

Más allá de la legislación: comparación entre métodos de cultivo y moleculares para evaluar la calidad del agua potable¹

Anna Pinar-Méndez *^{a,b,c}, Belén Galofré^a, Anicet R. Blanch^{b,c}, Cristina García-Aljaro^{b,c}

Resumen

Para garantizar el suministro de agua potable es necesario implementar nuevas estrategias que permitan el uso de recursos hídricos alternativos, acompañadas de tecnologías de tratamiento de agua potable, así como sistemas de control de la calidad del agua que garanticen su seguridad a toda la población.

En la actual legislación de la calidad del agua de consumo (RD 3/2023) solo se monitorizan 7 indicadores microbianos de cultivo. Si bien los parámetros microbiológicos legislados aseguran la inocuidad del agua alertando de un posible fallo en el sistema, son necesarios métodos complementarios que permitan detectar en detalle las variaciones de las comunidades bacterianas heterótrofas. La importancia de conocer esta biodiversidad reside en su influencia en la calidad del agua, pues son el resultado de interacciones complejas entre las comunidades de microorganismos que habitan, y estas, a su vez, están influenciadas por factores ambientales que regulan su crecimiento, principalmente la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de desinfectantes. Estas bacterias pueden crecer en los sistemas de agua y su actividad metabólica puede influenciar su calidad, como alterar las propiedades organolépticas del agua, formar *biofilms* o corrosión en las tuberías, o incluso suponer un riesgo para la salud pública en el caso de los potenciales patógenos.

El objetivo de los estudios realizados en la Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP) de Sant Joan Despí, que sumi-

nistra agua a la ciudad de Barcelona y a toda su área metropolitana, se ha centrado en poner a punto una metodología alternativa de cultivo y una molecular, complementarias a la legislada, para caracterizar su biodiversidad y evaluar en conjunto la calidad del agua. Para ello se han monitorizado los distintos tratamientos de potabilización, desde la captación hasta el agua potable final, y han sido identificadas, por un lado las bacterias cultivables del agua mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, y por otro se ha evaluado la totalidad de comunidades bacterianas del agua (cultivables y no cultivables) por *metabarcoding* del gen 16S ARNr (secuenciación masiva), además de evaluar su calidad según los parámetros legislados.

Los resultados han permitido observar que, a pesar de que todas las muestras han cumplido con los criterios sanitarios de calidad del agua, en la ETAP habita una gran diversidad bacteriana que ha ido variando a lo largo de los tratamientos, especialmente en el agua potable, y se ha visto influenciada por el tipo de tratamiento aplicado y la temperatura ambiente. Además, se ha observado una reducción eficaz de los indicadores y se han detectado secuencias de bacterias patógenas y potenciales formadores de *biofilms*, a bajas proporciones, pero no detectables por los métodos legislados.

La estrategia de combinar dos herramientas metodológicas alternativas a la legislada para evaluar la calidad del agua ha permitido disponer de una visión holística del sistema de potabilización evaluando la diversidad y las dinámicas espacial y temporal de la totalidad de las comunidades bacterianas, que puede ser valiosa para la gestión de los distintos recursos hídricos y la futura adaptación a los impactos derivados del calentamiento global.

^a Aigües de Barcelona, Empresa Metropolitana de Gestió del Cicle Integral de l'Aigua, Barcelona

^b Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona

^c Institut de Recerca de l'Aigua (IdRA), Universitat de Barcelona (UB), Barcelona

*apinar@aiguesdebarcelona.cat

¹ Ponencia presentada en el XXI Workshop MRAMA - DYCFung memorial (21-24 de noviembre de 2023)

1. Introducción

Los recursos hídricos de agua dulce son sistemas especialmente vulnerables al clima. Algunas regiones se ven más fuertemente afectadas, como la cuenca mediterránea, que se caracteriza por binomios de sequía y lluvias torrenciales. Estos episodios, que afectan a la capacidad y la calidad del agua, suponen un reto en su potabilización, que cada vez se acentúa más ante un escenario de calentamiento global, aumento de la población y sequías cada vez más prolongadas.

Por ello la gestión integrativa de los diferentes recursos hídricos es clave para poder asegurar agua potable para toda la población. Además de disponer de las masas de agua convencionales como ríos, lagos y recursos subterráneos, actualmente toman relevancia la desalinización o la reutilización de aguas residuales depuradas o regeneradas como fuentes de agua alternativas y necesarias en el presente y futuro.

Las tecnologías de potabilización en las ETAP permiten tratar aguas de distintos orígenes, puesto que constituyen una barrera eficaz a contaminantes y microorganismos patógenos impactando positivamente en la calidad del agua y garantizando su seguridad para el consumo humano. Cada ETAP puede presentar variaciones de los procesos de tratamiento que aplica en función de distintos factores como el origen de la fuente de captación y la calidad de esta, la demanda hídrica, etc.

El presente trabajo se ha llevado a cabo en la ETAP de Sant Joan Despí (Barcelona), que abastece de agua potable a la ciudad de Barcelona y su área metropolitana, y presenta una elevada complejidad por su localización. Esta ETAP se encuentra cerca de la desembocadura del río Llobregat, con una alta demanda hídrica, una calidad del agua del río influenciada por efluentes de depuradoras río arriba (aguas residuales tratadas), una elevada salinidad en el río que proviene de la actividad minera de potasa río arriba, rápidas crecidas del caudal del río en caso de fuertes lluvias, etc., que inducen cambios en la operativa de la ETAP para una rápida y controlada adaptación a las condiciones adversas.

El proceso de tratamiento en la ETAP de Sant Joan Despí (Figura 1) consta de dos fuentes de captación de agua: la superficial (río) y la subterránea (pozos del acuífero de Llobregat). El agua se capta del río y se dirige hacia un pretratamiento que consta de una coagulación de partículas flotantes y desinfección (dióxido de cloro), y seguidamente una decantación donde se sedimentan las partículas coaguladas. A continuación, el agua clarificada sigue un tratamiento por filtración por arena para la eliminación tanto de partículas no retenidas anteriormente, así como protozoos. En este punto, el agua pretratada confluye con el agua captada de los pozos con el objetivo de mejorar la calidad del agua final. A continuación, el agua se dirige hacia dos líneas de tratamientos independientes: el tratamiento convencional y el tratamiento avanzado. El tratamiento convencional consta de una ozonización (oxida compuestos orgánicos y óxidos metálicos) y una filtración por carbón que retiene estos compuestos por adsorción obteniendo un agua clarificada. La línea de tratamiento avanzado dispone de una ultrafiltración (retiene las partículas pequeñas en suspensión, bacterias y virus según su tamaño), y una ósmosis inversa, que elimina o reduce casi en su totalidad bacterias, virus, sales y compuestos orgánicos e inorgánicos. El agua osmotizada resultante, por su muy bajo contenido en sales, se remineraliza, y se envía a la cámara de mezcla donde confluyen las dos líneas de tratamiento: convencional y avanzado. Finalmente, el agua final es clorada e impulsada a la red de distribución de aguas de consumo.

En estos sistemas de agua existe una biodiversidad microbiana asociada configurada por billones de microorganismos que viven, crecen e interaccionan en el agua (Sala-Comorera *et al.*, 2020; Vaz-Moreira *et al.*, 2014) de los que se conoce muy poco y que no están contemplados por la actual legislación de aguas de consumo.

