

## Efecto de la adaptación de *Listeria monocytogenes* a tratamientos térmicos subletales en su resistencia al calor

### Effect of the adaptation of *Listeria monocytogenes* to sublethal heat treatments on its resistance to heat

A. Luciano<sup>1\*</sup>, S. Guillén<sup>1,2</sup>, A. Palop<sup>1</sup>, P.S. Fernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

<sup>2</sup>Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 - Universidad de Zaragoza-CITA, Zaragoza, España.

\*antonio.luciano@upct.es

#### Resumen

*Listeria monocytogenes* es una de las bacterias patógenas más comunes que pueden encontrarse en los alimentos porque puede adaptarse muy bien a factores estresantes como temperaturas bajas o pH ácidos. Las verduras envasadas, la leche sin pasteurizar, el queso y los productos cárnicos son los alimentos en los que se puede encontrar. La mayoría de estos productos están expuestos a tratamientos térmicos para asegurar su conservación. En algunas circunstancias, esta bacteria puede aumentar su resistencia térmica, si se trata a temperaturas subletales. El objetivo de esta investigación fue seleccionar poblaciones de *L. monocytogenes* resistentes al calor tras aplicar tratamientos térmicos prolongados a temperaturas de tratamiento bajas (1 hora a 55°C) y tratamientos térmicos cortos a temperaturas altas (1 minuto a 65°C). Los resultados obtenidos muestran que el microorganismo es capaz de aumentar su resistencia al calor en ambas situaciones, tras ciclos sucesivos de tratamiento térmico y crecimiento.

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*; inactivación térmica; pasteurización.

#### Abstract

*Listeria monocytogenes* is one of the most common foodborne pathogenic bacteria. It can adapt very well to stressors such as low temperatures or acidic pH. It is mostly found in food product like packaged vegetables, raw milk, cheese, and meat products. Most of these food products undergo a heat treatment to ensure preservation. In some circumstances, this bacterium can increase its heat resistance, if treated at sub-lethal temperatures. The aim of this study was to select heat-resistant populations of *L. monocytogenes* after prolonged heat treatments: long heat treatment at a lower temperature (1 hour at 55°C) and short heat treatments at a higher temperature (1 minute at 65°C). The obtained results show that the *L. monocytogenes* is able to increase its heat resistance in both situations, after successive cycles of heat treatment and growth.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; thermal inactivation; pasteurization.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* es una de las bacterias patógenas más relevantes en el mundo alimentario. Si bien causa relativamente pocos casos de enfermedades de transmisión alimentaria, es una de las bacterias que más letalidad causa (1). Esta bacteria es capaz de desarrollar resistencia a las condiciones adversas de los medios alimenticios. De hecho, se puede encontrar en muchos alimentos que no hayan sido sometidos a tratamientos térmicos previos,

como por ejemplo leche cruda, vegetales confeccionados, leche no pasteurizada, quesos y productos cárnicos. La resistencia al calor de los microorganismos en los alimentos se ve afectada tanto por la composición del alimento como por la condición fisiológica de las células o esporos microbianas. Las características de los alimentos que conducen a una mayor resistencia al calor de un organismo incluyen la actividad del agua y la presencia de carbohidratos, lípidos, proteínas, sal, etc. Las células en fase estacionaria de crecimiento son más tolerantes al calor que las células en fase logarítmica. Además, la resistencia al calor de las bacterias tiende a aumentar a medida que aumenta la temperatura de incubación.

Han aparecido informes contradictorios en la literatura sobre la posibilidad de que *L. monocytogenes* pueda sobrevivir a la pasteurización de la leche. Beams y Girard (2), en 1958, fueron los primeros en demostrar que el organismo puede sobrevivir a un proceso de pasteurización a 61,7 °C durante 35 min. *Listeria* es capaz de desarrollar una resistencia al tratamiento térmico cuando se somete a periodos cortos de adaptación, denominados choques térmicos (3).

