



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena



**Máster Universitario en  
Técnicas Avanzadas en Investigación y  
Desarrollo Agrario y Alimentario**

**Condiciones de inactivación de *Listeria monocytogenes* por  
tratamiento suave en distintos alimentos**

Alumno: Vincenzo De Matteis  
Director: Dr. Pablo Fernández Escámez  
Co-Director: Dr. Alberto Garre Pérez

Cartagena, Octubre 2018



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena

### AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

Los Drs. Pablo Fernández Escámez y Alberto Garre Pérez

#### **EN CALIDAD DE DIRECTORES INFORMAN:**

Que el trabajo titulado “Condiciones de inactivación de *Listeria monocytogenes* por tratamiento suave en distintos alimentos”, ha sido realizado por D. *Vincenzo De Matteis* bajo nuestra dirección y supervisión en los laboratorios del área de Tecnología de Alimentos del Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola al amparo del Proyecto de Investigación del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad AGL 2017-86840-C2-1-R y a los fondos FEDER.

En Cartagena, a 8 de octubre de 2018

Fdo.: Dr. Pablo Fernández Escámez

PABLO SALVADOR|  
FERNANDEZ|  
ESCAMEZ

Firmado digitalmente por PABLO SALVADOR|  
FERNANDEZ|ESCAMEZ  
Nombre de reconocimiento (DN): cn=PABLO  
SALVADOR|FERNANDEZ|ESCAMEZ,  
serialNumber=274623667, givenName=PABLO  
SALVADOR, sn=FERNANDEZ|ESCAMEZ,  
ou=Ciudadanos, o=ICIT, c=ES  
Fecha: 2018.10.08 22:44:40 +02'00'

Fdo.: Dr. Alberto Garre Pérez

## ***Agradecimientos***

Agradezco grandemente a mis directores, Dr. Pablo Fernández Escámez y al Dr. Alberto Garre Pérez que sin su gentil y expresa ayuda, no hubiese podido finalizar este trabajo.

Agradezco al Profesor Alfredo Palop por su invaluable ayuda, la cual ha sido de gran importancia para la realización de esta tesis.

Agradezco a mis compañeros de la UCTP y en especial a Marta Clemente Carazo por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico y por la paciencia que ha tenido y a Gerardo González Tejedor por sus consejos y recomendaciones en el proceso de desarrollo del trabajo.

Agradezco a mi familia por apoyarme y soportarme.

Agradezco a la persona que mas no me ha permitido de desanimarme mi hermosa novia Uruguay, Veronica.

Y porfin, agradezco a todos los hombres y mujeres de ciencia cuyos sacrificios, en el pasado como hoy, han permitido que la ciencia sea enseñada y divulgada a todos, para que la humanidad no viva en las nubes de superstición y oscurantismo, y que no crean en el dicho comun que 'la ciencia considera bueno solo lo que funciona, y malo lo que no'.

Sin ellos hoy no estaría aquí.

VINCENZO

# Índice

1.1	Objetivos:.....	4
1.2	Introducción.....	4
1.3	Listeria Monocytogenes.....	6
1.3.1	Características microbiológica e identificación.....	7
1.3.2	Vías de transmisión.....	8
1.3.3	Patogenicidad.....	9
1.3.4	Epidemiología.....	9
2	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	11
2.1.	Descripción del Termorresistometro.....	11
2.2	Fase preliminar al tratamiento isotermico.....	14
I.	Preparación del inculo.....	14
II.	Pre-Tratamiento del Termorresistometro.....	14
III.	Preparación de los Medios de tratamiento.....	14
IV.	Preparación de los medio de cultivo.....	16
2.3.	Tratamiento isòtermico.....	17
3)	<b>RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÒN</b> .....	21
3.1	Modelización de datos experimentales.....	23
3.2	Modelos matemáticos aplicados.....	25
3.3	Modelización de datos obtenidos en caldo TSB.....	25
3.4	Modelización de datos obtenidos en smoothie.....	27
3.5	Modelización de datos obtenidos en leche.....	30
4)	<b>CONCLUSIONES</b> .....	33
5)	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	34

## **1)PROLOGO**

### **1.1 Objetivos:**

El objetivo global de este trabajo consiste en caracterizar el riesgo microbiológico asociado a dos alimentos líquidos representativos de productos clásicos y nuevos, como son la leche y el smoothie. Para alcanzarlo se plantean los siguientes objetivos parciales:

- a. Determinación de la resistencia térmica de *L. monocytogenes* en leche UHT.
- b. Determinación de la resistencia térmica de *L. monocytogenes* en smoothie.
- c. Modelización de datos cinéticos obtenidos y optimización de tratamientos.

Por razones experimentales, los dos tratamientos han sido comparados integrándolos con unos corrientes utilizando un medio nutritivo cual es el TSB. Tryptic Soy Broth (TSB) es un medio nutritivo que apoya el crecimiento de una amplia gama de microorganismos, en particular los aerobios comunes y los anaerobios facultativos. (Marshall, R.T. (ed.1993)). ((MacFaddin, J.F. 1985.). El TSB se acidificò con la intención de crear un ambiente particular y estudiar su comportamiento en esta condición juntas al tratamiento termico.

### **1.2 Introducción**

Los hábitos alimentarios de la población humana han estado cambiando a lo largo de los últimos años debido al rápido ritmo de vida actual, con escaso tiempo para la preparación de comidas sanas y equilibradas. Esta situación ha desencadenado en una mayor demanda de alimentos naturales y frescos listos para el consumo directo, pero manteniendo los altos estándares de seguridad microbiológica. El principal objetivo de cualquier proceso de conservación es minimizar el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos, al fin de garantizar la seguridad alimentaria.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), desde la Cumbre Mundial de la Alimentación (CMA) de 1996, la Seguridad Alimentaria "a nivel de individuo, hogar, nación y global, se consigue cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias, con el objeto de llevar una vida activa y sana".[www.fao.org]<sup>1</sup>

Por lo tanto, la innovación, unida a la competencia, ha estado, y está, aumentando en los países industrializados y capaces de avanzar en este ámbito, buscando el desarrollo de técnicas que cada vez garanticen más la calidad y seguridad alimentaria con la mínima alteración de las cualidades nutritivas y organolépticas que el producto posee sin ser manipulado, es decir, en su estado más fresco.

En los alimentos líquidos, el riesgo de presencia de agentes patógenos puede ser más alto debido a una mayor disponibilidad de agua, (por aquellos agentes patógenos que necesitan de una cantidad de agua libre más alta) la cual representa la condición necesaria para que sea utilizada como: 1) solvente de nutrientes para permitir su transporte y disponibilidad en el citoplasma; 2) agente químico que interviene en las reacciones hidrolíticas que dan lugar a monómeros necesarios para la síntesis microbiana y para las reacciones energéticas.

En el ámbito de la seguridad alimentaria, la ausencia de riesgo microbiológico es de relevante importancia, y esto se refleja de manera ulterior sobre las costumbres viejas y nuevas de los consumidores, los cuales, con sus elecciones, influyen al mercado.

Por esta razón, el fin de este trabajo es lo de dar una ulterior caracterización al ámbito de la seguridad microbiológica en dos alimentos líquidos representativos de esos hábitos que son la leche y el smoothie.

Estos alimentos, debido a sus composiciones y sus pH son alimentos propicios al desarrollo de las bacterias patógenas, tal como la *L. Monocytogenes*, y es porqué su tratamiento es de importancia considerable por el control de la seguridad alimentaria.

Algunos autores han observado que la resistencia microbiana al calor puede variar, dependiendo de varios factores que actúan antes, durante o después el tratamiento térmico [Hassani et al., 2007].

Se ha demostrado que la resistencia al calor de diferentes organismos se incrementa cuando sus células son expuestas durante un período corto de tiempo a temperaturas moderadamente elevadas, normalmente por encima del máximo de su crecimiento, antes de aplicar el tratamiento térmico para su inactivación [Pagan et al., 1997].

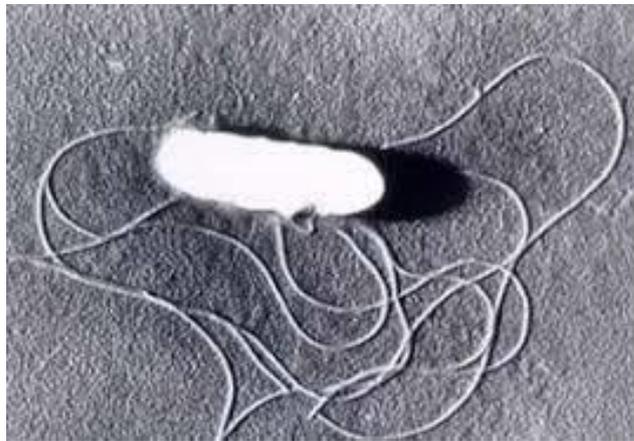
En la leche, las pruebas realizadas de resistencia térmica de *L. monocytogenes* hasta hoy, han servido a determinar cuál es el tratamiento más eficaz para la



### 1.3.1 Características microbiológica e identificación

*Listeria* es un bacilo pequeño y Gram positivo que mide entre 0,5 y 2  $\mu\text{m}$  de longitud y mòvil a 20-25°C. Esta movilidad suya es debida a su formación flagelada en ciliatura peritricas [Lemon, K. P., Higgins, D.E., Kolter, R., 2007].

Figura 1



*L. monocytogenes* y sus flagelos vista al microscopio

[https://web.mst.edu/~microbio/BIO221\\_2010/L\\_monocytogenes.html](https://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2010/L_monocytogenes.html)

Es decir que los flagelos rodean a la célula. Esta formación hace que la célula se mueva y le da una movilidad dicha vacilante.

El tipo *Listeria* es fácilmente identificable gracias a sus características microbiológicas. En efecto *Listeria* es una bacteria que no espolura aero-anaerobico facultativo, porque la mayoría de las cepas tienen una catalasa positiva.

Ella hidroliza, un heteròxido a base de glucosio y es oxidasa negativa. *Listeria* fermenta igualmente diferentes glucidos sin producir gas. Las cepas de *L.monocytogenes*. son siempre D—xylosa negativo y hemolíticos, y producen unas lecitinas, enzima que hidroliza las lecitinas.

Esas son generalmente  $\beta$ -hemolíticas, es decir que destruyen completamente los glòbulos rojos, y son L-rhamnosas. Y son principalmente estas últimas características las que permiten identificar la especie de *L. monocytogenes* entre el género *Listeria*.

Una de las particularidades de *L.monocytogenes* es su capacidad de crecer a las temperaturas de refrigeración. Su crecimiento, siendo óptimo aproximadamente a los 30-37°C, puede llegar, sin embargo, a crecer hasta los -2°C y es capaz de sobrevivir a temperaturas inferiores.

