



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA  
Departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento agrícola

**“INFLUENCIA DE TRATAMIENTOS COMBINADOS DE CALOR Y  
ANTIMICROBIANOS NATURALES EN LA VIABILIDAD DE  
DISTINTOS MICROORGANISMOS”**

**“INFLUENCE OF HEAT TREATMENT AND NATURAL ANTIMICROBIALS  
IN THE VIABILITY OF DIFFERENT MICROORGANISMS”**

M<sup>a</sup> Dolores Esteban Maestre

2014





UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA  
Departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento agrícola

**“INFLUENCIA DE TRATAMIENTOS COMBINADOS DE CALOR Y  
ANTIMICROBIANOS NATURALES EN LA VIABILIDAD DE  
DISTINTOS MICROORGANISMOS”**

**“INFLUENCE OF HEAT TREATMENT AND NATURAL ANTIMICROBIALS  
IN THE VIABILITY OF DIFFERENT MICROORGANISMS”**

Memoria presentada por **M<sup>a</sup> Dolores Esteban Maestre**  
para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Cartagena

Director: **Alfredo Palop Gómez**





**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE  
TESIS DOCTORAL POR EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS**

D. Alfredo Palop Gómez, Director de la Tesis doctoral “Influencia de tratamientos combinados de calor y antimicrobianos naturales en la viabilidad de distintos microorganismos”

**INFORMA:**

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Dolores Esteban Maestre, dentro del programa de doctorado Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (TAIDA), dando mi conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado para ser autorizado su depósito.

La rama de conocimiento en la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 14 de Marzo de 2014

EL DIRECTOR/A DE LA TESIS



Fdo.: D. Alfredo Palop Gómez

**COMISIÓN DE DOCTORADO**





**CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL  
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA**

D. Francisco Artés Hernández, Presidente de la Comisión Académica del Programa Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (TAIDA).

**INFORMA:**

Que la Tesis Doctoral titulada, “Influencia de tratamientos combinados de calor y antimicrobianos naturales en la viabilidad de distintos microorganismos”, ha sido realizada, dentro del mencionado programa de doctorado, por D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Dolores Esteban Maestre, bajo la dirección y supervisión del Dr. D. Alfredo Palop Gómez.

En reunión de la Comisión Académica de fecha 7/03 de 2014, visto que en la misma se acreditan los indicios de calidad correspondientes y la autorización del Director de la misma, se acordó dar la conformidad, con la finalidad de que sea autorizado su depósito por la Comisión de Doctorado.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 14 de marzo de 2014

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

Fdo: D. Francisco Artes Hernandez

**COMISIÓN DE DOCTORADO**





*A mis hijos,*



Me gustaría dar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una u otra forma, han hecho que sea posible la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi director de tesis, el Catedrático Alfredo Palop Gómez, porque no hay palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí. Por tu apoyo continuo, por tu paciencia y por tu esfuerzo y perseverancia para que este trabajo saliera adelante. Por todo lo que me has enseñado, y sobre todo por tu calidad humana. Ha sido un placer trabajar contigo todos estos años.

Gracias también al Catedrático D. Pablo S. Fernández Escámez y a la Dra. Paula M. Periago Bayonas, por haberme acogido en el departamento, por vuestros consejos y recomendaciones.

Al Instituto de Biotecnología Vegetal, por permitirme realizar parte de este trabajo en sus instalaciones.

Especial thanks to Prof. Mackey to let me the opportunity to work at his Department in the University of Reading. Working under his supervision enabled me to increase my knowledge about sublethal injury and food preservation by High Hydrostatic Pressure. Thanks to the rest of the staff for all the help during my instance.

I also acknowledge Prof. Leguerinel, Prof. Pin, Pro. Valdramidis and Prof. Stéphane for kindly accepting to refer this manuscript.

A Juanpi, May, y Vera, por vuestra amistad y por estar ahí, dispuestos a ayudarme siempre que os he necesitado. Una experiencia enriquecedora haber podido trabajar en equipo con vosotros.

A Javi, Leymaya, Lola, Marina, Rakel, Santi y Vera por vuestra ayuda, vuestros consejos y por vuestra compañía, que han hecho más amenas todas esas horas de laboratorio.

A Fermín, gracias por tu paciencia, esfuerzo y profesionalidad, no se si este trabajo habría sido posible si no hubieras estado ahí para solucionar tantos problemas.

Al Ministerio de Educación y Ciencia que ha financiado esta investigación a través de una Beca de Formación de Personal Investigador.

A mi padre, primero por la educación que me diste cuando era una niña, por confiar y sobre todo, por tu amistad incondicional cuando llegué a ser adulta, apoyándome y respaldando mis decisiones, aun sabiendo que podían no ser las más acertadas. Gracias papá. A ti mamá por ser cómo eres, fuerte y luchadora. Valores que vendrán siempre conmigo. Gracias mamá.

Y por supuesto gracias a mi familia. A ti Álvaro por estar siempre a mi lado, por hacerme seguir hacia delante y también por todas esas horas de apoyo logístico. Y a mis hijos Paula, Marina y Álvaro, porque haceis que cada día merezca la pena.

## RESUMEN

Los tratamientos térmicos se aplican profusamente en la industria alimentaria ya que permiten destruir a los microorganismos y a sus enzimas de forma controlada, garantizando, hasta ciertos niveles, la salubridad y estabilidad de los alimentos. Sin embargo, dichos tratamientos también afectan a algunos componentes termolábiles y a sus características organolépticas. El uso de antimicrobianos naturales es una alternativa que, mediante su combinación con los tratamientos térmicos, permitiría disminuir la intensidad de los mismos, conservando así sus características originales.

En esta Tesis Doctoral se eligieron como microorganismos objeto de estudio aquellos responsables de toxiinfecciones alimentarias pertenecientes a grupos estructuralmente distintos, para comprobar si estas diferencias podrían afectar a la eficacia de los tratamientos aplicados. Para profundizar en el estudio de los tratamientos térmicos, se ha hecho una especial incidencia en la investigación del efecto de las velocidades de calentamiento, factores cuya influencia en la termorresistencia microbiana es bastante desconocido. Se ha elegido como antimicrobianos naturales, una bacteriocina (nisina) y dos compuestos presentes en los aceites esenciales de hierbas aromáticas y especias (carvacrol y timol).

Se ha investigado el efecto de las características del medio de tratamiento y de la velocidad de calentamiento y enfriamiento sobre la resistencia al calor de esporas de *Bacillus sporothermodurans*. Los resultados obtenidos para tratamientos no isotérmicos de 1 y 10°C/min en distintos medios de tratamiento pudieron predecirse adecuadamente mediante el uso de los modelos no lineales de Weibull y Geeraerd.

Se comprobó si la adición de timol al medio de calentamiento y/o de recuperación afectaba a la termorresistencia de distintas cepas de esporas de *Bacillus*, obteniendo un efecto mayor cuando este compuesto era añadido al medio de recuperación. Se pudo plantear una ecuación que encontraba una relación entre la concentración de timol adicionada al medio de recuperación y la disminución del valor D (valor  $z_{\text{timol}}$ ) para cada microorganismo estudiado. El mayor efecto se observó en *Bacillus subtilis* AdHC1 que presentó un valor  $z_{\text{timol}} = 3,14$ .

Al estudiar el efecto de la adición de nisina sobre el crecimiento de una cepa de *Listeria monocytogenes* y dos cepas de *Salmonella enterica*, se observó un aumento de

la fase de latencia de 13,84 a 17,03 horas para *Listeria* cuando se añadió 0,13  $\mu\text{M}$  de nisina, pero no varió para *Salmonella* incluso a la concentración más alta ensayada (1,2  $\mu\text{M}$ ). La velocidad de crecimiento se redujo ligeramente para los tres microorganismos.

El carvacrol tuvo un efecto mayor en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* mostrando, en el caso de *Listeria*, un efecto dosis-dependiente que se pudo predecir mediante modelos matemáticos secundarios.

La adición de nisina y carvacrol a células de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* sometidas a un tratamiento térmico previo de 15 minutos a 55°C mostró un efecto sinérgico sobre el crecimiento en caldo de *Listeria* y un efecto aditivo en el caso de *Salmonella*. El efecto sinérgico hallado en *Listeria* se encontró también cuando el crecimiento se realizó en una matriz alimentaria.

## ABSTRACT

Heat treatments are widely extended in food industry since they are able to inactivate microorganisms and their enzymes in a controlled way, ensuring food safety and stability to certain levels. Nevertheless, these treatments have negative effects on heat sensitive compounds and on the organoleptic characteristics of foods. The use of natural antimicrobials is an alternative that, in combination with heat treatments, would help to decrease their intensity, preserving the natural characteristics of the products.

In this Thesis, the microorganisms were chosen among those responsible for food poisoning outbreaks and belonging to different structural groups, in order to check if the differences would affect the efficiency of the treatments applied. With the aim of going in depth of the heat treatments. A special emphasis has been paid to the heating rates, applied during thermal treatments, since the influence of this factor on the heat resistance of microorganisms is quite unknown. As natural antimicrobials, a bacteriocin (nisin) and two compounds present in the essential oils of aromatic herbs and spices (carvacrol and thymol) were chosen.

The effect of the medium characteristics and of the heating and cooling rates on the heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* spores has been investigated. The results obtained for non-isothermal heat treatments at 1 and 10°C/min in different treatment media were accurately predicted by the non-linear models of Weibull and Geeraerd.

The impact of the addition of thymol to the heating and/or recovery medium on the heat resistance of different strains of *Bacillus* spores was tested. The results showed a greater effect when thymol was added to the recovery medium than when it was added to the heating medium. Moreover, a relationship between the thymol concentration added to the recovery medium and the decrease in the  $D_{\text{value}}$  was found. This relationship was expressed as a mathematical equation ( $z_{\text{thymol}}$ ) for each microorganism under research. The biggest effect was shown for *Bacillus subtilis* AdHC1, with a  $z_{\text{thymol}} = 3.14$ .

The effect of the addition of nisin on the growth of one strain of *Listeria monocytogenes* and two strains of *Salmonella enterica* was also studied. An increase in the lag phase from 13.84 to 17.03 hours was found for *Listeria* when a concentration 0.13  $\mu\text{M}$  nisin was added, but no delay in the lag phase of *Salmonella* was shown, even

for the highest concentration tested (1.2  $\mu\text{M}$ ). The growth rate was slightly decreased for the three microorganisms under study.

Carvacrol had a higher effect than nisin on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*, showing, a dose-dependent effect for *Listeria* that could be predicted by mathematical secondary models.

The addition of nisin and carvacrol to *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* cells, previously heat treated to 55°C for 15 minutes, showed a synergistic effect on the growth on broth of *Listeria* and an additive effect for *Salmonella*. The synergistic effect found for *Listeria* in broth was also found in a food matrix.



## ÍNDICE



<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1. MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN LOS ALIMENTOS</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1.1. Estructura celular de las bacterias: Bacterias Gram-positivas y Gram negativas</b> .....	<b>9</b>
1.1.1.1. La membrana plasmática.....	10
1.1.1.2. La pared celular.....	10
<b>1.1.2. Bacterias Gram-positivas: <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	<b>12</b>
<b>1.1.3. Bacterias Gram-negativas: <i>Salmonella spp.</i></b> .....	<b>13</b>
<b>1.1.4. Bacterias esporuladas: <i>Bacillus spp.</i></b> .....	<b>14</b>
1.1.4.1. <i>Bacillus sporothermodurans</i> .....	14
1.1.4.2. <i>Bacillus cereus</i> .....	16
1.1.4.3. <i>Bacillus subtilis</i> .....	17
1.1.4.4. <i>Bacillus licheniformis</i> .....	17
<b>1.2. CRECIMIENTO MICROBIANO</b> .....	<b>18</b>
1.2.1. La curva de crecimiento microbiano.....	18
1.2.2. Factores que afectan al crecimiento microbiano.....	19
1.2.3. Modelización de la curva de crecimiento microbiano.....	20
<b>1.3. LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS</b> .....	<b>22</b>
1.3.1. Pasteurización.....	22
1.3.2. Esterilización.....	23
<b>1.4. CINÉTICA DE DESTRUCCIÓN MICROBIANA POR CALOR</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4.1. Inactivación de microorganismos en condiciones isotérmicas</b> .....	<b>24</b>
1.4.1.1. Curvas de supervivencia no logarítmicas.....	26
<b>1.4.1.2. Modelización de la curva de supervivencia</b> .....	<b>27</b>
1.4.1.2.1. El modelo de Weibull.....	28
1.4.1.2.2. El modelo de Geeraerd.....	30
1.4.2. Efecto de la temperatura de tratamiento en la inactivación de microorganismos.....	31
<b>1.4.3. Inactivación de microorganismos en condiciones no isotérmicas</b> .....	<b>32</b>
1.4.3.1. Modelo de Weibull.....	33
1.4.3.2. Modelo de Geeraerd.....	33
<b>1.5. DAÑO SUBLETAL</b> .....	<b>34</b>
<b>1.6. MECANISMOS DE ADAPTACIÓN Y RESISTENCIA</b> .....	<b>34</b>
<b>1.7. LOS ANTIMICROBIANOS NATURALES COMO MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS</b> .....	<b>36</b>
<b>1.7.1. Nisina</b> .....	<b>37</b>
1.7.1.1. Mecanismo de acción.....	37
1.7.1.2. Aplicaciones.....	38
<b>1.7.2. Aceites esenciales</b> .....	<b>40</b>
1.7.2.1. Carvacrol.....	40
1.7.2.2. Timol.....	41
1.7.2.3. Mecanismo de acción.....	41
<b>1.8. MÉTODOS COMBINADOS DE CONSERVACIÓN</b> .....	<b>45</b>

1.9. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS: LA CITOMETRÍA DE FLUJO. ....	46
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3. AIM AND IMPACT .....</b>	<b>54</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>
4.1. Microorganismos. ....	60
4.2. Preparación de los microorganismos. ....	61
4.2.1. Células vegetativas. ....	61
4.2.2. Esporas.....	61
4.3. Compuestos químicos. ....	62
4.4. Preparación del zumo de zanahoria. ....	62
4.5. Curvas de crecimiento.....	63
4.5.1. Curvas de crecimiento realizadas por medida de la absorbancia en un espectrofotómetro. ....	63
4.5.2. Curvas de crecimiento realizadas por medida de la absorbancia en un Bioscreen. ....	64
4.5.3. Curvas de crecimiento realizadas por recuento en placa. ....	64
4.5.4. Tratamiento térmico previo. ....	64
4.5.5. Modelización de las curvas de crecimiento. ....	65
4.5.6. Análisis estadístico. ....	66
4.6. Determinación de la resistencia térmica. ....	66
4.6.1. El termorresistómetro Mastia.....	66
4.6.2. Determinaciones de termorresistencia de microorganismos en el termorresistómetro Mastia.....	68
4.6.3. Recuperación de supervivientes.....	69
4.6.4. Análisis de datos.....	70
4.6.4.1. Cálculo de los valores D y z en condiciones isotérmicas.....	70
4.6.4.2. Modelo de Weibull.....	71
4.6.4.3. Modelo de Geeraerd.....	72
4.6.4.4. Predicción del número de supervivientes en condiciones no isotérmicas. ....	72
4.6.5. Análisis estadístico. ....	73
4.7. Citometría de flujo.....	73
4.7.1. El citómetro de flujo. ....	73
4.7.2. Fluorocromos.....	74
4.7.3. Preparación de las muestras. ....	74
4.7.4. Adquisición de muestras.....	76
4.7.5. Recuento en placa.....	76
4.7.6. Análisis de datos.....	76
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>

5.1. CAPITULO I: “Efecto de las características del medio y de la velocidad de calentamiento y enfriamiento en la resistencia al calor en condiciones no isotérmicas de esporos de <i>Bacillus sporothermodurans</i> IC4.” .....	79
5.2. CAPITULO II: “Efecto del timol en el medio de calentamiento y de recuperación sobre la resistencia al calor de esporos de <i>Bacillus</i> en condiciones isotérmicas y no isotérmicas” .....	89
5.3. CAPITULO III: “Nisina carvacrol y sus combinaciones en el crecimiento de células de <i>Listeria monocytogenes</i> tratadas termicamente.” .....	100
5.4. CAPITULO IV: “Efecto combinado effect of nisin, carvacrol and a previous thermal treatment on the growth of <i>Salmonella</i> enteritidis and <i>Salmonella</i> senftenberg.” .....	110
5.5. CAPITULO V: “Evaluación de la viabilidad de <i>Listeria monocytogenes</i> expuesta a calor y antimicrobianos naturales mediante citometría de flujo” .....	120
6. CONCLUSIONES .....	134
7. CONCLUSIONS .....	139
8. REFERENCIAS .....	144



# **1. INTRODUCCIÓN**





El hombre, en sus orígenes era nómada, y para poder alimentarse iba de un lugar a otro, buscando siempre zonas con agua, y abundante caza y pesca. Con el transcurso del tiempo, el hombre fue evolucionando, y comenzó a producir y almacenar sus propios alimentos. Ya entonces, era evidente la alteración de los alimentos por los microorganismos y la muerte por ingesta de alimentos contaminados. Así que sin tener constancia de la existencia de los microorganismos, los sumerios, 3000 años antes de Cristo, empezaron a conservar de la carne y el pescado por medio del uso de salazones. Más tarde, surgieron otras técnicas de conservación y elaboración de alimentos, como la conservación en aceite, el ahumado, el secado al sol, las fermentaciones naturales, la

transformación de cereales en pan y la reducción de la actividad acuosa por el agregado de azúcar y sal.

Sin embargo, no fue hasta el siglo XIX cuando se produjo un cambio significativo en los métodos de conservación de alimentos. La revolución industrial originó un desarrollo tal de las ciudades que los métodos artesanales de producción de alimentos eran insuficientes para abastecer las necesidades de toda la población. Esto hizo necesario el desarrollo de la producción de alimentos a escala industrial y también del transporte, ya que estas industrias necesitaban abastecerse de materias primas, obtenidas en ocasiones a gran distancia del lugar de demanda. Era por tanto necesaria la conservación, y el almacenamiento y transporte tanto de las materias primas como de los alimentos procesados.

Con el desarrollo de la ciencia y la tecnología, la conservación de alimentos evolucionó con gran rapidez, estableciéndose las bases científicas de la conservación de los alimentos, hasta entonces aplicadas de forma empírica en los métodos tradicionales. Aunque el descubrimiento de la existencia de los microorganismos se atribuye a Antony van Leeuwenhoek, en 1693, gracias a la invención del microscopio, no fue hasta casi dos siglos más tarde, en que Louis Pasteur reconoció el importante papel que juegan éstos en la alteración de muchos alimentos.

## **1.1. MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN LOS ALIMENTOS.**

La naturaleza biológica de los alimentos, sus propiedades físico-químicas y la disponibilidad de sus nutrientes, los convierten en un sustrato idóneo para el desarrollo de microorganismos. Además, estas características de los alimentos también son determinantes en el efecto que un posible tratamiento de conservación pueda tener sobre un microorganismo determinado, ya que varios estudios han comprobado la existencia de un efecto protector de algunos compuestos de los alimentos sobre los microorganismos cuando los alimentos eran sometidos a distintas técnicas de conservación (Delgado *et al.*, 2004; Pagan *et al.*, 2005). Así mismo, estos métodos de conservación también pueden modificar estas características e influir en el deterioro de los mismos.

Los principales tipos de microorganismos que participan en el deterioro de los alimentos son bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Estos pueden atacar prácticamente todos los componentes de los alimentos, e incluso si los colonizan de forma simultánea, favorecer unos el desarrollo de otros (Davis *et al.*, 1996).

Estos microorganismos son de un gran interés para la industria agroalimentaria, no sólo desde un punto de vista económico, por las elevadas pérdidas producidas por los microorganismos alterantes de alimentos, sino también desde un punto de vista sanitario, ya que son muchos los microorganismos patógenos, causantes de tox infecciones alimentarias (Davidson, 2001). De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la diarrea por intoxicación de origen alimentario como la enfermedad más común y más ampliamente diseminada en poblaciones humanas en el mundo; para 1999 se estimaron 1.500 millones de casos al año y 3 millones de muertes de niños (WHO, 1999).

Para intentar saber cómo las distintas técnicas de conservación pueden afectar a cada microorganismo es necesario conocer su estructura y fisiología. Por esto, para la realización de esta Tesis Doctoral se eligieron microorganismos con características estructurales y fisiológicas distintas: células vegetativas Gram-positivas y Gram-negativas y esporos.

### **1.1.1. Estructura celular de las bacterias: Bacterias Gram-positivas y Gram negativas.**

En función de las estructuras celulares que envuelven la célula, las bacterias se dividen en dos grandes grupos taxonómicos: Gram-positivas y Gram-negativas (figura 1.1). La envoltura celular de las bacterias Gram-positivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior. A diferencia de éstas, las bacterias Gram-negativas, presentan una segunda membrana lipídica externa a la capa de peptidoglicano, la cual es mucho más delgada. Entre la membrana plasmática y la pared celular se encuentra el periplasma o espacio periplasmático. En el interior de la membrana plasmática se encuentra el citoplasma que está constituido por una disolución acuosa, en la que existen gran variedad de sustancias como: sales, azúcares, aminoácidos, vitaminas y

coenzimas, y en el centro se ubica la zona menos densa llamada nucleoide, cuyo principal componente es el ADN.

