



Universidad de Valladolid

CAMPUS DE PALENCIA

Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

“Variabilidad en la inactivación de *Listeria monocytogenes* frente a la aplicación de altas presiones hidrostáticas (HPP) en zumos modelo”

Alumna: Marta Bernal Ortega

Tutor académico: Carlos Blanco Fuentes

Tutor de empresa: Mario González Angulo

2015-2016

Julio 2016



INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT:	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	4
3. MATERIAL Y MÉTODOS	5
3.1. MICROORGANISMOS:	5
3.2. INOCULACIÓN:	7
3.2.1. Preparación del inóculo	7
3.2.2. Medio de cultivo	7
3.2.3. Preparación del material	8
3.2.4 Inoculación	9
3.3. TRATAMIENTO CON HPP:	9
3.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RECuento	11
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1. SELECCIÓN DE LAS CEPAS MÁS RESISTENTES A LAS HPP	13
4.2. ANÁLISIS DE LAS RESULTADOS OBTENIDOS Y SELECCIÓN DE LAS CEPAS MÁS RESISTENTES A LAS HPP	18
4.2.1 Variabilidad de las cepas	18
4.2.3 Dendrograma:	19
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA RESISTENTE	22
4.3.1. Estudio del efecto del pH	23
4.3.2. Estudio de los parámetros del proceso de HPP:	24
5. CONCLUSIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA	27

RESUMEN

En la presente memoria se recogen los resultados del estudio en el que se evaluó el comportamiento de distintas cepas de *Listeria monocytogenes* frente a su inactivación por altas presiones hidrostáticas en zumos modelo. Se trabajó con 48 cepas (cubriendo un amplio rango de linajes, serotipos, reservorios y virulencia), unas condiciones de procesado de 500 MPa 1 min, dos valores de pH (4.5 y 6) y realizando un seguimiento en el tiempo (días 1, 7 y 22) de las muestras incubadas a 12 °C. Se observó un gran variabilidad de *L. monocytogenes* frente a las altas presiones, con inactivaciones que a las 24 horas variaron entre 5.3 y 1.1 log UFC/mL. También se observaron diferencias en cuanto a su capacidad de recuperación en el tiempo. Teniendo en cuenta todas las variables del proceso se seleccionaron como cepas más resistentes la ILSI 10, la ILSI 19, ILSI 40 y *Listeria innocua* UBU (esta última incluida en el estudio para evaluar su uso como surrogato o sustituto del patógeno).

En este trabajo también se recogen los resultados de la caracterización de una de las cepas más resistentes (ILSI 40) frente a diferentes valores de pH (3, 4, 5 y 6), presiones (500 y 600 MPa) y tiempos (1, 2, 3, 4, y 5 min). La inactivación completa para el tratamiento de 500 MPa y 1 min se obtuvo a pH < 5. Un tratamiento superior a 600 MPa durante 4 min produjo la inactivación completa de la cepa en el zumo modelo con pH = 6.

ABSTRACT:

This report discusses the results obtained in the evaluation of the behavior of *Listeria monocytogenes* towards its inactivation by means of high pressure processing (HPP) in model juice systems. Forty eight strains were studied (covering a wide range of lineages, serotypes, reservoirs and virulence). Processing conditions of 500 MPa and 1 min were selected to process pH adjusted media (4.5 and 6.0). Samples stored at 12 °C were periodically analyzed (days 1, 7 and 22). Results reveal a great variability of *L. monocytogenes* towards high pressure processing. Inactivations after 24 h ranged between 5.3 and 1.1 log UFC/mL. Differences were also observed in the capacity to recover of the strains. Taking into consideration all variables involved in the study, strains ILSI 10, ILSI 19, ILSI 40 and *Listeria innocua* UBU were selected as the most pressure resistant (the latter was included in order to evaluate its potential as a surrogate for the pathogen).

This work also includes the results obtained in the characterization of one of the most pressure resistant strains (ILSI 40) towards different pressures (500 and 600 MPa), processing times (1, 2, 3, 4, and 5 min) and pH values (3, 4, 5 and 6). Complete inactivation of the strain was achieved when processing at 500 MPa and 1 min and pH < 5. A more intense treatment of 600 MPa and 4 min was required to fully inactivate the strain in model juice with pH = 6.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado el consumo de frutas y verduras, como consecuencia de la mayor preocupación de los consumidores por la salud (Park et al., 2011; Jordan et al., 2001), En el caso de los zumos se demandan zumos no pasteurizados debido a la búsqueda de alimentos más naturales y frescos que aporten todos los nutrientes que poseen las frutas (vitaminas y minerales) y que tengan un bajo contenido calórico (Rathnayaka, 2013; Valero et al., 2006; Bull et al., 2005). El principal problema de estos zumos no tratados térmicamente es el de su seguridad alimentaria, ya que pueden ser causa de infecciones alimentarias producidas por patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*). Por ello se están buscando nuevas tecnologías no térmicas que proporcionen alimentos seguros microbiológicamente pero mantengan todas las cualidades sensoriales y nutricionales de los zumos (Muñoz-Cuevas et al., 2013; Raybaudi-Massilia et al., 2006; Bae et al., 2015)

El tratamiento por altas presiones hidrostáticas ha surgido como una alternativa a los métodos convencionales de procesamiento térmico de los alimentos dando lugar a productos más frescos, con modificaciones mínimas en la calidad sensorial y nutricional y con una seguridad equiparable a los tratamientos térmicos convencionales de pasteurización (Hiremath et al., 2012; Koseki et al., 2011)

La tecnología de altas presiones hidrostáticas (HPP) es una tecnología alternativa que aplica altas presiones (350-600 MPa, en condiciones industriales) con temperaturas de 0-25 °C durante un periodo corto de tiempo (unos pocos segundos a 20 min) en alimentos ya envasados, con el fin de eliminar los microorganismos patógenos, microorganismos responsables de la descomposición vegetal e inactivar enzimas (Andrés et al., 2015, Bull et al., 2005). La presión se transmite de una forma rápida, inmediata y uniforme por todo el alimento evitando problemas de convección o conducción o baja penetración como ocurre con tratamientos térmicos, con microondas o con radiación (Muñoz-Cuevas et al., 2013; Rastogi et al., 2007).

El grado de inactivación de patógenos de esta tecnología va a depender de la combinación de numerosos factores: del propio microorganismo (forma, tipo de Gram, estado fisiológico, cepa o temperatura de crecimiento), de la matriz del alimento (pH, solutos, nutrientes, presencia de bacteriocinas) y de las condiciones de presurización (nivel de presión, tiempo de presurización, y temperatura) (Bozoglu et al., 2004; Jofré et al., 2010).

Se han estudiado diversos mecanismos sobre los que actúan las altas presiones para la inactivación microbiana. Las HPP alteran la estructura celular y las funciones fisiológicas de la célula, rompen la cadena de ADN, alterando la integridad de la

membrana celular, inactivando enzimas clave y desnaturalizando proteínas (Andrés et al., 2015; Koseki et al., 2006). Sin embargo, algunas de las células pueden sobrevivir después de este tratamiento, produciéndose en ellas un daño subletal. El daño subletal es un fenómeno por el cual las células que son dañadas por la presión son capaces de recuperarse y proliferar si las condiciones del medio son favorables (pH alto, aw elevada, temperatura óptima etc.), por ello será importante el control del tiempo y de la temperatura de conservación posterior al tratamiento de HPP (Koseki et al., 2008; Bozoglu et al., 2004).

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva, en forma de bastón, que no forma esporas, ampliamente distribuida en la naturaleza. Esta bacteria produce listeriosis, una de las principales enfermedades transmitidas por los alimentos que tiene unas de las más alta tasa de mortalidad (30%). Afecta principalmente a ancianos, niños recién nacidos, embarazadas y personas con sistemas inmunes débiles. Los síntomas de la listeriosis son variables, desde síntomas similares a una gripe hasta enfermedades más graves como meningitis, septicemia o abortos (EFSA, 2015; Juck et al., 2011)

Según indica la EFSA (Agencia Europea sobre Seguridad Alimentaria) el número de casos de listeriosis en el año 2014 fue de 2161 lo que supone un aumento de un 30% desde el año 2013. Este aumento es debido a un mayor consumo de alimentos listos para el consumo. La Unión Europea establece un contenido de *L. monocytogenes* \leq 100 UFC/g para los productos listos para el consumo en el mercado, en el caso de lactantes y en productos para usos médicos especiales se exige ausencia en 25 g.

Listeria monocytogenes es un microorganismo ubicuo que puede crecer en gran cantidad de condiciones. Los principales productos a los que se asocia la listeriosis son derivados del pescado, principalmente pescado ahumado, seguido de los quesos semi-blandos o blandos y de los productos cárnicos listos para el consumo, aunque también en algunos productos ácidos como la ensalada de col, vegetales mínimamente procesados y zumos de fruta sin pasteurizar (Jordan et al., 2001; Valero et al., 2006). En el caso del zumo se ha observado cómo *L. monocytogenes* puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración (4° C) y con pH superior a 3 (Valero et al., 2006; Bae et al., 2015)

Es por este motivo que diferentes autoridades sanitarias internacionales implementan medidas para controlar la presencia de patógenos en los alimentos mínimamente procesados y garantizar la seguridad alimentaria. En Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) exige estudios de validación. Para el caso concreto de los zumos, la validación consiste en la inoculación con microorganismos patógenos y procesado con las condiciones de presión y tiempo que, como mínimo, se van emplear en el proceso de elaboración. En estos estudios se exige una reducción de 5.0 log UFC/mL durante toda su vida útil (Raybaudi-Massilia et al., 2009; FDA, 2004).

Por ello en vista de la seguridad de los zumos se debe estudiar una combinación adecuada de presión y tiempo junto con otros factores de conservación, de tratamiento y de manipulación del producto alimenticio (BPM), para conseguir una buena inactivación de las bacterias y evitar la recuperación de las células que han sufrido un daño subletal (Lianou et al., 2013).

El tratamiento convencional de HPP que se aplica a los zumos es similar a un tratamiento de pasterización térmica respecto a su seguridad alimentaria (Park et al. 2011; Jordan et al., 2001). Hay un amplio número de estudios donde se demuestra la eficacia de las HPP sobre zumos de cítricos, guayaba, fresa, manzana, lichi, naranja, mango, tomate o pomelos (Uckoo et al., 2013) empleando presiones de 450-600 MPa con tiempos de 1 a 5 minutos (Tonello-Samson et al., 2014).

L. monocytogenes es considerada patógena, virulenta y causante de enfermedad. No obstante, se ha demostrado que las diferencias entre cepas afectan a su virulencia y a su comportamiento frente a la inactivación por tecnologías de procesado alternativas, especialmente en los procesos físicos como altas presiones (Lianou et al., 2013).

Existen numerosos factores que van a afectar a la inactivación de los patógenos en zumos. Uno de ellos es el pH del medio en el que se encuentran que en el caso de las frutas y verduras con las que se elaboran los zumos dependerá de la concentración de ácidos que presenten, que aportan un efecto antioxidante y aromatizante (Rathanayaka, 2013; Park et al., 2011). El efecto de ácidos orgánicos débiles sobre *L. monocytogenes* se ha estudiado en numerosos trabajos y se ha visto cómo esta bacteria es muy afectada por este parámetro, que dependerá sobre todo del grado de disociación del ácido y del tipo de bacteria. (Valeo et al., 2006; Raybaudi-Massilia et al., 2009). El ácido cítrico es un ácido que se encuentra en los zumos de forma natural.