En la actual legislación RD 3/2023, de 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de calidad del agua de consumo, su control y suministro, para garantizar la calidad del agua a nivel microbiológico, se monitoriza un total de 7 indicadores microbianos de cultivo (6 bacterianos y 1 vírico) que alertan de una posible contaminación fecal, así como

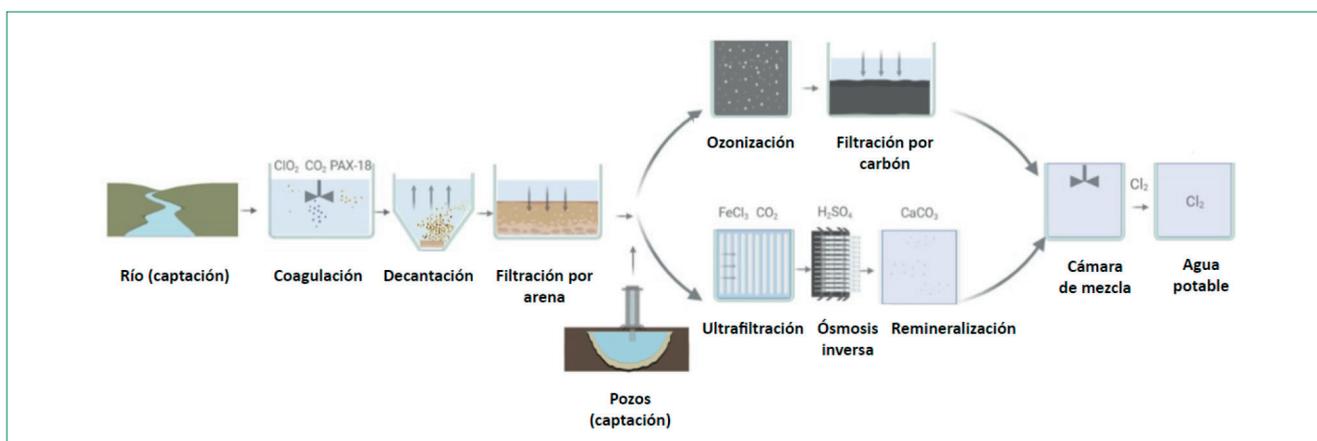


Figura 1. Esquema de los tratamientos de potabilización en la ETAP de Sant Joan Despí (Barcelona)

del recuento numérico de bacterias heterótrofas, sin embargo, se desconoce la composición del microbioma del agua.

Mientras que las bacterias heterótrofas contribuyen de forma natural al tratamiento del agua reduciendo la materia orgánica y los contaminantes, también pueden proliferar provocando un deterioro del agua, como por ejemplo cambios organolépticos, corrosión en tuberías, o incluso convertirse en un riesgo para la salud en el caso de los potenciales patógenos (Li *et al.*, 2017). En algunos estudios se ha observado que incluso un agua con un recuento de bacterias heterótrofas estable (sin cambios significativos) puede tener una composición y abundancia microbiana variable, que es indetectable mediante los métodos convencionales, con lo que es de gran importancia conocer la diversidad bacteriana en los procesos de potabilización para disponer de una visión más completa de su calidad. Asimismo, algunos de estos microorganismos suelen encontrarse en bajas concentraciones en el agua (por ejemplo, patógenos), por lo que resulta indispensable disponer de un método de concentración de microorganismos adecuado para su detección.

De los distintos métodos de concentración de microorganismos, el método exigido en la actual Directiva de aguas de consumo es la filtración por membrana, con ausencia de los indicadores microbianos en un volumen de 100 mL. Sin embargo, para indagar más allá de la legislación y conocer las comunidades microbianas en el agua, son necesarios métodos alternativos a los convencionales que permitan analizar un volumen de muestra superior para aumentar la representatividad, sensibilidad y detección de aquellos microorganismos que se encuentran en menor proporción. Por ello, el método de ultrafiltración sin salida (DEUF) permite analizar volúmenes de agua muy grandes (superiores a 1.000 L). Es un cartucho de filtración de fibra hueca que retiene las partículas y microorganismos en la superficie del entramado de fibras para el que se ha descrito con buenas recuperaciones (y simultáneas) de bacterias, virus y protozoos (Gunnarsdottir *et al.*, 2020; Pascual-Benito *et al.*, 2020).

En cuanto al análisis de los microorganismos, existen distintos métodos para la detección, cuantificación, identificación o caracterización de estos que principalmente se agrupan en métodos dependientes de cultivo y los métodos independientes de cultivo o moleculares. Los métodos actuales para determinar la calidad del agua basados en la legislación vigente se basan exclusivamente en métodos de cultivo.

En el presente estudio se han seleccionado dos métodos alternativos a la legislación para la caracterización de las poblaciones bacterianas: MALDI-TOF MS (método de cultivo basado en proteómica), y Metabarcoding (método independiente de cultivo basado en secuenciación de nueva generación de alto rendimiento).

La técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF se basa en la detección y la relación masa/carga de las proteínas ribosó-

micas (2-20 KDa) de las bacterias, que componen un perfil de espectro de masas único que permite su identificación. El espectro adquirido mediante esta técnica se compara con una base de datos que consiste en una colección de espectros de masas de cepas de referencia (librería) y, según las similitudes con estas, se consigue una identificación (género, especie, o subespecie), o bien no identificación en caso de no parecerse a ningún espectro de la librería. La metodología requiere el uso de material biológico de microorganismos cultivables partiendo de una colonia de un cultivo puro y fresco. La librería configurada por perfiles del espectro de masas principal (*main spectrum profile* o MSP) es clave para una identificación correcta, pudiendo suponer una limitación ya que mayoritariamente contiene MSP de cepas de ámbito clínico, sin embargo, es posible desarrollar librerías específicas para la identificación de microorganismos específicos en la matriz de interés (Kopcakova *et al.*, 2014; Pinar-Méndez *et al.*, 2021).

Por otra parte, para identificar la totalidad de las comunidades bacterianas es ampliamente usada la técnica de metabarcoding, basada en secuenciación masiva de amplicones. Para ello, partiendo del ADN extraído de las muestras, se amplifica por PCR dirigida a un fragmento corto del gen 16S ARNr que, mediante herramientas bioinformáticas, permite asignar la taxonomía y evaluar la diversidad en las muestras. Estas herramientas proporcionan una información detallada que complementa los resultados obtenidos de los controles de calidad del agua basados en la legislación.

El objetivo de este trabajo se centró en la comparación entre métodos de cultivo y moleculares para evaluar la calidad del agua potable caracterizando de la diversidad bacteriana cultivable en la ETAP de Sant Joan Despí, mediante la identificación de bacterias heterótrofas por MALDI-TOF MS, y la comparación con las bacterias totales identificadas por metabarcoding del gen 16S ARNr (Pinar-Méndez *et al.*, 2022a, 2022b).

2. Materiales y métodos

2.1. Muestreo

A lo largo de un año se realizaron 8 campañas de muestreo en 9 procesos de potabilización: captación (pozos y río), pretratamiento (decantación y filtro de arena), tratamiento convencional (ozonización y filtro de carbón), tratamiento avanzado (ósmosis inversa) y agua final (cámara de mezcla y agua potable clorada). Se recogió un total de 72 muestras en épocas de baja y alta temperatura ambiental, y evitando precipitaciones moderadas para así determinar las poblaciones bacterianas en las condiciones de normalidad operativa de la ETAP.

Los puntos de muestreo se clasificaron en dos grupos según la carga microbiana: río y etapas de pretratamiento (alta carga microbiana), y aguas subterráneas y tratamientos convencio-

nales/avanzados (menor carga microbiana). Las condiciones de muestreo y procesamiento fueron diferentes para cada grupo. Para el primer grupo (río y pretratamiento), se recogieron 2 L de agua en botellas estériles de polietileno con tiosulfato de sodio (24 mg/L), mientras que para el segundo grupo (etapas de tratamiento), se muestrearon grandes volúmenes (100-1.100 L/muestra) mediante el dispositivo de ultrafiltración sin salida (DEUF) Rexeed™ 25-A (Asahi Kasei Medical Co, Japón).

Todas las muestras fueron conservadas a 4 °C para su análisis dentro de las primeras 24 horas.

2.2. Procesamiento de las muestras

Para el primer grupo de muestras (río y pretratamiento), se concentraron entre 100 mL⁻¹ L por filtración membrana de policarbonato de 0,22 µm de poro (Millipore, Francia).

Para el segundo grupo de muestras (etapas de tratamiento), se procedió a un lavado a contracorriente que permite recuperar los microorganismos en un eluado con volumen reducido (500-600 ml). A continuación, se aplicó una segunda concentración por ultracentrifugación hasta obtener un volumen final de 2-4 ml.

2.2.1. Análisis de la calidad microbiológica e identificación por MALDI-TOF MS

Para comprobar la calidad microbiológica de todas las muestras, se analizaron los parámetros microbiológicos legislados: coliformes totales, *E. coli*, *C. perfringens*, enterococos intestinales, recuento de aerobios (HPC) y colifagos somáticos. Además, de las placas de HPC, se aislaron 1.807 cepas (~30 por muestra) y se identificaron por MALDI-TOF MS haciendo uso de la librería *in-house* Drinking Water Library (Pinar-Méndez *et al.*, 2021).