#### **1.1.1.1. La membrana plasmática.**

La membrana citoplasmática está constituida por una bicapa fosfolipídica, compuesta por ácidos grasos y glicerol. En esta membrana lipídica se pueden encontrar proteínas embebidas, tanto integrales como periféricas. La estructura de la membrana citoplasmática se estabiliza mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Además, cationes como  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  contribuyen a la estabilización de la membrana mediante interacciones iónicas con los grupos polares con carga negativa presentes en los fosfolípidos.

En todo el rango de temperatura de crecimiento de las bacterias, los fosfolípidos y las proteínas presentan cierta fluidez, lo que le confiere permeabilidad a la membrana. Esta permeabilidad otorga a la membrana la función de barrera selectiva, permitiendo la entrada de determinados metabolitos y la salida de las sustancias de desecho, ya que el paso de estas sustancias se realiza mayoritariamente por transporte activo.

#### **1.1.1.2. La pared celular.**

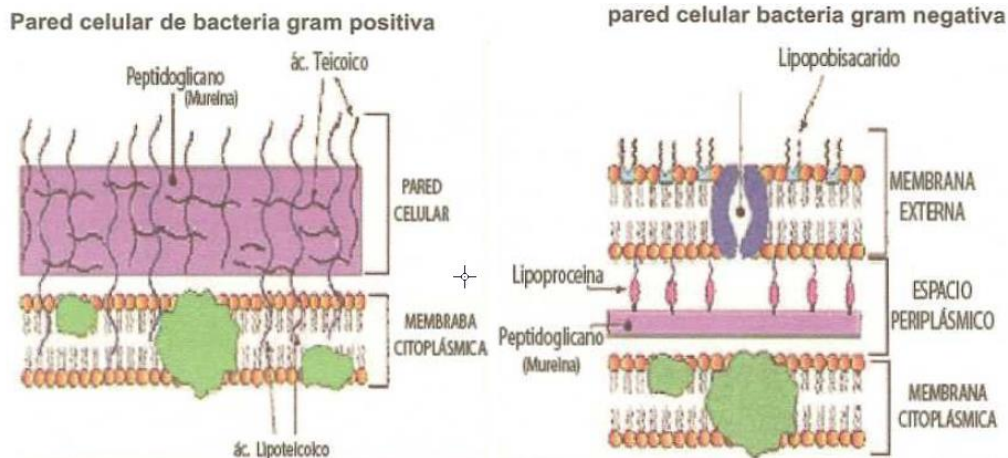
Las bacterias Gram-positivas presentan una capa de peptidoglicano muy gruesa (figura 1.1), que es responsable de la retención de los tintes violetas durante la tinción de Gram. Este peptidoglicano es un polímero de N-acetil-2-D-glucosamina, unido en orientación  $\beta$ -1,4 con ácido N-acetil murámico. A éste se agrega por el grupo lactilo un péptido formado por cuatro o más aminoácidos. Esta molécula se polimeriza gran cantidad de veces, de modo que se forma una malla especial, llamada sáculo de mureína. Dicho compuesto es de vital importancia para conservar la forma y darle rigidez a la célula bacteriana (si este compuesto no existiese, la célula reventaría debido a su gran potencial osmótico). Las paredes celulares Gram-positivas contienen unos polialcoholes denominados ácidos teicoicos, algunos de los cuales se enlazan con lípidos para formar ácidos lipoteicoicos. Puesto que los ácidos lipoteicoicos tienen

enlaces covalentes con los lípidos de la membrana citoplásmica, son responsables de enlazar el peptidoglicano a la membrana citoplásmica. Los ácidos teicoicos dan a la pared celular Gram-positiva una carga negativa total debido a la presencia de los enlaces de fosfodiéster entre los monómeros del ácido teicoico.

La pared celular de las bacterias Gram-negativas, por el contrario, contiene una capa fina de peptidoglicano adyacente a la membrana citoplásmica, que es insuficiente para conservar el color violeta en la decoloración con etanol durante la tinción de Gram.

Además de la capa de peptidoglicano, las bacterias Gram-negativas presentan una membrana externa adicional semejante a la membrana citoplasmática (figura 1.1), compuesta por fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos. La naturaleza altamente cargada de los lipopolisacáridos confiere una carga negativa total a la pared. La estructura química de los lipopolisacáridos externos de la membrana es a menudo única a las cepas bacterianas específicas y es responsable de muchas de las características antigénicas de estas cepas.

Como en el caso de la membrana citoplasmática, la parte lípida de la membrana externa es, en gran parte, impermeable a todas las moléculas cargadas. Sin embargo, unos canales denominados porinas, presentes en la membrana externa, permiten el transporte pasivo de muchos iones, azúcares y aminoácidos a través de la membrana externa. Estas moléculas están, por lo tanto, presentes en el periplasma, la región comprendida entre las membranas citoplasmática y exterior. El periplasma contiene la capa de peptidoglicano y muchas proteínas responsables de la unión al substrato, hidrólisis y recepción de señales extracelulares. Se supone que el periplasma se encuentra en un estado de tipo gel más que en estado líquido debido a la alta concentración de proteínas y de peptidoglicano que contiene. Debido a la localización del periplasma entre las membranas citoplásmica y externa, las señales recibidas y los substratos son transportados mediante las proteínas que contiene.



**Figura 1.1.** Estructura de la envoltura de una bacteria Gram-positiva y de una bacteria Gram-negativa (fuente: biologia.laguia2000.com)

### 1.1.2. Bacterias Gram-positivas: *Listeria monocytogenes*.

*Listeria monocytogenes* es una bacteria bacilar, anaerobia facultativa, móvil a 20-25°C, gracias a la presencia de un flagelo en posición distal, pero inmóvil a 37°C. Es un microorganismo capaz de crecer a temperaturas de refrigeración y en un amplio rango de pH. También es capaz de crecer a elevadas concentraciones de NaCl (Farber y Peterkin., 2000). Además este microorganismo posee una gran capacidad de adaptación al medio lo cual le permite sobrevivir a diversos cambios (Chaturongakul. *et al.*, 2008). *L. monocytogenes* es un patógeno oportunista, capaz de sobrevivir y multiplicarse fuera de hospedadores animales y en medios nutritivos muy simples. *L. monocytogenes* ha sido aislada de gran variedad de hábitats, como el suelo, aguas residuales, aire de salas de procesamiento de alimentos, carne, marisco crudo, hortalizas, heces de personas y animales sanos, y leche.

*L. monocytogenes* es el agente causal de la listeriosis, enfermedad de gran relevancia para la salud pública dada su gravedad, ya que puede provocar la muerte por meningitis y septicemia en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas, presenta un alto índice de mortalidad, causando la muerte del 20-30% de las personas infectadas. El 99% de las listeriosis producidas en humanos son de origen alimentario (Mead *et al.*, 1999). Dado que la contaminación de alimentos por *L. monocytogenes* suele ser baja, y que la dosis infectiva de humanos es relativamente alta (Vázquez-Boland *et al.*, 2001), la alta tasa de

incidencia de listeriosis en humanos se debe a la capacidad de *L. monocytogenes* de sobrevivir a distintas técnicas de procesado y a su capacidad para multiplicarse a temperaturas de refrigeración.

Por todo esto, *L. monocytogenes* es un microorganismo objeto de gran número de investigaciones realizadas sobre nuevas técnicas de conservación en productos listos para el consumo conservados a temperaturas de refrigeración durante largo tiempo, ya que, en los últimos años, han sido los productos de mayor riesgo (Rocourt y Cossart, 2000).

### **1.1.3. Bacterias Gram-negativas: *Salmonella* spp.**

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* son microorganismos patógenos que actualmente se encuentran englobadas dentro de la familia de las enterobacterias. Son bacilos Gram- negativos, no formadores de esporos, anaerobios facultativos y presentan flagelos peritricos. Son microorganismos capaces de crecer en un alto rango de temperaturas, desde 5,2 hasta 46°C, y en un amplio rango de pH desde 3,8 hasta 9,5. La capacidad de este microorganismo para resistir condiciones extremas de pH y temperatura, unido al hecho de que puedan sobrevivir largos periodos de tiempo en los alimentos, le permiten en determinadas ocasiones sobrevivir a determinados tratamientos de conservación y posteriormente desarrollarse durante el almacenamiento, inclusive a temperaturas de refrigeración.

*Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium son las serovariedades relacionadas mayoritariamente con los brotes de intoxicaciones alimentarias (Doyle y Mazzota, 2000). Sin embargo, otras serovariedades altamente termorresistentes, como *Salmonella* Senftenberg, también han sido las causantes de distintos brotes (L'Ecuyer *et al.*, 1996; Rushdy *et al.*, 1998). Es un microorganismo causante de enfermedades gastrointestinales, principalmente diarreas, que incluso pueden llevar a la muerte si no son tratadas debidamente (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010). Es el responsable de 14,43 casos de toxiinfecciones alimentarias por cada 100.000 habitantes (CDC, 2006). Esto hace que sea uno de los microorganismos responsables de la mayoría de las toxiinfecciones alimentarias declaradas a nivel mundial y, por lo tanto, objeto de gran número de estudios en la industria agroalimentaria.

#### **1.1.4. Bacterias esporuladas: *Bacillus spp.***

Ciertas bacterias Gram-positivas pueden sintetizar una forma de resistencia bacteriana, el espora, que les permite sobrevivir en condiciones desfavorables, y que, se puede transformar de nuevo en forma vegetativa cuando las condiciones del medio vuelven a ser favorables. Las bacterias esporuladas, debido a su elevada resistencia al calor y a otras condiciones adversas, tienen un gran interés en la industria agroalimentaria.

El género *Bacillus* esta compuesto por bacilos Gram-positivos capaces de formar esporos, estrictamente aerobios o anaerobios facultativos. Estos microorganismos se encuentran en frutas y vegetales y, sus esporos, son capaces de resistir las condiciones de esterilización, causando daños y alterando las conservas. No obstante su rango de pHs de crecimiento con un mínimo siempre por encima de 4, les impide desarrollarse en alimentos ácidos. Presentan un amplio rango temperatura de crecimiento, que va desde los 4 hasta los 75°C (Prescott *et al.*, 2002).

Existen más de sesenta especies distintas ampliamente distribuidas en la naturaleza.

##### **1.1.4.1. *Bacillus sporothermodurans.***

Tradicionalmente la especie más termorresistente del género *Bacillus* ha sido *Bacillus stearothermophilus*, reclasificada en la actualidad dentro del género *Geobacillus* (Nazina *et al.*, 2001). No obstante, varios autores (Foschino *et al.*, 1990; Kessler *et al.*, 1994; Haummer *et al.*, 1995) publicaron la existencia de bacterias mesófilas formadoras de esporos termorresistentes causantes de la no esterilidad de la leche UHT. Investigaciones moleculares sobre el RNAr de la fracción 16S de los ribosomas de estas bacterias mostraron que se trataba de una nueva especie de *Bacillus* (Klijn *et al.*, 1994) la cual, fue aislada por primera vez en 1990 en leche esterilizada por UHT en Alemania y descrita por Petterson *et al.*, (1996) como *Bacillus sporothermodurans*.

Su capacidad para poder sobrevivir a estos tratamientos radica en su elevada termorresistencia, ya que es capaz de sobrevivir a un tratamiento térmico de 130°C durante 4 segundos (Huemer *et al.*, 1998), a su inusual cinética de termodestrucción, y a



su capacidad para germinar durante el almacenamiento de estos productos, alterando sus características organolépticas debido a su actividad proteolítica y, por tanto, reduciendo su vida útil. Los daños que este microorganismo provoca en la leche se manifiestan en cambios de color y sabor de la leche y desestabilización de la caseína (Klijn *et al.*, 1997). Un aumento de la temperatura y el tiempo de tratamiento para inactivar *B. sporothermodurans* afecta notablemente a las características organolépticas y nutricionales de la leche (Claeys *et al.*, 2001). *B. sporothermodurans* también fue aislado en sopa con curry india la cual había recibido un tratamiento térmico con un  $F_0$  mínimo de 8,9 minutos (Oomes *et al.*, 2007).

Van Zuijlen *et al.* (2009) realizaron un estudio sobre cómo afectan las condiciones de esporulación a la termorresistencia de *Bacillus sporothermodurans* IC4, obteniendo los valores de termorresistencia más altos a 121°C, 4,1 y 4,34 min., respectivamente, en el agar de esporulación Campden (Campden sporulation agar, CSA) y en el agar nutritivo fortificado (Fortified Nutrient Agar; FNA). Los valores de termorresistencia obtenidos con agar con extracto de sopa de champiñones (Mushroom soap agar; MSA;  $D_{121}=2,87$  min.) y con agar nutritivo ( $D_{121}$  2,7 min.) fueron netamente inferiores. En su estudio concluyeron que *B. sportothermodurans* es un microorganismo adecuado para evaluar y optimizar procesos de esterilización de alimentos porque sus esporos tienen una termorresistencia constante y adecuada, la cual puede llegar a ser máxima utilizando diferentes medios de esporulación. Por todo ello, concluye que estos esporos son más adecuados para la validación de procesos, que por ejemplo, los esporos de *Geobacillus stearothermophilus* utilizados normalmente para este fin.

Su elevada termorresistencia lo hace una de las especies más termorresistentes del género *Bacillus* por lo que está siendo utilizada como microorganismo de referencia para la evaluación biológica de tratamientos térmicos (Periago, *et al.*, 2004). A pesar de ello existen pocos datos sobre su comportamiento frente a los tratamientos térmicos, posiblemente debido a su reciente descubrimiento.

Los estudios realizados por Periago *et al.*, (2004), mostraron que las curvas de supervivencia isotérmicas de *B. sporothermodurans* en diferentes sopas son claramente no lineales. Por lo tanto, ninguno de los métodos convencionales basados en la linealidad del logaritmo de supervivientes frente al tiempo puede ser utilizado para predecir su inactivación. Van Zuijlen *et al.*, (2009), también observaron la presencia de

hombros en las curvas de supervivencia de estos esporos obtenidas tanto en tubos capilares como en el termorresistómetro, lo que corrobora estudios previos y confirma que esto es un fenómeno común en esporos de alta termorresistencia (Cook y Brown, 1965; David y Merson, 1990). Además publicaron que los modelos de Weibull y Geeraerd que describían mejor la inactivación de los esporos de *B. sporothermodurans* que los modelos logarítmicos lineales convencionales.

#### **1.1.4.2. *Bacillus cereus*.**

Los microorganismos pertenecientes a esta especie producen dos tipos de enfermedades alimentarias, el síndrome emético y el diarreico. El síndrome emético o de vómitos ha sido asociado a una toxina termoestable, capaz de permanecer activa durante dos meses almacenada a 4°C. A diferencia de la toxina diarreica, la toxina emética se produce durante la fase estacionaria del crecimiento. El número de microorganismos necesarios para provocar el síndrome emético es mayor que el número necesario para provocar el síndrome diarreico. Ambas enfermedades gastrointestinales presentan, generalmente, síntomas moderados, que desaparecen en unas 24 horas y son muy similares a otras enfermedades producidas por patógenos alimentarios, por lo que la incidencia de estos microorganismos puede ser infra estimada. Sin embargo, las enfermedades no gastrointestinales, son reportadas como enfermedades sistémicas, normalmente asociadas con pacientes inmunodeprimidos (Kotiranta *et al.*, 2000).

*B. cereus* es, del género *Bacillus*, el principal agente causal de las infecciones gastrointestinales debido a la producción de un amplio rango de factores de virulencia. Aunque los procesos heméticos y diarreicos son moderados, se han descrito casos severos e incluso en algunos casos han provocado la muerte (Lund *et al.*, 2000). Además, *B. cereus* es el responsable de infecciones locales y sistémicas entre las que se incluyen queratitis, endoftalmitis, panoftalmitis, periodontitis, meningitis, neumonía, infecciones del tracto urinario y fallos renales letales (Beecher *et al.*, 2000; Kotiranta *et al.*, 2000) especialmente en pacientes inmunodeprimidos, neonatos, drogadictos, heridas quirúrgicas y catéteres (Drobniowski, 1993; Kotiranta *et al.*, 2000; Hilliard *et al.*, 2003).

#### **1.1.4.3. *Bacillus subtilis*.**

Es una especie típicamente mesófila, con temperaturas óptimas de crecimiento y esporulación próximas a 32°C. Este microorganismo no está considerado como patógeno humano. Sin embargo, puede contaminar los alimentos, aunque raramente causa intoxicación alimenticia. Pese a que tradicionalmente se ha considerado de baja termorresistencia (Stumbo, 1965), y consecuentemente de escasa repercusión en la alteración de productos esterilizados, ha sido aislado repetidamente en alimentos tratados por el calor, desde conservas vegetales acidificadas (Fields *et al.*, 1977) hasta leches esterilizadas, incluso a temperaturas ultraelevadas (Davies, 1975). Por esto, *B. subtilis*, es una de las especies más investigadas y de la que todavía no se han resuelto las causas de su inesperada supervivencia. Además, *B. subtilis* se ha mostrado muy manejable para la manipulación genética, por lo que se ha adoptado como un organismo modelo para estudios de laboratorio, sobre todo de esporulación.

*B. subtilis* ha sido identificado como uno de los agentes causales de enfermedades transmitidas por alimentos en el Reino Unido, Australia, Nueva Zelanda y Canadá. Los alimentos contaminados que han provocado todos estos síntomas han sido carne, mariscos, pasta y arroz. Los niveles de *B. subtilis* encontrados en estos alimentos oscilaban en un rango de 10<sup>5</sup> a 10<sup>9</sup> ufc/g (Robinson *et al.*, 1999). El comienzo de los síntomas, que típicamente incluyen diarrea y vómitos, puede ocurrir en un corto periodo de tiempo, de 10 minutos a 14 horas y la duración de estos síntomas puede durar desde 1,5 a 8 horas (Robinson *et al.*, 1999). Otros síntomas que pueden aparecer son dolor abdominal y náuseas.

#### **1.1.4.4. *Bacillus licheniformis*.**

Es un microorganismo muy ubicuo, ya que lo podemos encontrar en la tierra y en el polvo, por lo que ha sido asociado frecuente como contaminante de alimentos y enfermedades alimentarias (Salkinoja *et al.*, 1999). Es conocido como un microorganismo alterante del pan, la leche (Mostert *et al.*, 1979; Foschino *et al.*, 1990),

carnes envasadas (Bell y DeLacy, 1984), y algunos productos enlatados (Norris *et al.*, 1981).

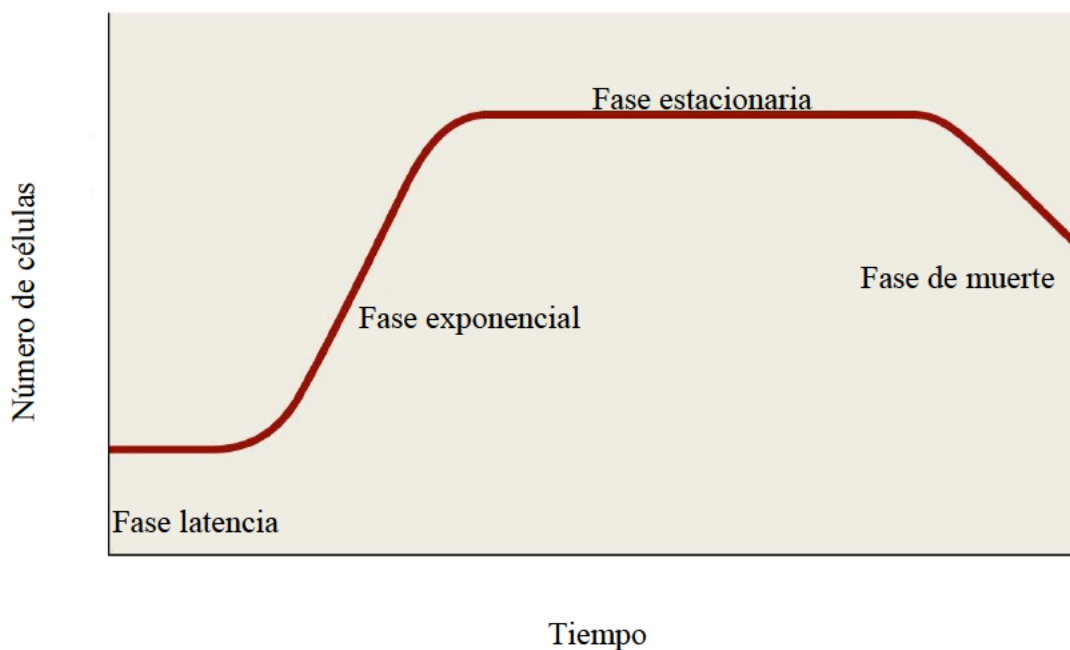
Generalmente, produce afecciones gastrointestinales que cursan con diarreas, vómitos, e incluso en casos más graves pueden producir septicemias. También puede producir oftalmitis, abortos y afectar a la movilidad del esperma.

## 1.2. CRECIMIENTO MICROBIANO.

Conocer cómo crecen los microorganismos y los distintos factores que pueden influir sobre su crecimiento es fundamental para poder controlar y predecir el crecimiento de los mismos en los alimentos.