En los estudios de validación que se realizan actualmente no existe ningún criterio de selección de las cepas, a pesar de la variabilidad existente entre microorganismos dentro de una misma especie. Los laboratorios usan cocteles de cepas (entre 5 y 10) según las disponibles en cada laboratorio, sin haber evaluado si su resistencia a la presión es significativa o no. Por ello en este estudio se va a buscar evaluar la resistencia de muchas cepas para la selección de *Listeria* representativas de la variabilidad de la especie, especialmente de las más resistentes, para diseñar un cóctel de 5 cepas que puedan emplearse en los estudios de validación del proceso y de vida útil.

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo de investigación fueron evaluar la variabilidad de *Listeria monocytogenes* frente a su inactivación por altas presiones en medios de laboratorio que simulan las condiciones fisicoquímicas de zumos de acidez alta (pH < 4.6)

y acidez baja (pH > 4.6) e identificar cepas que puedan ser utilizadas en estudios de validación.

Los objetivos generales se han desarrollado tratando de cubrir los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar la relación que existe entre los diferentes pH en los que se dividen los zumos: acidez alta (pH < 4.6) y acidez baja (pH > 4.6) y la inhibición de las cepas, para un mismo tratamiento de HPP (500 MPa, 1 min).
2. Establecer cuáles son las cepas más resistentes a las altas presiones hidrostáticas para en estudios posteriores poder caracterizarlas
3. Establecer cuáles son las condiciones de inactivación en el tratamiento por altas presiones hidrostáticas (pH, tiempo y presión) para la cepa seleccionada como más resistente

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MICROORGANISMOS:

En este estudio se ha trabajado con 48 cepas de *Listeria monocytogenes*. 44 de ellas proporcionadas por el International Life Sciences Institute de Estados Unidos (ILSI) y 4 de ellas proporcionadas por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) aisladas de productos vegetales. Además se ha incluido una cepa de *Listeria innocua* proporcionada por la Universidad de Burgos, (*Listeria innocua* UBU) una cepa resistente a la presión aislada de una industria cárnica que se estudió como posible surrogate (o sustituto) de la especie patógena. En la tabla 1 se incluyen las características de cada una de estas cepas.

Tabla 1. Características de las cepas de *L. monocytogenes* empleadas en este estudio junto a la clasificación genética (linaje y serotipo), virulencia, factores de virulencia, origen y casos de listeriosis asociados. (ND. No disponible)

Cepa	Linaje	Serotipo	Serovar	inl A/C/J	Virulencia	Origen	Casos asociados
ILSI 01	I	4	4b	+/+	SI	Humano	Epidemia (Mass., 1983)
ILSI 02	I	4	4b	+/+	SI	Humano	Epidemia (US 1998-99)
ILSI 03	II	1	1/2a	+/+	SI	Animal	Animal, vaca
ILSI 04	I	4	4b	+/+	SI	Comida, láctea	Epidemia, queso L.A. 1985
ILSI 05	I	4	4b	+/+	SI	Humano	Caso esporádico humanos
ILSI 06	I	3	1/2b	+/+	SI	Animal	Animal, vaca
ILSI 07	I	3	1/2b	+/+	SI	Humano	Caso esporádico humanos
ILSI 08	I	3	1/2b	-/-	NO	Animal	Animal, cabra
ILSI 09	I	3	3b	+/+	SI	Humano	Caso esporádico humanos
ILSI 10	I	2	3c	+/+	SI	Humano	Caso esporádico humanos

Variabilidad en la inactivación de Listeria Monocytogenes frente a la aplicación de altas presiones hidrostáticas (HPP) en zumos modelo

ILSI 11	II	1	1/2a	+ / + / +	SI	Humano	Caso esporádico humanos
ILSI 12	II	1	1/2a	+ / + / +	SI	Animal	Animal, oveja
ILSI 13	II	<i>Listeria spp</i>	N/A	+ / + / +	SI	Humano	Caso esporádico humanos
ILSI 14	II	1	1/2a	+ / + / +	SI	Animal	Animal, bovino
ILSI 15	II	1	1/2a	+ / + / +	SI	Animal	Animal, oveja
ILSI 16	II	1	1/2a	+ / + / +	SI	Animal	Animal, oveja
ILSI 17	II	2	1/2c	+ / + / +	SI	Humano	Caso esporádico humanos
ILSI 18	II	1	3a	+ / + / +	SI	Humano	Caso esporádico humanos
ILSI 19	III	<i>Listeria spp</i>	4a	+ / + / +	SI	Humano	Caso esporádico humanos
ILSI 20	III	<i>Listeria spp</i>	4a	+ / + / +	SI	Humano	Caso esporádico humanos
ILSI 21	IV	<i>Listeria spp</i>	4c	+ / + / -	SI	Desconocido	Desconocido
ILSI 22	IV	<i>Listeria spp</i>	4a	+ / + / -	SI	Desconocido	Desconocido
ILSI 23	III	<i>Listeria spp</i>	4c	+ / + / +	SI	Desconocido	Desconocido
ILSI 24	IV	4	4b	+ / + / -	SI	Animal	Animal, Cabara
ILSI 26	I	4	4b	+ / + / +	SI	Humano	Epidemia, L.A., 1985
ILSI 27	I	4	4b	+ / + / +	SI	Vegetal	Epidemia, ensalada de col, Halifax, 1981
ILSI 28	I	4	4b	+ / + / +	SI	Humano	Epidemia, Halifax, 1981
ILSI 29	I	4	4b	+ / + / +	SI	Comida, carne	Epidemia, pate, UK, 1988-1990
ILSI 30	I	4	4b	+ / + / +	SI	Humano	Epidemia, UK, 1988-1990
ILSI 31	I	4	4b	+ / + / +	SI	Alimento	Queso, epidemia, Suiza, 1987
ILSI 32	I	4	4b	+ / + / +	SI	Humano	Caso esporádico Suiza, 1987
ILSI 33	II	1	1/2a	+ / + / +	SI	Comida, carne	Caso esporádico perrito caliente, US
ILSI 34	II	1	1/2a	+ / + / +	SI	Humano	Caso esporádico perrito caliente, US
ILSI 35	II	1	1/2a	+ / + / +	SI	Humano	Epidemia, pavo en rodajas (2000)
ILSI 36	I	4	4b	+ / + / +	SI	Comida, carne	Productos cárnicos listos para el consumo epidemia (US 1998-99)
ILSI 37	I	4	4b	+ / + / +	SI	Comida, lácteo	Queso, epidemia, Carolina del norte (2000)
ILSI 38	I	4	4b	+ / + / +	SI	Humano	Epidemia, Carolina del norte (2000)
ILSI 40	I	3	1/2b	- / + / +	Probable virulenta	Humano	Epidemia Illinois (1994)
ILSI 41	I	4	4b	- / + / +	Probable virulenta	Humano	Epidemia, NE USA (2002)
ILSI 42	I	4	4b	- / + / +	Probable virulenta	Comida, carne	Carne en rodajas NE USA (2002)
ILSI 43	I	4	4b	- / + / +	Probable virulenta	Ambiental	Ambiental, NE USA (2002)
ILSI 44	I	4	4b	+ / + / +	SI	Humano	Epidemia, Suiza 1987
ILSI 55	II	1	1/2a	+ / + / +	SI	Comida, carne	Epidemia, pavo en rodajas (2000)
ITA 358	ND	<i>Listeria spp</i>		+ / + / +	SI	Comida, vegetal	Fresa

Variabilidad en la inactivación de Listeria Monocytogenes frente a la aplicación de altas presiones hidrostáticas (HPP) en zumos modelo

ITA 359	ND	<i>Listeria spp</i>		+ / + / +	SI	Comida, vegetal	Champiñón
ITA 360	ND	<i>Listeria spp</i>		+ / + / +	SI	Comida, vegetal	Lechuga
ITA 363	ND	<i>Listeria spp</i>	1/2b	+ / + / +	SI	Comida, vegetal	Vegetales

*la muestra 25 y 39 no se pudieron ensayar ya que la empresa suministradora no nos pudo completar el envío.

En la segunda columna se muestra el linaje (I, II, III y IV) siendo el linaje II el más asociado a listeriosis en humanos y el linaje III el asociado a animales (Lianou et al., 2013).

Respecto a su serotipo *L. monocytogenes* posee 13 serotipos distintos pero los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b son responsables del 96% de las infecciones en humanos, siendo el serotipo 4b el que más se asocia con grandes brotes de listeriosis y el 1/2a el que se ha relacionado principalmente con los casos esporádicos (Lianou et al., 2013).

Los factores de virulencia de *Listeria* son los genes Inl A, inlC e inl J, genes que se relacionan con la producción de intarnalina (proteína responsable de la adhesión celular). Las cepas con estos tres genes serán más virulentas que aquellas que no los poseen (Dongyou et al., 2007)

Los cultivos stock se conservaron a -80 °C en una solución de glicerol, a partir de ellos y empleando un asa de siembra de 10 µl se llevan a placas de tryptone soya agar (TSA) (Conda, España) enriquecidas con 0,6 % extracto de levadura (YE) (Conda, España), se incuban a 37 °C hasta su crecimiento y se conservarán a 4 °C hasta la realización del experimento.

3.2. INNOCULACIÓN:

3.2.1. Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo de cada una de las cepas se transfirieron colonias aisladas con asas estériles de las placas de TSA almacenadas a 4 °C a tubos con 10 ml de la disolución de TSB+YE (Oxoid, Inglaterra). Estos tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h, obteniendo un recuento inicial en torno a 10⁹ UFC/mL.

3.2.2. Medio de cultivo

Para todos los experimentos se empleó como medio de cultivo TSB (Milipore, Alemania) enriquecido con un 0.6% de extracto de levadura (Conda, España). El medio TSB es un caldo CASO, caldo de peptona de caseína-peptona de harina de soja, con una composición mostrada en la tabla 2.

El extracto de levadura es un extracto elaborado a partir de células de levaduras autolisadas, rico en vitaminas del grupo B. con la composición aproximada que se muestra en la tabla 2:

El extracto de levadura es un extracto elaborado a partir de células de levaduras autolisadas, rico en vitaminas del grupo B. con la composición aproximada que se muestra en la tabla 2:

Tabla 2. *Composición de los medios de cultivo*

TSB (g/litro)	Extracto de levadura (%)
17 g de peptona de caseína	11.10% de nitrógeno total
3 g peptona de harina de soja	5.10% de nitrógeno amónico
2.5 g D(+) glucosa monohidrato	0.15% de cloro
5 g de cloruro sódico	4% de humedad.
2.5 g de hidrogeno fosfato dipotásico	

Ha este medio se le modifica el pH empleando ácido cítrico (Prolabo, Bélgica) al 99.9%, ácido mayoritario en frutas (Andrés et al., 2015) intentando ajustar los parámetros fisicoquímicos del medio a los de los zumos.

❖ **Primer experimento, estudio de las cepas:**

La FDA establece dos tipos de zumos en función de su pH, zumos de pH superior a 4.6 y con pH inferior a 4.6. Por ello en este primer experimento se elaboran dos medios uno con un pH de 4.5 y otro con un pH de 6, empleando ácido cítrico de 99.9% (Prolabo, Bélgica) para el ajuste del pH.