2.2.2. Extracción de ADN

El ADN de las muestras se extrajo mediante el sistema automatizado de extracción MagNA Pure LC Kit III (Bacterias y Hongos) (Roche Diagnostics, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad del ADN se verificó mediante la visualización en gel de electroforesis de agarosa 0,8% y la concentración se midió con el fluorímetro Qubit y el kit dsDNA HS (Invitrogen, EEUU).

2.2.5. Metabarcoding mediante secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr

Para la caracterización de la totalidad de la diversidad bacteriana con metabarcoding, primeramente se amplificó por PCR un fragmento de la región genómica 16S ARNr V4 utilizando cebadores 515F y 806R siguiendo el protocolo descrito de Caporaso (Caporaso *et al.*, 2011).

Para la preparación de las librerías de secuenciación, se agruparon todas las muestras para la secuenciación, se purificaron

los productos de PCR mediante el kit PCR MinElute Kit (Qiagen, Alemania), se insertaron los adaptadores de secuenciación con el kit NEXTflex (Bio Scientific, EE.UU.) y se cuantificó la librería utilizando el kit NEBNext Library Quant (Illumina, EE.UU.). La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma Illumina Miseq Plataforma usando el kit v3 2x300pb (600 ciclos) (Illumina, EE.UU.).

Por último, las distintas herramientas bioinformáticas (pipelines) que permitieron curar las secuencias, asignar la taxonomía y evaluar la diversidad en las muestras fueron Cutadapt (Martin *et al.*, 2011), DADA 2 (Callahan *et al.*, 2016), QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019) y Phyloseq (McMurdie *et al.*, 2013).

3. Resultados y discusión

3.1. Análisis de la calidad microbiológica

Todas las muestras de agua cumplieron con los requisitos sanitarios de calidad del agua. Los recuentos de aerobios fueron variables en los distintos tratamientos de la ETAP donde se observó una reducción significativa de más de 5 logaritmos entre el río (4,62 log₁₀ UFC/mL) y el agua potable clorada (0,027 log₁₀ UFC/mL). La temperatura ambiental durante el muestreo presentó valores significativamente más altos en el río, ozonización y agua potable clorada en temperaturas elevadas (>22 °C). La temperatura tiene un efecto modulador en la dinámica microbiana que puede alterar la composición de las comunidades microbianas.

3.2. Comparativa entre comunidades bacterianas identificadas por MALDI-TOF MS y metabarcoding

Los resultados del estudio de diversidad bacteriana de heterótrofos cultivables por MALDI-TOF se compararon con la caracterización de comunidades bacterianas por metabarcoding. Ambas aproximaciones mostraron diferencias en taxonomía y diversidad pese a presentar recuentos de aerobios sin cambios significativos en las muestras de agua. Así se observó una elevada diversidad bacteriana por ambos métodos, sin embargo, por MALDI-TOF MS se observó un menor índice de diversidad (intervalo de índice de Shannon: 0,38-2,88) en comparación con metabarcoding (intervalo de índice de Shannon: 3,3-5,2) probablemente debido a la diferencia en las poblaciones analizadas: bacterias cultivables (MALDI) en comparación con las bacterias totales (metabarcoding).

Las tendencias en cuanto a la diversidad bacteriana entre ambas técnicas coincidían en una mayor diversidad en río y pozos, y baja diversidad en agua potable, pero presentaban algunas diferencias, por ejemplo: MALDI-TOF MS mostró un aumento en la diversidad en la ozonización respecto al filtro de arena, y sin embargo una disminución según metabarcoding. También la temperatura ambiental elevada produjo un aumento de la diversidad y cambios en su composición especialmente en la decantación y filtración por carbón. A nivel taxonómico, am-

bas técnicas mostraron un perfil de filos similares, con dominio de Proteobacteria a lo largo de los tratamientos excepto en el agua potable, donde la cloración marca una fuerte presión selectiva que reduce la diversidad y produce un cambio en el filo mayoritario del agua final, siendo Firmicutes (según MALDI-TOF MS) o Cyanobacteria (según metabarcoding) (Figura 2).

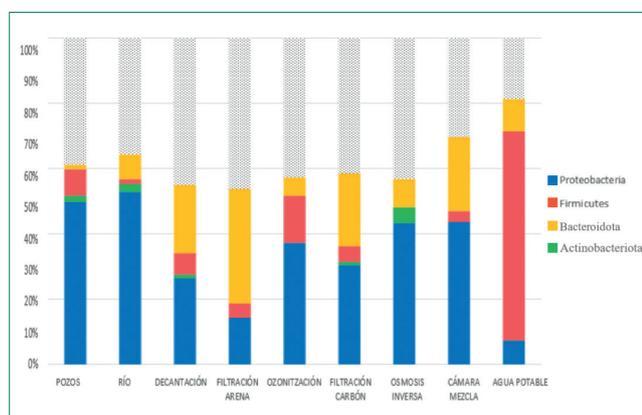
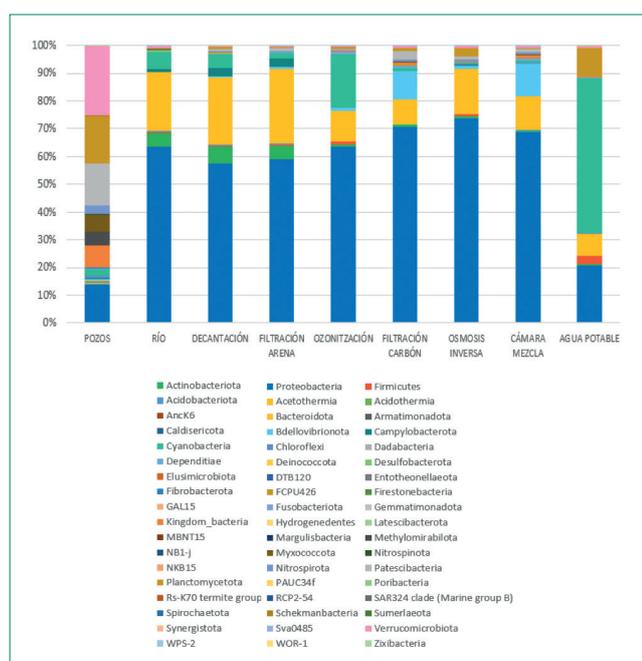


Figura 2. Comparativa de la abundancia relativa de cepas identificadas por MALDI-TOF MS (arriba) y abundancia relativa de reads por Metabarcoding (abajo) a nivel de filum en los tratamientos de la ETAP

Para evaluar la capacidad de ambas técnicas a un nivel taxonómico más bajo (género), se comparó su detección y fluctuación a lo largo de los diferentes tratamientos y se observaron similitudes y diferencias. En algunos casos, determinados géneros solo fueron detectados por MALDI-TOF o por metabarcoding, a excepción de los géneros más abundantes de cada etapa según MALDI-TOF, que fueron también detectados por metabarcoding, pero con abundancias relativas distintas. Por ejemplo, *Bacillus* presentó un

