en elevades poblacions en verdures fresques al mercat

o destinades a amanides preparades, fins i tot envasades en atmosfera controlada (*CDC surveillance summaries*, 2000; *Risk profile...*, 2002). Igualment, productes com llavors

germinades, que són molt típics en països com el Japó i els Estats Units, han estat vectors de brots molt importants. Cal destacar vuit brots d'*E. coli* i *Salmonella* spp. en llavors germinades d'usarda i cacahuet als Estats Units entre els anys 1995 i 1999, que van afectar més de mil persones. També s'han referit brots a causa del consum de llavors germinades de soja i altres productes germinats en set mil casos entre els anys 1988 i 1997 a Anglaterra, Suècia, Finlàndia, Dinamarca, el Canadà i el Japó, que inclouen *Salmonella* i *E. coli*, a més de *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* i *Bacillus cereus*.

Amb la finalitat de determinar la qualitat microbiològica de fruites, hortalisses i productes de quarta gamma al nostre país, el nostre laboratori va endegar el projecte INIA/CeRTA durant el període 2004-2006, que va incloure productes amb diversos graus de processament, diferents distribuïdors i marques comercials, a botiga, supermercat, gran superfície o mercat clàssic (Badosa *et al.*, 2007). En total, es van processar quatre-centes quaranta-cinc mostres i es van determinar els nivells de bacteris aerobis i coliforms, llevats i fongs, mitjançant mètodes ISO normalitzats, a més dels nivells de *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* spp., mitjançant una tècnica molt sensible basada en l'enriquiment segons norma ISO i PCR a temps real (Pla *et al.*, 2005). La qualitat microbiològica d'aquests productes va ser variable, amb recomptes aerobis —1 a 9 log ufc/g— i coliforms totals presents en el 65,7 % de les mostres, amb una major incidència en productes de quarta gamma —5 a 9 log ufc/g. Els recomptes de llevats i fongs van ser també molt variables —2 a 9 log ufc/g. Tanmateix, es va detectar *Salmonella* spp., *Listeria* spp. i *L. monocytogenes* en el 0,67 %, el 2,7 % i el 0,9 %, respectivament, del total de les mostres. Es va concloure que, dels productes de quarta gamma, els que presentaven nivells més elevats de càrrega microbiana van ser les llavors germinades. Tot i haver detec-

tat aquests patògens, la seva molt baixa incidència no és preocupant.

En general, aquests productes poden contaminar-se tant pel procés productiu —aigües de reg, fems— com per la collita —manipulació de la fruita o de la verdura—, el maneig abans de la frigoconservació —central hortofrutícola— o el processat industrial —rentat, trossejat, etc.—, o fins i tot al mercat públic, pel que fa als productes no envasats, per la manipulació del client (*Microbiological safety evaluations...*, 1999; Solomon *et al.*, 2002; Ongeng *et al.*, 2006). Els mètodes de control recomanats per assegurar la qualitat i la seguretat microbiològica tenen en compte tota una sèrie de mesures durant la fase de producció i de maneig en post-collita, que inclouen tractaments desinfectants —aigua clorada, ozonitzada, electrolitzada— conduents a reduir la càrrega microbiana (Wessinger i Beuchat, 2000).

## ELS BIOCONSERVADORS

Els bioconservadors sorgeixen en aquest context amb fortes expectatives com a alternativa o complement als productes químics de síntesi i als tractaments desinfectants, ja que es tracta de microorganismes segurs que provenen dels aliments —bacteris de l'àcid làctic, bacteris, fongs o llevats no làctics, bacteriòfags— o compostos químics d'origen natural —pèptids i proteïnes antimicrobians, extractes botànics, enzims— i fins i tot compostos sintètics basats en estructures naturals, però menys tòxics i més eficients. Com a exemples de bioconservadors microbians, es poden citar els desenvolupats sobretot per a productes carnis i de la pesca, com *Lactobacillus planctarum*, *Lactobacillus sakei* i *Propionibacterium shermanii*. Pel que fa a compostos d'origen natural, cal citar la nisina, la pimaricina, la liozima i els olis essencials