❖ **Segundo experimento, caracterización de la cepa resistente**

Estudio del efecto del pH

En este experimento se estudió el efecto del pH y se trabajó a cuatro valores de pH distintos (3, 4, 5 y 6) manteniendo constantes los valores de presión y tiempo (500 MPa a 1 min).

Estudio de los parámetros del proceso de HPP

En este tercer experimento donde se trabaja a diferentes tiempos y presiones, se trabajó a pH 6 y su preparación fue igual que en el experimento 1.

Este medio de cultivo se empleó tanto en las botellas que serán tratadas y analizadas como en los tubos de dilución que se emplean en la inoculación.

La **medida del pH** se realizó con un pH-metro sensION+ PH31 de sobremesa, con un electrodo de pH del tipo 52-02 para medios acuosos y un error de medida de $\pm 0,01$ unidades de pH.

3.2.3. Preparación del material

Para el tratamiento por altas presiones se emplearon botellas de 30 ml previamente lavadas y esterilizadas mediante el siguiente protocolo:

- Llenado con disolución de hipoclorito de sodio y agua destilada a una concentración de 3000 ppm intentando llenarlas sin aire para que se produzca la esterilización completa
- Se dejan en posición horizontal (para que se esterilice también el tapón durante un mínimo de 24 horas.
- Pasado ese tiempo se realiza el aclarado empleado agua estéril.
- El último paso es la aplicación de luz ultravioleta a las botellas vacías como medida adicional de higienizado.

Una vez desinfectadas se llenaron botellas de 30 ml con el medio TSB+YE al que se ha modificado el pH, hasta un volumen de 27 ml aproximadamente en ambiente estéril y se las vuelve a aplicar luz ultravioleta.

Se emplearon un total de 6 botellas por pH, tres de ellas como control (muestras no tratadas) y las otras tres como botellas a las que se las aplica el tratamiento de HPP. En el experimento de modificación de presión y tiempo se empleará un control para todas ya que las condiciones iniciales son las mismas en todos los casos.

3.2.4 Inoculación

Para la incubación se transfirió 1 ml de las cepas de *Listeria* preparadas 24 horas antes a tubos de TSB +YE de 9 ml a los que se ha modificado el pH (3, 4, 4.5, 5 o 6). Estos tubos tendrán una concentración de 10^8 UFC/mL.

De estos tubos se transfirieron 3 ml a las botellas que poseen 27 ml de TSB+YE a los diferentes pH 3, 4, 5, 5 o 6, obteniendo así un volumen total de 30 ml. La concentración inicial de *L. monocytogenes* en estas botellas fue de 10^7 UFC/mL. Finalmente se comprobó que el sellado de las botellas era correcto colocándolas en una envasadora a vacío de campana (Orved, Italia) y se identificaron aquellas mal cerradas al observarse burbujeo en el interior. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta el tratamiento por altas presiones hidrostáticas (< 1 h).

3.3. TRATAMIENTO CON HPP:

❖ Primer experimento, estudio de las cepas

El tratamiento por altas presiones hidrostáticas se realizó inmediatamente después de la inoculación (< 1 h). La presión aplicada fue de 500 MPa durante 1 min empleando el equipo Hiperbaric 55 (Hiperbaric S.A., Burgos) fijando una temperatura de procesado de 25 ° C. Este tratamiento ha sido seleccionado específicamente con el objetivo de obtener información de las cepas en función de su respuesta a unas condiciones de procesado poco severas.

Variabilidad en la inactivación de *Listeria Monocytogenes* frente a la aplicación de altas presiones hidrostáticas (HPP) en zumos modelo



Figura 1. Máquina de altas presiones empleada en los experimentos. Hiperbaric 55 (Hiperbaric S.A., Burgos).

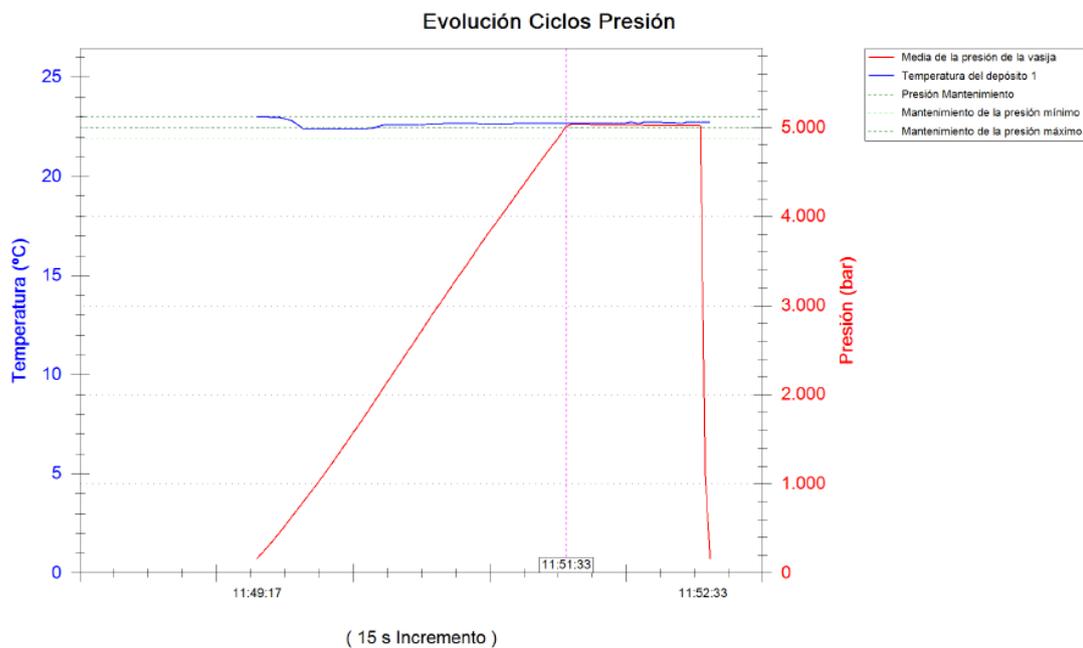


Figura 2. Ciclo de un tratamiento de HPP 500 MPa 1 minuto. Azul-temperatura del agua durante el tratamiento, rojo-presión durante todo el tratamiento.

Se produce un aumento de la presión hasta que llega a la presión fijada (500 MPa) tras llegar a esta presión se mantienen el tiempo fijado (en nuestro caso 1 min) y finalmente tiene lugar la despresurización que ocurre en un tiempo inferior a los 3 segundos.

Las muestras se conservarán a una temperatura de 12° C, hasta la realización de su análisis. Esta temperatura puede considerarse inadecuada para un zumo convencional, simulando unas condiciones de “abuso” de temperatura (frigorífico abierto (Russel, 2002)) que podrían favorecer la recuperación de las células dañadas por las HPP.

❖ **Segundo experimento, caracterización de la cepa resistente**

Estudio del efecto del pH:

En el segundo experimento se evaluó el comportamiento de la cepa seleccionada como más resistente frente al tratamiento previamente seleccionado (500 MPa, 1 min) pero variando el pH de la matriz (6, 5, 4 y 3). Además, a diferencia del experimento anterior, se evaluó el grado de inactivación inmediata y no transcurridas 24 h y la presencia o ausencia del patógeno tras cada uno de los tratamientos.

Estudio de los parámetros del proceso de HPP:

En el tercer experimento donde se estudió el efecto del tratamiento se trabajó al pH 6 con la cepa seleccionada como más resistente y se estudió el efecto de los siguientes tratamientos mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones y tratamiento sufrido por la cepa seleccionada como más resistente al tratamiento por altas presiones.

Tratamiento	PH	Presión(MPa)	Tiempo de tratamiento
T1	6	500	1 minuto
T2	6	500	2 minutos
T3	6	500	3 minutos
T4	6	500	4 minutos
T6	6	500	5 minutos
T7	6	600	1 minutos
T8	6	600	2 minutos
T9	6	600	3 minutos
T10	6	600	4 minutos
T11	6	600	5 minutos

3.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RECuento

El medio de cultivo empleado fue TSA (Conda, España) suplementado con extracto de levadura al 0.6%, posee una composición similar al TSB pero con agar para que sea un medio sólido.

Para la realización de las diluciones se empleó eppendorf de 1 ml llenados con 900 µl de solución de Ringer (Oxoid, Inglaterra) en condiciones estériles.

La siembra se realiza mediante el método Drop-plate o goteo en placa que consiste en sembrar en una misma placa 12 muestras, mediante la aplicación de una gota de 10 µl sin extender en cada espacio.

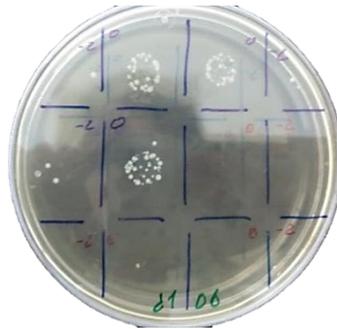


Figura 3. Ejemplo de placa de TSA+YE mediante el método drop-plate (goteo en placa).

Este método permite un gran ahorro de material y de tiempo, ya que permite el recuento de varias cepas a la vez. Su nivel de detección es de 2 log UFC/mL. En nuestro caso en una misma placa se sembraron a los dos pH y para las tres réplicas de cada uno (Corral-Lugo et al., 2012). Las colonias obtenidas son blancas pequeñas redondeadas.

Para expresar los recuentos como logaritmos de unidades formadoras de colonia (log UFC/mL) se empleó la siguiente fórmula:

$$\log UFC/ml = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times 10^{\text{dilución}}}{\text{volumen inoculado (0.01)}}$$

Las placas se incubaron a 37 ° C durante 24-48 h antes de llevar a cabo su recuento.

En el caso de existir dudas sobre algunas colonias respecto a su morfología, empleamos como medio de cultivo el agar Oxoid Chromogenic *Listeria* (OCLA) (Oxoid, Inglaterra) suplementado con OCLA Selective Supplement (Oxoid, Inglaterra) y Brilliance *Listeria* Differential Supplement (Oxoid, Inglaterra). En este medio de cultivo, las colonias de *L. monocytogenes* son fácilmente identificadas por la formación de un halo debido a la acción de una fosfodiesterasa exógena del patógeno que hidroliza la yema de huevo del medio. El cultivo en este medio se realiza mediante una siembra en superficie de 4x4. Se toma una colonia aislada con un asa de 10 µl y se realiza la siembra.

❖ **Primer experimento, estudio de las cepas**

En el primer experimento se realizó el análisis de las muestras a día 0 de las muestras no tratadas (controles), las muestras tratadas por HPP se analizaron a día 1 a día 7 y a día 22.

❖ **Segundo experimento, caracterización de la cepa resistente**

Estudio del efecto del pH:

En el segundo experimento los análisis se realizaron a día 0 tanto de las muestras control como de las muestras tratadas.

Además se procedió a confirmar la presencia o ausencia de *Listeria*. En el caso de las botellas de pH 5 y pH 6 se incuban durante 48h a 25°C y se observa si existe turbidez,

estos resultados se confirman en OCLA. En el caso de los pH 4 y 3 la presencia o ausencia de *Listeria* se realiza mediante un método de enriquecimiento, que consiste en la adición de 25 ml de las botellas tratadas en 225 ml de TSB (pH=7) obteniendo un volumen final de 250 ml, se incuban a 25°C 48 horas y se comprueba la turbidez, los resultados positivos se comprueban en OCLA. En el caso de no existir *Listeria* se podrá declarar ausencia en 25 ml según marca la legislación europea 2073/2005.