58% de abundancia en el agua potable clorada según MALDI-TOF, pero solamente 0,05% según metabarcoding, ya que según esta técnica el mayoritario correspondía a un género no descrito perteneciente a Obscuribacteraceae (31%), no detectado por MALDI-TOF. Sin embargo, atendiendo a un criterio de ausencia/presencia, se comparó la robustez de ambas técnicas en la detección de los 57 géneros distintos encontrados en la ETAP mediante la técnica MALDI-TOF. Se observó que en 41 ocasiones mediante MALDI-TOF MS se detectó la presencia de algunos géneros no detectados por metabarcoding, mientras que en 152 ocasiones sucedió lo contrario. Gracias al análisis por metabarcoding se pudo detectar una mayor variedad de géneros en el agua potable agrupados dentro de Gammaproteobacteria (grupo potencial formador de *biofilms*) y no detectados por MALDI-TOF. Sin embargo, atendiendo a las etapas del tratamiento donde se encuentran en mayor abundancia (puntos calientes) los 6 géneros mayoritarios según cada técnica (abundancia relativa >5%), se pudo comprobar que ambas aproximaciones coincidían en que *Flavobacterium* y *Pseudomonas* presentan una abundancia elevada en la ETAP, pero la localización de los puntos calientes para estos géneros, difieren en algunas etapas. Por ejemplo, según metabarcoding, *Flavobacterium* se encontraba en gran abundancia en la ozonización y la filtración por carbón, pero presentaba una abundancia relativa pequeña (<5%) según MALDI-TOF, o bien *Pseudomonas* que solo se detectó por metabarcoding en el agua clorada, pero no por MALDI-TOF. El resto de los géneros con gran abundancia en toda la planta diferían por ambas técnicas, siendo también *Bacillus*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium* y *Acidovorax* las mayoritarias por MALDI-TOF, mientras que por metabarcoding lo fueron *Limnohabitans* y géneros no descritos agrupados dentro de Chloroplast and Obscuribacteraceae. Este último presentó una gran abundancia en el agua potable según metabarcoding, mientras que según MALDI-TOF MS el género dominante fue *Bacillus*. No obstante, hay que tener en cuenta que Cyanobacteria presenta casi un 50% de cepas no cultivables hasta el momento, por tanto, podría tratarse de un grupo no detectable mediante técnicas basadas en cultivo como el MALDI-TOF MS.

El estudio de las comunidades bacterianas heterótrofas cultivables mediante el uso de MALDI-TOF MS supone una ventaja en la determinación rápida y fiable de la presencia de ciertos géneros. El análisis requiere bacterias viables y, por tanto, aporta una información valiosa ya que estas tienen capacidad para crecer y colonizar o alterar diferentes sistemas de aguas, pero su poder de identificación depende directamente de la base de datos (librería). En este estudio, derivado del esfuerzo previo de la creación de la librería DWL, se han obtenido buenos resultados de identificación en todas las matrices y ha permitido identificar el 30% de los aislados a nivel de especie y el 32% a nivel de género, mientras que por metabarcoding solamente el 36% de las secuencias pudieron asignarse a nivel de género, y el resto a taxones superiores, debido a limitación del pequeño tamaño del fragmento de ADN secuenciado. Es importante destacar que la creación de una librería para MALDI-TOF es laboriosa, y requiere el uso de otras técnicas de identificación para caracterizar las cepas. Por otro lado, las

bacterias cultivables tienen el inconveniente de representar una fracción pequeña de la totalidad de la microbiota del agua, con lo que, el método 16S ARNr metabarcoding permite superar esta limitación proporcionando una visión más detallada de la totalidad de las comunidades bacterianas, pero sus resultados pueden estar influenciados por los factores como los protocolos de extracción y el procesamiento bioinformático, y no es adecuada para diferenciar viabilidad, con lo que dificulta interpretar, por sí sola, los peligros derivados de la presencia de determinados taxones.

4. Conclusiones

Las técnicas de MALDI-TOF MS y metabarcoding han permitido observar fluctuaciones entre etapas, estacionalidad según la temperatura ambiental, y una gran diversidad en la ETAP, siendo más elevada por metabarcoding en comparación con MALDI-TOF MS. Ambas metodologías permitieron describir los distintos géneros de cada tratamiento observando similitudes y diferencias, donde algunos géneros solo se detectaron mediante una metodología o ambas. Sin embargo, ambas técnicas coinciden con un dominio de Proteobacteria en las etapas de tratamiento y se diferencian principalmente en la composición del agua potable final (Firmicutes según MALDI-TOF MS, y Cyanobacteria según metabarcoding), así como en la identificación de taxones inferiores a filo. Por lo general, la composición microbiana en los sistemas de agua es compleja de interpretar con un solo enfoque, o basándose en los indicadores microbianos regulados. Por tanto, es de gran importancia combinar herramientas adicionales a la Directiva de aguas de consumo, como MALDI-TOF MS y metabarcoding del gen 16S ARNr, que aportan información complementaria y en profundidad de las comunidades bacterianas que pueden influir en la calidad de agua más allá de la información de ausencia o presencia de indicadores fecales o recuento de aerobios, por lo que una visión holística puede ayudar a mejorar la gestión de la calidad del agua.

5. Referencias bibliográficas

- Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 2019, 37, 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 2016, 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso, J.G.; Lauber, C.L.; Walters, W.A.; Berg-Lyons, D.; Lozupone, C.A.; Turnbaugh, P.J.; Fierer, N.; Knight, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Gunnarsdottir, M.J., Gardarsson, S.M., Figueras, M.J., Puigdomènech, C., Juárez, R., Saucedo, G., Arnedo, M.J., Santos, R., Monteiro, S., Avery, L., Pagaling, E., Allan, R., Abel, C., Eglitis, J., Hamsch, B., Hügler, M., Rajkovic, A., Smigic, N., Udovicki, B., Albrechtsen, H.J., López-Avilés, A., Hunter, P., 2020. Water safety plan enhancements with improved drinking water quality detection techniques. *Sci. Total Environ.* 698, 134185 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134185>
- Kopcakova, A., Stramova, Z., Kvasnova, S., Godany, A., Perhacova, Z., Pristas, P., 2014. Need for database extension for reliable identification of bacteria from extreme environments using MALDI TOF mass spectrometry. *Chem. Pap.* 68, 1435–1442. <https://doi.org/10.2478/s11696-014-0612-0>.
- Li, Q., Yu, S., Li, L., Liu, G., Gu, Z., Liu, M., Liu, Z., Ye, Y., Xia, Q., Ren, L., 2017. Microbial communities shaped by treatment processes in a drinking water treatment plant and their contribution and threat to drinking water safety. *Front. Microbiol.* 8, 2465. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02465>
- Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMB J.* 2011, 17, 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* 2013, 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Pascual-Benito, M., Emiliano, P., Casas-Mangas, R., Dacal-Rodríguez, C., Gracenea, M., Araujo, R., Valero, F., García-Aljaro, C., Lucena, F., 2020. Assessment of dead-end ultrafiltration for the detection and quantification of microbial indicators and pathogens in the drinking water treatment processes. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 230, 113628. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113628>
- Pinar-Méndez, A., Fernández, S., Baquero, D., Vilaró, C., Galofré, B., González, S., Rodrigo-Torres, L., Arahál, D.R., Macián, M.C., Ruvira, M.A., Aznar, R., Caudet-Segarra, L., Sala-Comorera, L., Lucena, F., Blanch, A.R., García-Aljaro, C., 2021. Rapid and improved identification of drinking water bacteria using the Drinking Water Library, a dedicated MALDI-TOF MS database. *Water Res.* 203, 117543. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2021.11>
- Pinar-Méndez, A., Wangenstein, O.S., Præbel, K., Galofré, B., Méndez, J., Blanch, A.R., García-Aljaro, C., 2022a. Monitoring bacterial community dynamics in a drinking water treatment plant: An integrative approach using metabarcoding and microbial indicators in large water volumes. *Water* 14, 1435. <https://doi.org/10.3390/W14091435>
- Pinar-Méndez, A., Galofré, B., Blanch, A.R., García-Aljaro, C. Culture and molecular methods as complementary tools for water quality management, 2022b. *Sci. Total Environ.* 848, 157789. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157789>
- Sala-Comorera, L., Caudet-Segarra, L., Galofré, B., Lucena, F., Blanch, A.R., García-Aljaro, C., 2020. Unravelling the composition of tap and mineral water microbiota: divergences between next-generation sequencing techniques and culture-based methods. *Int. J. Food Microbiol.* 334, 108850 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108850>

Listeria monocytogenes: update in regulations and impact of genetic diversity on its behaviour and detection*

Nathalie Gnanou Besse (ANSES, Maisons Alfort, France, nathalie.gnanou-besse@anses.fr)

Presentation of work of ISO/TC 34/SC 9 WG 32 "Improvement of (pre-) enrichment step in ISO 11290-1"

The origin of the group is a resolution from CEN/TC 463 after a proposal of France enhancing that some alternative commercial certified methods based on different enrichment broths than the ones of ISO 11290-1 method give better results in the detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Three media suppliers proposed to open their broth to standardization.