En este trabajo, nuestro objetivo ha sido lo de demostrar si esta bacteria era capaz de desarrollar una resistencia al calor tras aplicar tratamientos térmicos prolongados a temperaturas de tratamiento bajas y tratamientos térmicos cortos a temperaturas altas.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Microorganismo**

Se utilizó la cepa de *Listeria monocytogenes* CECT 4032, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Se prepararon cultivos de este microorganismo en caldo de triptona y soja (TSB, Scharlab, Barcelona, España) con incubación a 37 °C durante 24 h, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (aprox. 10<sup>9</sup> microorganismos/mL).

### **2.2 Determinaciones de termorresistencia**

Se realizaron en un termorresistómetro Mastia (4) en caldo TSB. Una vez atemperado a la temperatura de tratamiento, se inocularon 0,2 mL del cultivo en TSB y se tomaron muestras a tiempos preestablecidos según la temperatura de tratamiento. Se utilizaron dos temperaturas de tratamiento distintas, 55 y 65 °C.

### **2.3 Ciclos de tratamiento térmico - crecimiento**

Tras 1 hora de tratamiento a 55 °C o 1 minuto a 65 °C, correspondientes en ambos casos a una inactivación aproximada de 4 ciclos logarítmicos, se tomó una muestra de 1 mL, que se sembró en 5 mL de caldo TSB y se incubó durante 24 h a 37 °C. Tras esta incubación, el cultivo se utilizó de nuevo como inóculo para realizar un nuevo experimento en el termorresistómetro. Este ciclo de crecimiento inactivación se repitió diez veces para cada una de las temperaturas de tratamiento.

### **2.4 Incubación y recuento de supervivientes**

En los experimentos de inactivación, para cada uno de los tiempos de muestreo se realizaron las correspondientes diluciones decimales en agua de peptona (SCharlab), se sembraron en agar de triptona y soja (TSA, Scharlab) y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Los recuentos de supervivientes se representaron en las correspondientes gráficas de supervivencia, a partir de las que se calcularon los tiempos de reducción decimal o valores *D* (tiempo necesario para inactivar a un 90% de la población de microorganismos).

### **2.5 Tratamiento estadístico de los resultados**

Los experimentos se realizaron, al menos, por triplicado. Para cada uno de los valores *D* se calculó el coeficiente de regresión ( $r_0$ ) y los intervalos de confianza para el 95% inferior y superior.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*L. monocytogenes* mostró una resistencia al calor caracterizada por un valor  $D_{55\text{ }^\circ\text{C}}$  de 15 minutos y un valor  $D_{60\text{ }^\circ\text{C}}$  de 16 s. Cuando fue sometida a ciclos de inactivación y posterior crecimiento de los supervivientes al tratamiento térmico su valor  $D$  fue aumentando progresivamente, hasta prácticamente duplicarse a ambas temperaturas. La Fig. 1 muestra, a modo de ejemplo, las gráficas de supervivencia obtenidas a 55 °C tras 2 y 7 ciclos de inactivación-crecimiento, en las que se puede observar ese aumento de la resistencia térmica. La Fig. 2 muestra el resultado obtenido a la temperatura de 65°C, en la que también se pueden observar un efecto similar.

Entre los mecanismos de adaptación al calor, la síntesis de proteínas del choque térmico (HSPs) es uno de los más conocidos y más habituales entre las bacterias (2). Estas son sintetizadas, en tiempos tan cortos como 2 minutos, cuando los microorganismos son sometidos a tratamientos térmicos subletales. Así, la síntesis de HSPs podría explicar el aumento de resistencia observado a 55°C. Sin embargo, la inactivación a 65°C se produce de manera mucho más rápida, alcanzándose 4 ciclos logarítmicos de inactivación en aproximadamente 1 minutos. Este tiempo es demasiado corto como para permitir la síntesis de HSPs a esa temperatura, por lo que se plantea que podría haber otros mecanismos detrás del aumento de resistencia tras los ciclos de crecimiento - inactivación, al menos a temperaturas elevadas.

### 4. CONCLUSIONES

Estos resultados abren nuevos escenarios en relación a la pasteurización de alimentos, que debería ser capaz de prevenir que los microorganismos fueran capaces de adaptarse a las temperaturas de tratamiento. Este comportamiento se debería tener en cuenta a la hora de diseñar tratamientos térmicos efectivos para conservar alimentos, los cuales deberían evitar etapas de calentamiento innecesarias.