Estudio de los parámetros del proceso de HPP:

En el tercer experimento se estudió los parámetros del proceso tiempo y presión. Los análisis fueron realizados a día 0 tanto de los controles como de las muestras tratadas por *drop-plate* en medio de TSA+ YE.

Se realizó también un análisis de comprobación de ausencia de *Listeria* con la incubación de las muestras tratadas a 25 ° C (temperatura óptima de recuperación de las cepas de *Listeria monocytogenes*). La temperatura elegida para ver la presencia o ausencia de las cepas es de 25 ° C debido a que una temperatura superior a 30 °C puede provocar que las células se estresen y no reparen, es mejor una temperatura inferior en las que las células se reparan poco a poco.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos se representaron mediante la media \pm la desviación estándar de las tres réplicas para cada cepa y cada pH.

Los resultados obtenidos fueron normalizados, mediante la resta de la inoculación media (7.3 log UFC/mL) a los recuentos calculando así las inactivaciones. Con los datos de inactivaciones realizamos histogramas de frecuencia para observar el porcentaje que es inactivado en cada logaritmo.

Se realizó también un análisis multivariante, dendograma o Clustering para la elaboración de grupos de cepas en función de su respuesta a las altas presiones en función del pH y del tiempo, además de permitirnos ver cuál de ellas posee un comportamiento distinto.

Se empleó el software Statgraphics Centurion XVI (16.2.04) para llevar a cabo el análisis estadístico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SELECCIÓN DE LAS CEPAS MÁS RESISTENTES A LAS HPP

En el primer experimento se realizó un análisis de todas las cepas, con el objetivo de establecer cuáles de ellas son las más resistentes y capaces de adaptarse inmediatamente a las condiciones del medio, para poder continuar trabajando con ellas y

ver cómo la variabilidad genética puede afectar a su comportamiento frente a las altas presiones.

Para establecer la resistencia de las cepas, se realizó el recuento microbiano de las muestras no tratadas (controles) y de las muestras tratadas a día 1 a día 7 y a día 22 a valores de pH 4.5 y 6. Los recuentos obtenidos para los controles para las cepas de *L. monocytogenes* se muestran en la figura 5 en log UFC/mL.

Este primer análisis a día cero, de las muestras control nos ayuda saber de qué concentración hemos partido y observar si existe alguna cepa que sea especialmente sensible al ácido.

En la figura 4 se observa el valor obtenido para todas las cepas tras la inoculación, (controles, sin tratamiento HPP). Como ya se ha indicado en el apartado anterior de material y métodos en los controles inoculamos una concentración de 10^7 UFC/ml por lo que en la gráfica se observan valores de 7 log UFC/ml aproximadamente en ambos valores de pH para la mayoría de las cepas, tras un tiempo < 1 hora.

Sin embargo existen ciertas cepas como la ILSI 15 o la ILSI 28 que no llegan a ese valor y están 2 log UFC/mL más abajo, esto nos indica que se trata de cepas muy poco resistentes al ácido empleado para la modificación del pH. Como ya se había observado en el estudio de Rathnamayaka, sobre zumos de mango, papaya y piña *L. monocytogenes* es una bacteria muy afectada por el pH y en el estudio de Park et al. Se observa cómo el ácido cítrico se puede emplear como agente antimicrobiano en frutas frescas contra este patógeno. En el estudio de Jordan et al. Se obtienen reducciones de hasta 2.5 log UFC/mL con un 2% de ácido cítrico en manzanas, en nuestro caso la concentración es de 4.16% lo que explica reducciones en algunos casos de más de 2 log UFC/mL.

Esta actividad antimicrobiana de los ácidos se cree que es debida a la capacidad de estos para atravesar la membrana celular y liberarse dentro de la célula causando un daño significativo en el citoplasma celular, por la bajada del pH intracelular, la alteración de la membrana celular, la quelación de metales esenciales para su crecimiento y por la bajada del pH del medio (Valeo et al.2006; Bae et al.2015). Los mecanismos que regulan la tolerancia de las células por el ácido, están relacionados con la capacidad de reparar el daño al ADN, causado por los protones, que dependerán, de la capacidad de la cepa de generar proteínas de choque al estrés (Bae et al., 2015; Lianou et al. 2013).

En el estudio de Lianou et al., 2013 se estudia la variabilidad de las cepas de *L. monocytogenes* frente a su inactivación en condiciones de bajo pH debido a las diferencias moleculares que presentan las cepas respecto a su membrana celular que afectarán a la entrada y salida de los H^+ .

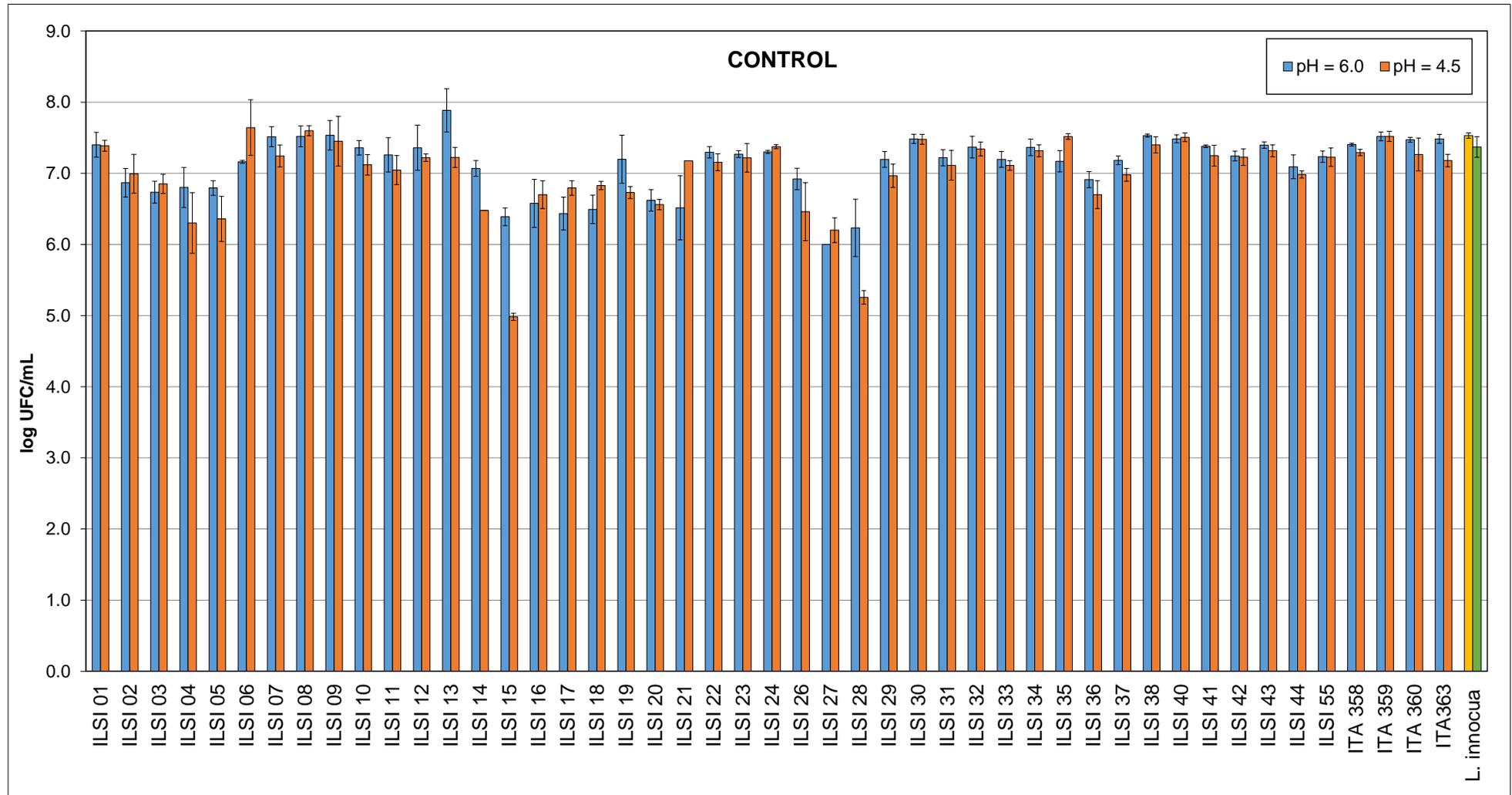


Figura 4. Recuentos obtenidos en las muestras controles para las distintas cepas de *Listeria monocytogenes* y a una cepa de *Listeria innocua* a dos valores de pH 6 (azul) y pH 4.5 (naranja)

Para comprobar cómo se ven afectadas las bacterias con el pH dos de las botellas control (pH 4.5 y pH 6) con recuentos de 7.3 log UFC/mL a pH 6 y 7.0 log UFC/mL a pH 4.5 son introducidas en la estufa a 37°C durante 24 horas. En la figura 5 se observan los resultados obtenidos.



Figura 5. Estudio del efecto del pH. Botellas sin tratar de pH 4.5 (roja) y pH 6 (azul) incubadas a 37°C durante 24 horas.

En esta Figura 5 se observa cómo la botella a pH 6 está mucho más turbia que la de pH 4.5 indicándonos que el crecimiento es mayor. Por lo que ya en este primer análisis de las muestras no tratadas, se aprecian diferencias en el comportamiento de las cepas de *L. monocytogenes* frente a los ácidos.

En la figura 6 se obtienen las reducciones logarítmicas que han sufrido cada una de las cepas a día 1, a día 7 y a día 22 tratadas por HPP a 500 MPa durante 1 minuto. Los resultados a pH 4.5 no se muestran debido a que la inactivación en todos los casos es superior a 5.3 UFC/mL para día 1 y día 7 (límite de detección de nuestro método de análisis) esto nos indica como ya habían visto otros autores que la combinación de pH 4.5 y HPP produce una reducción de más de 5 log UFC/mL de todas las cepas de *L. monocytogenes*, debido a la alta sensibilidad de este microorganismo al ácido (Park et al., 2011; Raybudy-Masilia et al., 2009; Rastogi et al., 2007).

Las reducciones logarítmicas fueron calculadas como diferencia entre los logaritmos obtenidos en los recuentos de las réplicas de controles (CN, no tratados por HPP) y los logaritmos de los recuentos observados tras cada uno de los tratamientos (T, tratados por HPP) de cada una de los días:

$$\text{Reducciones logarítmicas} = \log \text{CN (UFC/ml)} - \log \text{T (UFC/ml)}$$

En la figura 6 se observa una gran variabilidad respecto a las reducciones logarítmicas tras el tratamiento de las distintas cepas a las altas presiones. A día 1 se produce una reducción entre 5.5 a 1.1 log UFC/mL, observándose grandes diferencias de unas cepas a otras. Esto indica que el tratamiento es insuficiente para inactivar estas cepas, ya que no cumple la legislación de Estados Unidos exigida de reducción de 5 log UFC/mL en. El

trabajo de Lianou et al., (2013) muestra como las diferencias entre cepas de *L. monocytogenes* puede variar su inactivación por HPP desde 0,7-7,8 log UFC/mL.