Given Vienna agreement, ISO TC34 SC9 members agreed to create a new working group on the possible improvement of *Listeria* enrichment: WG "Improvement of pre-enrichment step in ISO 11290-1" under coordination by European Reference Laboratory for *L. monocytogenes* (Resolution N 2021/58, December 2021). The group consists of 54 members representing 15 countries.

WG 32 of ISO/TC 34/SC 9 is dedicated to the "Improvement of (pre-) enrichment step in EN ISO 11290-1", i.e., the selection of different alternative enrichment broths for a possible replacement of the primary/secondary enrichment broths of the current version of the Standard EN ISO 11290-1 for the detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp.

The other *Listeria* species (*sensu stricto*) are included in the missions of the group.

Four meetings of the Working Group were organized online.

After an enquiry at SC9, WG32 and National Reference Laboratories for *L. monocytogenes* levels, different alternative primary/secondary enrichment broths were retained for a possible replacement of the primary/secondary enrichment broths of the current version of ISO 11290-1:

- The broths coming from reference methods: BLEB proposed by USA (FDA BAM method, with a unique enrichment procedure) and UVM1 proposed by Canada (MFLP-01 method) tested in the frame of a two-step enrichment procedure with a secondary enrichment in Fraser.
- Three commercial broths proposed to be opened to standardization by media suppliers: LESS+ (Neogen); LSB (Bio-Rad); 24LEB (Thermofisher Scientific).

All these enrichment protocols will be tested in the frame of a two-step enrichment procedure with a secondary enrichment in Fraser.

- Modifications of Half-Fraser broth (primary enrichment) from Dupont (2010) and Bannenberg et al. (2021): including a formula improvement, and/or increasing incubation time from 24 to 26 hours, transfer volume to Fraser from 0.1 to 1.0 ml; an increasing incubation temperature from 30 to 37 °C will be also tested.

*Contribution at the XXI workshop 'Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria, Memorial DYCFung', November 2023, Universitat Autònoma de Barcelona.

regulation

It was agreed to begin the comparison study of these different enrichment procedures according to Step 3 of the draft standard ISO/DIS 17468 "evaluation study":

- *Firstly, a pre-study based on a "sensitivity study", performed with naturally (in priority) and artificially contaminated samples (if possible, end 2023);*
- *Secondly, a RLOD determination with the option(s) retained at the pre-study stage (expected for 2024).*

Possibly, a validation of the revised Standard by inter-laboratories studies may occur in 2025.

Relationship between the MLST genetic diversity of *Listeria monocytogenes* and growth, potential impact on detection

Advanced DNA sequencing-based methods, such as multilocus sequence typing (MLST), are accurate and precise for species

*characterization and allows for the definition of the structure of the population of *L. monocytogenes*.*

*Clonal complexes (CCs) are groups of sequence types, identified through MLST, which categorize *L. monocytogenes* strains into evolutionarily distinct groups. *L. monocytogenes* diversity is reflected by variation in the prevalence of the "sequence types" (ST) or CCs according to the sources (food, environment, animal, clinical cases) and the potential for virulence of the strain. Thus, some CCs are frequently associated with food products and food processing environments (CC121, CC9), and the distribution of CCs is itself unequal across food matrices, whereas CC1, CC2, CC4, and CC6 appear to be highly associated with clinical cases and are considered to be hypervirulent CC. The behavior of the strains and stress tolerance may be associated with serotype and CC.*

The aim of the project was to study if growth potential is different according to CCs, both in selective enrichment broths and under conditions mimicking food characteristics and

storage. The results would give data on the efficiency of the ISO 11290-1 method for the detection of *L. monocytogenes*. They may also contribute to understanding the reason why some CCs are rarely isolated from food. Finally, a potential link between strain growth and their CC could account for a greater human exposure and therefore potential risk of infection.

Using optical density measurements taken with an automated spectrophotometer, we compared the maximal growth rate and lag phase attained of 39 strains from 13 different CCs and various food origins, in 3 broths mimicking stressful food conditions (8 °C, aw 0.95 and pH5) and in ISO Standard enrichment broths (Half Fraser and Fraser). Combination of these two parameters allowed us to evaluate in each experimental condition the population reached after 24 hours, and in non-selective conditions at 8 °C the population reached after 3 days, 6 days and 10 days. These data reflect the global growth performances of each strain.

Generally, and in all conditions examined, no significant differences were observed between CCs or groups of CCs and the level of population attained. Some significant but minimal differences in lag and μ_{max} were found. They could suggest, for example, a better adaptation of potentially more virulent CCs to high temperature and acidic pH, and improved growth performances of CCs associated with food and Lineage II under cold conditions.

Our results also provide data on the efficiency of the selective enrichment protocol of EN ISO 11290-1 method for the detection of *L. monocytogenes*, which seems to be as efficient whatever CCs, lineages, and CCs frequency. We observed a relative homogeneity in the growth of unstressed *L. monocytogenes* under selective conditions in Half Fraser and Fraser broth. The lag duration ranged from 1.4 to 2.7 hours, with an average lag duration of 1.9 hours (standard deviation of 0.5 hours). The average maximum specific growth rate of all strains in half Fraser broth was 0.67 ± 0.05 hours. One must note that an increase of variability in *L. monocytogenes* population behavior, regarding the lag phase, but not maximum growth rate, is however likely to occur under stress conditions, even more at low contamination levels.

The relatively high and homogenous growth of unstressed *L. monocytogenes* population at refrigeration temperatures needs to be emphasized: at 8 °C in non-selective conditions, 24 hours storage allowed more than a doubling of the population, though behavior may vary in real solid foods, when inhibitors and/or background microflora are presents.

In conclusion, despite small differences highlighting natural intraspecific variability, our results show that growth

performances of *L. monocytogenes* strains under the conditions tested in selective and non-selective broth do not appear to be strongly correlated to CCs and cannot explain higher CC "virulence" or prevalence. Enrichment does not seem to introduce bias in the detection method regarding CCs. The MLST method has been used to identify CCs more related to infection or food; however, although MLST may reflect phylogenetics, it cannot always be linked to the phenotypes because there are natural variations among strains.

References

- Anonymous, 2017. EN ISO 11290, Microbiology of the Food Chain — Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. International Organization for Standardization, Geneva.
- Bannenberg, J.W., Abee, T., Zwietering, M.H., and den Besten, H.M.W. 2021. Variability in lag duration of *Listeria monocytogenes* strains in half Fraser enrichment broth after stress affects the detection efficacy using the ISO 11290-1 method. *Int J Food Microbiol.* 337,108914.
- Félix, B. et al., 2023. Identification by high-throughput Real-Time PCR of 30 major circulating *Listeria monocytogenes* clonal complexes in Europe. *Microbiology Spectrum* 10.1128/spectrum.03954-22.
- Fritsch, L., Felten, A., Palma, F., Mariet, J.F., Radomski, N., Mistou, M.Y., Augustin, J.C. and Guillier, L., 2019. Insights from genome-wide approaches to identify variants associated to phenotypes at pan-genome scale: Application to *L. monocytogenes*' ability to grow in cold conditions. *Int J Food Microbiol.* 291, 181-188.
- Guillier, L., Palma, F., Fritsch, L., 2022. Taking account of genomics in quantitative microbial risk assessment: what methods? what issues? *Curr. Opin. Food Sci.*, 48, 100922.
- Maury, M.M., Tsai, Y.H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francoise, V., Leclercq, A., Criscuolo, A., Gaultier, C., Roussel, S., Brisabois, A., Disson, O., Rocha, E.P.C., Brisse, S., and Lecuit, M., 2017. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet.* 48, 308-313. Erratum in: *Nat Genet.* 2017, 49: 651. Erratum in: *Nat Genet.*, 49, 970.
- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., Brisse, S., 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog.* 4, 9.
- Rosa Rodrigues de Souza, C., H. Bergis, P. Ng, L. Guillier, B. Félix, A. Leclercq, N. Gnanou Besse. Assessment of the relationship between the MLST genetic diversity of *Listeria monocytogenes* and growth under selective and non-selective conditions. *Food Microbiol.*, 114, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104303>.