### 1.2.1. La curva de crecimiento microbiano.

Cuando una bacteria encuentra unas condiciones óptimas para su crecimiento, comienza a multiplicarse de forma activa. Este crecimiento bacteriano se da en cuatro fases diferenciadas, como se muestra en la figura 1.2.



**Figura 1.2.** Curva de crecimiento microbiano.

La primera de las fases del crecimiento es la fase de latencia, en ella, los microorganismos se adaptan a su nuevo ambiente. Para ello, llevan a cabo una serie de modificaciones fisiológicas necesarias para poder adaptarse a este nuevo medio y crecer en él. En esta fase no hay multiplicación celular, sólo se genera la energía necesaria para comenzar a multiplicarse y entrar en la fase siguiente. La duración de la fase de latencia se conoce como ( $\lambda$ ).

La siguiente fase es la fase exponencial o de crecimiento logarítmico. En esta fase los microorganismos se multiplican activamente por fisión binaria. El paso de una fase a otra no es brusco sino que se produce de forma gradual. Se aprecia así un aumento progresivo de la velocidad de duplicación, hasta llegar a un punto en el que todas las células se están multiplicando y la tasa de crecimiento es máxima. La tangente a esta curva en su punto de inflexión nos dará la tasa de crecimiento máxima ( $\mu$ ).

Debido al crecimiento masivo de la fase anterior, se produce un acumulo de metabolitos tóxicos y/o un agotamiento de los nutrientes, lo que hace que las células dejan progresivamente de multiplicarse, y entran en fase de crecimiento estacionario, en la que se alcanza un equilibrio entre las células que todavía se están multiplicando y las que comienzan a morir, de manera que la concentración de microorganismos se mantiene constante.

Finalmente, cuando el número de células que mueren es mayor que el número de células que se dividen los microorganismos entran en fase de declinación o muerte, observándose un descenso progresivo en el número de microorganismos.

### **1.2.2. Factores que afectan al crecimiento microbiano.**

El crecimiento microbiano se puede ver afectado por una serie de factores: intrínsecos y/o extrínsecos. Se entienden por factores intrínsecos aquellos que son característicos del propio alimento: pH, aw, contenido de nutrientes, presencia de sustancias inhibidoras,...

Y cómo factores extrínsecos a aquellos propios del ambiente en el que se encuentra el alimento, como son: la temperatura, la humedad relativa y los gases. Son sobre estos últimos sobre los que realmente podemos actuar para poder controlar el crecimiento de los microorganismos.

La temperatura es uno de los factores más importantes, debido a su influencia en el crecimiento de los microorganismos. La temperatura puede influir tanto en la duración de la fase de latencia, como en la velocidad de crecimiento y hasta en el número final de microorganismos. En general, las temperaturas bajas prolongan la fase de latencia y disminuyen la velocidad de crecimiento. Estas temperaturas por debajo de la mínima de crecimiento no destruyen a los microorganismos, solo inhiben su crecimiento. Además, las temperaturas de congelación hacen que se formen cristales de hielo que pueden llegar a dañar la membrana y pared de los microorganismos, produciendo en muchos casos la muerte celular. A este efecto de la temperatura, también habría que sumar el efecto de la baja  $a_w$  sobre los microorganismos que sean capaces de sobrevivir a estas temperaturas. Las temperaturas que se encuentran por encima de la temperatura máxima de crecimiento son letales para los microorganismos. Cuanto más alta sea esta temperatura, más rápidamente se producirá la destrucción de los microorganismos.

Además de todos estos factores, también hay que considerar los factores implícitos de cada microorganismo, que están altamente influenciados por los factores ambientales. El principal es la velocidad específica de crecimiento. Esta depende de las reacciones implicadas en el metabolismo del microorganismo, es decir, de su equipo enzimático, y por tanto depende directamente del genotipo, pero depende también de factores fenotípicos, es decir, del ambiente.

### **1.2.3. Modelización de la curva de crecimiento microbiano.**

Como se puede observar en la figura 1.4, las tres primeras fases de la curva de crecimiento forman en su conjunto una curva aproximadamente sigmoidea. Por esto, en los últimos años, se han adaptado distintas funciones matemáticas sigmoideas (como la de Gompertz o la logística) para poder describir las curvas de crecimiento microbiano. La mayoría de los autores están de acuerdo en que la función de Gompertz, que describe una curva sigmoidea asimétrica, está definida por la ecuación 1.1 (Zwietering *et al.*, 1990):

$$\log(N_t / N_0) = C \times \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{\mu_{max} \times s}{c} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Ec. 1.1}$$

donde  $N_t$  es el número de microorganismos a tiempo  $t$ ,  $N_0$  es el número inicial de microorganismos,  $C$  es el número de ciclos logarítmicos de crecimiento,  $\lambda$  es la duración de la fase de latencia, que corresponde al corte de la tangente al punto de inflexión con la asíntota inferior y  $\mu_{max}$  es la tasa máxima de crecimiento.

Sin embargo, el modelo de Gompertz, en sus diferentes formas, presenta ciertos inconvenientes. Este modelo sólo describe la curva de crecimiento si ésta tiene la forma de una curva sigmoidea y, por ejemplo, no tiene en cuenta la posibilidad de que no exista fase de latencia. Además, para poder definir bien una curva de crecimiento, necesita tener datos del número de microorganismos en todas las fases de la misma.

Por estos motivos, Baranyi *et al.* desarrollaron en 1993 un nuevo modelo matemático que describía la fase de latencia como una fase de adaptación de las células al nuevo ambiente, independiente del posterior desarrollo de la curva de crecimiento.

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} \times A(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m \times \mu_{max} \times A(t)} - 1}{e^{m(y_{max} - y_0)}} \right) \quad \text{Ec. 1.2}$$

donde  $y(t)$  es el logaritmo del número de microorganismos a tiempo  $t$ ,  $y_0$  el logaritmo del número inicial de microorganismos del cultivo,  $m$  es un parámetro de curvatura que caracteriza la transición de la fase de latencia a la de crecimiento exponencial e  $y_{max}$  es el logaritmo de la concentración celular máxima alcanzada.  $A(t)$  describe el retraso gradual en el tiempo de transición entre la fase de latencia y la fase de crecimiento exponencial (ecuación 1.3).

$$A(t) = t + \frac{1}{v} \ln(e^{-vt} + e^{h_0} - e^{-vt-h_0}) \quad \text{Ec. 1.3}$$

donde  $v$  es otro parámetro de curvatura que caracteriza la transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase de crecimiento estacionario y  $h_0$  es un parámetro que caracteriza el estado fisiológico de las células.

Este modelo permite separar la duración de la fase de latencia del posterior crecimiento exponencial, y permite también construir la curva de crecimiento cuando no se dispone de datos en la fase estacionaria.

El modelo, aunque complejo, dispone de un software gratuito que facilita su uso, el DMFit. DMFit no es un programa en sí, si no que se instala como un complemento de Microsoft Excel.

### **1.3. LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS.**

Tradicionalmente, la técnica de conservación por calor de los alimentos, ha sido la más extendida en las industrias alimentarias. Bien para inactivar células vegetativas en los procesos de pasteurización, o para inactivar tanto células vegetativas como esporos en los procesos de esterilización.

El tratamiento térmico óptimo que se debe aplicar a un alimento depende de diversos factores, como son: la termorresistencia de los microorganismos presentes en el alimento, la carga microbiana inicial que contenga el alimento antes de su procesado, el pH del alimento, su estado físico y las cinéticas de inactivación de los distintos factores de calidad (color, vitaminas,etc).

Como tratamientos térmicos se entienden todos los procesos que tienen como fin la destrucción de los microorganismos alterantes o patógenos, presentes en los alimentos y que podrían desarrollarse durante la vida útil de los mismos. Dentro de estos tratamientos térmicos hay que destacar la pasteurización y la esterilización.

#### **1.3.1. Pasteurización.**

Según Fellows, (1994), es el método de conservación de los alimentos por inactivación de sus enzimas y destrucción de los microorganismos relativamente termosensibles (bacterias no esporuladas, levaduras y hongos filamentosos), que provoca cambios mínimos en el valor nutritivo y en las características organolépticas del alimento

La intensidad del tratamiento térmico y el grado de prolongación de su vida útil se hallan determinados principalmente por el pH del alimento.



### **1.3.2. Esterilización.**

El fin de este proceso es la destrucción, mediante la aplicación de calor a temperaturas superiores a 100°C, de todos los organismos viables, y sus esporos, que puedan ser contados por una técnica de recuento o cultivo adecuados.

Aunque el principal objetivo de la esterilización de alimentos es la destrucción de los microorganismos, en paralelo, ocurren otra serie de procesos. Algunos son deseables como la destrucción enzimática o el ablandamiento de los tejidos, aunque cuyos efectos también deben de ser controlados, para que no lleguen a afectar a sus propiedades físicas: color, forma, consistencia, etc. Otros efectos son menos deseables, pero inevitables en parte, como cambios sustanciales en su valor nutritivo y características organolépticas. Por tanto la optimización de estos procesos tecnológicos se debe centrar en reducir los tiempos y /o las temperaturas de tratamiento para poder minimizar estos efectos no deseables que originan un detrimento en el valor nutritivo y en las características sensoriales del producto, pero manteniendo siempre la seguridad desde un punto de vista microbiológico.

## **1.4. CINÉTICA DE DESTRUCCIÓN MICROBIANA POR CALOR.**

En la década de 1920, Bigelow, Esty y Meyer, en los laboratorios de la National Canners Association, estudiaron en profundidad los mecanismos de acción del calor sobre los microorganismos y la cinética de destrucción microbiana, sentando así las bases de los actuales procesos de esterilización. Pero, en los últimos años, han sido varias las industrias que han encontrado bacterias cuyos esporos son capaces de sobrevivir a estos procesos clásicos de esterilización. Por esta razón, una de las metas principales de la conservación de los alimentos, es conocer la cinética de inactivación por calor de estos esporos bacterianos, y desarrollar modelos matemáticos que permitan predecir su cinética de inactivación por calor, para poder optimizar dichos procesos, evitando también el sobreprocesado de los alimentos, que conllevaría a un detrimento importante de características organolépticas y nutricionales de los mismos así como una un coste energético excesivo del proceso. Actualmente, este sobreprocesado es la tendencia seguida por gran parte de las industrias alimentarias.

La cinética de inactivación por calor para cada microorganismo y cada condición, se pensaba que se podía definir en base a los valores  $D$  y  $z$ , que son en los que, tradicionalmente, se ha basado la industria alimentaria, para el desarrollo de sus tratamientos térmicos.

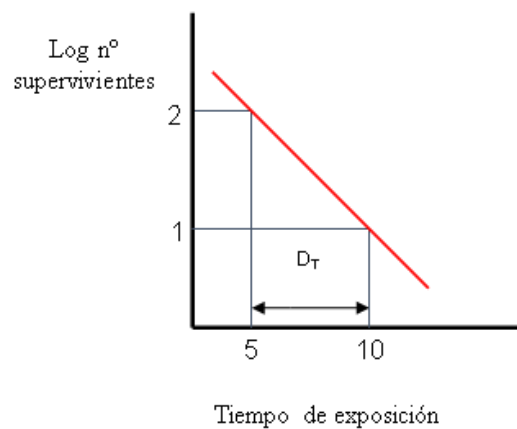
#### 1.4.1. Inactivación de microorganismos en condiciones isotérmicas.

Son muchos los autores, que durante años, han asumido que la mortalidad de los microorganismos expuestos al calor a temperatura constante sigue una cinética de primer orden (Jay, 1996; Holdsworth, 1997; Texeira y Rodriguez, 2003). Según esta teoría, si una población bacteriana es sometida a la acción del calor a una temperatura constante, la tasa de supervivientes es una función exponencial del tiempo de tratamiento (ecuación 1.4):

$$N_t = N_0 \times e^{-kt} \quad \text{Ec. 1.4}$$

donde  $N_t$  es el número de microorganismos supervivientes tras  $t$  minutos de tratamiento,  $N_0$  el número inicial de microorganismos,  $k$  la constante de inactivación y  $t$  el tiempo de tratamiento a una temperatura constante.

Si representamos el logaritmo de microorganismos supervivientes frente al tiempo de tratamiento, a una temperatura constante, se obtiene la gráfica de supervivencia (figura 1.3).



**Figura 1.3.** Gráfica de supervivencia.

Son numerosos los investigadores que han intentado explicar el orden logarítmico de la gráfica de supervivencia. Una de las teorías más aceptadas fue la de Rahn (1929, 1945a y b), que establecía como base de esta pérdida de la capacidad reproductiva la desnaturalización de un gen esencial en la reproducción. Ya que, si se daña un gen u otra estructura esencial para la reproducción, se perdería la capacidad reproductiva, lo que no ocurriría si se daña cualquier otro tipo de molécula. Marquis *et al.*, (1994), sugirieron el daño en las proteínas y enzimas como la causa de la inactivación de los esporos y, de hecho, Palop *et al.*, (1998) observaron que la destrucción de los esporos de *B. megaterium* por calor, y también por hidroperóxidos coincidía con la inactivación de determinados enzimas citoplasmáticos. A pesar de todas estas investigaciones, el mecanismo exacto de inactivación térmica, así como los componentes dañados durante el procesado térmico están aún por determinar (Tabis y Buys, 2010).

Muchos autores, en lugar de utilizar la constante de inactivación  $k$ , utilizan el tiempo de reducción decimal  $D_T$ , que se define como el tiempo de tratamiento necesario para reducir una población bacteriana a la décima parte, a una temperatura dada, (Katzin *et al.*, 1943). El valor  $D_T$ , representado en la figura 1.3 por la inversa negativa de la pendiente de la curva de supervivencia, es el tiempo necesario para que la recta atravesase un ciclo logarítmico.

El valor  $D_T$  es el parámetro empleado para poder comparar la termorresistencia de las distintas bacterias, bien a la misma temperatura para bacterias de la misma o de distinta especie, o bien, a distintas temperaturas para una misma cepa. Este parámetro, nos permite también evaluar el efecto del entorno (concentración y composición del substrato, pH, temperatura de incubación, sistema de calentamiento, etc) sobre la resistencia térmica aparente de cada bacteria.

La relación entre los valores  $D_T$  y  $k$  es la que se muestra en la siguiente ecuación (ec. 1.5):

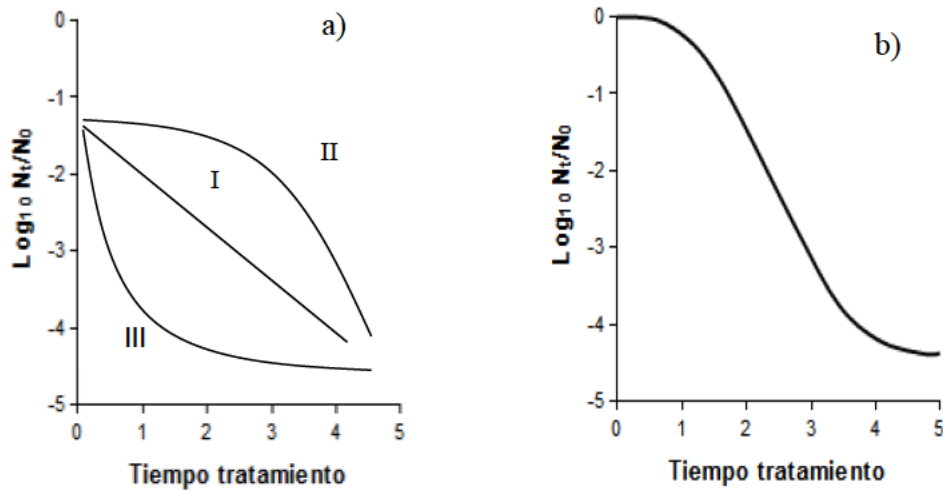
$$D_T = \frac{\ln 10}{k}$$

**Ec. 1.5**

#### 1.4.1.1. Curvas de supervivencia no logarítmicas.

Aunque desde hace muchos años, ha sido un gran número de autores (Licciardello y Nikerson; 1963; Alderton *et al.*, 1964; Yokoya y York; 1965; Han *et al.*, 1971; Stumbo, 1973; Han, 1975; Han *et al.*, 1976; Pflug y Smith, 1977; Bean *et al.*, 1979a; King *et al.*, 1979; Komemushi, 1983; Peleg *et al.*, 1998; Mafart *et al.*, 2002; Geeraerd *et al.*, 2005, entre otros), los que han descrito numerosas curvas de destrucción en las que los microorganismos no siguen el clásico comportamiento lineal. Hoy en día, en el diseño de las operaciones de esterilización de muchas empresas de alimentación, todavía se sigue asumiendo el carácter logarítmico de las curvas de destrucción bacteriana, debido quizás, a la sencillez de la expresión matemática. Ya que esta expresión se complica enormemente al considerar el carácter no logarítmico de la misma.

Las curvas de supervivencia no lineales presentan diferentes formas (figura 1.4). En la mayoría de los casos, estas curvas no lineales presentan una concavidad negativa, conocida como hombro y/o una concavidad positiva denominada cola. (figura 1.4.a.).



**Figura 1.4.** Distintas formas que pueden presentar las curvas de supervivencia a temperatura constante, a) Tipo I: De orden logarítmico, Tipo II: Hombro, y Tipo III: Cola; b) Hombro y cola.

En muchos casos, el logaritmo de los supervivientes con respecto al tiempo aparece como una línea recta o aproximadamente recta durante al menos las 4-5 primeras reducciones decimales. Esta situación corresponde con la curva tipo 1 de la figura 1.6. Por tanto, se ha concluido que, en estos casos, la inactivación microbiana es un proceso que sigue una cinética de primer orden (Stumbo, 1973, Texeira, 1992; Jay, 1996; Holdsworth, 1997; Toledo, 1999).

En el resto de los casos, en los que la relación del logaritmo del número de supervivientes con respecto al tiempo es claramente no lineal, como se muestra en las curvas Tipo II y Tipo III de la figura 1.4 a) y en la figura 1.4. b), diversos autores (Stumbo, 1973; Le Jean *et al.*, 1994) han sugerido que la población es una mezcla de subpoblaciones con diferente sensibilidad al calor, o bien, han aceptado la teoría de que la cinética de inactivación no sigue una cinética de primer orden, y han propuesto diferentes modelos matemáticos que permiten predecir dichas cinéticas no lineales (Shull *et al.*, 1963; Cole *et al.*, 1993; Hills y Mackey, 1995; Linton *et al.*, 1995; Peleg y Cole, 1998).

#### **1.4.1.2. Modelización de la curva de supervivencia.**

Dada la frecuencia con la que los microorganismos mostraban en sus curvas de supervivencia todas estas desviaciones de la linealidad, han sido muchos los autores que desde hace muchos años han desarrollado diversos modelos matemáticos con el fin de poder interpretar estas curvas no lineales. Muchos de estos eran modelos deterministas (Shull *et al.*, 1963; Rodriguez *et al.*, 1988; Kilsby *et al.*, 2000), y otros eran puramente empíricos (Baranyi *et al.*, 1996; Buchanan *et al.*, 1997; Geeraerd *et al.*, 2000). Estos modelos mostraron una buena bondad del ajuste, pero eran poco robustos y sólo se podían utilizar en situaciones muy concretas. Además, los parámetros de los modelos determinísticos pueden ser difíciles de estimar, mientras que los parámetros de los modelos empíricos, por lo general, no tienen un claro significado físico o biológico. Todos estos modelos, presentan de 3 a 4 parámetros, razón por los que las empresas evitan utilizarlos en los cálculos matemáticos de sus tratamientos térmicos.

#### 1.4.1.2.1. El modelo de Weibull.

Los modelos deterministas asumen la cinética logarítmica de destrucción por el calor y, a partir de ella, plantean distintas hipótesis para tratar de explicar las desviaciones de la linealidad. Otro grupo de teorías explica estos comportamientos en base a un planteamiento netamente diferente. Asume la existencia en la población, de una distribución de frecuencias, en cuanto a su resistencia al calor se refiere, del comportamiento de los microorganismos que están siendo sometidos al tratamiento térmico, y la forma de la gráfica de supervivencia, la consecuencia de dicha distribución. De entre todos los modelos probabilísticos utilizados, posiblemente el más empleado es el que se basa en la distribución de Weibull.

La distribución de Weibull surgió para describir el comportamiento de sistemas o hechos que tienen cierto grado de variabilidad. Fue Weibull, en 1939, quien desarrolló una función de distribución para analizar estadísticamente la resistencia de distintos materiales (Cunha *et al.*, 1998). Un modelo simple, derivado de la distribución de Weibull, basado en la función acumulativa de esta distribución, es capaz de describir cinéticas de destrucción no logarítmicas en microorganismos.

Fueron Peleg y Cole, 1998, los que introdujeron la función de Weibull en el campo de la Tecnología de Alimentos. Según estos y posteriormente otros autores (Fernandez *et al.*, 1999; Peleg, 1999), a una temperatura dada, el tiempo de exposición necesario para producir la muerte de una bacteria o de un esporo varía de unos individuos a otros., y esta dispersión de la resistencia térmica de cada individuo es la que sigue la función de distribución de Weibull. Si se consideran las gráficas de supervivencia como gráficas acumulativas de una distribución temporal de sucesos letales, cada microorganismo muere o es inactivado a un tiempo específico, de tal forma que la gráfica de supervivencia es un reflejo de la distribución de resistencias de las células, y la forma que ésta tenga dependerá de las características de la distribución de resistencias dentro de la población microbiana.