No obstante, es fácil destruirla con el calor; en efecto, *Listeria M.* no puede sobrevivir más de 30 minutos a 60°C.

La especie *L.monocytogenes* está dividida en 13 serotipos diferentes. En más del 90% de los casos humanos, solo 3 serotipos están implicados; los serotipos 1/2a, 1/2b, 4b. Para identificar los diferentes serotipos de *L.Monocytogenes* es posible utilizar el método de Polymerase Chain Reaction (PCR). Sin embargo, para evitar todo el riesgo de enfermedad, se considera el conjunto como cepas de seres patógenos [Anses,n.d.].

### **1.3.2 Vías de transmisión**

*L.monocytogenes* es una bacteria ubicuitaria y telúrica extendida en el medio ambiente. Ella resiste fácilmente en medio exterior y debido a esto es posible encontrarla en los suelos, en los lagos y ríos, y en aguas residuales o de bahías y también en la vegetación en descomposición.

*L.monocytogenes* es presente igualmente en el organismo animal; en su forma natural, como bacteria comensal o bajo la forma patógena, después de la contaminación. Entre un 6 a 30% de los bovinos, ovinos, cerdos, cabras y aves, contienen esta bacteria naturalmente en su organismo. Estos animales representan la principal fuente de contaminación para el hombre. Los alimentos epidemiológicamente relacionados con los brotes de infección por *L. monocytogenes* son salchichas, fiambres, leche, leche pasteurizada, derivados lácteos, carne y productos cárnicos y, debido a su presencia en aguas contaminadas, puede encontrarse en vegetales regados con agua no tratada [ (Blanco, 1994; Domínguez, 2001; Mena et al., 2003; Michanie, 2007; Guevara et al., 2015) ]. La presencia de este microorganismo en los alimentos es debida, en parte, a su habilidad de tolerar condiciones ambientales extremas (e.j. altas concentraciones de sal, amplio rango de pH y temperaturas y baja actividad de agua) [ (Gandhi & Chikindas, 2007) ].

En efecto, en el 99% [Anses,n.d.]. de los casos, la transmisión de *L.monocytogenes* del hombre, se hace por vía alimentaria, no obstante, es posible que hay una transmisión directa de la bacteria.

En las mujeres embarazadas, la infección puede ser transmitida al feto *in utero*, del pasaje de la bacteria vía placenta, o en el momento del parto si las vías genitales están contaminadas.

Para los granjeros y los veterinarios, hay también un riesgo de contaminación directa durante el nacimiento de un animal contaminado. [E. J. Regan, G. A. J. Harrison, S. Butler; 2005]

### **1.3.3 Patogenicidad**

La contaminación por *L.monocytogenes* es rara, pero puede ser muy peligrosa. Esta bacteria es la causa de la enfermedad llamada Listeriosis. La Listeriosis se presenta bajo dos formas: invasiva y no invasiva.

La forma no invasiva generalmente es rara, y se manifiesta esencialmente con gastroenterite febril. La forma invasiva es mucho más peligrosa, ella puede implicar una septicemia o una infección del sistema nervioso central que se manifiesta generalmente con una meningo encefalite.

Por la mujer embarazada, la infección es generalmente sin consecuencias por la madre, aunque si puede provocar un aborto, un parto prematuro, o una infección neonatal grave como una septicemia, como una infección pulmonar o neurológica y a veces, también cutánea. [Listeriose [WWW Document2015]]

### **1.3.4 Epidemiología**

Aunque si, hoy en día, la Listeriosis resulta rara, todavía hay una tasa de mortalidad del orden de 25 a 30% y una tasa de hospitalización del 92%, que es muy elevada.

Los casos más numerosos de Listeriosis han sido registrados en Europa, en los Estados Unidos de América y en Canadá. En 2009, aproximadamente, 1659 han sido diagnosticado en Europa, con una mortalidad casi del 20%. [(EFSA Journal 2011; 9 (3)2090)]

En 2011 estàn 1470 casos señalados con una mortalidad del 12,7%; el balance va en aumento a continuaciòn, con 1763 casos en 2013, que han causado la muerte de 64 personas en Francia.

[WWW Document2015 ( <http://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/listeria>)]  
EFSA Journal, 12 (2) (2014), p. 3547))

Hasta hoy, aproximadamente, han sido registrados 70 brotes de toxiinfecciòn en todo el mundo, y en la mayoria de los casos, los alimentos contaminados eran productos a base de carne o productos a base de leche . [Mead et al., 2006; Gillspie et al.,2006; Mc Donald et al., 2005;Billie et al.,2006.]

Estos casos subrayan la importancia de la vigilancia microbiologica de los alimentos y por esta razòn, es necesario aplicar a estos productos un tratamiento correcto, antes de ponerlos en marcha.

Tabla 1.

Year	Country	Numbers of cases <sup>(a)</sup>	Vehicle	Reference
1998	USA	108	Frankfurters	(Mead <i>et al.</i> , 2006)
1999	England	4	Hospital sandwiches	(Gillespie <i>et al.</i> , 2006)
1999-2000	France	10	Pork rillettes	(de Valk <i>et al.</i> , 2001)
1999-2000	France	32	Jellied pork tongue	(de Valk <i>et al.</i> , 2001)
2000	New Zealand	4*	Sliced cooked meat	(Sim <i>et al.</i> , 2002)
2000	USA	13	Mexican style soft cheese	(MacDonald <i>et al.</i> , 2005)
2000	USA	30	Cooked turkey	(Olsen <i>et al.</i> , 2005)
2001	USA	16*	Sliced cooked turkey	(Frye <i>et al.</i> , 2002)
2001	Sweden	50*	Cheese	(Carrique-Mas <i>et al.</i> , 2003)
2001	Japan	38*	Cheese	(Makino <i>et al.</i> , 2005)
2002	USA	54	Cooked turkey meat	(Gottlieb <i>et al.</i> , 2006)
2002	Canada	17	Cheese	(Gaulin <i>et al.</i> , 2003)
2003	England	17	Butter	(Gillespie <i>et al.</i> , 2006)
2003	England	18	None identified	(Gillespie <i>et al.</i> , 2006)
2003	Wales	2	Hospital sandwiches	(Gillespie <i>et al.</i> , 2006)
2003	England	5	Hospital sandwiches	(Gillespie <i>et al.</i> , 2006)
2004	England	2	Hospital sandwiches	(Gillespie <i>et al.</i> , 2006)
2005	Switzerland	10	Tomme cheese	(Bille <i>et al.</i> , 2006)
2006	Czech Republic	78	Soft cheese	(Vit <i>et al.</i> , 2007; EFSA, 2007a)
2006	Germany	6	Hard cheese	(EFSA, 2007a)

(a): All cases severe systemic disease except those marked with \* where febrile gastroenteritis was the predominant case presentation.

## 2 MATERIALES Y METODOS

Los experimentos de tratamiento térmico isotermico requiere necesariamente una precisa separación de las fases de trabajo, tanto por razones de seguridad como para evitar contaminaciones que podrian comprometer el resultado de la prueba. Para efectuar los experimentos ha sido necesario el utilizo del Termorresistometro que es el equipo que permite tan tratamientos isotermico que NO-Isotermicos. A continuación, un discusion explicativa de dicho equipo y de todas la fases necesaria para actualizar los experimentos.

### 2.1. Descripción del Termorresistometro

El termorresistometro Mastia (fig. 2) es un instrumento capaz de efectuar unos tratamientos isòtermicos y non-isotermicos para determinar la resistencia termica del microorganismo y eliminarlo desde un producto alimentario.

Figura 2



Termorresistometro Mastia

El Termorresistometro Mastia viene del Termorresistometro TR-SC (Condón et al., 1992). Muchos compuestos han sido incorporado para mejorar su eficacia. Antes de todo, una bobina en que del agua frio puede circular y puede actuar en cuanto el sistema de enfriamiento ha sido añadido. En seguida, un programa lògico de control (PLC) ha sido implantado en el viejo dispositivo, es necesario

poner en funcionamiento el sistema de calentamiento y de enfriamiento para controlar la temperatura en el recipiente principal. El PLC està conectado a una pantalla tàtil (fig.3) que permite la comunicaciòn con éste, y con un ordenador que programa y registra unos perfiles de temperatura utilizados.

Figura 3.



Descripciòn del sistema de control y programaciòn del termorresistòmetro Mastia.

El termorresistometro Mastia està compuesto por un recipiente de acero inoxidable con un dosificador a tornillo en el que està sumergida una hélice en teflon, que se sirve de un agitador y de una resistencia termica. (fig.4)

Sobre el dosificador estàn 7 puertas de entrada:

- Un ingreso de gas (N<sub>2</sub>) para aplicar una presiòn;
- Una puerta de inyecciòn del inoculo;
- Un termopar para medir la temperatura;
- Dos puertas para la resistencia termica;
- Dos puertas para el sistema de enfriamiento.

El dosificador tambièn cuesta de una salida para recoger las muestras tratadas.

figura 4

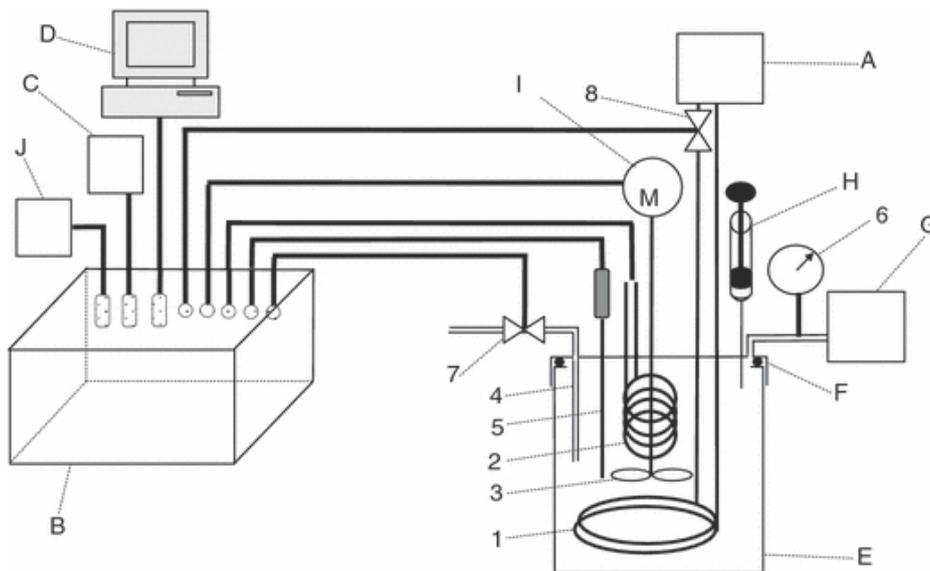


Figura 4: A) agua de enfriamiento B) PLC (Programmable Logic Controller) C) pantalla táctil D) ordenador E) envase principal F) tapa G) fuente de presión H) jeringa Hamilton I) motor de agitación J) PID – 1) bobina 2) resistencia 3) propelente 4) tubo de muestreo 5) termopar 6) manómetro 7) valva solenoide de muestreo 8) valva solenoide por el sistema de enfriamiento

El PLC està unido a otros elementos del termorresistometro: el motor que alimenta una hélice de agitación, la valvula de salida del dosificador y la valvula de entrada del agua frio.