Tendencias de futuro en seguridad alimentaria*

Marta Hugas

Expert independent, ex-Chief Scientist EFSA

martahugas6@gmail.com

Los Objetivos para el Desarrollo Sostenible (ODS; SDG en su sigla inglesa) de las Naciones Unidas, unidos a la demanda ciudadana de alimentación sostenible y segura, aspiran a alcanzar una producción de alimentos sostenible. Sin embargo, el aumento de la población lo hace muy complicado. En 2050 seremos 10.000 millones de personas que alimentar en el mundo, lo que tradicionalmente se ha traducido en un aumento del uso de suelo, agua y fertilizantes (FAO, 2009).

En lugar de eso, deberemos incrementar la producción mientras alcanzamos los ODS (Viana, Freire, Abrantes, Rocha & Pereira, 2021). Conseguirlo será solo posible innovando, empleando nuevos métodos y tecnologías de producción, cambiando los hábitos de consumo y aplicando una economía circular y, a su vez, evaluar los riesgos que todo ello implica usando un conocimiento integral (Singh *et al.*, 2021) a través de múltiples disciplinas, o sea, mediante el enfoque "One Health"¹ (Bronzwaer, Geervliet, Hugas & Url, 2021).

En un esfuerzo conjunto, la UE ha adoptado el Pacto Verde Europeo o "Green Deal", que adopta una perspectiva holística e integra múltiples estrategias para promover la transformación hacia sistemas alimentarios sostenibles (EC, 2019). En este marco, la Estrategia de la Granja a la Mesa (the Farm to Fork Strategy (F2F)) (EC, 2020c), la Estrategia de Biodiversidad (EC, 2020a), la Estrategia Química (EC, 2020d), la Política de Agricultura Común (EP & EUCO, 2013) y el Plan de Acción de Economía Circular (EC, 2020b) representan el núcleo del Pacto Verde Europeo.

La Estrategia F2F pretende reducir el impacto ambiental y la huella climática del sistema alimentario, liderar una transición global hacia la sostenibilidad competitiva "de la Granja a la Mesa", explotar nuevas oportunidades y crear un sistema alimentario robusto y resiliente (EC, 2020c).

Uno de los objetivos más importantes de la Estrategia F2F es la reducción en un 50% del uso total y el riesgo de los pesticidas químicos y reducir en un 50% el uso de los pesticidas más peligrosos. Además, se quiere reducir la pérdida de nutrientes en un 50% y asegurar la conservación de la fertilidad del suelo, conduciendo así a la reducción en el uso de fertilizantes en, al menos, un 20%. Asimismo, otro objetivo importante es la reducción de la venta de antimicrobianos en animales de granja y acuicultura en un 50%. La UE es líder a escala mundial para aumentar la concienciación y reducir el uso de antimicrobianos como se puede ver en el "Plan de Acción One Health sobre Resistencia a los Antimicrobianos" (One Health Action Plan on Antimicrobial Resistance) (EC, 2017). Finalmente, la F2F pretende que el 25% de la agricultura europea sea orgánica para

*Ponencia presentada en el XXI Workshop MRAMA - DYCFung memorial (21-24 Noviembre 2023)

¹One Health: la estrategia integral y colaboración transdisciplinaria en todos los aspectos de la salud de las personas, los animales y el medio ambiente

el 2030 y que la acuicultura orgánica aumente significativamente (EC, 2020c).

Sin embargo, la F2F se enfrenta a numerosos retos para conseguir la sostenibilidad ambiental, social y económica, sin que la mejora de una conlleve el detrimento de las otras (Figura 1), especialmente, para los gestores de riesgos y órganos políticos en el área de seguridad alimentaria y asesoramiento científico.

La sostenibilidad social (que incluye la salud humana) considera la implantación de dietas más sanas para reducir el sobrepeso, la asequibilidad de alimentos saludables y sostenibles y la mejora del bienestar animal (que tiene un claro impacto en la salud humana, por ejemplo, por su relación con las enfermedades zoonóticas). La sostenibilidad ambiental incluye afrontar el cambio climático, la protección del medio ambiente, la preservación de la biodiversidad, la reducción de la pérdida y desperdicio de alimentos, y la implementación de una economía biocircular. La sostenibilidad económica contempla la creación de nuevos negocios y puestos de trabajo, lo que es muy relevante en el área de seguridad alimentaria.

Además, la complejidad de esta tarea es notable ya que la evidencia científica crece exponencialmente, dificultando mantenerse al día. Esto deberá ser abordado mediante la implementación de tecnologías de inteligencia artificial para automatizar parcialmente los procesos de revisión (EFSA, 2021a) en las evaluaciones de riesgo. Asimismo, nuevos parámetros pueden surgir, como el uso del microbioma para establecer la seguridad de un compuesto químico (Merten *et al.*, 2020) o la necesidad de emplear "One Health" (Bronzwaer *et al.*, 2021).

Las expectativas de la sociedad son también muy exigentes, requiriendo un enfoque holístico, nuevos objetivos de protección, política de transparencia y mayor participación, que, aunque valiosa, es difícil de organizar (EP & EUACO, 2019). Más aun, las tendencias del mercado y la globalización han incrementado la movilidad de los componentes de los sistemas alimentarios, los posibles riesgos e innovación tecnológica. Un desafío adicional es hacer todo esto sin erosionar la confianza y la percepción pública.

La EFSA y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC en inglés) utilizan el enfoque de One Health uniendo sus fuerzas para analizar e interpretar datos sobre zoonosis y agentes zoonóticos notificados por los EEMM y otros países para crear el informe de zoonosis One Health de la UE (EFSA & ECDC, 2021). En 2020, la campilobacteriosis fue la zoonosis notificada con más frecuencia en la UE (120.946 casos), seguida de la salmonelosis (52.702), la yersiniosis (5.668) y las infecciones causadas por *Escherichia coli* productora de Shigatoxina (4.446). La listeriosis fue la quinta zoonosis más notificada (1.876 casos) y, junto con la infección por el virus del Nilo Occidental, fue la enfermedad con mayores tasas de mortalidad y hospitalización. El número de brotes de

enfermedades transmitidas por alimentos se redujo en 2020 en un 47%, con un descenso del 61% de personas afectadas, 60% de hospitalizaciones y 43% de muertes. La notificación de campilobacteriosis disminuyó un 33,4% y la salmonelosis un 29,7% desde 2019 (considerando el Reino Unido), el más bajo registrado desde que se inició la vigilancia de ambas enfermedades. La pandemia de covid-19 en Europa contribuyó de manera importante a la notable disminución de las enfermedades zoonóticas en humanos y los brotes transmitidos por los alimentos a causa de varios factores como la resiliencia de la atención médica (personal sanitario, capacidad de laboratorio y de diagnóstico, acceso a hospitales y asistencia médica), la cancelación de viajes, las restricciones de eventos, el cierre de restaurantes, la cuarentena y otras medidas de mitigación como el uso de mascarillas, distanciamiento físico e higienización de manos. En el último informe (2021), los brotes de toxoinfecciones han aumentado, aunque siguen siendo inferiores a los observados antes de la pandemia.

Uno de los temas más candentes que se están considerando es el uso del microbioma para la evaluación de riesgos. La comprensión cada vez mayor del papel del microbioma en la salud requiere un mapeo prospectivo de su función en ciencia reguladora, ya que actualmente no hay requisitos legales explícitos reflejados en la legislación europea. Necesitamos aprender a traducir la pérdida de diversidad del microbioma en consecuencias funcionales, ya que aún no existen estándares, metodología ni pautas para definir qué es un microbioma saludable (Merten *et al.*, 2020). Por el momento, los efectos potenciales en el microbioma se están considerando, por ejemplo, en la reevaluación de aditivos alimentarios, la legislación sobre declaraciones de propiedades, el papel que los microbiomas podrían desempeñar como reservorios de genes de resistencia a los antimicrobianos, y la eficacia de los potenciadores de la digestibilidad como aditivos alimentarios por su impacto en el microbioma intestinal animal. Por todas estas razones, es de gran importancia que los proyectos de investigación e innovación aborden el destino del microbioma en la evaluación previa a la comercialización de productos regulados y en las evaluaciones de riesgo genéricas (Dubey *et al.*, 2019).