### 5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido posible gracias al Proyecto PID2020-116318RB.C32 por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación y de la Agencia Estatal de Investigación.

### 6. REFERENCIAS

1. EFSA (European Food Safety). The European Union One Health 2021 zoonoses report. EFSA J. 2022;20(12):e07666.
2. Bearns RE, Girard KF. The effect of pasteurization on *Listeria monocytogenes*. Can J Microbiol. 1958;4(1):55-61.
3. Linton RH, Pierson MD, Bishop JR. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. J Food Prot. 1990;53(11):924-7.
4. Conesa R, Andreu S, Fernández PS, Esnoz A, Palop A. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. J Appl Microbiol. 2009;107(2):506-13.

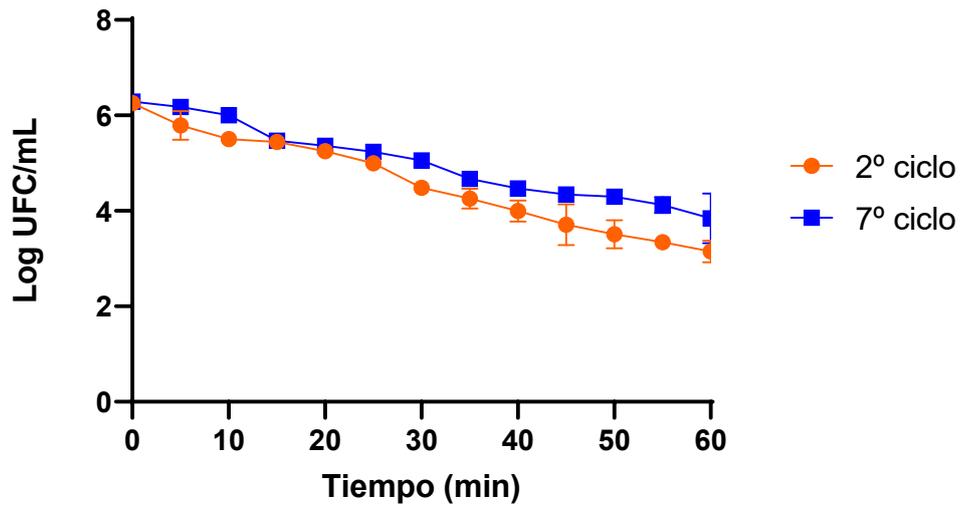


Figura 1. Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en caldo TSB a 55°C

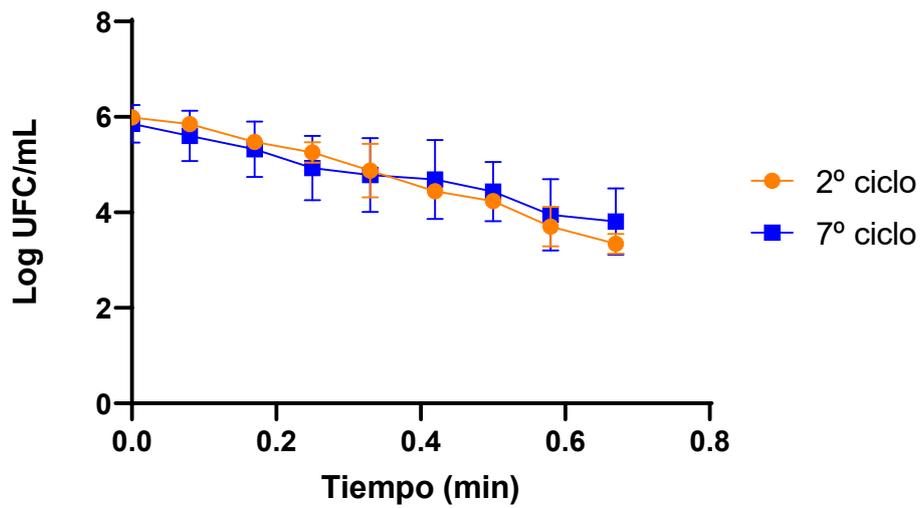


Figura 2. Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en caldo TSB a 65°C