Para estudiar la capacidad de recuperación de las cepas se realizan dos análisis más a día 7 y día 22, conservando las muestras a una temperatura de 12°C que se podría producir en el caso de un mal almacenamiento (abuso de temperatura) de los zumos.

A día 7 para todas las cepas en general se produce una reducción logarítmica inferior a la del día 1 de 1-2 log UFC/mL debido a la recuperación de las bacterias que hace que los recuentos se acerquen más a los niveles inoculados estas cepas son la ILSI 10, 12, 36, 39 y 40 poseen una reducción es similar a día 1.

Las cepas que presentan mayores recuentos y que por lo tanto poseen una mayor capacidad de adaptarse al medio y recuperarse son aquellas que atendiendo a la figura 6 pueden crecer por encima del nivel inoculado transcurridos 22 días (representadas con grados de inactivación negativos).

A día 22 se observa que casi todas las botellas a pH 6 presentan turbidez, esto indica que poseen una contaminación superior a 10^8 UFC/mL, presumiblemente de *L. monocytogenes*. Los recuentos a día 22 de las cepas a pH 4.5 a diferencia de lo observado a día 7 y día 1 muestran crecimiento en algunas cepas (> 2 log UFC/ml). Esto indica que se trata de cepas resistentes a las altas presiones y a condiciones de pH ácido, que sufren un daño subletal pero que pasado los 22 días de conservación son capaces de recuperarse y empezar a proliferar. Estas cepas son la ILSI 7, ILSI 9, la ILSI 10 la ILSI 12, la ILSI 13, ILSI 17, ILSI 35, ILSI 55, ILSI 42, ITA 358, ITA 359, *L.innocua*.

En el caso de las reducciones a día 22 la mayoría de ellas presentan recuentos superiores al control, obteniéndose un resultado negativo (recuentos entre 7 y 9 log UFC/mL). Las únicas cepas que poseen un recuento inferior al inoculado son las cepas ILSI 1, ILSI 6, ILSI 7, ILSI 8, ILSI 21, ILSI 26, ILSI 28, ILSI 35, ILSI 38, ILSI 42 e ILSI 44.

Las cepas que mayores recuentos presentaron fueron las cepas ILSI 09, ILSI 12, ILSI 33 e ILSI 35, tratándose de cepas con un gran poder de recuperación a 12 ° C y tras un tiempo de 22 días. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los que se ha demostrado cómo el efecto de HPP provoca lesiones en las células haciendo que no se detecten inmediatamente después del tratamiento, pero que tras un periodo de 1 a 15 días aparezcan debido a la recuperación y reparación de las lesiones (Koseki et al., 2006; Bozoglu et al., 2004).

Tras la realización de los análisis en el tiempo se observa cómo todas las cepas a pH 6 han crecido a temperatura de 12°C lo que nos indicaría que el tratamiento aplicado es insuficiente a nivel industrial para garantizar la seguridad alimentaria, en el caso de que las inactivaciones fueran similares en zumos reales, ya que no provoca la inactivación total de las bacterias, provocando su recuperación posterior.

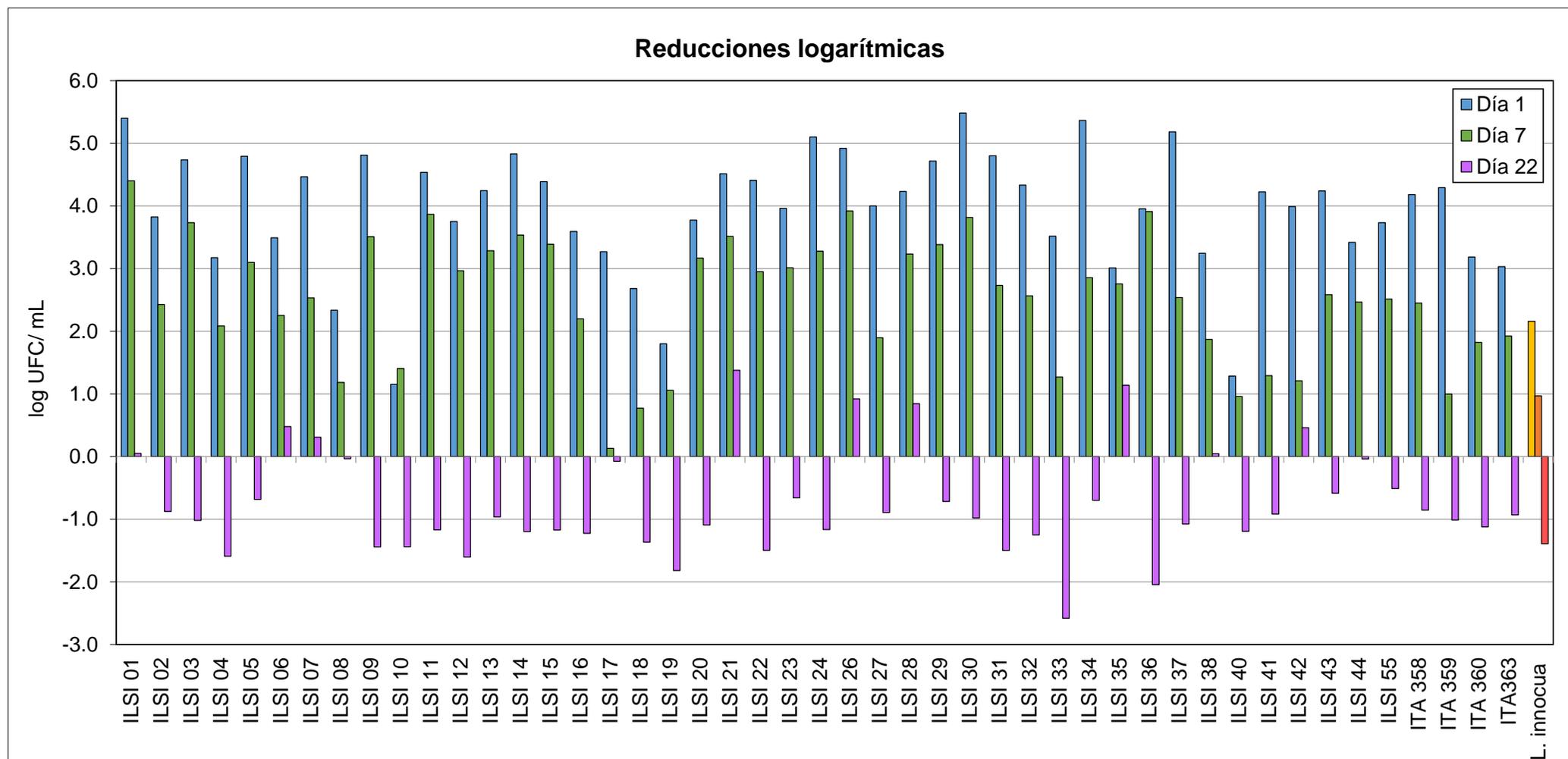


Figura 4. Reducciones logarítmicas para todas las cepas *Listeria monocytogenes* y una cepa de *Listeria innocua* tras un tratamiento de HPP (500 MPa 1 min) a día 1, a día 7 y día 22 a pH 6.

4.2. ANÁLISIS DE LAS RESULTADOS OBTENIDOS Y SELECCIÓN DE LAS CEPAS MÁS RESISTENTES A LAS HPP.

4.2.1 Variabilidad de las cepas

En los histogramas adjuntos a continuación (Figuras 7 y 8), se representa la frecuencia con la que se produjeron las inactivaciones en las cepas para el tratamiento de 500 MPa, 1 min a pH 6 (a) y pH 4.5 (b). Este análisis nos permite ver la variabilidad de la especie, en base a los distintos grados de inactivación obtenidos para cada cepa.

En la figura 7 se observan los histogramas de las muestras control y a 500 MPa 1 min DIA 1 para todas las cepas. En el caso del día 0 se observa que no todas las cepas se adaptaron de igual modo al medio tras inocular 7 log UFC/mL con inactivaciones con respecto al control que varían desde 1.2 log UFC/mL hasta 0.3 log UFC/mL. Esta dispersión en los datos se debe a la sensibilidad de las cepas al ácido.

En el caso del histograma a día 1 se observan grandes diferencias entre los valores de pH. A pH 4.5 (b) se observa una frecuencia de inactivación de 100% en el valor de 5.3 log UFC/mL (límite de detección de nuestro método) debido a que todas las cepas a este pH y a un tratamiento de 500 MPa 1 min están inactivadas.

A pH = 6 (a) la variabilidad es mucho mayor obteniendo valores de inactivación transcurridas 24 h comprendidos entre 1 log UFC/mL a 5.3 log UFC/mL (límite de detección de nuestro método de análisis).

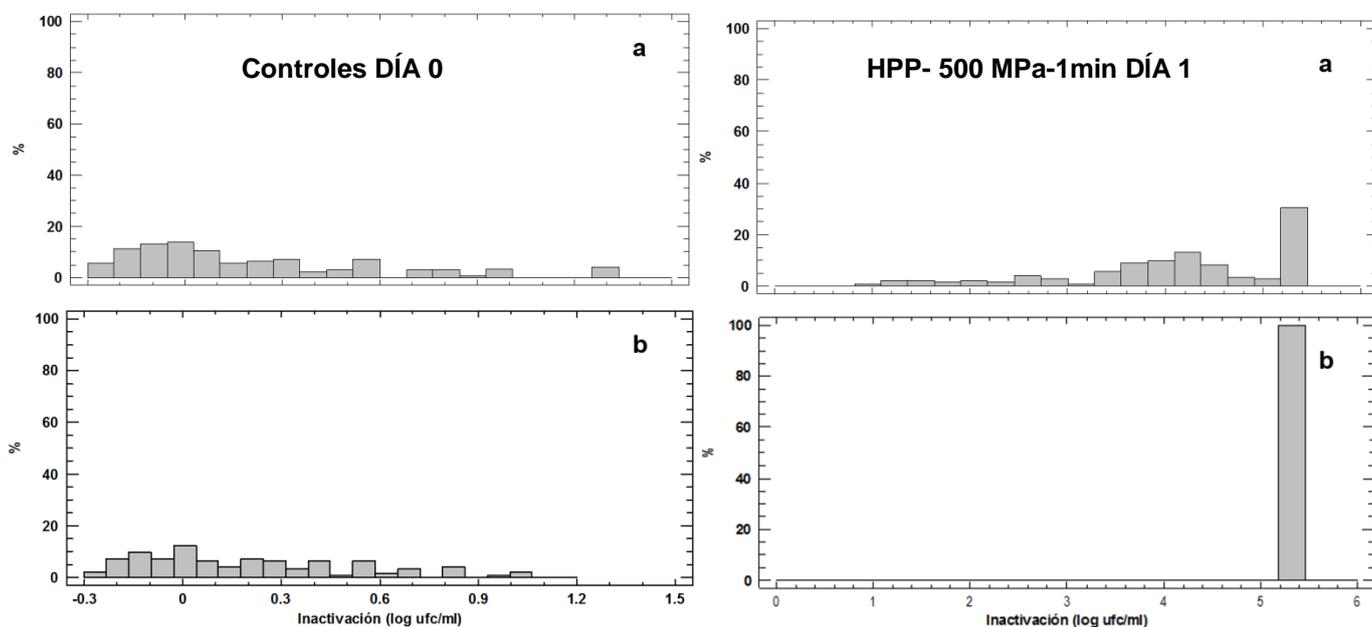


Figura 5. Histograma de frecuencia para día 0 y 1 (a) pH 6 y (b) pH 4.5.