Desde un punto de vista de futuro, es importante identificar los riesgos emergentes, definidos como un nuevo peligro o una mayor exposición / susceptibilidad / patogenicidad / toxicidad de un peligro conocido o una composición / ingesta modificada de un producto (EP & EUACO, 2002). Una vez que se identifican estas señales, se inicia un proceso para determinar si representan un riesgo (revisión bibliográfica, redes de EEMM, de la industria, etc.). Esta identificación conlleva mucha incertidumbre, por lo que es importante no generar inquietudes en los consumidores hasta que se alcance la valoración final. Algunos posibles riesgos emergentes son los microplásticos y nanoplásticos, las enfermedades transmitidas por insectos, los productos innovadores, la economía circular, la reducción del desperdicio de alimentos y la resistencia a los antimicrobianos.

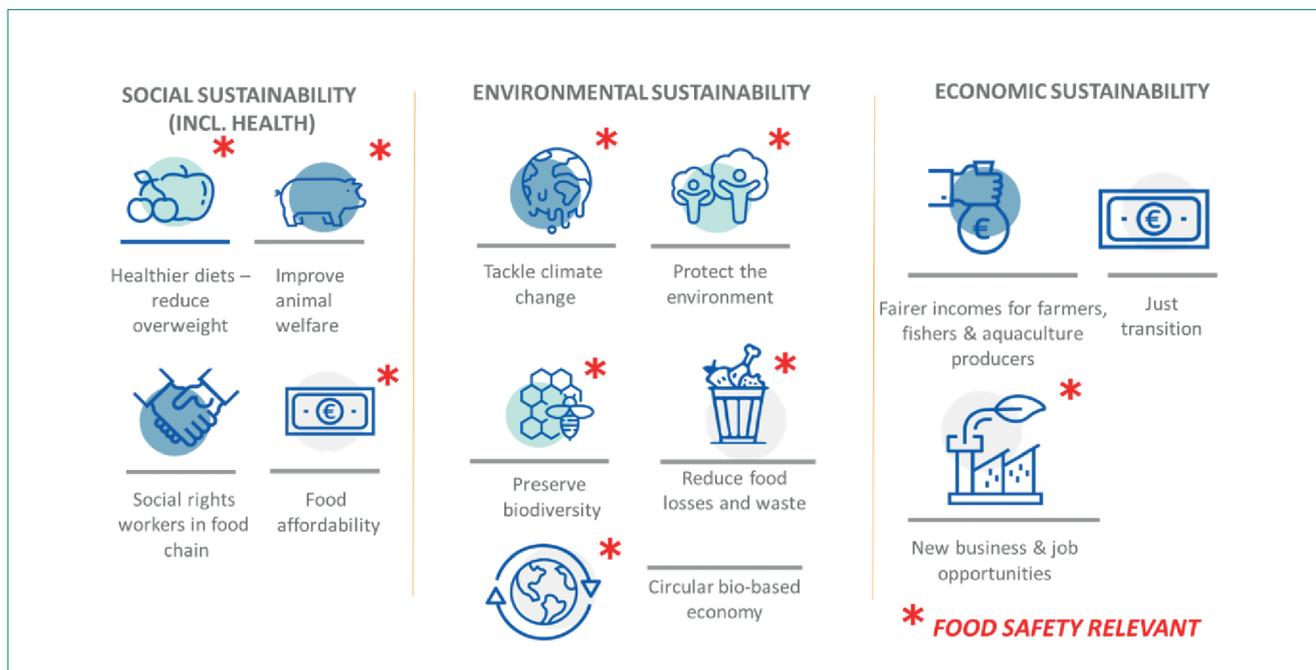


Figura 1: Desafíos a la sostenibilidad relacionados con los alimentos (Food sustainability challenges)

Los microplásticos representan un área de complejidad / incertidumbre (integración de nuevo conocimiento) en evaluación de riesgos. El Eurobarómetro descubrió que los microplásticos son una de las mayores preocupaciones públicas (EC, 2020e). Por lo tanto, la EFSA revisó el estado actual de los conocimientos e identificó las lagunas que subsanar. Por un lado, existen métodos para la identificación y cuantificación de microplásticos en alimentos, pero la información es limitada; por otro lado, no existen ni métodos ni información sobre nanoplasticos. La investigación en toxicocinética y toxicidad, incluyendo estudios sobre los efectos locales en el tracto gastrointestinal, la degradación de microplásticos y la formación potencial de nanoplasticos en el tracto gastrointestinal es necesaria. La EFSA ha abordado la nanociencia y las nanotecnologías en la cadena alimentaria en los últimos años, elaborando una guía sobre evaluación de riesgos en 2011 y actualizándola para la salud humana y animal (BfR *et al.*, 2020; EFSA, 2016; EFSA Scientific Committee, 2011; EFSA Scientific Committee *et al.*, 2021).

Por otro lado, afrontar la innovación también plantea retos. En términos de legislación, la UE considera alimentos nuevos cualquiera que no se consumiese de manera significativa antes de mayo de 1997 (EP & EUCO, 2015) y sus solicitudes se estudian en consecuencia. La categoría cubre nuevos alimentos, alimentos de nuevas fuentes, nuevas sustancias utilizadas en los alimentos, así como nuevas formas y tecnologías para producir alimentos. Las principales consideraciones en la evaluación de la seguridad son identificar condiciones de producción y composición del producto; especificaciones del producto (incluidas las toxinas, si se considera relevante) y datos de estabilidad (en relación con el uso previsto) y perfil nutricional (especialmente

digestibilidad de proteínas, antinutrientes, alergenicidad, etc.). Cabe destacar que la EFSA ha recibido numerosas solicitudes de evaluación en el área de proteínas alternativas. Algunas de estas solicitudes incluyen productos de origen animal como insectos y sus productos, carnes cultivadas (*in vitro*), plantas y sus productos, algas y productos derivados (macroalgas y microalgas) y proteínas de algunas fuentes ya presentes en la dieta actual de la UE (cereales, semillas, legumbres). Las posibles nuevas alergias y el impacto ambiental relacionado con su uso son de suma importancia (EC, 2021; Venlet, Hettinga, Schebesta & Bernaz, 2021).

Además, la economía circular tiene efectos muy positivos, pero también puede suponer vulnerabilidades. Es imprescindible mantenerse alerta para evitar amenazas para la salud pública, como la encefalopatía espongiiforme transmisible (coloquialmente, la enfermedad de las vacas locas) que surgió hace años como consecuencia de la recirculación de carne (EFSA, 2004).

Reducir el desperdicio de alimentos es un desafío, pues es una parte inherente de nuestra producción y consumo de alimentos. Hasta el 10% de los 88 millones de t de residuos alimentarios generados anualmente en la UE está vinculados con la fecha de caducidad. Por ello, una prioridad inmediata es el desarrollo de una nueva guía de la UE basada en los requisitos existentes y que garantice un marcado de la fecha más coherente y una mejora de otras prácticas relacionadas con la información sobre alimentos (EC, 2018). Esto desencadenó la elaboración de la opinión científica de la EFSA sobre la fecha de caducidad. Esta opinión científica incluye un diagrama para ayudar a los operadores de empresas alimentarias a aplicar en el etiquetado los consejos pertinentes sobre cuándo utilizar una fecha de

caducidad tipo “consumir antes de” o “preferentemente antes de” (EFSA *et al.*, 2020). También se desarrolló un diagrama para ayudar a los operadores de empresas alimentarias a decidir si es apropiado indicar las condiciones de almacenamiento y/o el límite de tiempo para el consumo después de abrir el paquete. El marcado de la fecha es especialmente relevante para evitar el desperdicio de alimentos en productos lácteos, zumos de frutas, y carne y pescado refrigerados (EFSA *et al.*, 2020). Se espera que esto genere como resultado un consumidor mejor informado que tire menos alimentos.

Por último, pero no menos importante, la resistencia a los antimicrobianos (AMR) también es un desafío importante en los objetivos de la F2F. El informe conjunto de la EFSA, el ECDC y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) analizó la posible relación entre el consumo de antimicrobianos por humanos y animales y la aparición de AMR (ECDC, EFSA, & EMA, 2017). En general, este informe confirma la asociación positiva entre el consumo de antimicrobianos y la resistencia a los antimicrobianos tanto en humanos como en animales productores de alimentos y subraya la necesidad de reducir el consumo de antimicrobianos en ambos (ECDC *et al.*, 2017).