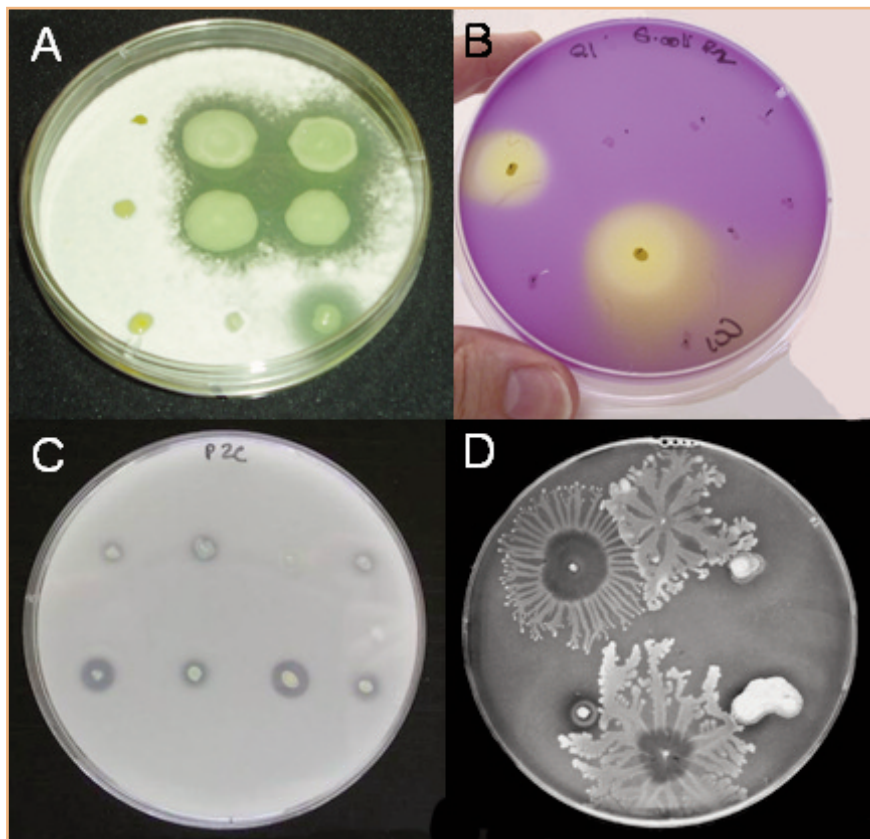


FIGURA 2. Antagonisme *in vitro* de diversos bacteris bioconservadors a causa de mecanismes d'inhibició de fongs i de bacteris patògens mitjançant compostos antifúngics (A), àcids orgànics (B), bacteriocines (C) i capacitat de formació de *biofilms* (D).



extrets de diferents plantes aromàtiques.

Tot i que es pugui tractar de productes segurs, l'autorització dels bioconservadors en el marc de la Unió Europea està regulada per les directives 89/107, sobre additius, aromes i enzims, a més de les noves modificacions del 2006 —més antiga la Directiva 95/2/EC per a la nisina—, i 258/97, sobre nous aliments i ingredients alimentaris. En alguns casos, depenent de si es poden considerar productes fitosanitaris per les directives 91/214/CEE, 2001/36/EC i 2005/25/EC, sobre productes fitosanitaris —inclou microorganismes. Actualment, els informes són realitzats per un panell sobre «Additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC)», de l'European Food Security Agency (EFSA).