La función de densidad de probabilidades que describe la distribución de Weibull viene definida por la ecuación 1.6.

$$f(t) = \frac{p}{\delta} \left(\frac{t}{\delta}\right)^{p-1} e^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p}$$

**Ec. 1.6**

donde  $\delta$  es el parámetro de escala y  $p$  es el parámetro de forma.

A partir de ésta, la función acumulativa de esta distribución es la que describe en la ecuación 1.7, propuesta por Mafart *et al.*, 2002:

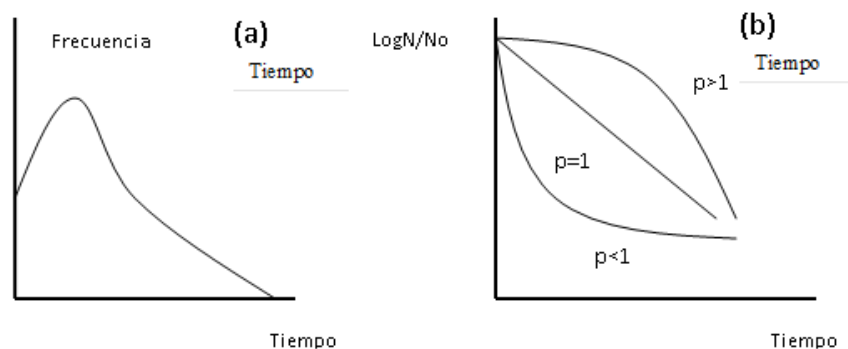
$$\text{Log}N = \text{Log}N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p$$

**Ec. 1.7**

donde  $N$  es el número de microorganismos tras  $t$  minutos de tratamiento y  $N_0$  es el número de microorganismos a tiempo 0.

La ventaja del modelo de Weibull frente a otros modelos no lineales es su extraordinario parecido con el modelo que define la cinética de destrucción de primer orden, lo que facilita enormemente su uso.

El parámetro de escala está relacionado con la intensidad del tratamiento y representa el tiempo necesario para inactivar el primer ciclo logarítmico de la población microbiana. El parámetro de forma describe el comportamiento de la población, de tal forma que si  $p > 1$  la gráfica es cóncava (fenómeno de hombro), si  $p < 1$  la gráfica es convexa (fenómeno de cola) y si  $p = 1$  la gráfica de supervivencia sería lineal (figura 1.5).



**Figura 1.5.** Gráficas de la distribución de Weibull. (a) Gráfica de densidad de probabilidad. (b) Gráficas de supervivencia de Weibull.

Se han propuesto diferentes formas de la función acumulativa del modelo de Weibull para describir las curvas de supervivencia no lineales, entre las que destacan las desarrolladas por Peleg y Cole (1998), van Boekel (2002) y Mafart *et al.*, (2002).

Esta función de distribución de frecuencias ha permitido modelizar cinéticas de inactivación bifásicas con presencia de colas, ampliamente descritas en la aplicación de antimicrobianos naturales o nuevas tecnologías para la conservación de alimentos (Fernández *et al.*, 2002). También se ha aplicado con éxito para describir la inactivación de esporos de *B. subtilis* mediante altas presiones y la inactivación de varias especies de *Bacillus* y *Clostridium* mediante calor (Peleg y Cole, 1998; Fernández *et al.*, 1999a) o de células vegetativas por pulsos eléctricos (Gómez, 2006).

#### 1.4.1.2.2. El modelo de Geeraerd.

Geeraerd *et al.* (2000), intentando eliminar las limitaciones presentes en la mayoría de los modelos propuestos hasta ese momento, desarrollaron un modelo propio, para describir las cinéticas no lineales (ecuación 1.8). Este modelo está basado en el concepto del valor  $D$  de la clásica cinética logarítmica, y permite describir gráficas de supervivencia no lineales de formas bien distintas, incluyendo tanto la presencia de hombro como de colas.

$$\text{Log } N = \text{Log} \left[ (N_0 - N_{res}) e^{-k_{max}t} \left( \frac{e^{-k_{max}S_l}}{1 + (e^{-k_{max}S_l} - 1) e^{-k_{max}t}} \right) + N_{res} \right] \quad \text{Ec. 1.8}$$

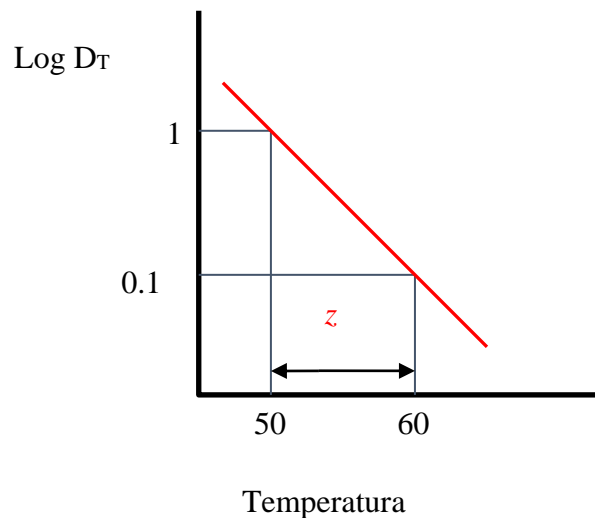
donde  $N$  es el número de microorganismos a tiempo  $t$ ,  $N_0$  el número inicial de microorganismos,  $N_{res}$  es el número residual de microorganismos (cola),  $k_{max}$  la constante de inactivación y  $S_l$  el tiempo de duración del hombro.

Estos mismos autores han desarrollado un software, GInaFIT, que permite ajustar las curvas de supervivencia tanto con su modelo, como con modelos matemáticos de otros autores que están siendo utilizados en la actualidad (Geeraerd *et al.*, 2005).



### 1.4.2. Efecto de la temperatura de tratamiento en la inactivación de microorganismos.

Se ha comprobado en numerosas ocasiones que los valores  $D_T$  también siguen un comportamiento logarítmico con respecto a la temperatura de tratamiento. Al representar el logaritmo de los valores  $D_T$  frente a las correspondientes temperaturas de tratamiento se obtiene una nueva gráfica, que se denomina de termodestrucción (figura 1.6). Basándose en esta gráfica se puede definir el valor  $z$ , como el número de grados que hay que aumentar la temperatura de tratamiento para que el  $D_T$  se reduzca en un ciclo logarítmico, es decir, cuando se eleva la temperatura de tratamiento en  $z$  grados, el tiempo requerido para conseguir la misma destrucción térmica es 10 veces menor. Se calcula como la inversa negativa de la pendiente de la curva de destrucción térmica (figura 1.6).



**Figura 1.6.** Gráfica de destrucción térmica (TDT) de un microorganismo.

A partir de la gráfica de destrucción térmica se puede calcular el valor  $D$  a cualquier temperatura, mediante la ecuación 1.9.

$$D(T) = D_{T_{ref}} \times 10^{-\frac{T-T_{ref}}{z}} \quad \text{Ec. 1.9}$$

donde  $D_T$  (min) es el valor  $D$  a la temperatura  $T$  (°C),  $D_{T_{ref}}$  (min) el valor  $D$  a la temperatura  $T_{ref}$  (°C) y  $z$  (°C) representa el valor  $z$  del microorganismo.

En el caso del modelo de Weibull, la dependencia de los valores delta con la temperatura, también puede ser descrita con el modelo clásico de Bigelow, al igual que los valores  $D$  convencionales, tal y como se expresa en la ecuación 1.10 (Mafart *et al.*, 2002):

$$\delta_T = \delta_{ref} 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} \quad \text{Ec. 1.10}$$

donde  $z$  (°C) representa el valor  $z$  del microorganismo,  $\delta_T$  (min) es el tiempo para la primera reducción decimal a la temperatura  $T$  (°C). y  $\delta_{ref}$  (min) el tiempo para la primera reducción decimal a la temperatura de referencia  $T_{ref}$  (°C).

Para describir la dependencia de la constante de inactivación con respecto a la temperatura, el modelo de Geeraerd se basa en la ecuación 1.11, derivada igualmente del modelo de Bigelow.

$$K_{max}(T) = \frac{\ln 10}{AsymD(T)} = \frac{\ln 10}{AsymD_{T_{ref}}} \times \exp\left(\frac{\ln 10}{z} \times (T - T_{ref})\right) \quad \text{Ec. 1.11}$$

donde  $AsymD(T)$  y  $AsymD(T_{ref})$  son los tiempos de reducción decimal a la temperatura  $T$  y a la temperatura de referencia ( $T_{ref}$ ), respectivamente.

### 1.4.3. Inactivación de microorganismos en condiciones no isotérmicas.

Tradicionalmente, para predecir las curvas de supervivencia en condiciones no isotérmicas se ha asumido que los microorganismos siguen una cinética de destrucción de primer orden, empleándose el concepto de letalidad ( $L$ ), que puede ser definido como el equivalente de un minuto a una temperatura  $T$  en minutos a una temperatura de referencia ( $T_{ref}$ ), y que vendría definido por el cociente de los valores  $D$  (a las temperaturas  $T_{ref}$  y  $T$ ), según viene expresado en la ecuación 1.12.

$$L_T = D_{ref} / D_T = 10^{((T_{ref} - T) / z)} \quad \text{Ec. 1.12}$$

El concepto de letalidad conlleva el cálculo del equivalente letal de cada instante del tratamiento no isotérmico, para así convertirlo en un tratamiento isotérmico de letalidad equivalente a la del tratamiento no isotérmico completo. Esta consideración puede llevar a errores, que serán de mayor magnitud cuanto mayores sean los intervalos de tiempo establecidos y también ante la presencia de desviaciones de la linealidad. Por este motivo, en los últimos años, se tiende más al empleo de modelos dinámicos, tanto lineales como no lineales, que permiten calcular la inactivación microbiana que se produce a cada una de las temperaturas del tratamiento no isotérmico en los diferenciales de tiempo que el medio de tratamiento permanece a esas temperaturas, sin necesidad de integrar la letalidad de ese tratamiento a una temperatura constante.

#### 1.4.3.1. Modelo de Weibull

El modelo de Weibull, para predecir el número de supervivientes en condiciones no isotérmicas, se basa en la dependencia de  $\delta$  con respecto a la temperatura (ecuación 1.10), ya que para cada intervalo, el valor de  $\delta$  depende también de la temperatura. La tasa de inactivación logarítmica isotérmica dependiente del tiempo puede ser descrita como una ecuación diferencial (ecuación 1.13) (van Zuijlen *et al.*, 2010):

$$\frac{dN}{dt} = -p \times \left(\frac{1}{\delta}\right) \times t^{p-1} \quad \text{Ec. 1.13}$$

#### 1.4.3.2. Modelo de Geeraerd

El modelo de Geeraerd también se puede emplear como modelo dinámico, para predecir el número de supervivientes en condiciones no isotérmicas. En ese caso, las ecuaciones que lo definen son las ecuaciones diferenciales 1.14 y 1.15, mientras que la dependencia de  $K_{max}$  con la temperatura ya ha sido definida en la ecuación 1.11.

$$\frac{dN}{dt} = -K_{max} \times N \times \left(\frac{1}{1+C_c}\right) \times \left(1 - \frac{N_{res}}{N}\right) \quad \text{Ec. 1.14}$$

$$\frac{dC_c}{dt} = -K_{max} \times C_c \quad \text{Ec. 1.15}$$

donde  $N$  representa la densidad de microorganismos (cfu/mL),  $C_c$  el estado fisiológico de la célula (-),  $K_{max}$  la tasa específica de inactivación (1/min) y  $N_{res}$  es la densidad de población residual (ufc/mL).

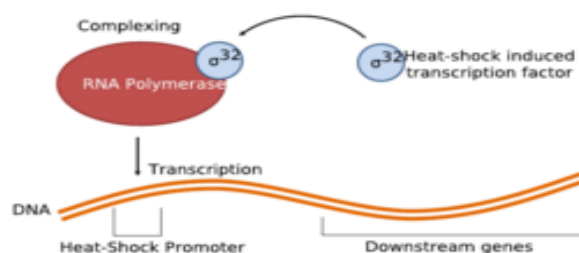
## 1.5. DAÑO SUBLETAL

Los microorganismos que sobreviven a la acción letal de los agentes conservantes pueden haber sido dañados de manera subletal, por lo que son capaces de crecer solamente si las condiciones ambientales son las adecuadas (Mackey, 2000). El análisis del daño subletal presenta dos grandes inconvenientes. Por un lado, las células dañadas pueden crecer o no cuando se utilizan medios selectivos para el cultivo de los microorganismos, lo que conlleva a una sobreestimación de la letalidad de los tratamientos. Además, el daño subletal produce un aumento en la fase de latencia de los microorganismos, por lo que se deben aumentar los tiempos de incubación de los cultivos tras el tratamiento. Sin embargo, si estos microorganismos pierden la capacidad de recuperación debido a la combinación de las distintas técnicas de conservación (barreras), se ve afectada su homeostasis, y la célula no será capaz de crecer, la tasa de inactivación obtenida será superior (Mackey, 2000). Por esto, la caracterización del daño subletal producido por las tecnologías emergentes de conservación es uno de los principales objetivos de numerosas investigaciones, para poder así optimizar la combinación de tratamientos técnicos subletales y conseguir así un mayor efecto letal sobre los microorganismos.

## 1.6. MECANISMOS DE ADAPTACIÓN Y RESISTENCIA.

Son muchos los autores que han demostrado que los microorganismos pueden desarrollar mecanismos de respuesta y de resistencia cuando son expuestos a daños

subletales, lo que puede afectar seriamente a la seguridad de alimentos (Abee y Wouters, 1999). En los últimos años, muchas son las teorías que han tratado de dilucidar los mecanismos de adaptación al estrés de las bacterias y el mecanismo de regulación por parte de los genes. El mecanismo regulador más importante (Mañas y Pagán, 2005) parece ser la activación del factor sigma ( $\sigma$ ). Una vez activado, este factor se une a las RNA polimerasas, formando un promotor específico. El factor  $\sigma^S$  (figura 1.8) es el que regula la transcripción de más de 50 genes implicados en la resistencia al calor y al estrés ácido y oxidativo entre otros en bacterias Gram-negativas (Huisman *et al.*, 1996). La inducción de este factor sigma se produce como respuesta al agotamiento de nutrientes, generalmente cuando las células entran en la fase estacionaria de crecimiento y también cuando las células que se encuentran en fase exponencial sufren algún tipo de estrés, incluido el agotamiento de los nutrientes del medio (Dodd y Aldsworth, 2002). En el caso de las bacterias Gram-positivas (*B. subtilis*, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) se ha descrito un factor sigma equivalente a este, el factor  $\sigma^B$  (Abee y Wouters, 1999; Hill *et al.*, 2002). Además, parece ser que ambos factores sigma presentan mecanismos de acción paralelos en cuanto al desarrollo de los mecanismos de resistencia al estrés de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se refiere. No se sabe exactamente cómo estos factores desarrollan los distintos mecanismos de resistencia. Sin embargo, se sabe que el factor  $\sigma^{32}$ , codificado por el gen *rpoH*, controla la respuesta a los choques térmicos mediante una rápida y temporal sobreexpresión de chaperones y proteasas.



**Figura 1.8.** Esquema de la respuesta de los microorganismos al estrés (fuente: California Institute of Technology).

Son muchos los casos (Palhano *et al.*, 2004; Buchanan *et al.*, 2004) en los que se han observado la aparición de resistencias cruzadas por la aplicación de distintas técnicas de conservación, por lo que la adaptación de los microorganismos a las condiciones ambientales adversas durante el procesado es un riesgo que siempre debe ser considerado. Sin embargo, la aplicación de un choque térmico en presencia de compuestos antimicrobianos o no, no protege a las bacterias de la acción de estos compuestos. Esto indica que los cambios originados por este choque térmico en las envolturas celulares no son relevantes en la resistencia a estos compuestos.

## **1.7. LOS ANTIMICROBIANOS NATURALES COMO MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS.**

De entre todos los métodos de conservación propuestos como alternativa a los tratamientos térmicos, los antimicrobianos naturales han atraído mucho interés y han sido objeto de numerosas investigaciones, ya que a pesar de que su dosis máxima está limitada para muchos de ellos por poder conferir olores y sabores desagradables a los alimentos, son totalmente seguros para la salud.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) son los encargados de realizar, entre otras muchas funciones, los análisis de los nuevos compuestos, comprobando la seguridad de los mismos y sus dosis de ingesta máxima (MDI) en los que se basa el organismo competente en materia de legislación de cada país para aprobar y regular el uso de los antimicrobianos químicos en los alimentos. Para evitar este proceso, las empresas alimentarias han buscado conservantes emergentes en compuestos que ya se utilizaban en los alimentos, posiblemente con otros propósitos, pero que son compuestos potencialmente antimicrobianos, la mayoría presentes en plantas y utilizados como ingredientes saborizantes. Estos compuestos ya están aprobados y no son tóxicos en los niveles utilizados, y la mayoría de los cuales están clasificados como GRAS.

Los compuestos antimicrobianos naturales se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, los podemos encontrar en plantas, animales, o bien, ser

producidos por distintos microorganismos, varios de los cuales ya están siendo utilizados como conservantes de alimentos.

Diversos estudios reflejan la distinta sensibilidad de los microorganismos a estos compuestos según su naturaleza, y también según el medio de laboratorio o alimento en el que se aplique el tratamiento (Twari *et al.*, 2009).

### **1.7.1. Nisina.**

Es una bacteriocina, producida por *Lactococcus (Streptococcus) lactis*. Es un compuesto de naturaleza proteica que presenta actividad antimicrobiana principalmente frente a células vegetativas y esporas de bacterias Gram positivas. Pero, en ausencia de otros métodos de conservación no inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas, levaduras ni hongos.

Como conservante de alimentos, es un compuesto que presenta unas propiedades muy atractivas, ya que no confiere colores ni olores desagradables a los alimentos y no presenta toxicidad para el ser humano, incluso se ha comprobado que no desarrolla resistencia cruzadas a antibióticos. Además, es estable al calor y al almacenamiento durante largos periodos de tiempo.

#### **1.7.1.1. Mecanismo de acción.**

En general, la nisina presenta una elevada actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y frente a esporos bacterianos. En circunstancias normales, no inhibe de forma significativa a mohos, levaduras y bacterias Gram-negativas. Las bacterias Gram-negativas son resistentes a la nisina porque ésta no es capaz de penetrar su compleja pared y alcanzar su sitio diana, que es la membrana citoplasmática (Lück y Jager, 1995; Philips, 1999; Davidson, 2000).

En el caso de las células vegetativas, la primera estructura afectada por la nisina es la membrana plasmática. La nisina forma poros en la membrana, por los que disipan la fuerza motriz de protones. Esto inhibe la entrada de aminoácidos, y producen una rápida salida al exterior de pequeños metabolitos, iones y otros solutos citoplasmáticos,

como aminoácidos, nucleótidos y ATP (Abbe, 1995; Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998 Crandall y Montville, 1998).

La membrana externa de las bacterias Gram-negativas evita que la nisina pueda interactuar con la membrana plasmática de las células. Pero, cualquier tratamiento como un tratamiento térmico subletal, altas presiones hidrostáticas o la congelación, pueden provocar alteraciones en la membrana externa que hagan que las bacterias Gram-negativas sean sensibles a la nisina (Hill *et al.*, 2006; Tiwari *et al.*, 2009).

Las bacterias formadoras de esporas, en general, son más sensibles a la nisina que el resto de las bacterias Gram positivas, sobre todo las especies pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Clostridium* y esta sensibilidad parece aumentar en condiciones ácidas y en esporos dañadas térmicamente (Jack *et al.*, 1995). En la mayoría de los estudios realizados, la nisina parece tener un efecto esporostático, aunque también se han visto efectos esporicidas dependiendo de la cepa estudiada y de los daños ocasionados por el tratamiento térmico (de Vuyust y Vandame, 1994; Thomas y Delves-Broughton, 2005). El mecanismo de acción de la nisina no inactiva esporas ni inhibe su germinación, sino que actúa en la postgerminación, inhibiendo crecimiento de la espora (Komitopoulou *et al.*, 1999; Meghrous *et al.*, 1999; Prittjarvi, *et al.*, 2001).

#### **1.7.1.2. Aplicaciones.**

La nisina es efectiva como conservante de alimentos contra microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* (Nassar *et al.*, 1995; Mahadeo *et al.*, 1994). Otro uso muy importante se centra en bacterias Gram-positivas formadoras de endosporas, incluyendo al género *Bacillus* y *Clostridium*, lo que la convierte en un conservante idóneo para productos pasteurizados o tratados térmicamente pero que no están estériles. Estos tratamientos eliminan las células vegetativas de los productos, pero no las bacterias esporuladas, que sobreviven a ellos y pueden, posteriormente, germinar y multiplicarse durante el almacenamiento de estos productos, incluso en refrigeración, alterando sus características organolépticas y convertirlos en productos no aptos para el consumo. Thomas y Delves-Broughton, 2001 comprobaron que el crecimiento de un cultivo de  $10^4$  ufc/mL de *Bacillus sporothermodurans* al que se le adicionaban 0,125 µg de de nisina/mL, aumentaba su fase de latencia en 7 días a 37°C. Otro grupo de



bacterias sensibles a la nisina son las bacterias ácido lácticas, microorganismos alterantes de productos ácidos, como ensaladas aliñadas, salsas o bebidas alcohólicas como vino y cerveza, que son productos que no suelen ser tratados térmicamente.