Sin duda, la seguridad alimentaria se enfrenta a muchos desafíos en la actualidad. Las agencias reguladoras como la EFSA seguirán proporcionando una evaluación de riesgos de alto nivel que proteja a los ciudadanos de la UE de enfermedades e influirá en todo el planeta estableciendo altos estándares de ciencia y ética, al tiempo que contribuye al desarrollo global de un mundo más seguro.

Otras palabras clave: evaluación de riesgos, riesgos emergentes, resistencia a los antibióticos, ODS - Objetivos de Desarrollo Sostenible, One Health, Pacto verde, Estrategia ‘de la Granja a la Mesa’, microplásticos, productos innovadores, economía circular, desperdicio de alimentos, zoonosis, vigilancia.

References

- BfR (German Federal Institute for Risk Assessment), Department of Food Safety, Unit Effect-based Analytics and Toxicogenomics Unit, Nanotoxicology Junior Research Group, Shopova, S., Sieg, H., & Braeuning, A. (2020). Risk assessment and toxicological research on micro- and nanoplastics after oral exposure via food products. *EFSA Journal*, 18(S1), e181102. doi:10.2903/j.efsa.2020.e181102
- Bronzwaer, S., Geervliet, M., Hugas, M., & Url, B. (2021). EFSA's expertise supports One Health policy needs. *EFSA Journal*, 19(5), e190501. doi:10.2903/j.efsa.2021.e190501
- Dubey, A., Malla, M. A., Khan, F., Chowdhary, K., Yadav, S., Kumar, A., Khan, M. L. (2019). Soil microbiome: a key player for conservation of soil health under changing climate. *Biodiversity and Conservation* (8-9). doi:10.1007/s10531-019-01760-5
- EC (European Commission). (2017). A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). Retrieved from https://ec.europa.eu/health/amr/sites/health/files/antimicrobial_resistance/docs/amr_2017_action-plan.pdf
- EC (European Commission). (2018). Market study on date marking and other information provided on food labels and food waste prevention. doi:10.2875/808514
- EC (European Commission). (2019). Communication from the Commission to the European Parliament, the European Council, the Council, The European Economic and social committee, and the Committee of the Regions: The European Green Deal COM/2019/640 final.
- EC (European Commission). (2020a). Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and social committee, and the Committee of the Regions: EU Biodiversity Strategy for 2030 - Bringing nature back into our lives COM/2020/380 final.
- EC (European Commission). (2020b). Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. A new Circular Economy Action Plan For a cleaner and more competitive Europe. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1583933814386&uri=COM:2020:98:FIN>
- EC (European Commission). (2020c). Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system. Retrieved from https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/communication-annex-farm-fork-green-deal_en.pdf.
- EC (European Commission). (2020d). Communication from the Commission to the European Parliament, the European Council, the Council, The European Economic and social committee and the Committee of the Regions: Chemicals Strategy for Sustainability COM(2020) 667 final. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:52020DC0667&from=EN>
- EC. (2020e). Protecting the environment – Eurobarometer survey. Retrieved from https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/QANDA_20_330
- EC (European Commission). (2021). Filling knowledge gaps on the nutritional, safety, allergenicity and environmental assessment of alternative proteins and dietary shift. TOPIC ID: HORIZON-CL6-2021-FARM2FORK-01-12. Horizon Europe Framework Programme (HORIZON).
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority), & EMA (European Medicines Agency). (2017). ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*, 15(7), 4872. doi:10.2903/j.efsa.2017.4872

- EFSA (European Food Safety Authority). (2004). Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on the interpretation of results of EU surveillance of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ovine and caprine animals, culling strategies for TSEs in small ruminants and the TSE-related safety of certain small ruminant products. *EFSA Journal*, 2(3). doi:10.2903/j.efsa.2004.12
- EFSA (European Food Safety Authority). (2014). Multi-annual programme on International Scientific Cooperation 2014–2016. *EFSA Journal*. doi:10.2805/65854
- EFSA (European Food Safety Authority). (2016). Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal*, 14, 4501. doi:10.2903/j.efsa.2016.4501
- EFSA (European Food Safety Authority). (2020). Extensive literature search on food and feed safety vulnerabilities in circular economy. Retrieved from <https://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/extensive-literature-search-food-and-feed-safety-vulnerabilities>
- EFSA (European Food Safety Authority). (2021a). EFSA Strategy 2027 science, safe food, sustainability. Retrieved from <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/2021-07/efsa-strategy-2027.pdf>
- EFSA (European Food Safety Authority), (2021b). Foodborne Outbreaks. Retrieved from <https://efsa.maps.arcgis.com/apps/MapJournal/index.html?appid=8d29138c40494709af52322351ab6d32>
- EFSA (European Food Safety Authority). (2021c). Foodborne outbreaks - dashboard. Retrieved from <https://www.efsa.europa.eu/en/microstrategy/FBO-dashboard>
- EFSA (European Food Safety Authority). (2021d). Programming Document 2021-2023. *EFSA Journal*. doi: 10.2805/310662
- EFSA (European Food Safety Authority), & ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(12), 6971. doi:10.2903/j.efsa.2021.6971
- EFSA (European Food Safety Authority), Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Lindqvist, R. (2020). Guidance on date marking and related food information: part 1 (date marking). *EFSA Journal*, 18(12), e06306. doi:10.2903/j.efsa.2020.6306
- EFSA Scientific Committee. (2011). Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA Journal*, 9, 2140. doi:10.2903/j.efsa.2011.2140
- EFSA Scientific Committee, More, S., Bampidis, V., Benford, D., Bragard, C., Halldorsson, T., Schoonjans, R. (2021). Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health. *EFSA Journal*, 19(8), 6768. doi:10.2903/j.efsa.2021.6768
- EP (European Parliament), & EUCO (European Council). (2002). Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32002R0178>
- EP (European Parliament), & EUCO (European Council). (2013). Regulation (EU) No 1306/2013 of the European Parliament and of the Council of 17 December 2013 on the financing, management and monitoring of the common agricultural policy and repealing Council Regulations (EEC) No 352/78, (EC) No 165/94, (EC) No 2799/98, (EC) No 814/2000, (EC) No 1290/2005 and (EC) No 485/2008.
- EP (European Parliament), & EUCO (European Council). (2015). Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001 (Text with EEA relevance). Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32015R2283>
- EP (European Parliament), & EUCO (European Council). (2019). Regulation (EU) 2019/1381 of the European Parliament and of the Council of 20 June 2019 on the transparency and sustainability of the EU risk assessment in the food chain and amending Regulations (EC) No 178/2002, (EC) No 1829/2003, (EC) No 1831/2003, (EC) No 2065/2003, (EC) No 1935/2004, (EC) No 1331/2008, (EC) No 1107/2009, (EU) 2015/2283 and Directive 2001/18/EC (Text with EEA relevance.)
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2009). How to Feed the World in 2050 Retrieved from https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- Garcia-Vello, P., Aiello, K., Smith, N., Fabrega, J., Paraskevopoulos, K., Heppner, C., & Hugas, M. (2022). Editorial: How to ensure preparedness for future risk analysis needs. *EFSA Journal*.
- Merten, C., Schoonjans, R., Di Gioia, D., Peláez, C., Sanz, Y., Maurici, D., & Robinson, T. (2020). Editorial: Exploring the need to include microbiomes into EFSA's scientific assessments. *EFSA Journal*, 18(6), e18061. doi:10.2903/j.efsa.2020.e18061
- Singh, B. K., Arnold, T., Biermayr-Jenzano, P., Broerse, J., Brunori, G., Caron, P., Wesseler, J. (2021). Enhancing science-policy interfaces for food systems transformation. *Nature Food*, 2, 838–842. doi:10.1038/s43016-021-00406-6
- Venlet, N. V., Hettinga, K. A., Schebesta, H., & Bernaz, N. (2021). Alternative proteins and EU food law. *Food Control*, 130, 1100-1107. doi:10.1093/advances/nmab041
- Viana, C. M., Freire, D., Abrantes, P., Rocha, J., & Pereira, P. (2021). Agricultural land systems importance for supporting food security and sustainable development goals: A systematic review. *Sci Total Environ*, 806, 150718. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.150718