La apertura de la valvula de salida del dosificador puede ser controlada por un temporizador unido con el PLC.

Éste efectua en partes iguales el control de la temperatura en el termorresistometro por parte de un PID (Proportional Integral Derivative) conectado con la resistencia y con la valva de entrada del agua frio.

Un PID, llamado también un regulador o conector PID, es un algoritmo de calculo que libera una señal de mando a partir de la diferencia entre la consigna y la medida. Por ejemplo, cuando el PID detecta que la temperatura està más baja de la programada, entonces el PLC pone en marcha la resistencia para aumentar la temperatura.

Inversamente, si el PID detecta una temperatura debajo de la aquella programada, el PLC activa la valva de control de entrada del agua frio. Enfin, la presión està medida por un manómetro unido con la fuente de gas. Ésta permite la recuperaciòn de las muestras a una presión interior débil, por unas temperaturas inferiores a 100° C, y unos disolventes demasiados viscosos.[Conesa, R.,Andreu, S., Fernandez, P. S., Esnoz, A., Palop, A., 2009].

## 2.2 Fase preliminar al tratamiento isotermico

### I. Preparación del inóculo

El microorganismo usado en este estudio fue *L.monocytogenes* CECT 4032, que fue proporcionada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Aproximadamente 100 µL de la cepa se inocularon en 50 mL de TSB (Tryptic Soy Broth), previamente esterilizado en Autoclave a 121° por 20 minutos. Las operaciones de inoculación ha sido hecha en campana de seguridad provista de flujo laminar vertical. Con la finalidad de obtener una disponibilidad de inóculo cierto se prepararon dos botellas de 100ml (vidrio borosilicado) de 50 ml de medio inoculado. Las botellas fueron incubadas en Agitador a Bagnomaria mequánico a 37 ° C durante 24 horas para obtener las células en fase de crecimiento estacionario con una concentración aproximada de  $1 \times 10^9$  UFC/mL.

### II. Pre-Tratamiento del Termorresistometro

Por cada tratamientos termicos el Termorresistometro MASTIA ha sido limpiado químicamente en su parte externas y esterilizado mediante agua destilada al fin de evitar algún tipo de contaminaciones debidas a los tratamientos precedentes .La esterilización se realiza llenando el envase (400ml) del equipo con agua destilada y calentada hasta la Temperatura de 135°C y mantenida por 2 minutos (P=2 atm). Eso permite al vapor esteril de alcanzar todos la partes del equipo implicadas nel tratamiento da efectuar. Al terminar de la fase caliente se procede bajando la T° hasta 20-25 °C y se vacia el envase. La esterilización puede ser repetida si necesario.

La jeringa de inoculación se trata con amoníaco y se limpia con agua destilada, de manera que el inóculo no vendrà contaminado.

### III. Preparación de los Medios de tratamiento

- a) **TSB:** Es un medio de enriquecimiento líquido universal utilizado para los procedimientos cualitativos de las pruebas de esterilidad y para el enriquecimiento y el cultivo de microorganismos aeróbicos que no son excesivamente exigentes. En microbiología clínica, el medio puede usarse para suspensión, enriquecimiento y cultivo De cepas aisladas en

otros medios. El TSB se acidificò echando por goteo una soluciòn de HCl 2M para alcanzar un pH de 4.44 desde un pH del TSB sub-alcalino de 7.3., medida con pH-metro (Basic 20 Crison, Barcelona, España), realizando un calibrado diario con patrones de pH 4 y 7, a temperatura ambiente. La soluciòn Estandar de TSB se preparò con 15g de TSB/500ml y esterilizada en autoclave (121°C-20 minutos.). Antes del tratamiento isotermico, se llenò el envase del equipo (T.MASTIA) de soluciòn para llevarlo a una temperatura de 100°C y mantenida por 1 minutos, luego bajada a la temperatura de tratamiento deseada.

**b) Leche UHT:** En este caso el medio cual es la leche UHT ha sido llevada a temperaturas de 80° por 40 segundos, de manera que no se iban a desnaturalizar, utilizando temperaturas mas alta, eventuales factores nutricionales por la vida del microorganismo en examen por un lado, y que los productos quemados interfieran con los sensores del aparato de control de las temperaturas de tratamiento.

**c) Smoothie:** El producto que utilizò tenia la siguiente composiciòn y carateristicas:

-Nombre Alimento: Zumo de fruta y verdura con extractos vegetales

-Descripciòn: Smoothie Chupinazo 250g - Verdifresh

-Marca: Verdifresh

-còdigo EAN Producto 08437013139410

-Nombre Proveedor: Verdifresh, S.L.U.

- Lista Ingredientes: Manzana (41%), zumo de remolacha (28%), piña (24%), zumo de limòn (5%), puré de limòn, jengibre (0,1%), fibra cítrica, aroma natural

- Menciones Obligatorias: Envasado en atmòsfera protectora

- Cantidad Neta: 250 g.

El pH del smoothie se midiò directamente en los tubos Falcon que contenían el smoothie y para ello se utilizò un pH-metro a temperatura ambiente. Se ha comprobado que no se habia eventuales diferencias significativas de pH con el pructo en su composiciòn original añadiendo el agua distilado. Por cada análisis de pH se realizaron 3 repeticiones distintas.El pH del smoothie medido despues de las tres repeticiones por cada tipo no mostraba diferencias significativas y se atestò a un pH de 3.85.(fig.5) Por el echo que los sensores del termoresistometro estan calibrados principalmente por alimentos ricos en agua, ha sido

necesario añadir una cantidad de agua al producto tal cual, cambiándolo de su composición original, de manera que, el Termoresistometro permite que la solución de pre-tratamiento de esterilización sea estabilizada, sin excsivos escursiones de temperatura. Así, ha sido posible una esterilización del producto nel Termorresistometro llegando la solución a 90 grados y enmediatamente enfriarla a la Temperatura de tratamiento deseada. Al finàl la solución definitiva por el envase (400ml) de tratamiento ha sido así formulada: 350 ml de producto + 50 ml de agua destilada y esterilizada, o sea 87,5% y 12,5% proporcionalmente. Esta composición se ha realizada en condiciones de esterilidad operando en cerca de una llama Bunsen y enmediatamte pasada al equipo por el pre-calentamiento.

Figura 5



Medida del smoothie con pH metro (Basic 20 Crison, Barcelona, España)

#### IV. Preparación de los medio de cultivo

Durante el tratamiento, la cantidad de alimento líquido requerida por las diluiciones seriales, necesitaba de ser tratada con un diluyente nutritivo cual es el agua de peptona. El agua de peptona es un medio nutritivo que permite a las células microbianas de mantener su viabilidad a la mayoría de los microrrganismos por su contenido enriquecido en peptones. Esta se preparò con (1 g/100mL de peptona de caseina (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España) y 0,9 g/100ml de cloruro de sodio

(Scharlau Chemie SA, Barcelona, España)) en agua destilada, por fin esterilizado en autoclave por 20 min. a 121°C.

El medio Utilizado por las células viables fue el Tryptona Soya Agar ((TFA)( Scharlau Chemie SA, Barcelona, España)) y se preparó con 15g/500ml de TSB y con 7,5g/500ml de Agar bacteriológico, en agua destilada. Se esterilizó todo en autoclave por 20 min. a 121.°C.

### 2.3. Tratamiento isotérmico

Por los tratamientos isotérmicos, el recipiente ha sido llenado con el menstuum, y una vez que el tratamiento de la temperatura del calor ha conseguido la estabilidad, el menstuum ha sido inoculado con 0.2 ml de suspensión microbiana de *L.Monocytogenes* (fig.6) poniendo en marcha el cronometro controlado. La temperatura ha sido mantenida constante a través de todo el experimento. Los ejemplos han sido reunidos en tubos esteriles a intervalos predeterminados, apropiadamente diluidos e inmediatamente niquelados. Por eso, se preparó una batería de disoluciones con 0.9 mL (Tubos eppendorf de 1,5ml) de agua peptonada estéril en cada una. De cada una de ellas se pipeteó asépticamente una alícuota de 100 µL.(fig.7)

Antes de tomar muestras, los contenidos del tubo de muestra han sido desechados por unos segundos. La temperatura seleccionada por los experimentos isotérmicos eran 52.5, 55.0, 57.5 y 60.0°C por *L.Monocytogenes*. Experimentos han sido desarrollados en triplicado por cada temperatura del TSB acidificado a pH 4.44 (R. Conesa, S. Andreu, P.S. Fernández, A. Esnoz and A. Palop). Por cada tratamiento ha sido extraído una muestra de caldo de cultivo de crecimiento( o del alimento líquido de análisis) antes de inyectar el inóculo en el Termoresistometro, al fin de indicar eventuales ingresos por parte de agentes microbiológicos contaminados en la maquinaria que podría alterar los resultados del tratamiento (Control). A continuación, el prospecto de inoculación a las varias T° en función del tiempo de recolección(min.) de las muestras al Termoresistometro y de la diluición elegida que con más probabilidad podría permitir de sacar un resultado significativo:

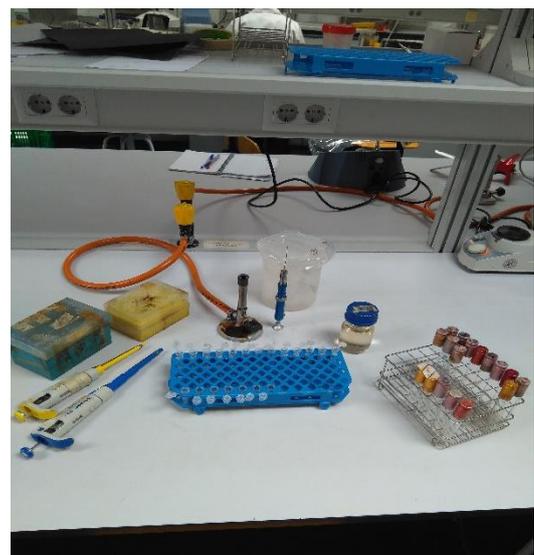
T°	T(min)	DILUICIONES
<b>TSB (4.44), SMOOTHIE</b>		
52.5°C	0 ; 5.	-3 ; -4
	10;15;20.	-2 ; -3
	25;30.	-2 ; -3
	35;40.	0;-1;-2
	40;45;50;55;60.	0; -1
55°C	0;3;6.	-2;-3;-4
	9;12;15.	-1;-2
	18; 21; 24; 27; 30; 33; 36; 39; 42; 45.	0 ; -1
57.5°C	0	-3 ; -4
	2; 4.	-2 ; -3
	6; 8.	-1;-2
	10; 12; 14; 16; 18; 20; 22.	0 ; -1
60 °C	0	-3 ; -4
	1	-1;-2
	2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10;	0 ; -1
<b>LECHE</b>		
52.5°C	0 ; 5.	-3 ; -4
55°C	10;15;20.	-2;-3;-4
57.5°C	25;30;	-2 ; -3
60 °C	40;45;50;55;60.	0;-1

Figura 6

Figura 7



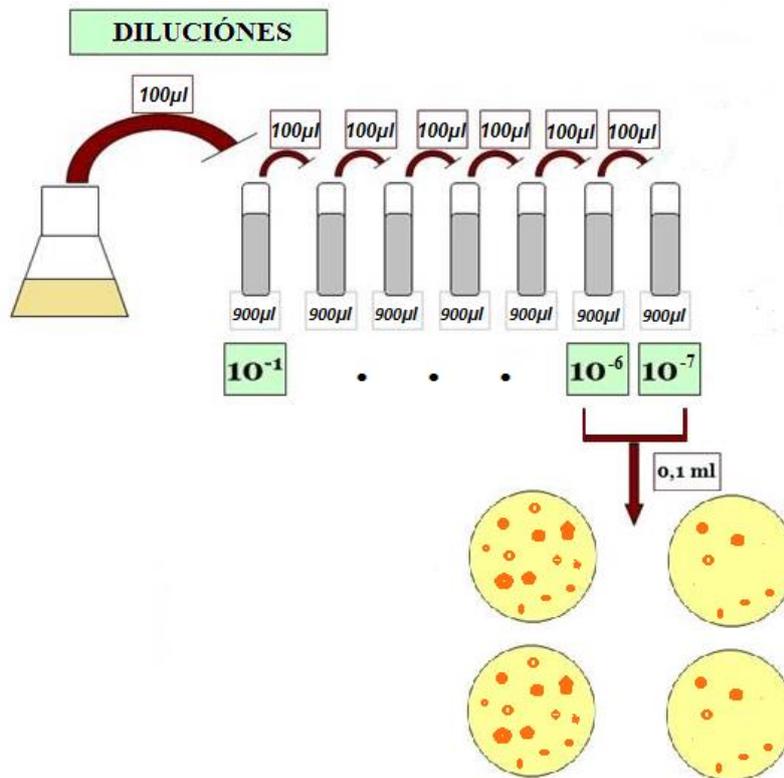
Inoculaci3n de la suspensi3n microbiana



Bateri3 de disoluciones de Eppendorf

De cada tratamiento, al fin de evaluar la carga microbiana a través de disoluciones seriales, han sido extraído 100µl en 900µl de Agua de peptona (Tryptone desde Caseina) y llegando a diluir y a vertir sobre una placa las disoluciones -6 y -7 (fig.8).

Figura 8

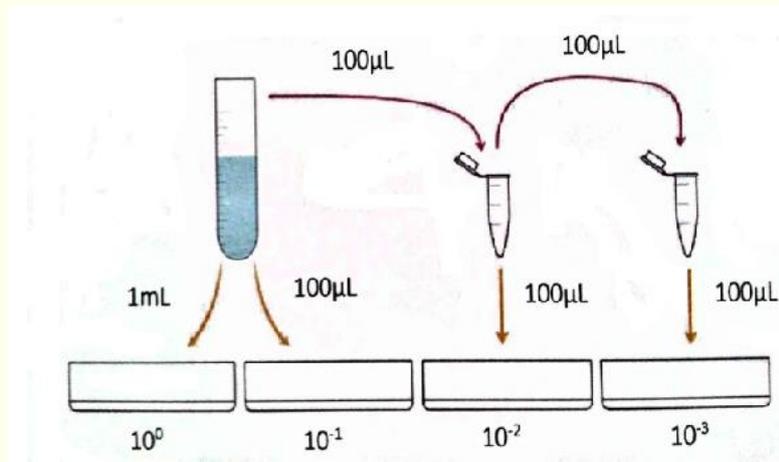


Con el mismo principio de las disoluciones seriales, se ha avanzado a respetar el esquema de inculo (véase arriba); en caso de las disoluciones "0" se ha avanzado a inocular directamente 1ml de la mutua tal y cual en placa (sin pasar por las disoluciones); en caso de las disoluciones siguientes a la "0" (-1, -2,...-4) han sido extraído 100 µl de la precedente dilución en suspensión e inculado en

Esquema por la Evaluación de la carga microbiana

900µl de agua de peptona en una probeta Eppendorf, al fin de realizar la dilución requerida. De ésta, han sido extraído 100µl para preparar el inculo en placa(fig.9).

Figura 9



Esquema general de las diluciones utilizadas. Por cada dilución se ha placadado en duplicado.

La enumeración de los recuentos viables sobrevividos están basados en recuentos duplicados en placa (fig.10) desde la dilución apropiada, en triptico agar de soya(TSA;ScharlauChemie). Las diluciones seleccionadas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas,posteriormente se realizó el conteo. El conteo se hizo calculando una media aritmetica de las colonias que salieron, rechazando placas contaminadas o incontable (>300 colonias). El crecimiento y/o reducción de células viables fue expresada como el logaritmo de UFC/mL partiendo del día 0.

Figura 10

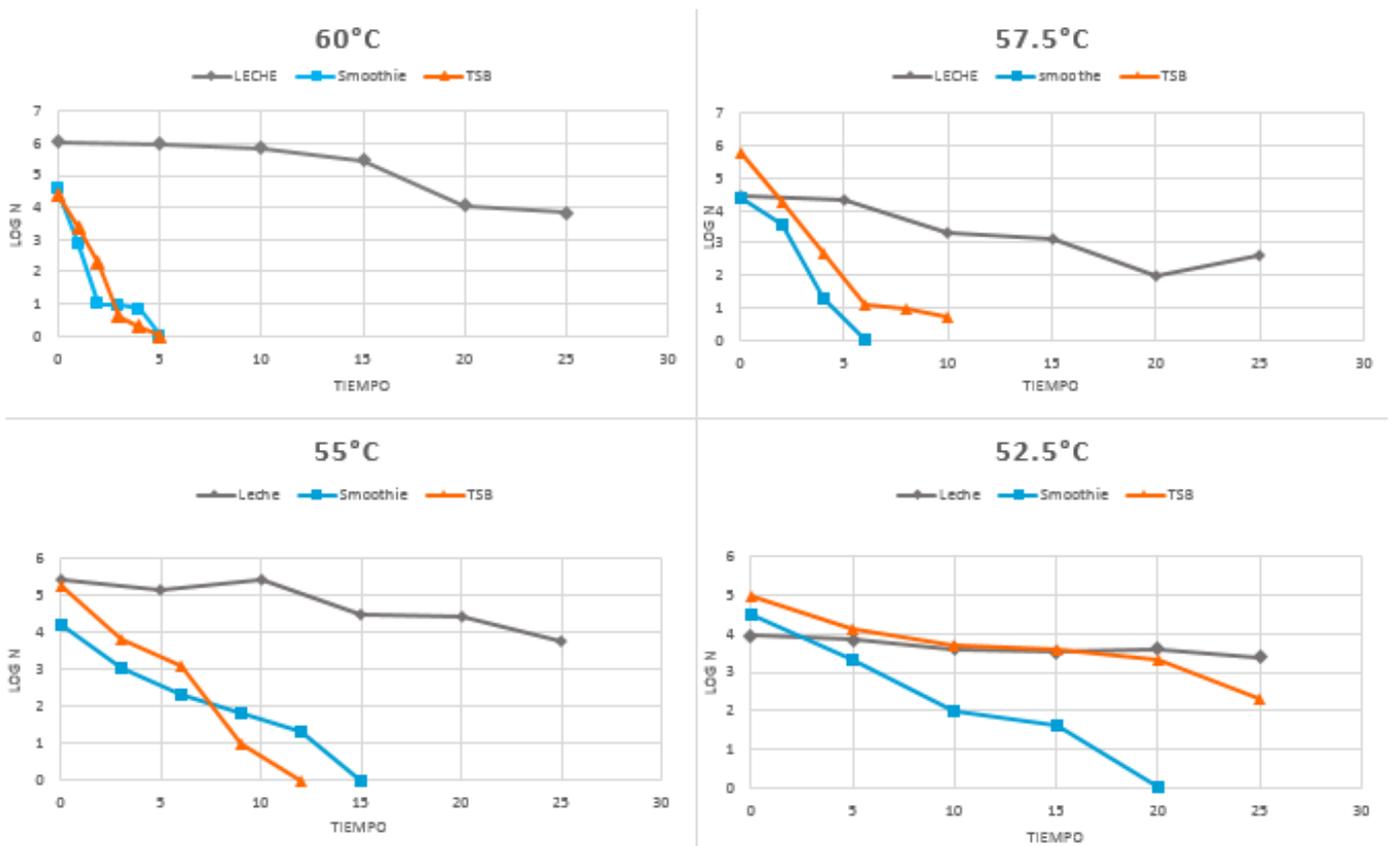


Aspecto de *L. Monocytogenes* su TSA

### 3) RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN

En la figura 3.7 se pueden observar las diferentes curvas de supervivencia de *L.Monocytogenes* tras cuatro tratamientos térmicos con distintos medios de calentamiento. Como se puede observar, las células de *Listeria monocytogenes*, dependiendo de la temperatura de tratamiento y de la naturaleza del medio, presentan comportamientos diferentes. En primer lugar se observa que a la Temperatura de tratamiento mas alta (60°) es la mas letal por *L.Monocytogenes* dentro el TSB y nel smoothie. Así que su comportamiento en estos medios es casi identico, es decir que la supervivencia es muy afectada, teniendo tambien en cuenta del ambiente muy acido (pH del TSB=4.44; pH del Smoothie=3.84) que desfavorece sus adaptaciòn a el incrementar del estres termico. Se observa en este caso una destruciòn total de la poblaciòn inicial ( $N_0$ ) a 5 minutos de tratamiento por los dos, diferentemente que por la leche, donde para llegar a una reduciòn de casi dos unidad logaritmicas se necesitan de 25 minutos de tratamiento.<sup>(1)</sup> (fig.11)

figura 11



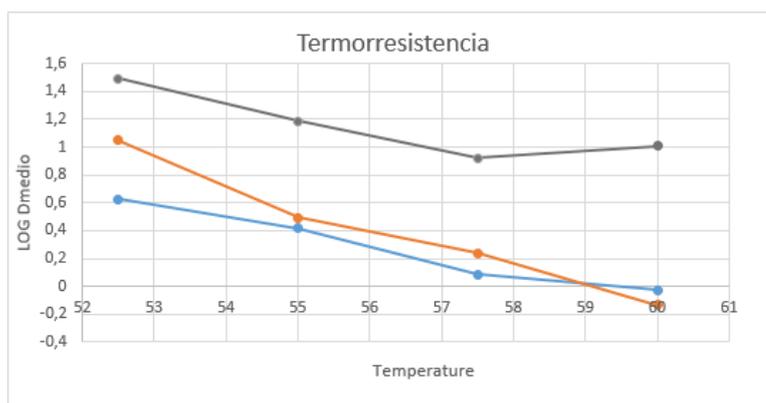
Curvas de inactivaciòn comparados entre tratamientos distintos por varia Temperatura