El uso de la nisina como conservante de alimentos ha sido probado en todo tipo de productos: tanto líquidos como sólidos, enlatados, almacenados a temperatura ambiente o en refrigeración (Delves- Broughton y Gasson, 1994; Thomas *et al.*, 2000; Thomas y Delves- Broughton, 2001), principalmente en alimentos procesados térmicamente para evitar la germinación de las esporas durante el almacenamiento y la consecuente alteración de los mismos. Además, permite disminuir los efectos negativos del tratamiento térmico al poder reducir la intensidad de los mismos, reduciendo al mismo tiempo el coste económico de los procesos.

La nisina (E-234) es la única bacteriocina reconocida como GRAS (Generally Recognized As Safe. Su uso como conservante alimentario está autorizado en la unión Europea por la Directiva 95/2/ (CE) sobre aditivos alimentarios diferentes a los colorantes y los edulcorantes, modificada por la Directiva 98/72/CE. Este compuesto es utilizado mayoritariamente en la industria quesera para controlar el crecimiento de *Clostridium spp.* y en otros alimentos cremosos.

**Tabla 1.1.** Concentración de nisina aceptada por la Directiva 98/72/CE.

Postres de semolina tapioca y productos similares	3 mg/kg
Queso madurado y queso fundido	12,5 mg/kg
Clotted cream	10 mg/kg
Queso mascarpone	10 mg/kg

Ciertos compuestos, han mostrado un efecto sinérgico cuando se han usado de combinados con la nisina. Entre estos, se pueden destacar aceites esenciales como el timol y el carvacrol, ácidos orgánicos, bacteriocinas, extractos de ajo, y lisozima entre otros (Pol y Smid, 1999; Pol 2001; Singh *et al.*, 2001; Mansour and Millieri, 2001). Otras estudios *in situ* (Schillinger, 1999), incluso han demostrado la producción de bacteriocinas que pueden potenciar el efecto de la nisina. En *Listeria monocytogenes* y

*Bacillus* ha sido probado este efecto sinérgico de nisina, carvacrol y citrato en paté de hígado (ter Steeg, 1993; ter Steeg *et al.*, 1994).

### **1.7.2. Aceites esenciales.**

Muchas plantas, especias y hierbas aromáticas, así como sus aceites esenciales, contienen un elevado número de compuestos que se sabe que son letales para bacterias, mohos y levaduras, o bien que inhiben, distintas actividades metabólicas, como la producción de micotoxinas y toxinas bacterianas (Beuchat, 1994; Davidson, 2001 Ultee y Smid, 2001).

Los compuestos antimicrobianos de las plantas se encuentran presentes normalmente en la fracción de los aceites esenciales de las hojas (romero y tomillo), flores (clavo), bulbos (ajo y cebolla), frutos (pimienta y cardamomo) y otras partes de las plantas (Nychas, 1995; Shelef, 1983). Estos compuestos antimicrobianos suelen ser terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides.

La compleja composición de los aceites esenciales puede variar en función de las condiciones de crecimiento de cultivo de la planta, del modo de extracción del mismo, y de otros factores que hacen que éstos tengan diferente grado de actividad antibacteriana (Dorman y Deans, 2000).

Generalmente, los aceites esenciales que poseen elevada actividad antibacteriana frente a patógenos resistentes contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como carvacrol, eugenol y timol (Frag *et al.*, 1989).

En esta Tesis Doctoral, para evitar fluctuaciones debido a esta variabilidad se utilizaron productos comerciales puros, asegurándose así una concentración fija del compuesto a utilizar.

#### **1.7.2.1. Carvacrol.**

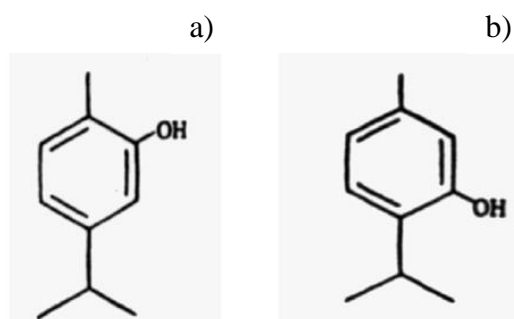
El carvacrol (figura 1.9 a) es un fenol monoterpenoide presente en la fracción esencial de distintas plantas, como el orégano (*Origanum vulgare*) en un 60-70% y el tomillo (*Thymus spp.*) en un 45% (Ultee *et al.*, 2002).

El estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de tomillo y, del carvacrol como su componente mayoritario, presenta distintos niveles de inhibición del crecimiento cuando se utilizó frente a especies Gram-positivas y Gram-negativas (Dorman y Deans, 2000).

Otros autores han estudiado la actividad antimicrobiana de este compuesto frente a distintas bacterias. Du *et al.*, (2008), comprobaron la efectividad de este compuesto frente al crecimiento de *E.coli* en films de manzana comestible. Ultee y Smid, (2001) vieron como afectaba este compuesto al crecimiento y a la producción de toxina de *Bacillus cereus*.

### 1.7.2.2. Timol.

Es un compuesto fenólico (figura 1.9 b), incoloro, de olor y sabor agradable, que se encuentra presente en la naturaleza en los aceites esenciales del tomillo y del orégano, al igual que su isómero carvacrol. Es, junto con el carvacrol uno de los terpenos mayoritarios presente en la fracción del aceite esencial del tomillo en un porcentaje de un 43% y del orégano, en un porcentaje hasta en un 50%.



**Figura 1.9.** Fórmula química del carvacrol a) y del timol b).

### 1.7.2.3. Mecanismo de acción

Pese a que son muchos los estudios realizados sobre la actividad de los aceites esenciales y sus componentes, su mecanismo de acción no ha sido estudiado en detalle (Lambert *et al.*, 2001).

La mayoría de los estudios sobre la acción de los aceites esenciales frente a microorganismos patógenos coinciden en que son más activos frente a Gram- positivos que frente a Gram- negativos (Shelef, 1983; Farag *et al.*, 1989; Outtara *et al.*, 1997; Smith- Palmer *et al.*, 1998; Delaquis *et al.*, 2002; Harpaz *et al.*, 2003). Este hecho se debe a que la membrana externa de las bacterias Gram- negativas disminuye la difusión de compuestos hidrofóbicos a su través (Vaara, 1992). Sin embargo, no todos los estudios coinciden (Wilkinson *et al.*, 2003). Lambert *et al.*, 2001, comprobaron que los aceites esenciales son capaces de entrar en el periplasma de las bacterias Gram- negativas a través de las proteínas de membrana externa. De hecho, *Aeromonas hydrophyla*, parece ser una de las especies más sensibles a la acción de los aceites esenciales (Deans y Ritchie, 1987; Stecchini *et al.*, 1993; Wan *et al.*, 1998).

Todos los estudios apuntan a que la principal acción principal de estos aceites esenciales la llevan a cabo los compuestos fenólicos.

Su actividad antimicrobiana parece que no se debe a un sólo mecanismo de acción, sino a la acción multifactorial que los distintos componentes de los aceites esenciales tienen sobre la célula: alteración de la membrana plasmática y de las proteínas, degradación de la pared celular, filtración del contenido celular, afectando a la concentración del citoplasma y produciendo la disminución de la fuerza motriz, (Skandamis y Nychas, 2001; Skandamis *et al.*, 2001; Carson *et al.*, 2002; Holley y Patel, 2005).

Una de las características más importantes de los aceites esenciales es su naturaleza hidrófoba, que les confiere la capacidad de penetrar a través de las membranas celulares, alterando su estructura y haciéndolas más permeables (Carson *et al.*, 2002). La célula, debido a este aumento de permeabilidad, sufre una salida moderada de iones y otros compuestos celulares, que puede tolerar, cuando es moderada, sin perder su viabilidad. Sin embargo, cuando esta pérdida es excesiva puede llevar a la muerte celular (Ultee *et al.*, 2000).

También parece evidente la interacción de los componentes de los aceites esenciales con las proteínas integrales de membrana (Knobloch *et al.*, 1989; Pol *et al.*, 2001). Las moléculas hidrocarbonadas presentes en los aceites esenciales pueden acumularse en la bicapa lipídica y destruir la interacción lipoproteica (Juven *et al.*, 1994; Sikkema *et al.*, 1995), provocando modificaciones de la estructura celular y como consecuencia

alteraciones de la funcionalidad celular. Según Burt (2004), los componentes de los aceites esenciales podrían interaccionar con las ATPasas presentes en la membrana citoplasmática, por lo que se vería afectada la síntesis de energía y de componentes estructurales.

Gill *et al.* (2006), llevaron a cabo un estudio con eugenol, carvacrol y cinamaldehído y demostraron su efecto inhibitorio sobre la ATPasa de membrana de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

Los mecanismos de acción del carvacrol y del timol son muy similares al de otros compuestos fenólicos, provocando la interrupción de la cadena respiratoria, la alteración de canales iónicos de membrana, las alteraciones del flujo de electrones y el transporte activo (Denyer y Hugo, 1991b).

Burt *et al.* (2007) observaron que al exponer las células a concentraciones subletales de agentes antimicrobianos naturales (como carvacrol y timol), se produjeron cambios en la concentración de los ácidos grasos de la membrana celular, aumentando los ácidos grasos insaturados. Cuando las bacterias Gram-negativas fueron expuestas al carvacrol, observaron que este compuesto era capaz de desintegrar la membrana externa de estas bacterias, favoreciendo así la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Lambert *et al.*, 2001), provocando con ello la salida del ATP, la inhibición de las ATPasas y la disminución de la fuerza motriz de protones.

De acuerdo con Ultee *et al.* (2000), se pueden distinguir tres fases físicas de las membranas celulares: una bicapa en fase gel (cadena de lípidos ordenada), una bicapa en fase líquida-cristalina (cadena de lípidos desordenada) y una estructura hexagonal. Para una funcionalidad biológica óptima, la membrana debe mantenerse en estado fluido líquido cristalino, por lo que la actividad del carvacrol, probablemente tenga efecto a este nivel, ya que se ha observado que conforme aumenta la concentración de carvacrol, mayor es la cantidad de este componente acumulado en la membrana y por consiguiente mayor es el daño. Estudios en *B. cereus* analizaron el mecanismo de acción del carvacrol, encontrando que el grupo OH- del compuesto y la presencia de un sistema deslocalizador de electrones son requisito importante para la actividad antimicrobiana de este compuesto. El carvacrol interactúa con la membrana celular disolviéndose en la bicapa fosfolipídica, alineándose entre las cadenas de ácidos grasos.

Esta distorsión de la estructura física puede causar la expansión y desestabilización de la membrana, aumentando su fluidez y provocando un aumento en su permeabilidad (Ultee *et al.*, 2002).

El mecanismo de acción del timol es semejante al del carvacrol, ya que su estructura química es similar. Es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, permitiendo así la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Helander *et al.*, 1998). Lambert *et al.* (2001) estudiaron el mecanismo de acción del timol frente *S. typhimurium* y *S. aureus*, concluyendo que este agente antimicrobiano se une a las proteínas hidrofóbicas de la membrana mediante puentes de hidrógeno, lo que permite un incremento en la permeabilidad, afectando la homeostasis del pH y la concentración de iones. Lambert y Pearson (2000) señalaron que el timol cambia la permeabilidad de las células microbianas, dejando así que salgan iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos, esenciales para el metabolismo. Estos efectos causan un incremento en la fase lag, provocando una disminución en la carga microbiana total.

Chaibi *et al.* (1997) confirmaron que en células de *B. cereus* y *Clostridium botulinum* el timol puede inhibir alguno de los diferentes procesos involucrados en la transición de espora a célula, como la germinación, el crecimiento y la multiplicación celular. Para inhibir la multiplicación celular era necesario menos cantidad de timol, posiblemente por su carácter hidrofóbico. Falcone *et al.* (2005) encontraron que para una concentración de timol de 50 a 250 ppm se veía un efecto dosis dependiente, mientras que cuando la concentración era igual o superior a 500 ppm no se observó crecimiento alguno, efecto totalmente inhibitorio. También observaron que este efecto inhibitorio es mayor en *Bacillus subtilis*, seguido de *Bacillus cereus* y por último de *Bacillus licheniformis*.

#### **1.7.2.4. Aplicaciones.**

Muchos son los autores que han controlado el desarrollo de distintos microorganismos patógenos en alimentos. Roller y Seedhar (2002) utilizaron una solución de carvacrol y cinamaldehído para controlar la carga microbiana en kiwi y melón. Para ello, la fruta se sumergió en soluciones de 0,15-0,75  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de ambos

compuestos, siendo el tratamiento menos efectivo en melón, posiblemente debido a la diferencia de pH entre ambas frutas más ácido en el kiwi que en el melón.

También son muchos los estudios que han comprobado el efecto sinérgico contra microorganismos cuando se utilizan distintos aceites esenciales de forma conjunta, o bien, cuando se combinan con otros antimicrobianos naturales u otras técnicas de procesado. Hay varias hipótesis que demuestran que el carvacrol puede incrementar el número, tamaño o la duración de la existencia de poros creados por nisina en la membrana celular (Periago y Moezelar, 2001).

Actualmente, el uso de aceites esenciales está ampliamente extendido sobre todo tipo de productos: carne, pescados, arroz, productos lácteos, frutas y hortalizas.

## **1.8. MÉTODOS COMBINADOS DE CONSERVACIÓN.**

La aparición de nuevos métodos de inactivación microbiana, ha hecho que se vuelva considerar la aplicación de técnicas combinadas (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003), basada en la “Teoría de Barreras” de Leistner, (2000). Esta teoría se basa en la conservación de alimentos mediante la aplicación de varias “barreras” o métodos de conservación aplicados de forma simultánea y/o sucesiva, con objeto de mejorar el efecto letal conseguido por cada una de ellos por separado, de forma, que se puedan obtener productos seguros sin un detrimento de su calidad organoléptica ni nutricional. Conocer con exactitud el mecanismo de inactivación de cada una de las distintas técnicas de conservación permite elegir tratamientos que al aplicarlos de forma conjunta obtengan un efecto sinérgico, permitiendo así reducir su intensidad, disminuyendo, por lo tanto, las alteraciones o daños que pudieran ocasionar sobre el producto.

La existencia de un daño subletal en las envolturas celulares de los microorganismos es importante en la conservación de alimentos por procesos combinados (Mackey, 2000). Ya que las células microbianas dañadas presentan menor resistencia a condiciones adversas. Distintos estudios han comprobado que la existencia de daños subletales en las envolturas celulares y/o poros reversibles, son de gran utilidad en el desarrollo de técnicas combinadas con otros agentes o antimicrobianos naturales (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003). La aplicación simultánea de nisina (0,15 µg/mL) y carvacrol o timol (0,3 mmol/L) causó una mayor disminución del crecimiento

de cepas de *B. cereus* que cuando los antimicrobianos fueron aplicados individualmente (Periago *et al.*, 2001). Estos mismos autores consiguieron la máxima reducción de la viabilidad en células que habían experimentado un tratamiento térmico previo a 45 °C. La acción sinérgica de nisina y carvacrol fue mayor a 30 °C que a 8 °C a pH 7, lo que parece indicar que la temperatura induce cambios en la permeabilidad de la membrana.

## **1.9. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS: LA CITOMETRÍA DE FLUJO.**

En determinadas circunstancias, las industrias de alimentación necesitan técnicas rápidas de detección y estimación del número de microorganismos viables en un alimento. La citometría de flujo, conjuntamente con el uso de fluorocromos, parece satisfacer estas necesidades (Nuñez, 2001, Invitrogen, 2012).

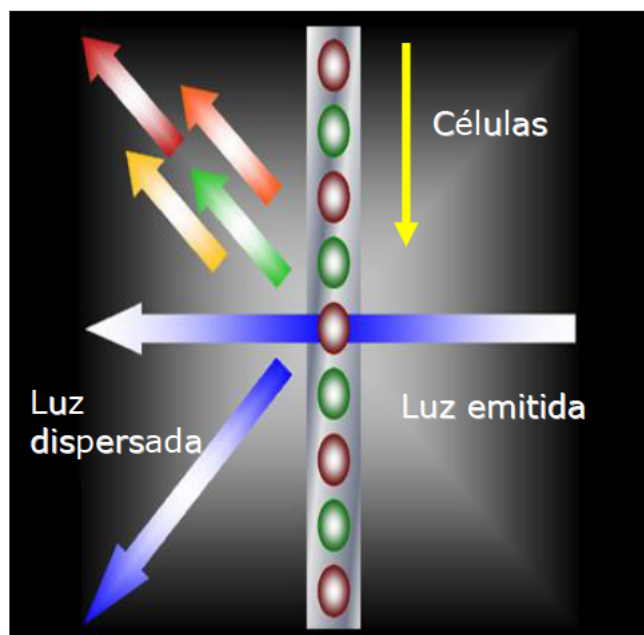
Esta técnica permite conocer no sólo el número de microorganismos, sino también el estado fisiológico de los mismos, permitiendo así diferenciar la presencia de distintas subpoblaciones. Esta información no se puede obtener con los métodos tradicionales de recuento en placa y pruebas bioquímicas.

La citometría de flujo comenzó a desarrollarse en los años veinte del siglo pasado, para analizar suspensiones coloidales y poder detectar, contar y medir el tamaño de las partículas de los aerosoles. Fue en los años setenta, cuando los avances en el campo de la óptica y de la fluorescencia permitieron el desarrollo de esta técnica para poder ser utilizada en el análisis de células.

En esencia, un citómetro de flujo es un equipo que consigue un flujo de células, el cual es atravesado por una luz láser. El láser, al impactar con las células, produce una serie de señales que son recogidas por detectores y fotomultiplicadores, los cuales transforman la luz emitida en una señal electrónica (voltaje), que puede ser cuantificada. También puede presentar un sistema “sorting” para la separación de las subpoblaciones celulares.

Las células, arrastradas por un fluido envolvente, que generalmente es una solución salina, son bombeadas al interior del citómetro de flujo a través de un conducto sobre el cual incide el haz del láser, y que es tan estrecho, que las células tienen que pasar a su través una detrás de otra.





**Figura 1.10.** Esquema del fundamento del citómetro de flujo.

El láser más común es el de argón, de 488 nm, ya que a esta longitud de onda, se excitan la mayoría de los fluorocromos. También se utiliza el láser de diodo de 635 nm. En su interior, el citómetro de flujo presenta una serie de lentes y filtros que seleccionan y dirigen la emisión y la excitación de los haces de luz. Al atravesar el rayo de luz, las células interactúan con éste, causando dispersión de la luz. Basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células que pasan (parámetro denominado Forward Scatter, FSC) y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de éstas (parámetro denominado Side Scatter, SSC). Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de anticuerpos marcados con moléculas fluorescentes, o son teñidas con fluorocromos específicos o bien presentan autofluorescencia, se puede obtener más información con respecto a su naturaleza y a su estado fisiológico. El uso de moléculas fluorescentes distintas (con distintos colores de fluorescencia) permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea. Los detectores más frecuentes son los de fluorescencia verde (FL1; 530 nm), naranja (FL2; 585 nm) y roja

(FL3; > 650 nm). El parámetro de forma (FSC) es captado por un fotodiodo, mientras que el parámetro de tamaño (SSC) y las emisiones fluorescentes son captadas por fotomultiplicadores. Ambos, fotodiodos y fotomultiplicadores, generan una señal eléctrica cuando los fotones inciden sobre ellos, proporcional al número de fotones, que es amplificada a un voltaje. Y es este voltaje el que puede ser procesado electrónicamente. Los restos y el ruido electrónico también pueden generar un voltaje determinado, por lo que para obviar este voltaje, habría que fijar un umbral, y sólo se reconocerían señales con voltaje superior a este umbral establecido.

Los resultados pueden ser analizados de diversas maneras. Los parámetros estadísticos más utilizados son los recuentos totales, recuentos en regiones definidas, media, desviación estándar y coeficiente de variación. Las formas de mostrar los resultados también son muy variadas: diagramas de dispersión de puntos, histogramas, diagramas de densidad o tablas con estadísticas.

La citometría de flujo es una técnica muy útil para el recuento y análisis de células en suspensión, en una concentración de al menos  $10^3$  ufc/mL. El uso de esta técnica está ampliamente extendido en medicina, para el conteo de células sanguíneas y también de otros tipos de células. En la industria alimentaria, también se ha utilizado esta técnica en la industria cervecera y otro tipo industrias de alimentos líquidos (vino, leche, zumos de frutas, etc.) para comprobar la viabilidad de los cultivos iniciadores de estos productos, poder detectar patógenos y microorganismos alterantes, comprobar si los microorganismos esporulados están germinando o no, o incluso para cuantificar la eficacia de antisépticos o bacteriocinas (Berney, *et al.*, 2006a; Berney, *et al.*, 2006b; Boulos, *et al.*, 1999).