Respecto a los histogramas representando las inactivaciones a día 7 y a día 22, para los dos valores de pH son los que se muestran en la figura 8. En el caso del pH 4.5 a día 7 el histograma es muy similar al obtenido en el día 1, la inactivación es de 5.3 debido a que todas las cepas están por debajo del nivel de detección de nuestro método. Sin

embargo a día 22 como ya habíamos observado en los recuentos algunas cepas son capaces de recuperarse y crecer, por ello en el histograma se observa cierta variabilidad, pero mucha menor de la observada a pH 6 transcurrido el mismo tiempo.

A pH 6 a día 7 el histograma nos muestra una gran variabilidad, con inactivaciones comprendidas entre 0.5 log UFC/mL y superiores a 5 log UFC/mL, lo que indica que existe una gran variabilidad entre las diferentes cepas de *Listeria* a este pH. A pH 6 el día 22 existe también una gran variabilidad con frecuencias cercanas al 20% entre -2 y -1.5 UFC/mL. Estos valores negativos son debidos a que como habíamos observado en los recuentos estas cepas poseen un crecimiento superior que las muestras control.

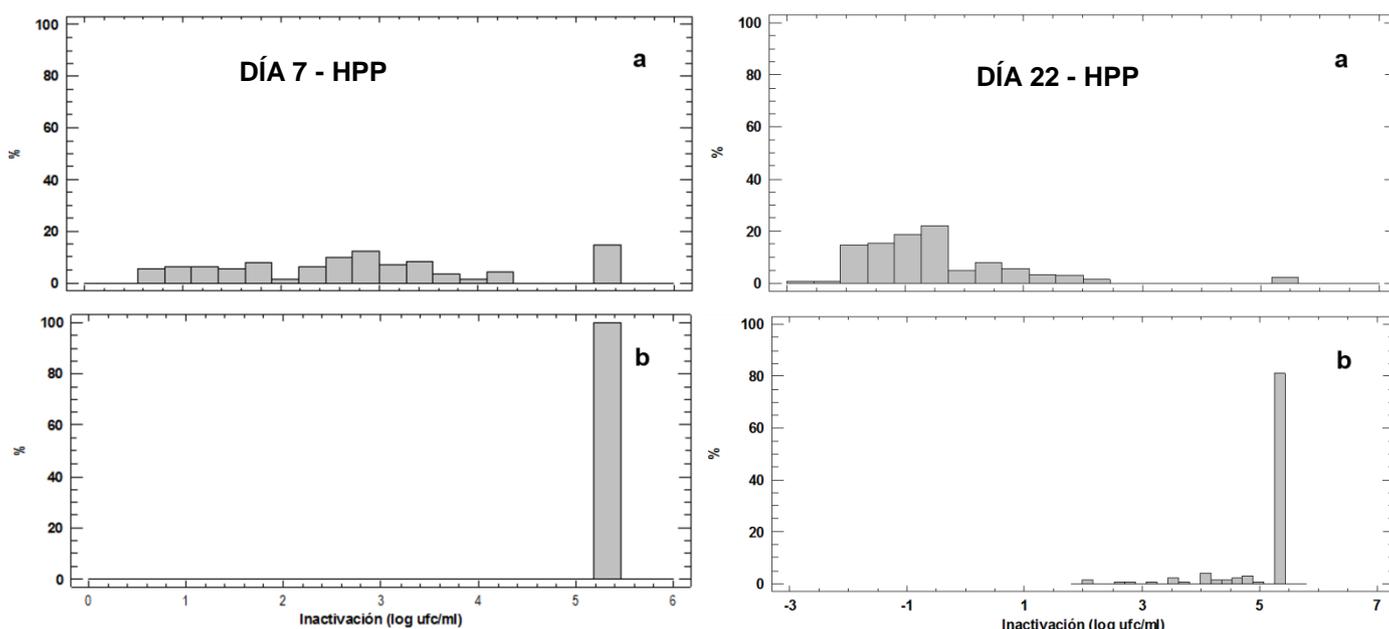


Figura 6. Histogramas de frecuencia para los días 7 y día 22 de todas las cepas a pH 6 (a) y pH 4.5 (b)

4.2.3 Dendrograma:

El dendrograma o algoritmo de clustering es una representación gráfica de los datos en forma de árbol, que clasifica los datos en subcategorías que se dividen en otros hasta llegar al nivel deseado. Este tipo de representación permite realizar grupos según las relaciones entre los datos y según su similitud o cercanía, considerando todas las variables (pH y tiempo en este caso).

El dendrograma o clustering obtenido en este trabajo se muestra en la Figura 9, en el cuál se crearon 3 grupos, agrupando en cada uno de ellos cepas con características similares. Al analizar con más detalles los tres grupos, en el grupo 1 encontramos cepas que están inactivadas a día 1 (recuentos ≤ 2 log UFC/mL) y a día 7 (recuentos ≤ 3 log UFC/mL) y a día 22 tienen una inactivación cercana a 0 por lo que se tratará de las cepas menos resistentes a las altas presiones.

En el grupo 2 (que son el grupo en el que más cepas se incluyen), a día 1 poseen inactivaciones entre 5.3 y 3.7 log UFC/mL, a día 7 poseen inactivaciones entre 4 a 2.2 log UFC/mL y a día 22 los recuentos entre 7.7 a 9 UFC/mL. Lo que nos indica que son las cepas con una resistencia media a las altas presiones.

En el grupo 3 se encuentran las cepas más interesantes para este trabajo ya que poseen inactivaciones a día 1 inferiores a 4 log UFC/mL, a día 7 reducciones inferiores a 2 log UFC/mL, y a día 22 recuentos superiores a 7.8 log UFC/mL.

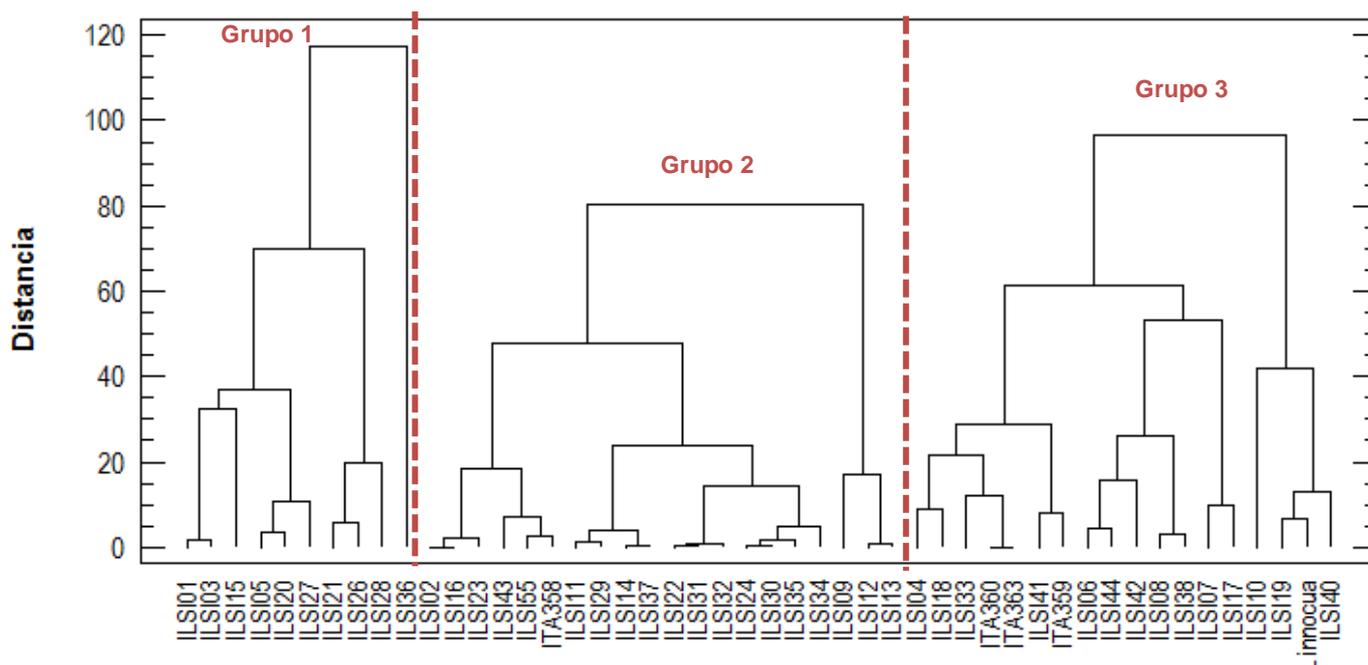


Figura 7. Dendrograma o algoritmo de clustering para todas las cepas estudiadas

Como se observa en la figura 9 el grupo de las cepas más resistentes (grupo 3) es bastante amplio, se deberían realizar más estudios para poder obtener el coctel con las cepas más representativas, en este trabajo seleccionamos las cepas ILSI 10, ILSI 19, L. innocua UBU e ILSI 40 como más interesantes según el objetivo de este trabajo. Estas presentan los mayores recuentos a día 1 y por lo tanto su inactivación fue menor, por lo que se trata de las cepas más resistentes a las altas presiones y que podrían ser seleccionadas para estudios de validación.

4.2.5 Selección de la cepa

Con este estudio se establece que las cuatro cepas más resistentes a las altas presiones y que se pueden emplear en *challenge test* de zumos o en estudios de validación son la cepa ILSI10, la ILSI 19 y la ILSI 40. Las características para las 3 cepas de *Listeria monocytogenes* se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Características de las cepas seleccionadas como más resistentes a las altas presiones.

Cepa	Linaje	Serotipo	Serovar	inl A/C/J	Virulencia	Origen	Casos asociados
ILSI 10	I	2	3c	+/+/+	SI	Humano	Caso esporádico humanos
ILSI 19	III	<i>Listeria</i> spp	4a	+/+/+	SI	Humano	Caso esporádico humanos
ILSI 40	I	3	1/2b	-/+/+	Probable virulenta	Humano	Epidemia Illinois (1994)

Al observar las características de las cepas se observa cómo poseen unas características distintas, siendo las más virulentas la ILSI 10 y 19 pero la causante de epidemias únicamente la ILSI 40. Todas ellas tienen un origen humano y cada una de ellas presenta un serovar distinto, siendo la ILSI 40 perteneciente al serovar que más infecciones en humanos causa.

La cuarta cepa seleccionada como más resistente es la cepa *L. innocua* UBU, aislada en una industria cárnica y cuyo comportamiento es similar a *L.monocytogenes* pero sin ser patógena para el ser humano. Esta cepa de *Listeria innocua* muestra una resistencia comparable a las cepas de *L.monocytogenes* más resistentes por lo que se podría emplear para poner a punto procesos o tratamientos de conservación sin suponer un riesgo de contaminación para la salud teniendo un gran potencial de ser empleada como surrogate (microorganismo subrogado).

En Estados Unidos los estudios de validación se realizan con cócteles de 5 cepas (21 CFR de la FDA), en nuestro caso realizamos un estudio con una cepa como ejemplo de lo que se debería hacer con el resto de cepas en próximos estudios, basándonos en la información obtenida y analizada en los clusters. De entre ellas elegimos la cepa 40 debido a que es la cepa de origen humano, que pertenece al serovar causante de infecciones más común en humanos y que en el cluster aparece como más resistente y se diferencia un poco más del resto de cepas.