(1) Han sido voluntariamente eliminados parte de datos no necesarios ne los intervalos de tiempo objeto de observaciòn

Se observa ademàs que el smoothie, es el medio mas afectado en absoluto en todos los tratamientos termicos recibidos por *L.Monocytogenes*, no obstante presenta muy pocas diferencias de comportamiento con el TSB en terminos de reducciones a lo largo del tiempo; Esto se puede ver que siguen teniendo intervalos de reducciones de unidad logaritmica aproximadamente constante entre ellos. En un solo caso, a la Temperatura mas baja de 52.5, el TSB se demostrò compatible con el Tiempo de inactivaciòn por la Leche hasta a 25 minutos, pero luego empezar a bajar, confirmando su tendencia que se oservò a las distintas temperaturas. Esto puede ser debido a su composiciòn que ofrece condiciones mas favorable en respuesta a el estres termico. En general, es la leche que se presenta como el medio mas apto por la superviviencia de *L.Monocytogenes* en condiciones de estres termico, y esto gracias a su composiciòn, valor de pH y probablemente a la presencia de la grasa, que ofrece un efecto escudo por las celulas al subir de la temperatura. A continuaciòn, las tabla de los parametros microbiologicos que permiten de interpretar los resultados observados, y necesarios para obtener un modelo de inactivaciòn microbiana de cada medio en base al  $D_{value}$ . Tales modelos nos permite de estimar la Termorresistencia del microorganismo a las Temperaturas que hemos elegidos por los tratamientos termico (Fig.12)

fig 12

Smoothie(pH3.85)			
T°	Dmedio	Log Dmedio	r^2
52,5	4,207343547	0,624007975	0,9593
55	2,616258916	0,417680721	0,9614
57,5	1,220522126	0,086545657	0,9731
60	0,944725322	-0,024694444	0,9011
TSB(pH4.44)			
T°	Dmedio	Log Dmedio	r^2
52,5	11,14599175	1,047118717	0,8774
55	3,103131507	0,491800181	0,9668
57,5	1,728559737	0,237684393	0,9995
60	0,733759943	-0,134446001	0,9897
Leche			
T°	Dmedio	Log Dmedio	r^2
52,5	31,22441498	1,49449431	0,9622
55	15,43990516	1,188644628	0,8395
57,5	8,308919666	0,91954456	0,929
60	10,21626692	1,009292231	0,8444



A confirma de cuanto dicho antes, la leche presenta un  $D_{value}$  muy alto respecto a los otros medios que presentan un pH acido y tal se mantiene por todas la temperaturas tratadas . En ningun caso se ha obtenido un  $D_{value}$  que llegue a una reduciòn consistente nel tiempo de tratamiento . Eso significa que por la especie de *L.Monocytogenes* la leche es un medio que tiene un alto nivel de riesgo microbiologico si no se trata

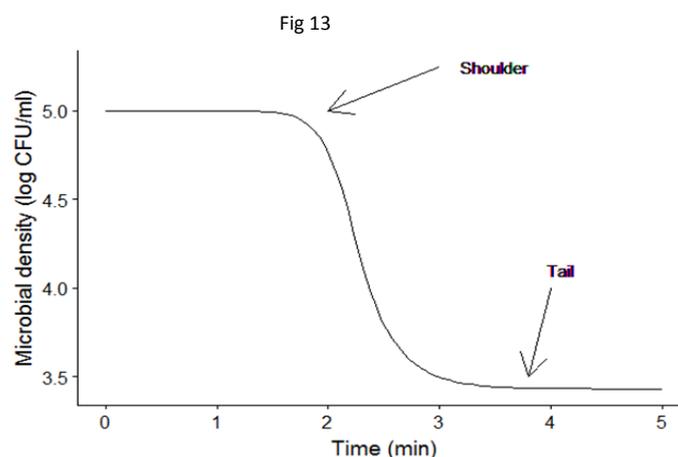
adecuadamente. Tal valor alto por la leche, sugiere que para obtener unas reducciones aceptables de este patógeno la Temperatura de tratamientos deberían ser mayor que 60° y menor de 70°. Por otro lado, la Termorresistencia del TSB y del Smoothie respectivamente es muy similar, llegando en el caso del tratamiento a 60°C, a un valor negativo de  $\text{Log}_{(D_{\text{medio}})}$  por ambos, que, por ejemplo, se podría tener en cuenta como tratamientos térmicos aptos por alimentos a base de ortizales. La diferencia del  $D_{\text{value}}$  a la temperatura inicial de 52.5°C depende del bajo valor del pH del Smoothie y del TSB acidificado (3.84 y 4.44 respectivamente) teniendo en cuenta que por *L.Monocytogenes* el intervalo óptimo de pH por su crecimiento es entre 4.0-9.5. .

### 3.1 Modelización de datos experimentales.

Existen distintos modelos matemáticos que permiten derivar los parámetros que caracterizan las curvas de supervivencia.

Los primeros modelos utilizados asumían que la reducción de la concentración bacteriana sigue una relación semilogarítmica con el tiempo durante un tratamiento isotérmico. Este tipo de modelos permite la predicción de la carga microbiana en tiempos diferentes a los registrados en el experimento, a partir de ellos se deduce el valor D como el tiempo requerido para reducir en un 90% la población microbiana. Bigelow (1921) extendió este modelo definiendo el valor de z: aumento de la temperatura necesario para reducir el valor D un 90%. Este modelo permitió predecir la inactivación de la población microbiana frente a tratamientos de calor a una temperatura determinada, cuando se utilizan temperaturas diferentes a las experimentales.

Posteriormente han surgido otros muchos modelos que intentan explicar cinéticas diferentes a la de primer orden, cuando existen fenómenos como hombros de activación o colas de supervivencia (Fig 13).



Los modelos más utilizados han sido los siguientes:

El modelo de Bigelow (1921) viene descrito por las siguientes ecuaciones,

$$\frac{d\log_{10} N}{dt} = -\frac{1}{D(T)}$$

$$\log_{10} D(T) = \log_{10} D(T_{ref}) - \frac{T - T_{ref}}{z}$$

Otros modelos disponibles que permiten describir desviaciones de la cinética de primer orden son el de Mafart et al. (2002),

$$\frac{d\log_{10} S}{dt} = -p \left( \frac{1}{\delta(T)} \right)^p t^{p-1}$$

$$\log_{10} \delta(T) = \log_{10} \delta(T_{ref}) - \frac{T - T_{ref}}{z}$$

El de Geeraerd et al. (2000),

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{1}{1 + C_c} k_{max}(T) N \left( 1 - \frac{N_{res}}{N} \right)$$

$$k_{max}(T) = k_{max}(T_{ref}) 10^{-(T-T_{ref})/z}$$

O el de Peleg (1998),

$$\frac{d\log_{10} S}{dt} = -b(T) n \left( \frac{-\log_{10} S}{b(T)} \right)^{\frac{n-1}{n}}$$

$$b(T) = \ln(1 + e^{k_b(T-T_c)})$$

### 3.2 Modelos matemáticos aplicados

Se ha utilizado *Bioinactivation* FE, que cuenta con un entorno Shiny que permite su fácil aplicación (Garre et al., 2017 y 2018). Bioinactivation permite aplicar los principales modelos matemáticos descritos en la bibliografía mediante la herramienta Shiny de Bioinactivation disponible en el siguiente enlace: [https://opada-upct.shinyapps.io/bioinactivation\\_Full/](https://opada-upct.shinyapps.io/bioinactivation_Full/)

Debido a las características de los datos obtenidos, se utilizó el modelo de Bigelow disponible.

### 3.3 Modelización de datos obtenidos en caldo TSB.

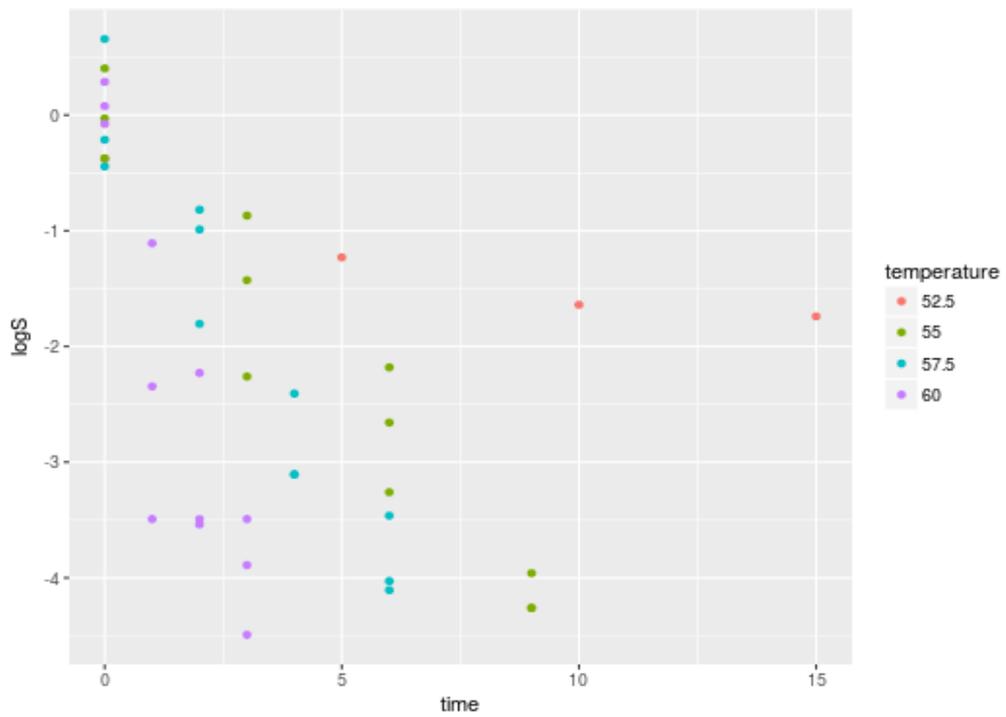
Se llevó a cabo la modelización de las curvas de supervivencia obtenidas en TSB mediante el modelo de Bigelow. Para ello se han ajustado todos los datos de supervivencia obtenidos y los resultados generados por el modelo se muestran a continuación. Se ha utilizado 52,5°C como temperatura de referencia.