Entre els bioconservadors microbians, els bacteris làctics han mostrat grans expectatives d'aplicació sobretot en productes carnis crus curats, en fruites i verdures fresques i, en especial, en productes de quarta gamma, així com a mètode per reduir la càrrega microbiana de patògens en subproductes alimentaris abans del seu processament. Cal destacar els grups de recerca que treballen a Catalunya en aquests temes, en productes carnis crus i curats i productes de la pesca curats —IRTA-CTC, Unitat de Microbiologia i Biotecnologia—, en fruites i hortalisses fresques, inclosos els productes de quarta gamma —CIDSAV-UdG, Laboratori de Patologia Vegetal; UdL-IRTA, Unitat de Postcollita— i en subproductes de la indústria alimentària —INTEA-UdG, Grup de Tecnologia dels Aliments.

### DESENVOLUPAMENT DE BIOCONSERVADORS MICROBIANS PER A FRUITA I HORTALISSES FRESQUES I PRODUCTES DE QUARTA GAMMA

Tant a causa de la nova problemàtica detectada com a causa de les restriccions presents i futures en l'ús de con-



FIGURA 3. Assajos de control de podridures i bacteris patògens de transmissió alimentària en fruita, hortalisses i productes de quarta gamma.

servants, desinfectants i fungicides, resulta necessari avaluar noves estratègies de control de podridures, de bacteris patògens associats a toxi-infeccions alimentàries i de fongs productors de micotoxines. Actualment, el control biològic de fongs causants de podridures en postcollita ofereix bones expectatives en l'àmbit mundial. Es tracta de microorganismes antagonistes que actuen mitjançant exclusió competitiva o per la colonització de llocs d'entrada del patògen —lenticel·les o ferides—, competència per nutrients —C, P, N, Fe, etc.— o formació de barreres físiques —*biofilm*—; interacció directa amb el patògen per hiperparasitisme o interferència per contacte; antibiosi com enzims lítics, pèptids i proteïnes antimicrobians, compostos fenòlics, poli-quètics, poliens o peròxids, i fins i tot interferència amb senyals intercel·lulars de tipus *quorum sensing* (AHL).

Aquesta tecnologia basada en microorganismes és objecte d'un nombre creixent d'aplicacions i de patents, que inclouen soques de bacteris pertanyents a *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans* i *Bacillus subtilis*; llevats com *Candida oleophila*, *Candida sake*, *Pichia guilliermondii*, *Cryptococcus laurentii* i *Kloeckera apiculata*, i fongs com *Acremonium breve* i diverses espècies de *Trichoderma*, que han

demostrat diversos graus d'eficàcia contra *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Mucor* i *Alternaria*, causants de podridures en fruita de llavor, pinyol o cítrics (Montesinos, 2003; Montesinos i Bonaterra, 2008).

El nostre laboratori treballa en aquesta tecnologia des del 1994 i ha aïllat i desenvolupat aplicacions amb soques de bacteris com *Pseudomonas fluorescens* EPS288 i *Pantoea agglomerans* EPS125 —aquesta darrera, objecte d'una patent—, molt efectives en el control de fongs causants de podridures en una àmplia gamma de fruita (Francés *et al.*, 2006).

El control de patògens humans transmesos per aliments, principalment *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. i *Staphylococcus aureus*, ha estat demostrat en productes carnis i lacticis utilitzant bacteris de l'àcid làctic productores de bacteriocines, àcids orgànics o peròxid d'hidrogen, com *Lactobacillus acidovorans*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* i *Pediococcus* spp. (Muriana, 1996). Els BAL estan considerats d'ús alimentari i han estat qualificats com a GRAS (Generally Recognized As Safe) per la USA Food and Drug Administration (FDA), ja que han estat utilitzats històricament per a la conservació de