Con este primer experimento se observa cómo la variabilidad intra-especie dentro de un mismo microorganismo puede influir de forma muy notable en su comportamiento de inactivación, (Lianou et al., 2013).

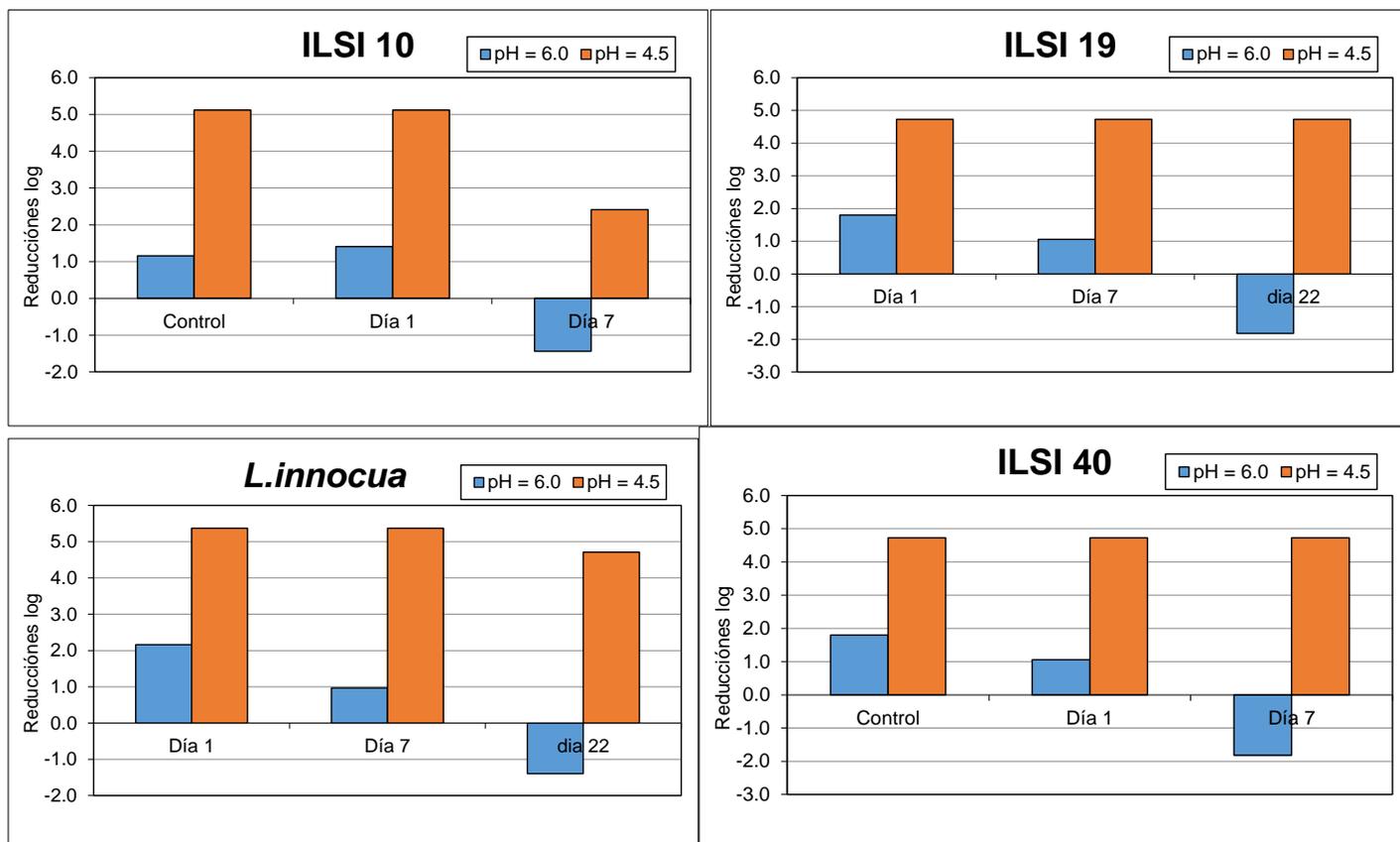


Figura 8. Reducciones logarítmicas para las cinco cepas seleccionadas como más resistentes a día 1, día 7 y día 22 a pH 6 y a pH 4.5

También podemos concluir que es necesario sentar las bases y criterios para el diseño de cócteles que se utilicen en estudios de validación. La tarea de elegir las cepas más representativas para ser empleadas en estudios de validación está influenciada por numerosos factores, pero es de vital importancia en el diseño de cócteles. Para ello, a continuación se procedió a caracterizar una de las cepas más resistentes en función de las condiciones de tratamiento y del medio.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA RESISTENTE

La siguiente parte de este trabajo consistió en evaluar el efecto frente a distintos tratamientos HPP donde variaron las condiciones intrínsecas del proceso (presión y tiempo) y las condiciones extrínsecas al mismo (pH de la matriz) sobre una de nuestras cepas seleccionadas como más resistente para ver su adecuación en los *challenge test*.

Para la caracterización de una de las cepas más resistentes se procedió a evaluar su comportamiento frente a distintos tratamientos HPP donde variaron las condiciones intrínsecas del proceso (presión y tiempo) y las condiciones extrínsecas al mismo (pH de la matriz).

En el primer caso se mantuvieron constantes los parámetros del proceso (500 MPa, 1 min) y se varió el pH de la matriz (pH = 6, 5, 4 y 3) con el fin de evaluar el efecto del

mismo sobre el grado de inactivación de la bacteria. En cuanto al segundo criterio de evaluación se aplicaron tratamientos de 500 y 600 MPa durante 1, 2, 3, 4 y 5 min sobre la matriz inoculada a pH = 6, pues es el valor al cuál más resistencia exhibió la cepa evaluada

4.3.1. Estudio del efecto del pH

Se estudió el efecto del pH (3, 4, 5, y 6) sobre la cepa de *L. monocytogenes* ILSI 40, para comprobar cómo afecta el pH a la cepa y el efecto sinérgico con las altas presiones, pudiendo establecer una relación previa con el tipo de zumos (según su pH) con los que proporcionaría un inactivación similar por HPP. Los valores de pH de algunos de los zumos se muestran en la tabla 5 (Jordan et al., 2001; Raybaudi-Masisilia et al., 2009; FDA, 2013).

Tabla 5. pH de algunos de los zumos consumidos

Zumo	pH
Agua de coco	6.0
Zumo de melón	5.45
Zumo de papaya	5.41
Zumo de pera	4.60
Zumo de mango	4.21
Zumo de manzana	3.94
Zumo de piña	3.43

En este análisis de 500 MPa 1 minuto los resultados son inferiores (3.5 log UFC /mL) a los obtenidos en el experimento 1 (6.2 log UFC /mL). Esto se debe a que en el primer experimento se mira el crecimiento a las 24 horas, lo que puede provocar la recuperación de la bacteria y en este experimento se hace inmediatamente lo que impide su recuperación. Esta variación en los resultados de un análisis a otro es debido al efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento de las muestras tratadas. Diversos artículos hablan sobre este tema indican que la temperatura y el tiempo de almacenamiento influyen en el de crecimiento de *Listeria*, provocando una mayor recuperación cuando ésta se conserva en temperaturas de refrigeración durante 24 horas (Bull et al., 2005; Koseki et al., 2006; Rastogi et al., 2007; Juck et al., 2011). Este efecto es debido a varios fenómenos por un lado a que un tiempo de recuperación a una temperatura óptima para una bacteria psicrótrofa como *L. monocytogenes* (4-12 °C) provoca una reparación de las lesiones producidas por las HPP, aumentando su crecimiento y por otro lado a la acción del ácido, a altas temperaturas se produce una mayor fluidez de la membrana y por lo tanto una mayor entrada del ácido a la célula. Si las muestras se conservan en refrigeración la membrana estará más rígida dificultando la entrada del ácido e impidiendo su efecto antimicrobiano (Raybaudi-Massilia et al., 2009).

Los resultados obtenidos son los que se muestran en la figura 11, para todos los pH, sometidos a una presión de 500 MPa durante 1 minuto.

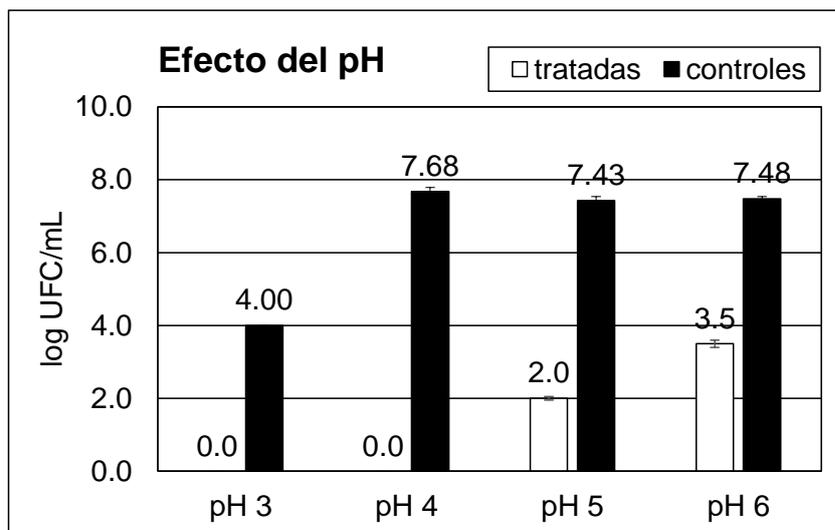


Figura 9. Estudio de diferentes valores de pH para la cepa ILSI 40, después de un tratamiento de HPP de 500 MPa 1 min.

Como ya habían observado Park et al., 2011 y Valero et al. 2006 en la figura 11 vemos la gran dependencia de *L. monocytogenes* con el pH. Resultados que ya se observan en los controles, donde a un pH de 3 se observa una reducción de la población inicial de 3 log solo por el efecto del pH.

En las muestras en las que se combina HPP (500 MPa 1 min) y un valor de pH inferior a 5 se produce la inhibición total de *Listeria monocytogenes*, en el caso de pH 6 se produce una reducción de 4 log UFC/mL, mientras que a pH 5 se produce una reducción de 5.4 log UFC/mL.

En algunos estudios se ha observado el efecto del pH sobre *L. monocytogenes* obteniéndose la inactivación de esta bacteria con pH inferiores a 4.4 o 5.3 (Rathnayaka., 2013; Raybaudi-Massilia et al., 2009).

Para profundizar en la evaluación del comportamiento de cepas resistentes a la alta presión se deberían realizar también estudios con matrices reales de zumos y observar cómo le pueden afectar la composición del zumo (azúcares, ° brix, sales, tipo de ácido orgánico mayoritario...). Según este primer estudio los zumos con más probabilidad de crecimiento serán los zumos con valores de pH más altos como el zumo de melón de papaya, de sandía, zumos verdes (a base de hortalizas) o el agua de coco. Con este experimento podemos concluir como el pH del medio es un factor muy importante a tener en cuenta en la inactivación de *L. monocytogenes* por altas presiones.