Tabla 2

Fitted parameters							
Parameter	Estimate		Std. deviation		lower CI (95%)		Upper CI (95%)
D_R	4.98		0.51		3.94		6.02
z	8.86		0.64		7.56		10.16
ME	RMSE	loglik	AIC	AICc	BIC	Af	Bf
-0.07	0.64	-39.16	82.32	82.64	85.70	4.41	0.84

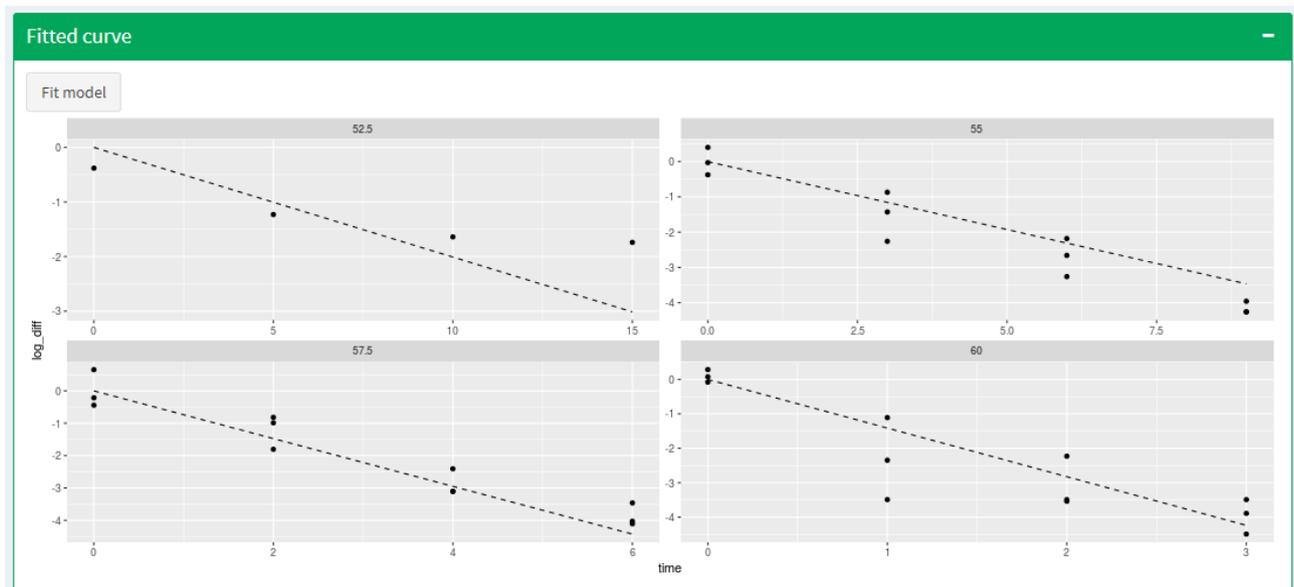
Parámetros D y z ajustados mediante el modelo de Bigelow en un solo paso.

Fig 14



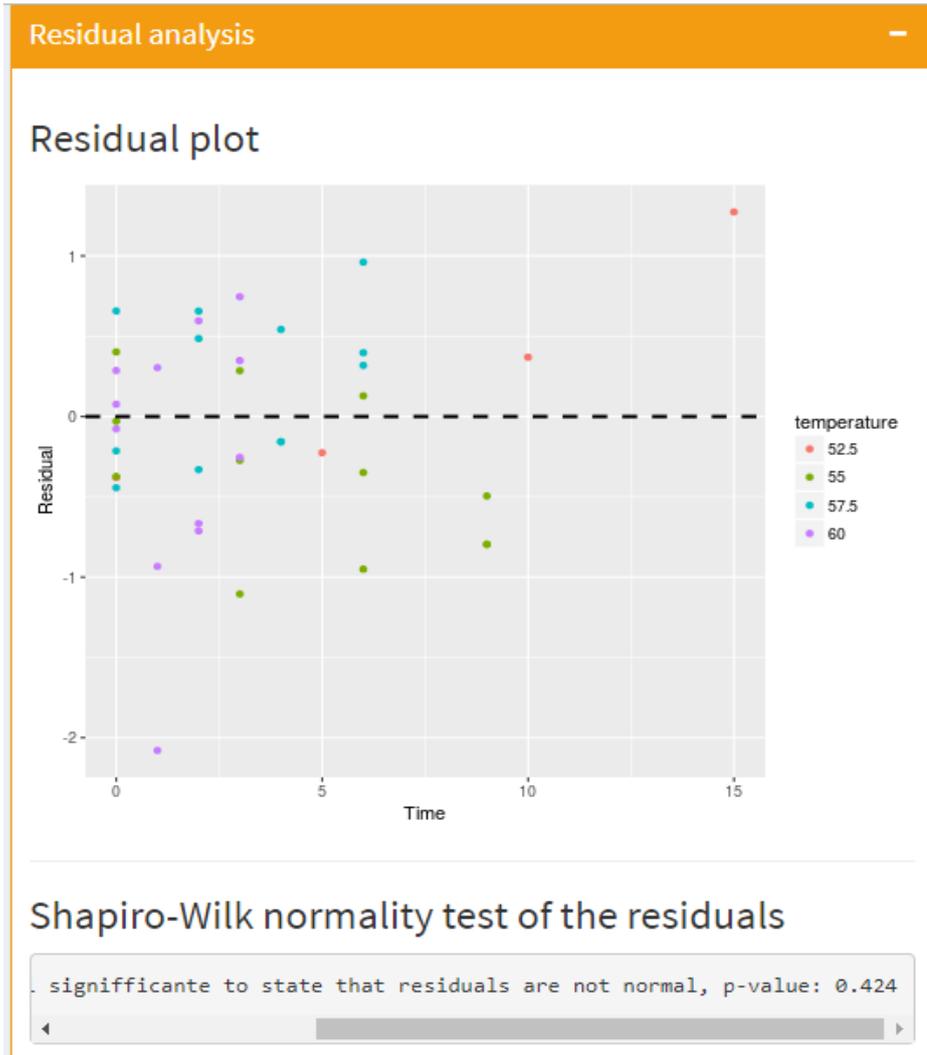
Datos de supervivencia de *L. monocytogenes* en caldo TSB

Figura 15



. Ajuste del modelo de Bigelow a los datos experimentales de *L. monocytogenes* en caldo TSB.

Fig.16



Test de Shapiro Wilkinson de normalidad de los residuos.

### 3.4 Modelización de datos obtenidos en smoothie.

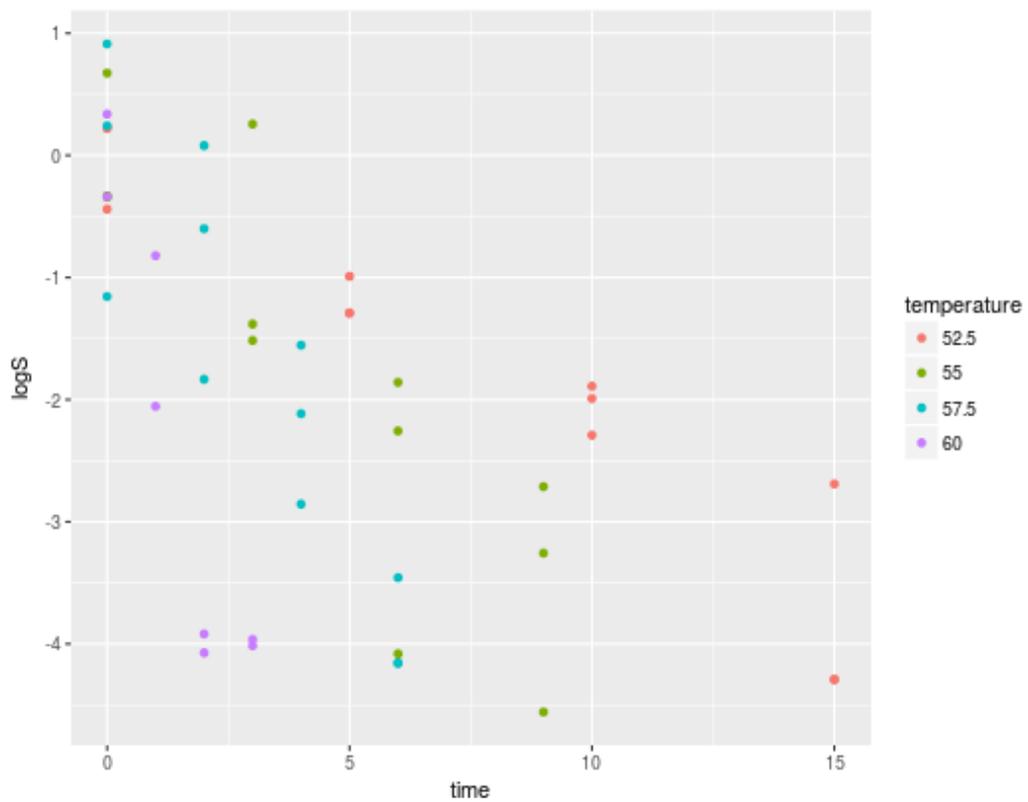
Se llevó a cabo la modelización de las curvas de supervivencia obtenidas en smoothie mediante el modelo de Bigelow. Para ello se han ajustado todos los datos de supervivencia obtenidos y los resultados generados por el modelo se muestran a continuación. Se ha utilizado 52,5°C como temperatura de referencia.