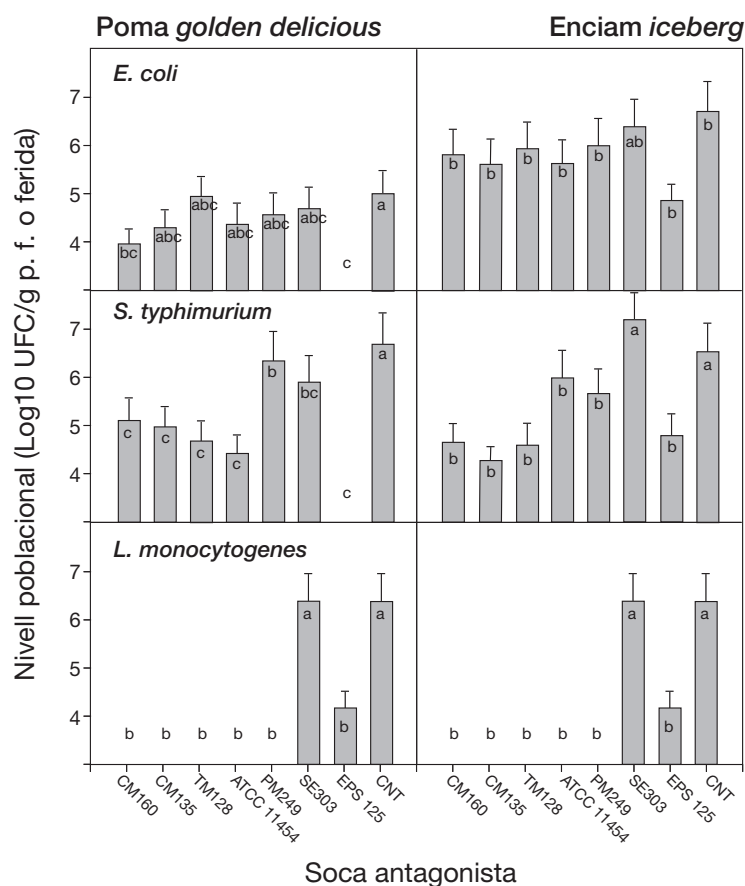


FIGURA 4. Efecte dels tractaments amb bacteris de l'àcid làctic en els nivells poblacionals de bacteris patògens alimentaris en poma i enciam després de dos dies de la inoculació i el tractament. Els valors són mitjanes de tres repeticions i les barres sobre les columnes indiquen l'error estàndard de la mitjana. N: per sota del nivell de detecció; CNT: control no tractat. Els grups significativament diferents s'identifiquen amb una lletra diferent d'acord amb el test de Fisher sense protecció (modificat de Trias *et al.*, 2008).

productes carnis i làctics i de productes vegetals fermentats (Hugas, 1998; Aymerich *et al.*, 2002). Però l'ús de bacteris de l'àcid làctic en la preservació de productes vegetals frescos i en el control de patògens humans de transmissió alimentària ha estat descrit per primera vegada pel nostre laboratori (Trias *et al.*, 2008). Hem observat que, dels productes vegetals frescos, els productes de quarta gamma presenten poblacions de BAL de fins a 6 log ufc/g, principalment *Leuconostoc* spp. i *Lactobacillus plantarum*, i en menor quantitat, de *Weissella* spp. i *Lactococcus* spp. Les soques de *Leuconostoc mesenteroides* CM130 i CM160 productores de bacteriocines van ser altament eficaces en el control de

bacteris patògens en poma *golden delicious* i en enciam trossejat de la varietat *iceberg*, sense afectar la qualitat organolèptica d'aquests productes, tot demostrant els seu potencial com a bioconservadors.

### PRODUCCIÓ I FORMULACIÓ DE BIOCONSERVADORS MICROBIANS

Els mètodes preferits per a la producció de bioconservadors microbianos consisteixen en fermentacions en fase líquida, tot utilitzant la mateixa metodologia que la indústria farmacèutica o alimentària per a altres microorganismes. L'objectiu és obtenir el màxim rendiment amb

el mínim cost de medi de cultiu, freqüentment aconseguit mitjançant molasses alimentàries, peptones, extracte de llevat cerveser i hidrolitzats de proteïnes per a ús industrial. Després de la fermentació, les cèl·lules es concentren mitjançant centrifugació en continu per obtenir suspensions cel·lulars concentrades al voltant de  $10^{10}$  ufc/ml.