4.3.2. Estudio de los parámetros del proceso de HPP:

Se realizó un análisis para establecer cuáles son las condiciones de presión y tiempo que provocan la inactivación total de una de las cepas seleccionada como más resistente y establecer su resistencia frente a las altas presiones. Se realiza el estudio de dos presiones (500 y 600 MPa) a tiempos de 1, 2, 3, 4 y 5 minutos. El análisis se realiza justo después del tratamiento lo que impide a las células recuperarse obteniéndose recuentos inferiores (e inactivación mayor) a los del experimento 1.

Estas presiones fueron seleccionadas de acuerdo con estudios previos (Jordan et al., 2001 y Andrés et al., 2016) en los que presiones superiores a 500 MPa y 5 min provocaban inactivaciones de más de 5 log UFC/mL en zumo de naranja y zumo de tomate y porque son las empleadas normalmente en la industria de zumos.

Tras el análisis a día 0, las muestras son llevadas a incubar a una temperatura de 25°C durante una semana para comprobar si la inactivación era completa o por el contrario se encontraba por debajo del límite de detección de la técnica empleada, como criterio de detección se empleó la presencia de turbidez dentro de las botellas.

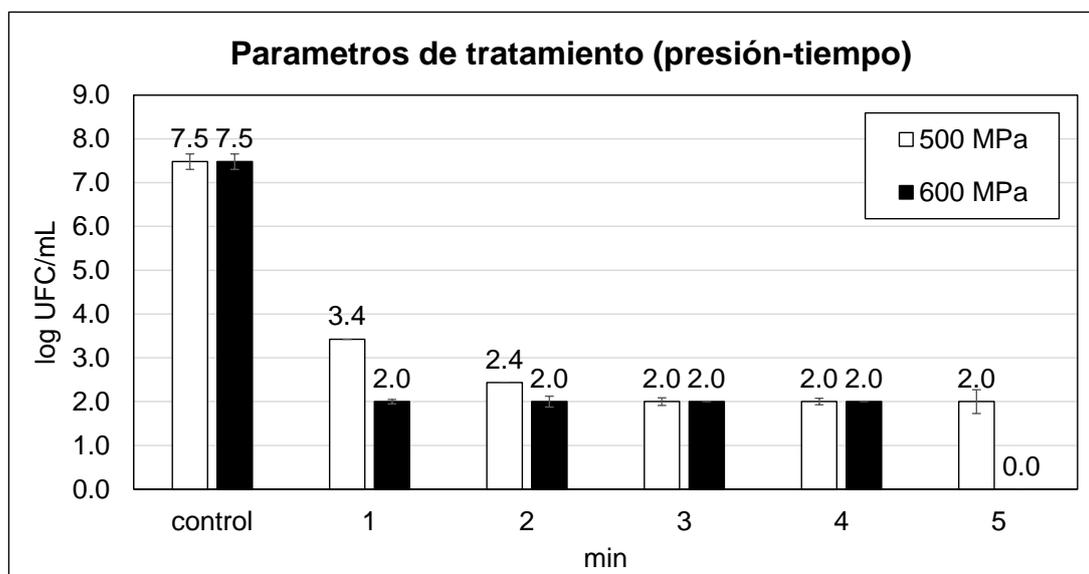


Figura 10. Recuentos obtenidos en los diferentes tratamientos para la cepa ILSI 40 a un pH=6.

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos en los dos tratamientos referidos. En el tratamiento a 500 MPa, a cualquiera de los tiempos de tratamiento se observa una gran resistencia, permaneciendo por debajo del límite de detección de la técnica (2 log UFC/mL) a tiempos de procesado superiores a los 3 min. Además la recuperación de *L. monocytogenes* en este tratamiento es mucho más rápida, pues transcurridas 24 horas todas las botellas ya estaban turbias (resultados no mostrados para no hacer más extensa esta memoria), lo que evidencia que la cepa resiste a esta presión a cualquiera de los tiempos estudiados.

Respecto a la presión de 600 MPa se observa cómo el recuento es inferior a 2 log UFC/mL con reducciones logarítmicas superiores a 5.4 log UFC/mL. En el análisis de las

botellas para ver si la inactivación es completa, las botellas de 600 MPa a 1, 2, 3 y 4min presentan turbidez debida a *L. monocytogenes* lo que nos indica que la inhibición no ha sido total.

Con estos resultados podemos concluir que para la cepa ILSI 40 será necesario una presión superior a 600 MPa durante 4 min para la inactivación completa a pH = 6. En el caso de la presión de 500 MPa será necesario un estudio de tiempos superiores para observar la inhibición total de esta cepa.

Será importante un estudio previo de las presiones y del tiempo de tratamiento para optimizar el tratamiento de HPP y lograr una buena combinación de tiempo-presión-ciclos que produzca una mayor reducción logarítmica de los patógenos con un menor gasto económico.

En estudios posteriores este trabajo se podría ampliar con la caracterización de las cepas seleccionadas como resistentes, realizando cócteles de cepas y estudios de validación, y realizando ensayos en zumos reales

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones establecidas a partir de los resultados anteriores son:

1. Existe una gran variabilidad entre las cepas patógenas respecto a su comportamiento frente a los métodos de inactivación como las altas presiones. La eficacia de la tecnología de HPP dependerá de la diversidad dentro de la especie y de la matriz del alimento
2. Este estudio confirma que *Listeria monocytogenes* es una bacteria muy afectada por el pH del medio y la presencia de ácidos orgánicos, por lo que será un factor importante a controlar en los tratamientos
3. El tratamiento de HPP combinado con un pH inferior a 4.5 produce una reducción superior a 5 log UFC/mL a día 1 y 7 para todas las cepas.
4. La cepa de *Listeria innocua* UBU se podría emplear como sustituto de *Listeria monocytogenes* en estudios de validación del tratamiento con altas presiones en zumos, sin que suponga un riesgo para la salud, aunque se deberían realizar más estudios con zumos reales para confirmarlo. El tiempo y la temperatura de almacenamiento influyen notablemente en el efecto subletal producido por las altas presiones.
5. La cepa ILSI 40 seleccionada como una de las más resistentes, presenta una inactivación completa a pH inferior a 5 y un tratamiento de 500 MPa 1 min. En el estudio de los parámetros de presión y tiempo, la inactivación completa para

esta cepa se producirá en tiempos de tratamientos superiores a 4 min y 600 MPa.

6. La variabilidad entre las cepas patógenas de un mismo microorganismo es un factor importante en la seguridad de los alimentos, influyendo de forma muy notable en su comportamiento en la inactivación. Se deben realizar estudios previos de los patógenos para sentar las bases y criterios para el diseño de cócteles que se utilicen en estudios de validación

6. BIBLIOGRAFÍA

- Andrés, V., Villanueva, M.J. & Tenorio M.D. (2015). Influence of high pressure processing on microbial shelf life, sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content of milk- and soy-smoothies. *Food Science and Technology*. 65, 98–105.
- Bae, Y.M., & Lee, S.Y. (2015). Combined effects of organic acids and salt depending on type of acids and pathogens in laboratory media and acidified pickle. *Journal of applied microbiology*. 119, 455–64.
- Bozoglu, F., Alpas H., & Kaletunc G. (2004). Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 40, 243-7.
- Bull, M.K., Hayman, M.M., Stewart, C.M., Szabo, E.A., & Knabel, S.J. (2005). Effect of prior growth temperature, type of enrichment medium, and temperature and time of storage on recovery of *Listeria monocytogenes* following high pressure processing of milk. *International Journal of Food*. 101, 53–61.
- Bull, M.K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., Stockman, R, Sellahewa J., Szabo, E.A., Johson R.L. & Stewart, C.M. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 5, 135–149.
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., & Pazos-rojas, L. A. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo” Quantification of cultivable bacteria by the “Massive Stamping Drop Plate” method. *Colombia Biotecnología*. 14, 147–156.

- Dongyou, L., Lawrence, M.L., Frank, W., & Austin, A.J.A. (2007). A multiplex PCR for species and virulence specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*. 71, 133-140.
- EFSA. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13, 4329
- Food and Drug administration FDA (2004) Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition; Final Guidance. Disponible en:<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm>
- Food and Drug administration FDA (2013)pH of Foods and Food Products - Acidity / Alkalinity or Fruit, Vegetables and Foods to Help in Home Canning and Food Preservation. Disponible en: http://www.pickyourown.org/ph_of_foods.htm#6lEpFV28Vq5PB2a2.99
- Hiremath N.D. & Ramaswamy, H.S. (2012). High-pressure destruction kinetics of spoilage and pathogenic microorganism in mango juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36, 113–125.
- Jofré, A., Aymerich, T., Bover-cid, S. & Garriga, M. (2010). Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. *International microbiology*.105–112.
- Jordan, S.L., Pascual, C., Bracey, E. & Mackey, B.M. (2001). Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of applied Microbiology*.91, 463–469.
- Juck, G., Neetoo, H., Beswick, E. & Chen, H. (2011). International Journal of Food Microbiology Influence of prior growth conditions, pressure treatment parameters, and recovery conditions on the inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Salmonella Typhimurium* in turkey meat. *International Journal of Food Microbiology*. 153, 203–211.
- Koseki, S., Mizuno, Y., & Yamamoto., K. (2008). Use of mild-heat treatment following high-pressure processing to prevent recovery of pressure-injured *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology*. 25, 288–293.

- Koseki, S. & Yamamoto, K. (2006). Recovery of *Escherichia coli* ATCC 25922 in phosphate buffered saline after treatment with high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 110, 108–111.
- Lianou, A., & Koutsoumanis, K.P. (2013). Microbiology Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens : A review. *International Journal of Food Microbiology*. 167, 310–321.
- Muñoz-Cuevas, M., Guevara, L., Aznar, A., Martínez, A., Periago, P.M. & Fernández, P.S. (2013). Characterization of the resistance and the growth variability of *Listeria monocytogenes* after high hydrostatic pressure treatments. *Food Control*. 29, 409–415.
- Park, S., Choi, M., Park, J., Park, K., Chung, M., Ryu, S. & Kang, D. (2011). Use of Organic Acids to Inactivate *Escherichia coli* monocytogenes on Organic Fresh Apples and Lettuce. *Journal of Food Science*. 76, 293-98.
- Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S. M.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjan & Knorr, K. (2007). Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods. *Food Science and Nutrition*. 1040- 8398 1457-7852.
- Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., & Martín-Belloso, O. (2009). Antimicrobial activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple, pear and melon juices. *Food Control*. 20, 105–112.
- Rathnayaka, R.M.U.S.K. (2013). Antibacterial effect of malic acid against *L. monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *E. coli* in mango, pineapple and papaya juices. *American Journal of Food Technology*. 1557-4571.
- Russell, N.J. (2002). Bacterial membranes : the effects of chill storage and food processing. An overview, *International Journal of Food Microbiology*. 79, 27-34.
- Tonello-Samson, C., (2014). Advances in high pressure processing: case studies, *IFT Annual Meeting & Food Expo*.
- Uckoo, R.M., Jayaprakasha, G K., Somerville, J.A., Balasubramaniam, V.M., Pinarte, M., & Patil, B.S. (2013). High pressure processing controls microbial growth and minimally alters the levels of health promoting compounds in grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad) juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 18, 7–14.

- Valero, A., Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., García-Gimeno, R.M. & Zurera, G., (2006). Growth / no growth model of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, citric acid and ascorbic acid. *Eur Food Res Technol.* 224, 91-100.