Tabla 3

Fitted parameters							
Parameter	Estimate	Std. deviation	lower CI (95%)		Upper CI (95%)		
D_R	4.55	0.40	3.75		5.35		
z	9.76	0.79	8.17		11.35		
ME	RMSE	loglik	AIC	AICc	BIC	Af	Bf
0.01	0.74	-49.29	102.58	102.87	106.14	5.52	1.03

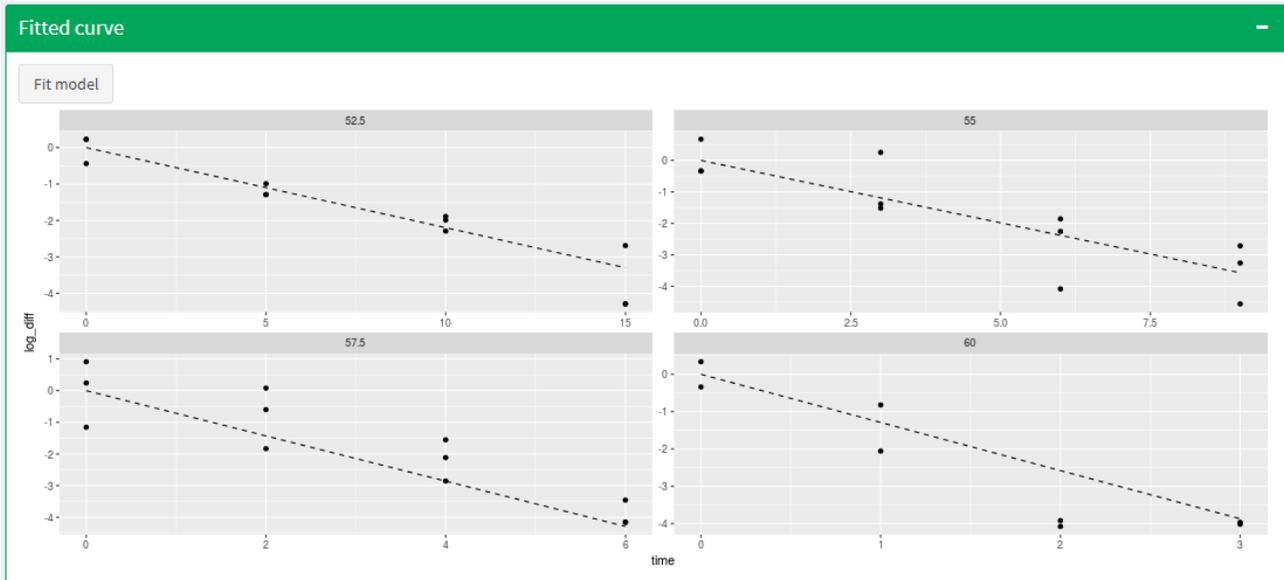
Parámetros D y z ajustados mediante el modelo de Bigelow en un solo paso.

Figura 17

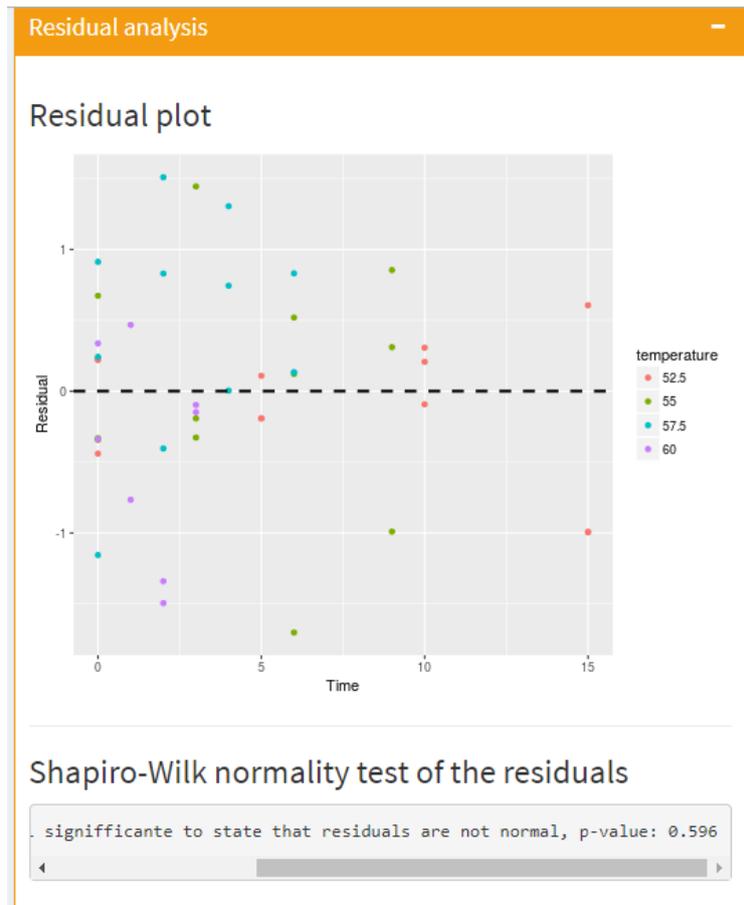


Datos de supervivencia de *L. monocytogenes* en smoothie.

Figura 18



Ajuste del modelo de Bigelow a los datos experimentales de *L. monocytogenes* en smoothie.



Test de Shapiro Wilkinson de normalidad de los residuos.

### 3.5 Modelización de datos obtenidos en leche.

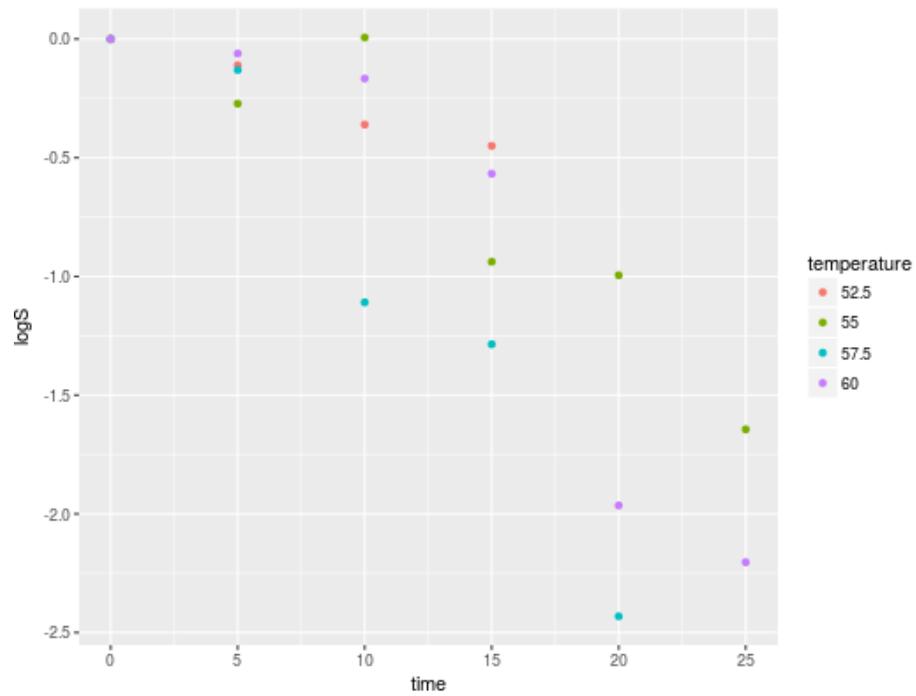
Se llevó a cabo la modelización de las curvas de supervivencia obtenidas en smoothie mediante el modelo de Bigelow. Para ello se han ajustado todos los datos de supervivencia obtenidos y los resultados generados por el modelo se muestran a continuación. Se ha utilizado 52,5°C como temperatura de referencia.

Tabla 4

Fitted parameters							
Parameter	Estimate	Std. deviation	lower CI (95%)	Upper CI (95%)			
D_R	19.71	4.35	10.60	28.82			
z	33.02	17.67	-3.97	70.00			
ME	RMSE	loglik	AIC	AICc	BIC	Af	Bf
0.07	0.38	-9.38	22.76	23.43	24.85	2.39	1.16

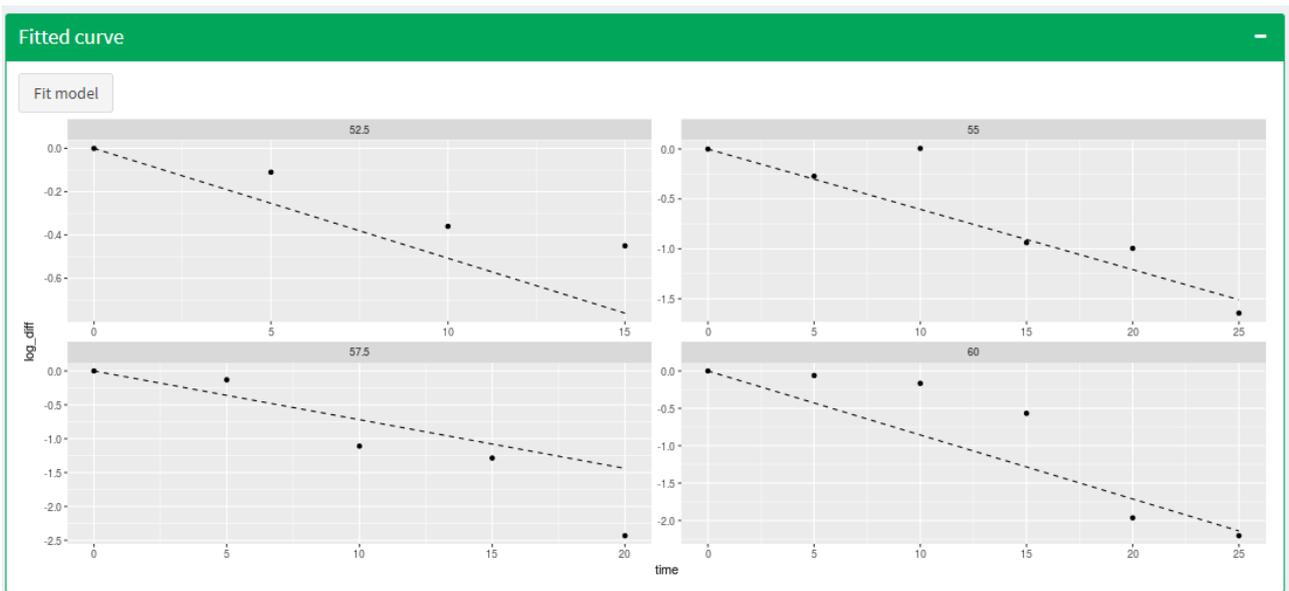
Parámetros D y z ajustados mediante el modelo de Bigelow en un solo pas