La citometría de flujo permite conocer la viabilidad de las células utilizando compuestos fluorescentes capaces de cuantificar parámetros como la actividad enzimática, la integridad de membrana, contenido en ácidos nucleicos o el potencial de membrana entre otros. En general, se deben utilizar dos o más técnicas simultáneamente. Normalmente se combina una técnica positiva con un parámetro vital (por ejemplo la actividad enzimática) con otra negativa para otro parámetro vital (por ejemplo, la integridad de membrana) (Hernlem y Hua, 2010).

## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



El tratamiento térmico ha sido y es el método de conservación por excelencia en la conservación de alimentos. Sin embargo, la aparición en los últimos años de microorganismos resistentes a los tratamientos térmicos tradicionales ha hecho que la tendencia de la industria alimentaria haya sido la de incrementar los tiempos y las temperaturas de dichos tratamientos. Con ello se pretende garantizar la seguridad microbiológica de los alimentos, pero conlleva un sobreprocesado de los productos, con el consiguiente detrimento de las características organolépticas y nutricionales de los mismos.

Esto ha hecho que parte de las industrias alimentarias busquen métodos alternativos a los tratamientos térmicos para la conservación de alimentos. No obstante, ninguno de estos métodos es capaz de garantizar la seguridad y estabilidad alimentaria, cuando es aplicado de manera individual. Por esto, la tendencia actual como solución a sus problemas es la búsqueda de un efecto sinérgico en la combinación de los distintos métodos de conservación.

Una de los métodos alternativos es la utilización de antimicrobianos naturales, tanto de bacteriocinas como de distintos compuestos presentes en los aceites esenciales de distintas hierbas aromáticas y especias. La combinación de antimicrobianos naturales con un tratamiento térmico permitiría reducir la intensidad de éste, mejorando la calidad del producto final, que es una de las principales demandas del consumidor actual.

Para garantizar la seguridad de los alimentos sometidos a cualquiera de estos procesos de conservación, es necesario conocer y poder predecir las cinéticas de inactivación de los microorganismos, así como las cinéticas de crecimiento de los supervivientes presentes en los alimentos tratados.

El objetivo final de esta Tesis Doctoral es optimizar los tratamientos térmicos aplicados de manera individual y/o combinados con compuestos antimicrobianos, garantizando la seguridad y estabilidad alimentaria. La investigación se ha llevado a cabo sobre bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y esporos bacterianos, dado que las grandes diferencias existentes entre estos grupos de microorganismos condicionan el efecto de los tratamientos.

Con la finalidad de alcanzar este objetivo se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar el efecto de las características del medio y de la velocidad de calentamiento y enfriamiento sobre la resistencia al calor de microorganismos esporulados.
- Estudiar el efecto de la adición de antimicrobianos naturales al medio de calentamiento y de recuperación sobre la resistencia al calor de microorganismos esporulados expuestos a tratamientos de calentamiento isotérmico y no isotérmico.

- Evaluar el efecto combinado de un tratamiento térmico previo sobre el crecimiento en presencia de antimicrobianos naturales de diversas especies de bacterias vegetativas en alimentos y en un medio de referencia.
- Profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de estos procesos combinados.
- Estudiar la validez de modelos matemáticos para predecir el comportamiento de los microorganismos sometidos a estos métodos de conservación de alimentos.





### **3. AIM AND IMPACT**



Heat treatment has been the most widely used procedure for microbial inactivation in food. Nevertheless, the finding in recent years of microorganisms able to survive to these traditional treatments has led food industries to increase treatment times and temperatures. Such increases aim to ensure food safety, but involves an overprocessing of food products, which unfortunately entails unwanted side effects in the organoleptic and nutritional properties.

This limitation has promoted the development of alternative methods to heat treatments for food preservation. However, none of these new technologies is able to ensure food safety and stability, when applied individually. Consequently, present

trends include to look for synergistic effects when, at least, two of these methods are combined.

One of the alternative methods is the addition of natural antimicrobials, either bacteriocins or different compounds present in the essential oil of aromatic herbes and spices. The combination of natural antimicrobials with a heat treatment could help to reduce its intensity, improving the quality of the final product, wich is actually, one on the most important requests of present consummers.

In order to ensure the microbiological safety of food products exposed to these treatments, there is a need for accurate predictions of microbial inactivation kinetics, as well as for growth kinetics of the survivors.

The aim of this Thesis is to optimize the heat treatments applied individually and/or in combination with natural antiicrobials, ensuring both, food safety and stability. The research has been carried out with Gram positive bacteria, Gram negative bacteria and bacterial spores, since differences among these groups are expected to determine the effects of the treatments.

Within this global aim, several more specific objectives were set:

- To explore the effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the heat resistance of sporeformig bacteria.
- To explore the effect of the addition of natural antimicrobials to the heating and recovery media on the heat resistance of sporeformig bacteria exposed to isothermal and non-isothermal treatments.
- To assess the combined effect of a previous heat treatment on the growth in presence of natural antimicrobials of different vegetative bacteria in food and in a reference medium.
- To explore the mechanism of action of these combined processes.
- To explore the suitability of mathematical models to predict the behaviour of microorganisms exposed to these preservation technologies.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**



#### **4.1. Microorganismos.**

A lo largo de esta investigación se utilizaron los siguientes microorganismos:

- *Listeria monocytogenes* CECT 4031, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).
- *Listeria monocytogenes* Scott A NCTC 11994, suministrada por Institute of Food Research.
- *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CECT 4300, suministrada por la CECT.

- *Salmonella enterica* serovar Senftenberg CECT 4565, suministrada por la CECT.
- *Bacillus cereus* INRA ATZ421, suministrada por la colección de cultivos del Institut National de la Recherche Agronomique.
- *Bacillus licheniformis* CECT 4525, suministrada por la CECT.
- *Bacillus subtilis* AdHC1, suministrada por Unilever Bestfoods Research Vlaardingen.
- *Bacillus subtilis* CECT 4071, suministrada por la CECT.
- *Bacillus sporothermodurans* cepa IC4, suministrada por Unilever Netherlands Sourcing Unit Oss.

## **4.2. Preparación de los microorganismos.**

### **4.2.1. Células vegetativas.**

Las cepas de *L. monocytogenes* 4031 y *S. enterica* se mantuvieron en placas de agar triptono soja (TSA) suplementadas con un 0,6 % (m/V) de extracto de levadura (TSAYE; Scharlau Chemie, Barcelona, España) a 4°C.

Los cultivos se prepararon tomando una colonia de la placa que se inoculaba en caldo de triptono soja (TSB; Scharlau Chemie) enriquecido con un 0,6% (m/V) de extracto de levadura (TSBYE) y se incubaba a 37°C durante 24 horas. De este cultivo se tomaba una muestra con un asa de siembra que se subcultivaba en TSBYE otras 24 horas a 37°C, hasta que los microorganismos alcanzaban la fase estacionaria, con una concentración aproximada de  $10^9$  células/mL.

### **4.2.2. Esporas.**

El medio de esporulación que se utilizó para *B. cereus*, ambas cepas de *B. subtilis* y *B. licheniformis* fue agar de recuento en placa (PCA; Scharlau Chemie).



Cada placa de Petri fue inoculada con 0,2 mL de un cultivo crecido 24 horas a 37°C en caldo infusión de cerebro y corazón (BHIB; Scharlau Chemie), sembrado a partir de una colonia aislada de una placa de agar. Las placas así inoculadas se incubaron a 37°C.

Para la obtención de esporos de *B. sporothermodurans* se realizó una siembra en estría en placas de PCA que se incubaron a 30°C durante 24 horas. De esta placa de agar se tomaron 4 colonias aisladas que se suspendieron en una disolución de NaCl (Panreac, Barcelona, España) al 0,85%. Posteriormente, se inocularon con 0,2 mL de esta suspensión en placas de agar de esporulación de Campdem (CSA; Brown *et al.*, 1984) que contienen 28g/L de agar nutritivo (Scharlau), 0,1 g/L de MnSO<sub>4</sub> (Panreac), 0,056 g/L de CaCl<sub>2</sub> (Panreac), 3g/L de agar bacteriológico (Scharlau). Estas placas se incubaron a 37°C.

Para todos los microorganismos, las placas inoculadas se incubaron durante al menos 5 días, hasta asegurar mediante microscopía de contraste de fases (Leica DM LS. Wetzlar, Alemania), una tasa de esporulación de, al menos, el 90%.

Los esporos se recogieron de las placas mediante inundación con agua destilada estéril y arrastre con una varilla estéril. Después de ser recogidas, las suspensiones de esporos se centrifugaron 3 veces durante 20 minutos a 3.000×g en una centrífuga (Haraeus Instruments, Hanau, Alemania). La concentración final de esporos se ajustó a 10<sup>9</sup> esporas/ mL con agua destilada estéril y se almacenó a 4°C.

### **4.3. Compuestos químicos.**

Las soluciones madre de nisina, carvacrol y timol (todos de Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania) a concentraciones de 0,3 mM para nisina (N) y 0,5 M para carvacrol (C) y timol (T) se prepararon en un 95 % de etanol y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### **4.4. Preparación del zumo de zanahoria.**

El zumo de zanahoria se preparó a partir de zanahorias frescas de la variedad Nantesa, suministradas por una empresa local de productos mínimamente procesados. Las zanahorias se pelaron, lavaron y trocearon. El zumo se preparó utilizando una

licuadora convencional y se filtró a través de un colador metálico. El zumo de zanahoria obtenido se dispensó en tubos que se trataban con vapor durante 15 minutos, y se almacenaban a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Los inhibidores naturales presentes en las zanahorias se destruyen por este tratamiento térmico (Valero *et al.*, 2000). El pH final del zumo de zanahorias fue de  $6,14 \pm 0,10$ . Justo antes de los experimentos, los tubos se trataban otra vez con vapor durante 15 minutos, y posteriormente se ajustaba la temperatura a  $37^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.5. Curvas de crecimiento.**

Cuando el crecimiento se produjo en caldo de cultivo TSB, las curvas de crecimiento se realizaron mediante medidas de absorbancia, llevadas a cabo en un espectrofotómetro y en un Bioscreen C.

En el caso del crecimiento en zumo de zanahoria, la turbidez del medio impedía la estimación del crecimiento mediante medidas de absorbancia, y se tuvieron que realizar curvas de crecimiento mediante recuento en placa.

Se realizaron curvas de crecimientos con distintas concentraciones de nisina y carvacrol para conocer el efecto antimicrobiano de estos compuestos sobre los distintos microorganismos. En todos los casos, se comprobó que la cantidad de alcohol adicionada con los compuestos antimicrobianos no tenía efecto alguno sobre los microorganismos.

En ocasiones, se aplicó un tratamiento térmico a los cultivos de microorganismos, previo a su incubación en las condiciones de cultivo seleccionadas, con objeto de conocer su efecto en el crecimiento de los supervivientes al mismo.

##### **4.5.1. Curvas de crecimiento realizadas por medida de la absorbancia en un espectrofotómetro.**

En el caso de *L. monocytogenes*, las medidas de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro (ZUZI 4110RS, Auxilab, Beriáin, Spain) a una longitud de onda de 620 nm. Se prepararon tubos de 5 mL de TSBYE con nisina y/o carvacrol y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y, a tiempos preestablecidos, se tomaron medidas de la absorbancia a dicha longitud de onda. Para ver el posible efecto de estas sustancias antimicrobianas

sobre este microorganismo se utilizaron diferentes concentraciones de nisina (0,13, 0,26 y 0,39  $\mu\text{M}$ ) y carvacrol (0,11, 0,22, 0,33, 0,44 y 0,66 mM) solas y combinadas (0,13  $\mu\text{M}$  N + 0,11 mM C y 0,13  $\mu\text{M}$  N + 0,22 mM C).

Los compuestos antimicrobianos se adicionaban al medio previamente a la inoculación del microorganismo, en una concentración inicial de  $10^3$  ufc / mL, para poder estudiar así el posible efecto de estos compuestos en la fase de latencia o en la velocidad de crecimiento de estos microorganismos.

#### **4.5.2. Curvas de crecimiento realizadas por medida de la absorbancia en un Bioscreen.**

Los estudios sobre el efecto de los compuestos antimicrobianos en el crecimiento de *S. Senftenberg* y *S. Enteritidis*, se llevaron a cabo mediante medidas de absorbancia a 420-580 nm en placas microtiter en un Bioscreen C analyzer con baja agitación (Lab Systems, Helsinki, Finlandia). Para estos microorganismos, las curvas de crecimiento se realizaron en TSBYE con nisina y/o carvacrol a 37°C y se utilizaron diferentes concentraciones de nisina (0,13, 0,26, 0,39 y 1,2  $\mu\text{M}$ ) y carvacrol (0,11, 0,33, 0,55 y 0,77 mM) solas y combinadas (1,2  $\mu\text{M}$  N + 0,77 mM C), añadidas al medio con anterioridad a la adición del inóculo del microorganismo, en una concentración de  $10^3$  ufc/mL.

#### **4.5.3. Curvas de crecimiento realizadas por recuento en placa.**

Las curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* en zumo de zanahoria se realizaron añadiendo una concentración de nisina 0,13 $\mu\text{M}$  y/o una concentración 0,33 o 0,66 mM de carvacrol, solas o combinadas, que se añadían al medio antes de ser inoculados con una concentración de microorganismos de  $10^3$  ufc/mL para comprobar su efecto inhibitorio y se incubaban durante 24 horas a 37°C. Pasado este tiempo de incubación se sembraban diluciones seriadas de cada condición en placas de TSAYE y se incubaban a 37°C durante 24 horas.

#### **4.5.4. Tratamiento térmico previo.**

Para los experimentos realizados con *L. monocytogenes* y *S. enterica* se seleccionó un tratamiento térmico moderado de 15 min a 55°C por producir una reducción de 3 ciclos logarítmicos en *L. monocytogenes* CECT 4031 y *S. Enteritidis* y de un ciclo logarítmico en la población de *L. monocytogenes* Scott A y *S. Senftenberg*.

Los cultivos de trabajo se dividían en dos alícuotas. Una de ellas se utilizaba para el control no tratado y a la otra se le aplicaba dicho tratamiento térmico. El cultivo control se diluía hasta  $10^3$  células/mL, mientras que el cultivo expuesto al tratamiento térmico se diluía hasta  $10^6$  cells/mL en el caso de *L. monocytogenes* y *S. Enteritidis* y hasta  $10^4$  cells/mL para *S. Senftenberg*. Así se aseguraba que cuando comenzaba el crecimiento, todos los cultivos partían del mismo número inicial. Este tratamiento térmico se aplicó a los cultivos crecidos en TSBYE durante 24 h a 37 °C, colocando estos tubos en un baño de agua precalentado a 55°C (Frimengruppe Press-Daimier, Dresden, Alemania). Antes y después del tratamiento térmico, se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona tamponada (APT, Scharlau Chemie) y se sembraron en placas de TSAYE para conocer la tasa de inactivación del tratamiento. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C.

#### **4.5.5. Modelización de las curvas de crecimiento.**

Las curvas de crecimiento para estudiar el efecto de la nisina y el carvacrol sobre *L. monocytogenes* y *S. enterica* se construyeron representando las medidas de absorbancia (unidades de densidad óptica; u. D.O.) frente al tiempo de exposición en horas (t). Las medidas de absorbancia de un cultivo son sólo una estimación de su crecimiento pero, siguiendo el método propuesto por Smelt *et al.* (2000), se pueden convertir estas medidas de la densidad óptica en estimaciones de la fase de latencia ( $\lambda_t$ ) (Ecuación 3.1). De acuerdo con estos autores, para poder estimar este parámetro, es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones. La fase de latencia se define como el tiempo necesario para que las células puedan adaptarse a las nuevas condiciones del ambiente y dividirse en dos células hijas. Después de esta primera división, las células se considera que crecen inmediatamente a su mayor velocidad de crecimiento ( $\mu_{max}$ ). El tiempo de generación ( $g_t$ ) se calcula para cada una de las concentraciones de los distintos antimicrobianos. Las primeras muestras de turbidez aparecen cuando el número de

microorganismos es de  $10^6$  ufc / mL para ambos microorganismos, valor que se corresponde con 9,97 generaciones ( $N_g$ )

$$\lambda_t = t_t - (g_t \times N_g) \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde  $t_t$  es el tiempo al que aparece la turbidez.

Las curvas de crecimiento resultantes se ajustaron mediante la función propuesta por Baranyi *et al.* (1993) (Ecuación 1.2), reproducida aquí para facilitar la lectura de este capítulo.

$$y(t) = y_o + \mu_{\max} \times A(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m \times \mu_{\max} \times A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_o)}} \right) \quad \text{Ec. 1.2}$$

Las condiciones en las que pasados 15 días de incubación a 37°C no se observaba un aumento de la turbidez se sembraban en placas de TSA y se incubaban a 37°C durante 24 horas para comprobar el número de microorganismos presentes en el cultivo.

Estos experimentos se realizaron, al menos, por triplicado.

#### **4.5.6. Análisis estadístico.**

Los análisis de varianza y los test de Duncan's se realizaron con el programa Statgraphics Plus v. 5.1 (Statpoint Technologies, Inc, Warrenton, VA, USA). Las diferencias entre los datos se consideraron significativas cuando  $p \leq 0.05$ .

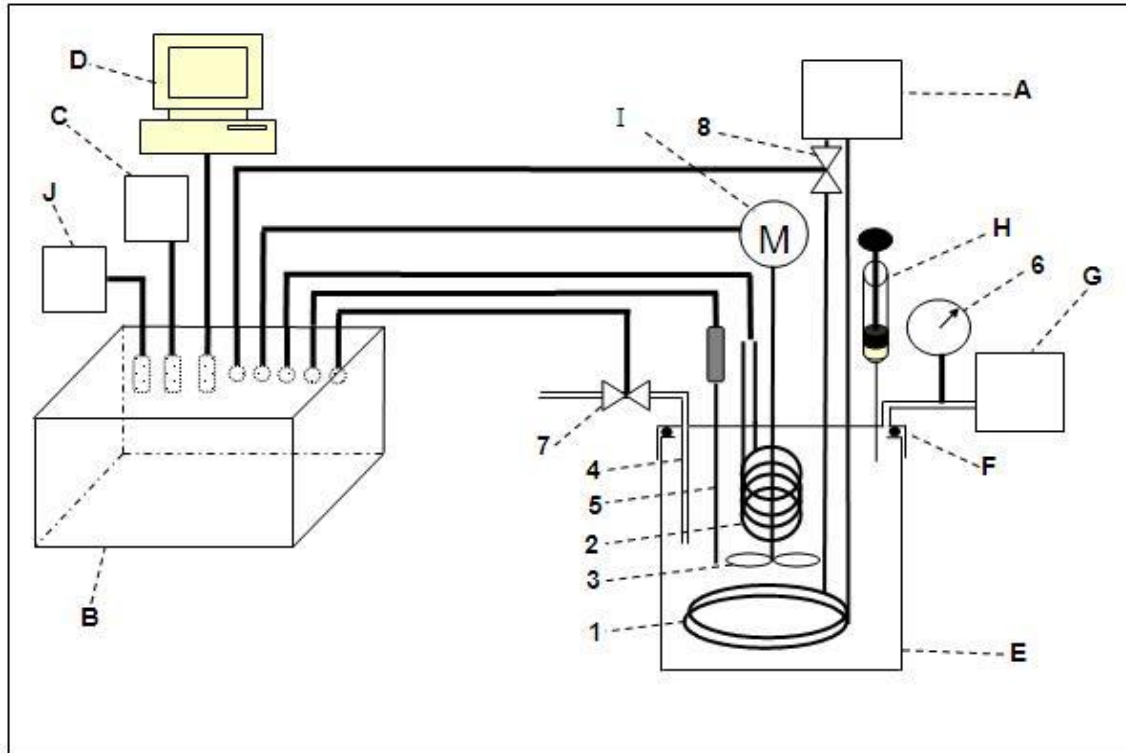
### **4.6. Determinación de la resistencia térmica.**

#### **4.6.1. El termorresistómetro Mastia.**

Las determinaciones de termorresistencia se llevaron a cabo en un termorresistómetro

Mastia (Conesa *et al.*, 2009), que es una modificación del termorresistómetro TR-SC (Condón *et al.*, 1993), que permite llevar a cabo rampas de calentamiento y enfriamiento a distintas velocidades. El esquema del termorresistómetro se muestra en la Figura 3.1. El aparato está formado por un vaso de calentamiento (E) de acero inoxidable, con unas dimensiones de 8,5 x 12 cm de diámetro externo y una pantalla deflectora para mejorar la turbulencia. Este vaso está cerrado por una tapa provista de una junta tórica (F), atravesada por un eje de agitación, provisto con una hélice (3) y ocho puertos con cierres roscados para: la fuente de presión (N<sub>2</sub>) (G); la inyección del inóculo, a través de un septum de cromatografía de gases; el tubo de recogida de muestras (4); un termopar (5) para monitorizar la temperatura durante el tratamiento; dos puertos para los brazos de la resistencia (2) y otros dos para los brazos del serpentín de refrigeración.