Un dels principals factors limitadors per a la comercialització dels bioconservadors és la conservació que permeti incrementar la seva vida útil. Això s'aconsegueix establint la viabilitat de les cèl·lules, sigui en fase líquida i mantenint la suspensió en refrigeració o congelant-se en presència d'agents crioprotectors, o bé mitjançant deshidratació. Els mètodes basats en deshidratació són millors sota el punt de vista pràctic, perquè permeten un emmagatzematge òptim i la distribució. La liofilitació és el mètode que manté millor la viabilitat cel·lular, però el cost és elevat. També s'utilitzen sistemes d'encapsulació de les cèl·lules, una tècnica que consisteix a barrejar-les amb materials que formen matrius polimèriques com polisacàrids gelatinitzats o emulsionant-les en materials lipídics, per finalment diluir-les i atomitzar-les per obtenir micropartícules deshidratades. En l'àmbit industrial, per produir un material de baix cost, els mètodes preferits són l'atomització o l'assecatge amb llit fluïditzat. Tanmateix, aquest darrer mètode produeix pèrdues elevades de viabilitat cel·lular en alguns microorganismes —especialment en bacteris Gram negatius— a causa del tractament tèrmic que acompanya al procés, però té bons rendiments en Gram positius, com els bacteris de l'àcid làctic. Finalment, l'ingredient actiu —és a dir, les cèl·lules— és formulat per obtenir un producte comercial. Aquestes formulacions consisteixen a afegir materials inerts per suportar i dispersar l'ingredient actiu i adjuvants, que promouen i mantenen la seva funcionalitat incloent nutrients o compostos osmoprotectors per evitar danys cel·lulars per dessecació.



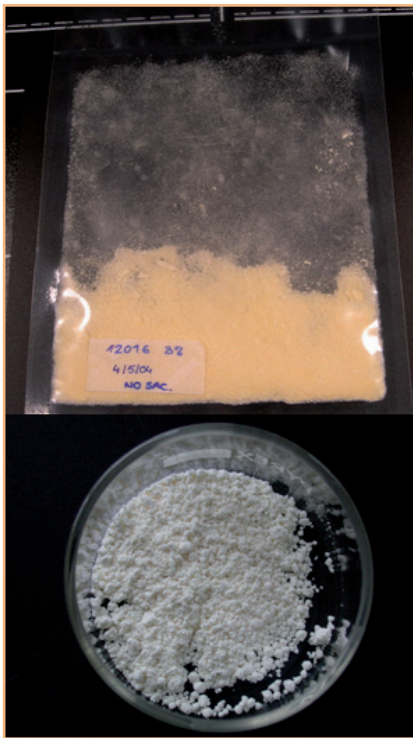


FIGURA 5. Bioconservadors obtinguts a partir d'un bacteri de l'àcid làctic després de la liofilització i l'envasat en atmosfera modificada —part superior— i d'atomització —part inferior.

Tanmateix, s'ha de tenir la precaució d'evitar certs compostos que poden estimular patògens presents en el producte vegetal fresc a conservar. La tecnologia és similar a la utilitzada per a productes farmacèutics i alimentaris i resulta en productes estables durant diversos mesos. Els productes formulats en pols solen contenir entre  $10^9$  i  $10^{10}$  ufc/g i són fàcils de reconstituir simplement en solucions aquoses.

El mètode d'aplicació depèn molt del producte a protegir, però, en general, s'apliquen mitjançant la immersió dels productes vegetals o bé la polvorització. Com en el cas dels bioplaguicides microbians, l'eficàcia depèn de la dosi efectiva mitjana — $DE_{50}$ — del bioconservador. En el nostre laboratori hem observat que les  $DE_{50}$  per a soques de *Leuconostoc mesenteroides* actives contra *L. monocytogenes*, *E. coli* i *Salmonella* són de l'ordre d'entre  $10^6$  i  $10^7$  ufc/ml. Les dosis recomanades, en general, es troben entre els

$10^7$  i els  $10^8$  ufc/ml, de manera que els productes formulats s'han de diluir adequadament per obtenir aquestes concentracions.