Fig.20



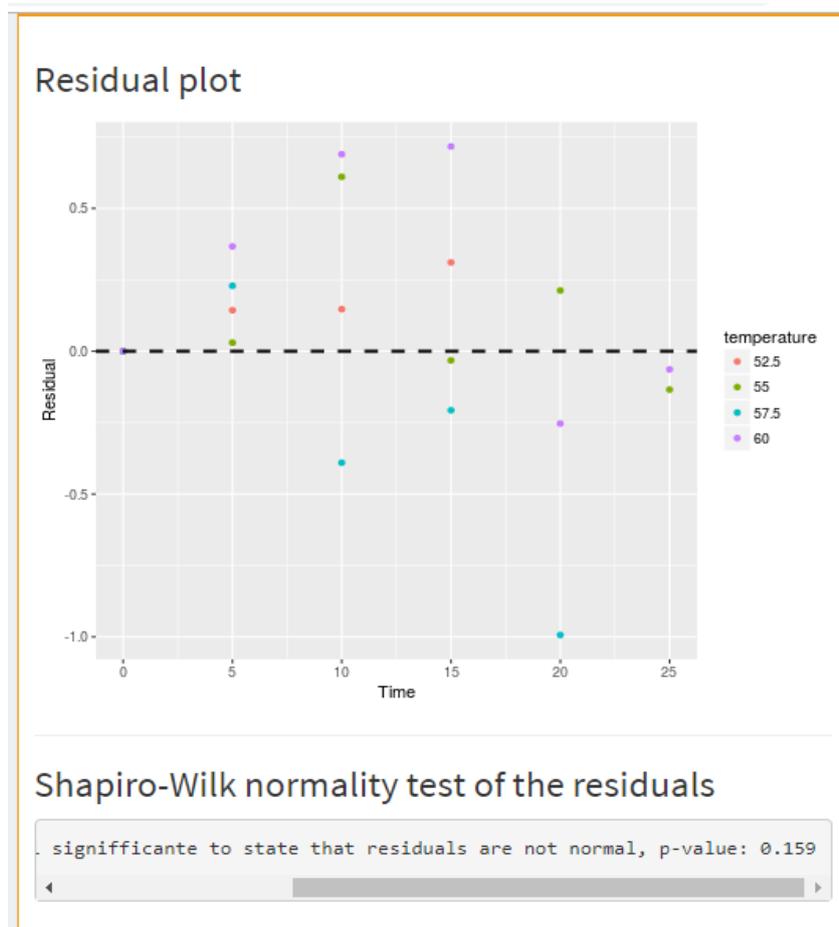
Datos de supervivencia de *L. monocytogenes* en leche

Figura 21



Ajuste del modelo de Bigelow a los datos experimentales de *L. monocytogenes* en leche.

Fig. 22



Test de Shapiro Wilkinson de normalidad de los residuos.

#### **4) CONCLUSIONES**

1. *Listeria monocytogenes* es un patógeno alimentario que puede sobrevivir a tratamientos térmicos y provocar listeriosis, una enfermedad grave en el consumidor.
2. La resistencia térmica de *L. monocytogenes* ha sido más alta cuando se ha utilizado leche como medio que en caldo TSB a pH 4,4 o en un smoothie de pH 3,8.
3. Los valores D y z obtenidos han sido comparables a los descritos en la bibliografía para niveles de pH similares, si bien en leche han sido elevados debido al efecto protector de sus componentes (grasa y/o proteínas).
4. La modelización matemática de los datos obtenidos mediante el software *Bioinactivation SE* ha permitido describir los valores D y z de *L. monocytogenes* en cada medio y su validez estadística.
5. Los resultados obtenidos pueden permitir optimizar el tratamiento térmico de *L. monocytogenes* en smoothie o caldo TSB acidificado. En el caso de la leche sería necesario contar con un mayor número de datos que permitan realizar una predicción con mayor significación estadística.

## 5) BIBLIOGRAFÍA

[ANSES,N.D.]

“*Listeria Monocytogenes*”

BLANCO, M. M.

” Recuperación de *Listeria monocytogenes* dañada subletalmente por el efecto de la congelación. Tesis doctoral.”

Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de Patología Animal. 1994.

BIGELOW, W.D. 1921.

“The logarithmic nature of thermal death time curves”.

J. Infect. Dis. 29, 528-536.

CONDÓN S., M. J. ARRIZUBIETA Y F.J. SALA (1992).

“Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC. Improvement of this methodology.”

J. Microbiol. Method., 18: 357-366.

CONESA R., ANDREU S., FERNÁNDEZ P., ESNOZ A. & PALOP A. (2009).

“Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia.”

J Appl Microbiol. 107, 506-513.

D. C. ARYANI, M. H. ZWIETERING, H. M. W DEN BESTEN

“The effect of different matrices on the growth kinetics and heat resistance of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum*”

International Journal of Food Microbiology, Volume 238, 5 Pages 326-337 5 December 2016

DOMÍNGUEZ-BERNALA, BRUNOGONZÁLEZ-ZORNAJÜRGENKREFTB., WERNER GOEBELB. (2001)

“Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*”

*Microbes and Infection* Volume 3, Issue 7, June 2001, Pages 571-584

E. J. REGAN, G. A. J. HARRISON, S. BUTLER, BMS2, J. MCLAUCHLIN, M. THOMAS AND S MITCHELL

“Primary cutaneous listeriosis in a veterinarian.”

*Veterinary Record* 2005;157:207 doi:10.1136/vr.157.7.207 (Letter)

GARRE, GERARDO GONZÁLEZ-TEJEDOR, JOSE LUCAS PEÑALVER-SOTO, PABLO S. FERNÁNDEZ, JOSE A. EGEA

“Optimal characterization of thermal microbial inactivation simulating non-isothermal processes”

*Food Research International*, Volume 107, May 2018, Pages 267-274

GARRE, A., FERNÁNDEZ, P.S., LINDQVIST, R., EGEA, J.A., 2017.

“Bioinactivation: Software for modelling dynamic microbial inactivation”.

*Food Research International* 93, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.012>

GARRE, A., CLEMENTE-CARAZO, M., FERNANDEZ, P.S., LINDQVIST, R., EGEA, J.A., 2018.

“Bioinactivation FE: A free web application for modelling isothermal and dynamic microbial inactivation”.

*Food Res. Int.* 112, pp. 353 – 360.

GUEVARA, L., ANTOLINOS, V., PALOP, A. & PERIAGO P. M.

“Impact of Moderate Heat, Carvacrol, and Thymol Treatments on the Viability, Injury, and Stress response of *Listeria monocytogenes*.”

Hindawi Publishing Corporation. 2015

GEERAERD, A.H., HERREMANS, C.H., VAN IMPE, J.F. 2000.

” Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment”.

*Int. J. Food Microbiol.* 59, 185-209. 2000

GERARDO A. GONZÁLEZ-TEJEDOR, ALBERTO GARRE, A. ESNOZ, F. ARTÉS-HERNÁNDEZ, P. S. FERNÁNDEZ

“Effect of storage conditions in the response of *Listeria monocytogenes* in a fresh purple vegetable smoothie compared with an acidified TSB medium”

Food Microbiology, Volume 72, June 2018, Pages 98-105

HASSANI, M., MAÑAS, P., PAGÁN, R. & CONDÓN

” Effect of a previous heat shock on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pHs”.

International Journal of Food Microbiology. 116: 228 – 238. S. 2007

IAIN A. GILLESPIE, JIM MCLAUCHLIN, KATHIE A. GRANT, CHRISTINE L. LITTLE, VINA MITHANI, CELIA PENMAN, CHRISTOPHER LANE, MARTYN REGAN.

“Changing Pattern of Human Listeriosis, England and Wales, 2001–2004”

Emerg Infect Dis. 2006 Sep 12(9): 1361–1366.

JAY, J. M., LOESSNER, M. J., & GOLDEN, D. A.

“Intrinsic and extrinsic parameters of foods that affect microbial growth”.

Modern food microbiology. 39-59.

KP LEMON, DE HIGGINS, R KOLTER - AM SOC MICROBIO

“Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation”

Journal of Bacteriology June 2007, p. 4418–4424

MACFADDIN, J.F. 1985.

“Media for the isolation – cultivation – maintenance of medical bacteria.  
Volume1.”

Williams and Wilkins, Baltimore, London

MAFART, P., COUVERT, O., GAILLARD, S., LEGUERINEL, I..

“On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model.”

Int. J. Food Microbiol. 72, 107-113. 2002

MARÍA B-T., MARÍA P-P., NURIA M-N., DOLORES R.

“Listeria monocytogenes inactivation kinetics under microwave and conventional thermal processing in a kiwifruit puree.”

Innovative Food Science and Emerging Technologies. 22, 131–136.

MARSHALL, R.T. (ed.). 1993.

“Standard methods for the examination of dairy products, 16th ed. American.”

Public Health Association, Washington, D.C

MEGHA GANDHI, MICHAEL L. CHIKINDAS

“Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive.”

International Journal of Food Microbiology, Volume 113, Issue 1, 1 January 2007, Pages 1-15

MENA, C., ALMEIDA, G., CARNEIRO, L., TEIXEIRA, P., HOGG, T., GIBBS, P. 2003.

“Incidence of Listeria monocytogenes in different food products commercialized in Portugal.”

Food Microbiology. 21: 213 – 216.

MICHANIE, S. 2004.

“Listeria monocytogenes la bacteria emergente de los 80. Ganados & carnes. Mayo 2004. Buenos Aires, Argentina.”

Online [http://www.bpm-haccp.com.ar/index\\_archivos/pdf/Listeria-onocytogenes.pdf](http://www.bpm-haccp.com.ar/index_archivos/pdf/Listeria-onocytogenes.pdf). Revisado 6/07/2015.

PAGÁN, R., CONDÓN, S. & SALA, F. J.

” Effect of several factors on heat-shock-induced thermotolerance of Listeria monocytogenes.”

Applied and Environmental Microbiology. 63: 3225–3232. 1997

PELEG, M., COLE, M.B..

“Reinterpretation of microbial survival curves. Crit. Rev.”

Food Sci. Nutr. 38, 353-380. 1998

P. S. MEAD , E. F. DUNNE , L. GRAVES , M. WIEDMANN.

“Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat”

<https://doi.org/10.1017/S0950268805005376>Published online: 01 December 2005 Volume 134, Issue 4 August 2006 , pp. 744-751.

SCOLARI G., ZACCONI C., BUSCONI M., LAMBRI M.

“Effect of the combined treatments of high hydrostatic pressure and temperature on *Zygosaccharomyces bailii* and *Listeria monocytogenes* in smoothies”

Food Control. 47, 166-174. (2015).

[WWW Document2015 ( <http://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/listeria>)]

EFSA Journal, 12 (2) (2014), p. 3547))

[(EFSA Journal 2011; 9 (3)2090)]

[www.combase.cc](http://www.combase.cc)

[www.fao.org](http://www.fao.org)