Atès el potencial aplicat d'aquests tipus de bioconservadors, s'han posat a punt els mètodes per a la seva millora, producció i formulació. Aquesta activitat, que s'ha iniciat als laboratoris de la Universitat de Girona, formarà part d'una línia estratègica de recerca i desenvolupament tecnològic sobre bioconservadors que es realitzarà, juntament amb l'IRTA, al Centre de Noves Tecnologies Alimentàries (CeNTA-UdG), per tal de transferir aquesta tecnologia al sector alimentari.

## BIBLIOGRAFIA

- CRIBADO, AYMERICH, M. T.; GARRIGA, M.; COSTA, S.; MONTFORT, J. M.; HUGAS, M. (2002). «Prevention of ropiness in cooked pork by bacteriocinogenic cultures». *International Dairy Journal*, 12: 237-244.
- BADOSA, A.; TRIAS, R.; PARÉS, D.; PLA, M.; MONTESINOS, E. (2008). «Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using plate counting normalized methods and QPCR». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 605-611.
- BEUCHAT, L. R. (1996). «Pathogenic microorganisms associated with fresh produce». *Journal of Food Protection*, 59: 204-216.
- (2002). «Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables». *Microbes Infection*, 4: 413-423.
- CDC surveillance summaries (2000). Vol. 49-SS9. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention.
- FRANCÉS, J.; BONATERRA, A.; MORENO, M. C.; CABREFIGA, J.; BADOSA, E.; MONTESINOS, E. (2006). «Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*». *Postharvest Biology and Technology*, 39: 299-307.
- Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables (1998). Silver Spring: US Food and Drug Administration; Washington: US Department of Agriculture; Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention.
- HUGAS, M. (1998). «Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products». *Meat Science*, 49: 139-150.
- Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds (1999). Silver Spring: US Food and Drug Administration. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Food.
- MONTESINOS, E. (2003). «Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection». *International Microbiology*, 6: 245-252.
- MONTESINOS, E.; BONATERRA, A. (2008). «Microbial pesticides». A: LEDERBERG, J. [ed.]. *Encyclopedia of microbiology*. S. Il.: John Wiley & Sons. 4 v.
- MURIANA, P. M. (1996). «Bacteriocins for control of *Listeria* spp.». *Journal of Food Protection*, 54-63 (supl.).
- NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. (1994). «The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables». *Critical Reviews on Food Science & Nutrition*, 34: 371-401.
- ONGENG, D.; DEVLIEGHERE, E.; DEBEVERE, J.; COOSEMANS, J.; RYCKEBOER, J. (2006). «The efficacy of electrolysed oxidizing water for inactivating spoilage microorganisms in process water and on minimally processed vegetables». *International Journal of Food Microbiology*, 109: 187-197.
- PLA, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; BADOSA, E.; MONTESINOS, E. (2005). «Measuring microbiological contamination in fresh fruits and vegetables». A: JONGEN, W. [ed.]. *Improving the safety of fresh fruit and vegetables*. Cambridge: Woodhead Publishers Ltd.
- Risk profile of the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw. Report of the Scientific Committee on Food (2002). Brussel·les: European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General.
- SOLOMON, E. B.; YARON, S.; MATHEWS, K. R. (2002). «Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization». *Applied of Environmental Microbiology*, 68: 397-400.
- TRIAS, R.; BANERAS, L.; BADOSA, E.; MONTESINOS, E. (2008). «Bioprotection of Golden Delicious apple and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria». *International Journal of Food Microbiology*, 123: 50-60.
- VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, E.; DEBEVERE, J. (2004). «Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation». *International Journal of Food Microbiology*, 96: 149-164.
- WESSINGER, W. R.; BEUCHAT, L. R. (2000). «Comparison of aqueous chemical treatments to eliminate *Salmonella* on alfalfa seeds». *Journal of Food Protection*, 63: 1475-1482.