Para poder llevar a cabo la extracción de muestras a través del tubo, desde el vaso principal cuando la presión es muy baja (temperaturas inferiores a 100°C) o cuando el medio es demasiado viscoso, éste está presurizado mediante un manómetro (6) conectado a la fuente de presión (G). Para poder vencer la presión cuando los microorganismos son inyectados, se utiliza una jeringuilla Hamilton (H). El eje de agitación está accionado por un motor (I), conectado con el autómatas (B). La temperatura en el interior del vaso se regula mediante un PID (Proporcional Integral Derivativo) (J), conectado a la resistencia (2), a una válvula solenoide (8) que regula el flujo de agua a través del serpentín de refrigeración (1), y a la Pt100 (5). Cuando el PID detecta que la temperatura es inferior a la seleccionada el autómatas activa la resistencia (2); cuando la temperatura supera la programada, el autómatas actúa sobre la válvula solenoide (8) para controlar el flujo de agua fría por el serpentín (1).



**Figura 3.1.** Diagrama de un termorresistómetro Mastia: (A) Agua de enfriamiento; (B) autómata programable; (C) pantalla táctil; (D) ordenador; (E) vaso principal; (F) tapa; (G) fuente de presión (N<sub>2</sub>); (H) jeringuilla Hamilton; (I) motor de agitación; (J) PID, (1) serpentín de refrigeración; (2) resistencia; (3) hélice; (4) tubo de extracción de muestra; (5) Pt100; (6) manómetro; (7) válvula solenoide; (8) válvula solenoide del sistema de enfriamiento.

El termorresistómetro puede ser programado para trabajar en modo isotérmico, en modo no isotérmico con incrementos o descensos regulares de la temperatura e incluso en modos más complejos, simulando tratamientos industriales y combinando fases de calentamiento, mantenimiento y enfriamiento.

#### **4.6.2. Determinaciones de termorresistencia de microorganismos en el termorresistómetro Mastia.**

Para llevar a cabo los tratamientos isotérmicos, una vez que el vaso lleno con el medio de calentamiento seleccionado se estabilizaba a la temperatura de tratamiento

seleccionada, se inoculaban 0,2 mL de la suspensión de microorganismos y se recogían las muestras en tubos estériles a los tiempos previamente seleccionados. Las muestras eran inmediatamente enfriadas, posteriormente se realizaban las diluciones apropiadas en agua de peptona tamponada (APT; Scharlau Chemie), a partir de las cuales se sembraban las placas de Petri y se les añadía el medio de cultivo determinado para cada microorganismo y se incubaban a las temperaturas y tiempos seleccionados.

Como medios de calentamiento para la determinación de los valores de termorresistencia de *B. sporothermodurans* se utilizaron tampón McIlvaine de distintos pH (3, 5 y 7) y crema de calabacín de pH 6,3 (Alvalle, Murcia, Spain). En el caso de *B. cereus*, *B. subtilis* 4071, *B. subtilis* AdHC1 y *B. licheniformis* el medio de calentamiento que se utilizó fue BHIB, al que se le adicionaban las distintas concentraciones de timol seleccionadas.

Para el estudio de la termorresistencia de *B. sporothermodurans* bajo condiciones no isotérmicas, el termorresistómetro se programó para las rampas de calentamiento a una temperatura inicial de 110°C y a dos velocidades distintas de calentamiento, 1 y 10°C por minuto. En el caso de los tratamientos de enfriamiento se programó una temperatura inicial de 126°C para las rampas de 1°C/min y de 130°C para las rampas de 10°C/min.

Para la realización de los tratamientos no isotérmicos, una vez estabilizada la temperatura inicial, se inoculaba 0,2 mL de la suspensión de esporos y se recogían las muestras en tubos estériles a intervalos predeterminados de tiempo. Las muestras se procesaban como se ha descrito anteriormente para los tratamientos isotérmicos.

#### **4.6.3. Recuperación de supervivientes.**

El recuento de microorganismos viables se realizó a partir de la siembra por duplicado, de las diluciones apropiadas de las muestras en APT, en agar triptona soja (TSA; Scharlau Chemie) + 0,6% YE para *L. monocytogenes* y *S. enterica* y en BHIA para *B. sporothermodurans* y en BHIA con la concentración predeterminada de timol para *Bacillus spp.* Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C para todos los microorganismos. Tiempos más largos de incubación no mostraron cambios significativos en los recuentos.



#### 4.6.4. Análisis de datos.

##### 4.6.4.1. Cálculo de los valores D y z en condiciones isotérmicas.

Todos los microorganismos investigados mostraron, a excepción de *B. sporothermodurans*, cinéticas logarítmicas de destrucción cuando fueron sometidos a condiciones isotérmicas de tratamiento. Para estos microorganismos, el cálculo de los tiempos de reducción decimal (valores  $D_T$ ), se realizó con el clásico modelo lineal (Bigelow, 1921), y se calcularon como la inversa negativa de la pendiente de la línea de regresión obtenida a partir de los valores de la curva de supervivencia.

Los valores  $z$  se calcularon como la inversa negativa de la pendiente de la línea de regresión resultante de representar los valores del logaritmo de  $D_T$  frente a las correspondientes temperaturas de tratamiento (curvas de termodestrucción o TDT). La dependencia de los valores  $D_T$  con la temperatura puede ser descrita matemáticamente mediante la ecuación 1.9, reproducida aquí para facilitar la lectura de este capítulo.

$$D(T) = D_{T_{ref}} \times 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} \quad \text{Ec. 1.9}$$

donde  $D_T$  (min) es el valor D a la temperatura T (°C),  $D_{T_{ref}}$  (min) el valor D a la temperatura  $T_{ref}$  (°C) y  $z$  (°C) representa el valor  $z$  del microorganismo.

El efecto de las diferentes concentraciones de timol en el medio de recuperación en los valores  $D$  se modelizó utilizando un modelo secundario basado en el modelo de Mafart y Leguerinel (1998) (ecuación 3.2)

$$\log D = \log D^* - \frac{[timol]}{z_{timol}} \quad \text{Ec. 3.2}$$

donde  $z_{timol}$  es el incremento en la concentración de timol en el medio de recuperación que conlleva a una reducción decimal en el valor  $D$  y  $D^*$  es el valor  $D$ , a esa misma temperatura, sin timol en el medio de recuperación.

Los valores  $Z_{timol}$  se calcularon como la inversa negativa de la pendiente de la línea de regresión resultante de representar los valores del logaritmo de  $D$  frente a las correspondientes concentraciones de timol de cada tratamiento.

Estos métodos tradicionales, para determinar la muerte microbiana, se basan en que esta inactivación sigue una cinética de primer orden y que la resistencia al calor de toda la población microbiana es homogénea. Sin embargo, en las curvas de supervivencia de *B. sporothermodurans* se encontraron desviaciones de esta linealidad, ya que se observaba la presencia de hombros. Otros investigadores (van Zuijlen *et al.*, 2010) habían aplicado, con éxito, los modelos de Weibull y Geeraerd como modelos no lineales, alternativos a los métodos tradicionales basados en una cinética de primer orden. En esta investigación también se aplicaron estos mismos modelos no lineales para ajustar las gráficas de supervivencia de este microorganismo, en lugar de la cinética logarítmica.

#### 4.6.4.2. Modelo de Weibull.

Para aplicar el modelo de Weibull, se empleó la ecuación propuesta por Mafart *et al.* (2002) de la función de supervivencia de la distribución de frecuencias de Weibull (ecuación 1.7), reproducida aquí para facilitar la lectura de este capítulo:

$$\text{Log}N = \text{Log}N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad \text{Ec. 1.7}$$

donde,  $N$  es el número de microorganismos tras  $t$  minutos de tratamiento y  $N_0$  es el número de microorganismos a tiempo 0,  $p$  es el parámetro de forma y  $\delta$  es el parámetro de forma, que representa el tiempo necesario para reducir la población microbiana en un ciclo logarítmico y cuya dependencia con la temperatura, al igual que los valores  $D$  convencionales puede ser descrita con el modelo clásico de Bigelow, tal y como se expresó en la ecuación 1.10 (Mafart *et al.*, 2002):

$$\delta_T = \delta_{ref} 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} \quad \text{Ec. 1.10}$$

Para el ajuste de todas las curvas de supervivencia de *B. sporothermodurans* en un mismo medio de calentamiento se utilizó un mismo valor del parámetro  $p$ , siguiendo el modelo descrito por Couvert *et al.* (2005).

#### 4.6.4.3. Modelo de Geeraerd.

Para modelizar las curvas de supervivencia de *B. sporothermodurans* también se empleó el modelo dinámico propuesto por Geeraerd *et al.* (2005) basado en la cinética logarítmica, descrita en la ecuación 1.4. Dado que no se observaron colas en las curvas de supervivencia, se empleó el modelo log linear + hombro propuesto por estos autores para estos casos (ecuación. 3.3):

$$\frac{dN}{dt} = -K_{max} \times N \times \left( \frac{1}{1+C_c} \right) \quad \text{Ec. 3.3}$$

$$\frac{dC_c}{dt} = -K_{max} \times C_c \quad \text{Ec. 1.15}$$

Para modelizar las curvas de supervivencia, se empleó la ecuación 3.4, la cual se obtiene a partir de las ecuaciones 3.3 y 1.15 (reproducida aquí para facilitar la lectura), cuando se aplica dicho modelo a los datos experimentales.

$$\log N = \log N_0 - \left( \frac{k_{T_{ref}} t_{T_{ref}}}{\ln 10} \right) + \log \frac{e^{k_{T_{ref}} SI_{T_{ref}}}}{1 + \left( e^{k_{T_{ref}} SI_{T_{ref}}} - 1 \right) \left( e^{-k_{T_{ref}} t_{T_{ref}}} \right)} \quad \text{Ec. 3.4}$$

donde  $N$  representa el número de microorganismos (ufc/mL),  $N_0$  el número inicial de microorganismos),  $k_{ref}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) es la tasa de inactivación específica a la temperatura de referencia  $T_{ref}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) y  $SI$  la longitud del hombro.

Los parámetros del modelo fueron estimados con el programa GInaFIT (Geeraerd *et al.*, 2000), creado por los mismos autores.

#### 4.6.4.4. Predicción del número de supervivientes en condiciones no isotérmicas.

En las pruebas realizadas bajo condiciones no isotérmicas, los resultados experimentales obtenidos se compararon con los resultados predichos a partir de los valores obtenidos en condiciones isotérmicas de los modelos no lineales de Weibull ( $\delta$ ,  $p$  y  $z$ ) y el modelo dinámico de Geeraerd ( $D_T$ ,  $Sl$  y  $z$ ). Se analizó la bondad del ajuste de los modelos de Weibull y Geeraerd y la capacidad de los mismos para predecir el número de microorganismos supervivientes a los tratamientos de calentamiento y enfriamiento.

El modelo de Weibull, para predecir el número de supervivientes en condiciones no isotérmicas, se basa en la dependencia de  $\delta$  con respecto a la temperatura (Ec. 1.10), ya que para cada intervalo, el valor de  $\delta$  depende también de la temperatura.

Cuando se empleó el modelo de Geeraerd para describir la inactivación en condiciones isotérmicas, la dependencia de  $k_{max}$  con respecto a la temperatura se describió según el modelo de Bigelow (ecuación 1.11)

$$K_{max}(T) = \frac{\ln 10}{AsymD(T)} = \frac{\ln 10}{AsymD_{T_{ref}}} \times \exp\left(\frac{\ln 10}{z} \times (T - T_{ref})\right) \quad \text{Ec.1.11}$$

#### 4.6.5. Análisis estadístico.

Los cálculos estadísticos y las regresiones lineales de los valores  $D$  y  $z$ , así como sus correspondientes pendientes, los coeficientes de correlación ( $r_0$ ) y los intervalos de confianza para el 95%, se calcularon usando el programa Microsoft® Excel 2007 para Windows®.

Las regresiones no lineales del modelo de Weibull fueron estimados con la herramienta Solver de Excel (Microsoft® Excel 2000 para Windows®). Las regresiones no lineales del modelo de Geeraerd, se realizaron usando la herramienta GInaFIT (Geeraerd *et al.*, 2005) para Excel. Los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) y valores del error cuadrático medio (RMSE) de dichas regresiones también se calcularon con Excel.

### 4.7. Citometría de flujo.

#### 4.7.1. El citómetro de flujo.

Se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA, USA) equipado con un láser de argón-ión de 488 nm y 15 mW enfriado por aire. Como fluido envolvente para todos los estudios se utilizó Facsflow™ (BD Biosciences). En la preparación de las muestras, también se utilizó tampón fosfato salino (PBS; Panreac, Barcelona, España) filtrado con un filtro Millipore Millex-GN (Millipore Corporation, Bedford, USA). Para el perfecto funcionamiento del aparato, se realizaba una limpieza diaria y una semanal según las instrucciones del fabricante y una calibración mensual con Beads fluorescentes (Calibrite™ three color calibration beads, BD Biosciences).

#### **4.7.2. Fluorocromos.**

Se utilizó un *Baclight* kit (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands), que contiene SYTO9 y yoduro de propidio (PI) como colorantes vitales para evaluar la viabilidad de las células tratadas. Ambos son compuestos que se unen al ADN. El SYTO9, necesita que la célula tenga una actividad metabólica normal para poder atravesar su membrana e unirse a las moléculas de ADN en formación. Sin embargo, el PI, necesita que la membrana celular no esté intacta y así poder penetrar en la célula y poder desplazar el SYTO9 y unirse al ADN (Ananta *et al.*, 2004).

Las células vivas teñidas con SYTO9 emiten fluorescencia verde, mientras que las células dañadas teñidas con PI emiten fluorescencia roja. La fluorescencia verde emitida por el SYTO9 es recogida en el canal FL1 y la fluorescencia roja emitida por el PI es recogida a su vez en el canal FL3.

#### **4.7.3. Preparación de las muestras.**

El microorganismos utilizado para las pruebas realizadas en el citómetro de flujo fue *Listeria monocytogenes* Scott A NCTC 11994. En estos experimentos se utilizaron dos tipos distintos de cultivos, un cultivo con la población en fase de crecimiento exponencial y otro con la población en fase de crecimiento estacionario, para poder comprobar si el estado fisiológico de las células influía en los resultados de los tratamientos aplicados.

Para la preparación de células en fase estacionaria se tomaba un asa de un tubo de glicerol congelado y se introducía en un tubo de 5 mL de TSBYE que se incubaba de 6 a 8 horas a 37°C. De este cultivo se tomaban 50 µL que se inoculaban en 50 mL de TSBYE en un matraz Erlenmeyer y se incubaba a 37°C (a 200 rpm) durante 18 h. Tras este periodo de incubación, los microorganismos se encontraban en fase estacionaria con una concentración aproximada de  $10^9$  ufc/mL. Para la preparación de células en fase exponencial se tomaban 100 µL del cultivo en fase estacionaria y se inoculaban en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de TSBYE y se incubaban a 37°C (a 200 rpm) durante 3 h. Tras este periodo de incubación, los microorganismos se encontraban en fase exponencial con una concentración aproximada de  $10^6$  ufc/mL. Los 50 mL del cultivo, exponencial o estacionario, eran introducidos en un tubo Falcon y centrifugado a 3500 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminaba el sobrenadante y el depósito era resuspendido en 50 mL de tampón salino fosfato (PBS; Panreac, Barcelona, España). Para células en fase estacionaria, se volvía a centrifugar y el depósito era resuspendido en 2 mL de PBS. Se tomaban 250 µL de esta suspensión y se añadían a 50 mL de PBS, obteniendo una suspensión con una D.O.<sub>680nm</sub> de 0,2, que se corresponde con una concentración final aproximada de  $10^6$  ufc/mL, que se mantenía en hielo hasta su uso. Para la preparación de células en fase exponencial las dos veces se resuspendía en 50 mL de PBS con una D.O.<sub>680nm</sub> de 0,2, que se corresponde con una concentración final de  $10^6$  ufc/mL. Los cultivos de trabajo se dividían en dos alícuotas. Una de ellas se utilizaba para el control no tratado térmicamente y a la otra se le aplicaba el tratamiento térmico. Así, finalmente ambos cultivos presentaban unas  $10^5 - 10^6$  células/mL. Para tener un control de células muertas se le aplicó un tratamiento térmico de 80°C durante 5 minutos.

Posteriormente, tanto las células control (vivas y muertas) como las tratadas térmicamente eran alicuotadas en tubos de 5 mL e incubadas con las distintas concentraciones de nisina y/o carvacrol a 37°C durante 15 minutos. De estos tubos se tomaban muestras de 1 mL que se incubaban con los fluorocromos en las proporciones indicadas por el fabricante e incubadas durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, los cultivos de las distintas condiciones eran centrifugados a 3000 rpm y resuspendidos en la misma cantidad de PBS.

#### **4.7.4. Adquisición de muestras.**

Para la adquisición de datos, se utilizó el software CellQuest Pro (BD Biosciences). Los análisis se llevaron a cabo utilizando los siguientes parámetros de detección: por su pequeño tamaño se fijaron los parámetros de forma, forward scatter (FSC) en E00; y de tamaño, side scatter (SSC), en 400; para los fluorocromos utilizados se fijó el valor de FL1 en 400 y el de FL3 en 500, utilizando ganancias logarítmicas. Las muestras se preparaban en una concentración de  $10^5 - 10^6$  células/mL que, pasándola con un flujo bajo, se recogían de 200-700 eventos por segundo y un total de 10.000 eventos en cada adquisición.

#### **4.7.5. Recuento en placa.**

Se hicieron diluciones seriadas de todas las condiciones ensayadas y fueron sembradas en agar TSA. Para el estudio del daño subletal se sembraron en agar TSA con un 5% de NaCl (TSA+5%NaCl; Panreac). Estas placas fueron incubadas a 37°C durante 48 horas. Se comprobó que tiempos más largos de incubación no aumentaban los recuentos.

#### **4.7.6. Análisis de datos.**

Los resultados obtenidos fueron analizados con el software BD CellQuest Pro. La fluorescencia recogida en los canales FL1 y FL3 fue analizada utilizando diagramas de densidad de FL1 frente a SSC y de FL3 frente a SSC. Para cuantificar la población bacteriana viva, o muerta, en cada uno de los tratamientos se construyeron diagramas de FL1 frente a FL3 y se contaba el número de eventos que aparecía en cada cuadrante (Paparella *et al.*, 2008).





## **5. RESULTADOS**



## **5.1. CAPITULO I: “Efecto de las características del medio y de la velocidad de calentamiento y enfriamiento en la resistencia al calor en condiciones no isotérmicas de esporos de *Bacillus sporothermodurans* IC4.”**

Este capítulo se corresponde con el siguiente artículo, publicado en la revista Food Microbiology:

Esteban, M.-D., Huertas, J.P., Fernández, P.S. y Palop, A. Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores. Food Microbiology, 34: 158-163 (2013)



En los últimos años se ha observado la aparición de una serie de microorganismos esporulados capaces de sobrevivir a los procesos tradicionales de esterilización utilizados en la industria agroalimentaria y crecer posteriormente en las condiciones habituales de almacenamiento. *Bacillus sporothermodurans* es uno de estos microorganismos causantes de elevadas pérdidas económicas, debido a la alteración de determinados lotes de productos tratados térmicamente. Las esporas de este microorganismo son capaces de resistir el tratamiento térmico, y posteriormente multiplicarse durante la vida útil del producto, a temperatura ambiente.

En esta parte de la investigación se planteó el estudio del efecto que las características del medio de calentamiento, tales como el pH o la composición del mismo, pudieran tener en la resistencia al calor de este microorganismo. Estos factores se conocen para muchos microorganismos esporulados, pero no para *B. sporothermodurans*. También se abordó el estudio del efecto de las velocidades de calentamiento y enfriamiento sobre la resistencia al calor, aspecto este que apenas ha sido explorado, pero que podría tener un efecto notable en la resistencia microbiana al calor. El control de estos parámetros permitiría, eventualmente, reducir la intensidad de los tratamientos térmicos aplicados, manteniendo los mismos niveles de seguridad y estabilidad alimentaria.

Son muchos los autores que han observado que muchas de las curvas de supervivencia de los microorganismos esporulados no siguen una tendencia lineal, sino que presentan fenómenos de hombro y cola. Debido a estas desviaciones de la linealidad, varios autores han desarrollado modelos no lineales que pretenden predecir las cinéticas de destrucción de estos microorganismos. Para el análisis de los resultados obtenidos en este capítulo se eligieron los modelos no lineales de Weibull y Geeraerd, ya que las gráficas de supervivencia presentaban habitualmente fenómenos de hombro. Ambos modelos ajustaron adecuadamente las gráficas de supervivencia.

Se observó que, al igual que ocurre para muchos otros microorganismos esporulados, las características del medio de tratamiento afectaban a su termorresistencia, disminuyendo ésta al acidificar. Por otro lado, velocidades de calentamiento de hasta 10°C/min no tuvieron efecto sobre su resistencia al calor, permitiendo predecir, también de modo satisfactorio, los supervivientes cuando *B. sporothermodurans* era sometido a tratamientos no isotérmicos de calentamiento en distintos medios. Sin embargo, a

velocidades de enfriamiento de 1°C/min el número de supervivientes fue superior al predicho.



## Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores

María-Dolores Esteban<sup>a</sup>, Juan-Pablo Huertas<sup>a</sup>, Pablo S. Fernández<sup>a,b</sup>, Alfredo Palop<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Murcia, Spain

<sup>b</sup>Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 July 2012

Received in revised form

27 November 2012

Accepted 28 November 2012

Available online 17 December 2012

#### Keywords:

Heat resistance

Inactivation kinetics

*Bacillus sporothermodurans*

Predictive models

Spores

### ABSTRACT

In recent years, highly thermo resistant mesophilic spore forming bacteria belonging to the species *Bacillus sporothermodurans* have caused non sterility problems in industrial sterilization processes. The aim of this research was to evaluate the effect of the heating medium characteristics (pH and buffer/food) on the thermal inactivation of *B. sporothermodurans* spores when exposed to isothermal and non isothermal heating and cooling treatments and the suitability of non linear Weibull and Geeraerd models to predict the survivors of these thermal treatments. Thermal treatments were carried out in pH 3, 5 and 7 McIlvaine buffer and in a courgette soup. Isothermal survival curves showed shoulders that were accurately characterized by means of both models. A clear effect of the pH of the heating medium was observed, decreasing the  $D_{120}$  value from pH 7 to pH 3 buffer down to one third. Differences in heat resistance were similar, regardless of the model used and were kept at all temperatures tested. The heat resistance in courgette soup was similar to that shown in pH 7 buffer. When the heat resistance values obtained under isothermal conditions were used to predict the survival in the non isothermal experiments, the predictions estimated the experimental data quite accurately, both with Weibull and Geeraerd models.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The traditional method for determining the kinetics of the death rate of microorganisms is based on the assumption that inactivation follows first order kinetics and that microbial populations are homogeneous from the point of view of their heat resistance. Hence,  $D_T$  values are calculated from the survival curve by linear regression of  $\log N$  versus time (Stumbo, 1973). However, many authors have found deviations from linearity of survival curves, such as shoulders or tails. Some researchers (Fernandez et al., 1999; Peleg and Cole, 1998) explain this behaviour assuming that at a given temperature, the time of exposure to heat, which causes the death of a microbial cell or a bacterial spore, is variable from one individual to the other, and that the dispersion of individual heat resistance is governed by a frequency distribution. This fact has

led to propose alternative models that provide with a satisfactory goodness of fit for non linear survival curves showing shoulders or tails (Geeraerd et al., 2000; Mafart et al., 2002) or even sigmoidal survival curves showing both shoulder and tail (Geeraerd et al., 2000; Coroller et al., 2006).

*Bacillus sporothermodurans* is a heat resistant mesophilic spore forming bacterium causing non sterility problems in canned foods (Huemer et al., 1998; Oomes et al., 2007). Van Zuijlen et al. (2010) observed the presence of shoulders in the survival curves of isothermal treatments of this microorganism and analysed the data obtained using Weibull and Geeraerd models. Both models characterized the heat inactivation of the spores of *B. sporothermodurans* better than the conventional log linear model. Although these authors found *B. sporothermodurans* a suitable microorganism to evaluate and optimize commercially applied sterilization processes for low acid foods, they also pointed out the influence of the heating medium characteristics on its heat resistance.

Heat resistance of microorganisms is mostly influenced by time and temperature of treatment, but environmental factors such as pH,  $a_w$ , composition of medium, etc., may drastically influence its heat resistance, even during the heat treatment (Eto and Michiels, 1998).

\* Corresponding author. Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Murcia, Spain. Tel.: +34 968 32 5762; fax: +34 968 32 5433.

E-mail address: [alfredo.palop@upct.es](mailto:alfredo.palop@upct.es) (A. Palop).

The effect of these factors on the heat resistance of spore forming bacteria has been extensively studied (Condón and Sala, 1992; López et al., 1996; Palop et al., 1999), however their effect on the thermal resistance of *B. sporothermodurans* spores is not so well known.

The effect of the heating and cooling rate has been scarcely studied. Still, some authors have used nonisothermal methods as an alternative to the study of microbial inactivation kinetics (Conesa et al., 2003; Fernández et al., 1999; Hassani et al., 2007; Peleg and Normand, 2004; Periago et al., 1998) and although differences between the heat resistance values obtained from isothermal and nonisothermal heating experiments have been found (De Cordt et al., 1992; Periago et al., 1998), the extraction of kinetic parameters from nonisothermal data has been successfully performed by several groups (Chen et al., 2007; Peleg and Normand, 2004; Valdramidis et al., 2008), who have obtained equivalent parameters using isothermal and non isothermal data, unless adaptation of the microorganism due to the use of low heating rates (Valdramidis et al., 2006).

The aim of this research was to evaluate the effect of the heating medium characteristics (pH and buffer/food) on the thermal inactivation of *B. sporothermodurans* spores when exposed to isothermal and nonisothermal heating and cooling treatments and the suitability of Weibull and Geeraerd models to predict the survivors to these thermal treatments.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacteria strain and sample preparation

The strain used in this study was *B. sporothermodurans* IC4 (kindly supplied by Unilever Netherlands Sourcing Unit Oss). Spores were prepared on Petri dishes of plate count agar (PCA) from (Scharlau, Barcelona, Spain) incubated at 30 °C for 24 h. Four pure colonies were taken from this agar plate and suspended in physiological salt solution. Then the agar plates containing Campden Sporulation Agar (CSA; Brown et al., 1984) were inoculated with 0.2 mL of this mixture. After 7 days of incubation at 37 °C more than 90% of sporulation rate was achieved, as determined by a phase contrast microscopy (Leica, Wetzlar, Germany).

Spores were collected by flooding the agar plates with 5 mL of distilled water, scratching the surface with a spatula. After harvesting, spores were washed four times by centrifugation at 3040×g for 15 min at 2–4 °C and resuspended in sterile distilled water. The concentration of spores in the final suspension was adjusted at 10<sup>9</sup> spores/mL with sterile distilled water. The spore suspensions were stored at 4 °C until used.

### 2.2. Determination of heat resistance

All heat treatments were carried out in a thermoresistometer Mastia (Conesa et al., 2009), which allows the performance of heating ramps at different rates. The temperatures of isothermal treatments were: 115, 120, 125 and 130 °C. For nonisothermal treatments, the thermoresistometer was programmed to perform linear temperature profiles, starting from an initial temperature of 110 °C at established rates of 1 °C/min and 10 °C/min.

Once the initial heat treatment temperature had attained stability the menstroom (400 mL of Mclvaine buffer of pH 3, 5 and 7 or a commercial courgette soup, pH 6.3) was inoculated with 0.2 mL of the spore suspension. At preset intervals, 1 mL samples for each treatment time were collected. Viable counts were based on duplicate counts of appropriate dilutions plated in Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (Scharlau, Barcelona, Spain) and incubated at 37 °C for 24 h. Preliminary experiments showed that longer incubation times did not modify plate counts.

All resistance determinations were performed at least twice in independent experiments at different days.

### 2.3. Data analysis

Survival curves showed shoulder phenomena. Hence, Weibull and Geeraerd non linear models were used to describe such survival curves.

#### 2.3.1. Weibull model

The cumulative form of the Weibull distribution function, as proposed by Mafart et al. (2002) was used (Eq. (1)):

$$\log_{10}S = \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (1)$$

where  $S(t)$  is the survival ratio, i.e.  $N_t/N_0$ ,  $\delta$  represents the time for the first decimal reduction (min), which is a function of temperature (see Eq. (3)), and  $p$  is the shape parameter.

In our study, we used a rate model derived from Eq. (1), representing the momentary time dependent isothermal logarithmic inactivation rate, which can be written as an ordinary differential equation as given by Eq. (2) (van Zuijlen et al., 2010):

$$\frac{dN}{dt} = p \cdot \left(\frac{1}{\delta}\right)^p \cdot t^{p-1} \quad (2)$$

with the initial condition:  $N(0) = N_0$ .

A single  $p$  value for all survival curves obtained in the same heating media was used as proposed by Couvert et al. (2005). For the global optimisation, Eq. (3) was incorporated into Eq. (1) and the parameter  $p$  was fitted in common, whereas the initial states were fitted for each curve.

The prediction of survivors under nonisothermal experiments was based on the dependence of  $\delta$  with respect to temperature, which can be described with the classic Bigelow model as given by Eq. (3) (Mafart et al., 2002):

$$\delta(T) = \delta_{T_{ref}} \times 10^{-\frac{T - T_{ref}}{z}} \quad (3)$$

where  $\delta_{T_{ref}}$  is the  $\delta(T)$  value at the reference temperature ( $T_{ref}$ ), and  $z$  is the number of degrees Celsius change of temperature required to achieve a tenfold change in  $\delta$  value.

#### 2.3.2. Geeraerd model

The dynamic model of Geeraerd et al. (2000) was used. The parameters of this model were estimated with the GlnaFIT

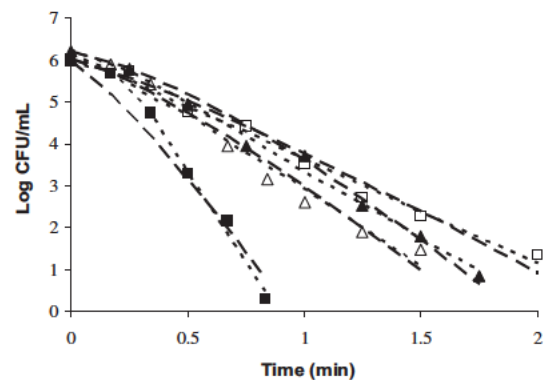


Fig. 1. Survival curves of *Bacillus sporothermodurans* IC4 at 125 °C in pH7 Mclvaine buffer (□) pH5 Mclvaine buffer (Δ) pH3 Mclvaine buffer (■) and in courgette soup (▲). Weibull model (dashed lines); Geeraerd model (dotted lines).



**Table 1**  
Heat resistance values of *Bacillus sporothermodurans* IC 4 spores obtained under isothermal heating conditions in different heating media, as derived from the Weibull and Geeraerd models.

	Temperature (°C)	Weibull model				Geeraerd model			
		$\delta$ (min)	$p$	RMSE	$r^2$	$D$ (min)	SL (min)	RMSE	$r^2$
Mcllvaine pH7	115.0	14.68	1.18	0.29	0.93	7.78	9.94	0.21	0.96
	115.0	12.88	1.18	0.38	0.98	10.11	1.72	0.38	0.97
	120.0	2.63	1.18	0.28	0.98	2.25	0.17	0.20	0.98
	120.0	2.71	1.18	0.29	0.97	1.80	1.70	0.26	0.97
	125.0	0.50	1.18	0.35	0.98	0.35	0.11	0.17	0.99
	125.0	0.44	1.18	0.23	0.99	0.33	0.12	0.22	0.99
	130.0	0.10	1.18	0.25	0.99	0.06	0.05	0.20	0.99
Mcllvaine pH5	130.0	0.11	1.18	0.37	0.98	0.06	0.11	0.21	0.99
	115.0	8.72	1.25	0.34	0.98	5.76	2.63	0.16	0.99
	115.0	8.72	1.25	0.51	0.96	4.74	7.38	0.40	0.97
	115.0	9.60	1.25	0.50	0.97	7.10	0.00	0.27	0.99
	120.0	2.01	1.25	0.32	0.99	1.18	1.30	0.19	0.99
	125.0	0.44	1.25	0.22	0.99	0.31	0.09	0.12	>0.99
	125.0	0.35	1.25	0.45	0.97	0.17	0.32	0.18	0.99
Mcllvaine pH3	130.0	0.09	1.25	0.70	0.92	0.03	0.13	0.25	0.99
	130.0	0.06	1.25	0.29	0.97	0.04	0.02	0.45	0.97
	115.0	3.30	1.19	0.27	0.99	2.91	0.00	0.22	0.99
	115.0	3.43	1.19	0.07	>0.99	3.49	0.00	0.55	0.98
	120.0	0.93	1.19	0.38	0.99	0.77	0.00	0.14	>0.99
	120.0	1.05	1.19	0.35	0.98	0.81	0.09	0.34	0.99
	125.0	0.25	1.19	0.30	0.99	0.16	0.14	0.24	0.99
Courgette soup	125.0	0.21	1.19	0.53	0.98	0.11	0.21	0.20	>0.99
	130.0	0.02	1.19	0.29	0.98	0.01	0.02	0.20	0.99
	130.0	0.04	1.19	0.20	0.98	0.02	0.02	0.03	>0.99
	130.0	0.03	1.19	0.31	0.96	0.02	0.01	0.31	0.96
	115.0	14.27	1.35	0.31	0.98	8.01	6.89	0.19	0.98
	115.0	13.21	1.35	0.40	0.99	6.75	8.49	0.17	0.99
	115.0	13.90	1.35	0.14	>0.99	8.00	7.35	0.09	>0.99
Courgette soup	120.0	2.76	1.35	0.25	0.98	1.73	0.95	0.20	0.99
	120.0	2.97	1.35	0.18	0.97	1.54	1.90	0.15	0.98
	120.0	2.85	1.35	0.28	0.97	1.57	1.67	0.20	0.98
	125.0	0.54	1.35	0.13	>0.99	0.32	0.25	0.07	>0.99
	125.0	0.49	1.35	0.31	0.99	0.31	0.13	0.19	0.99

application (Geeraerd et al., 2005). Since no tails were observed in the survival curves, the log linear + shoulder model of Geeraerd was used (Eqs. (4) and (5)).

$$\frac{dN}{dt} = k_{\max} \times \left( \frac{1}{1 + C_c} \right) \times N \quad (4)$$

$$\frac{dC_c}{dt} = k_{\max} \times C_c \quad (5)$$

Where  $N$  represents the microbial cell density (cfu/mL),  $C_c$  is related to the physiological state of the cells (units/cell) and  $k_{\max}$  denotes the specific inactivation rate (1/min).

For the prediction of survivors under nonisothermal experiments, the dependence of  $k_{\max}$  with respect to temperature was described with the Bigelow model (Eq. (6))

$$k_{\max}(T) = \frac{\ln 10}{AsymD(T)} \frac{\ln 10}{AsymD_{ref}} \times \exp\left(\frac{\ln 10}{z} \times (T - T_{ref})\right) \quad (6)$$

where  $AsymD(T)$  and  $AsymD_{ref}$  are the asymptotic decimal reduction times at the temperatures  $T$  and at the reference temperature ( $T_{ref}$ ) respectively.

### 2.3.3. Statistical analysis

The linear regressions of  $z$  values, the coefficients of determination ( $r^2$ ) and the root mean square error (RMSE) of these linear regressions were calculated using Windows Microsoft® Excel 2007.

The non linear regressions of the Weibull model were adjusted using the Solver tool for Excel. The non linear regressions of Geeraerd model were calculated using the GlnaFIT add inn (Geeraerd et al., 2005) for Excel 2007.

## 3. Results

### 3.1. Heat resistance of *B. sporothermodurans* under isothermal conditions

The presence of shoulders was very frequent in the survival curves of *B. sporothermodurans*. Fig. 1 shows, as an example, the survival curves obtained under isothermal conditions at 125 °C in different heating media.

Table 1 shows the heat resistance values, together with the RMSE and determination coefficients ( $r^2$ ), obtained in pH 3, 5 and 7 Mcllvaine buffer and in a courgette soup under isothermal conditions for *B. sporothermodurans* as derived from the Weibull and Geeraerd models.

A clear effect of the pH of the heating medium on heat resistance was shown, just observing the parameters of the models directly (Table 1). For example, the  $D_{120}$  value decreased down to one third from pH 7 to pH 3 Mcllvaine buffer, and a similar decrease was observed in the  $\delta_{120}$  value, from pH 7 to 3 (Table 1). Differences in

**Table 2**

$z$ -values of *Bacillus sporothermodurans* IC 4 spores obtained in different heating media as derived from the Weibull and Geeraerd models.

Heating media	Weibull model				Geeraerd model		
	$z$ (°C)	$p$	RMSE	$r^2$	$z$ (°C)	RMSE	$r^2$
Mcllvaine pH7	7.01	1.18	0.04	>0.99	6.96	0.07	>0.99
Mcllvaine pH5	7.21	1.25	0.08	>0.99	6.84	0.12	0.99
Mcllvaine pH3	7.24	1.19	0.14	0.98	6.64	0.12	0.99
Courgette soup	7.03	1.35	0.03	>0.99	7.24	0.04	>0.99

heat resistance were similar, regardless of the model used. The heat resistance in courgette soup was similar to that shown in pH 7 Mcllvaine buffer. Table 2 presents the  $z$  values in pH 3, 5 and 7 Mcllvaine buffer and in a courgette soup under isothermal conditions for *B. sporothermodurans*, as derived from the Weibull and Geeraerd's models. No differences were found in  $z$  values obtained in the different media, regardless of the model used, so the differences in heat resistance related to the heating medium were kept along all the temperature range studied.

### 3.2. Heat resistance of *B. sporothermodurans* under nonisothermal conditions

The heat resistance values obtained with Weibull and Geeraerd models under isothermal conditions were used to predict the survival in the non isothermal experiments at two different heating rates, 1 and 10 °C/min, in pH 3, 5, 7 Mcllvaine buffer and in courgette soup. Fig. 2 shows these survival curves together with the expected inactivation lines derived from the isothermal heat resistance

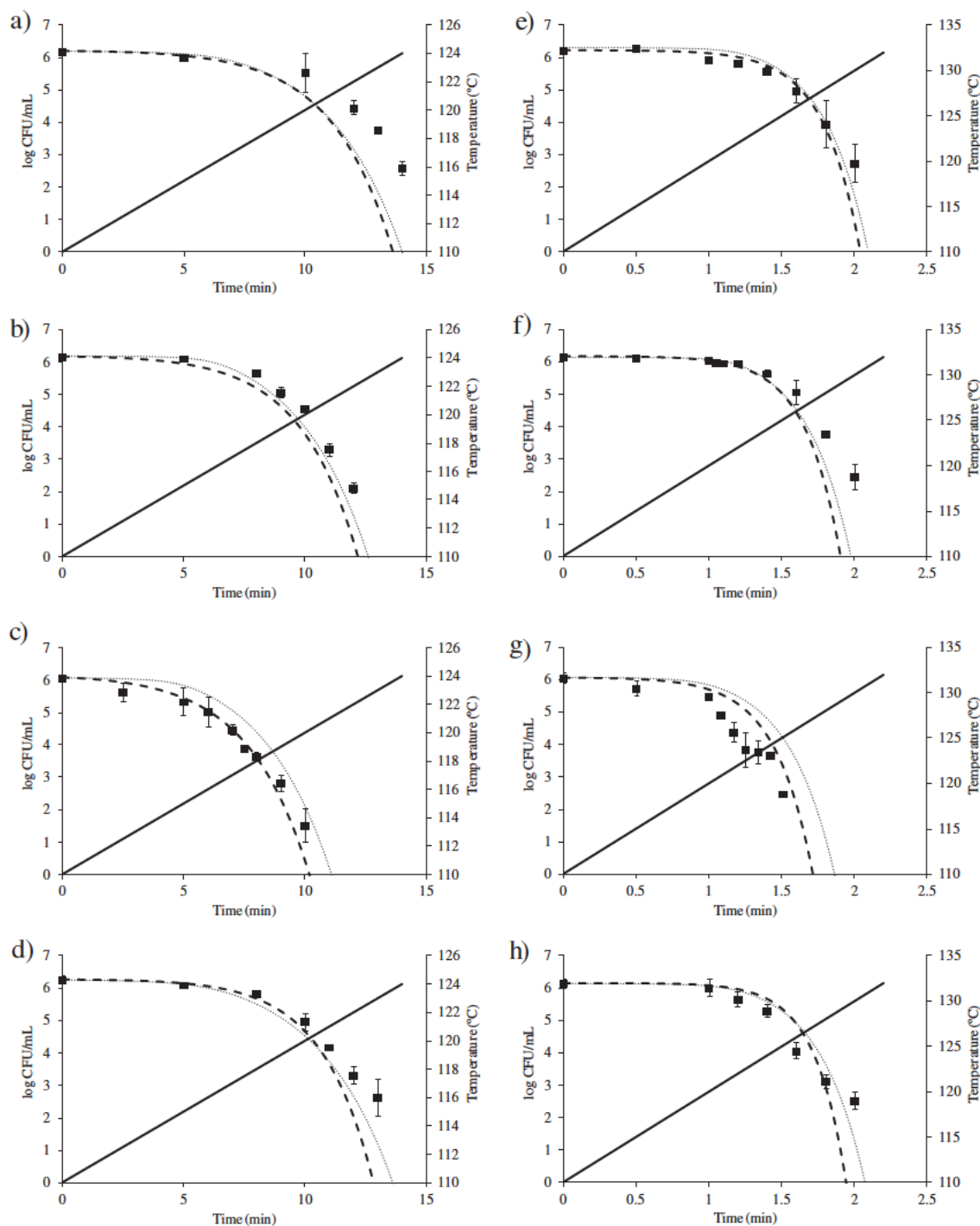


Fig. 2. Survival curves of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores obtained in different heating media and under different nonisothermal heating rates together with the expected inactivation lines for Weibull model (dashed lines) and Geeraerd model (dotted lines) and the corresponding temperature profiles (continuous lines) (a) pH7 Mcllvaine buffer at 1 °C/min (b) pH5 Mcllvaine buffer at 1 °C/min (c) pH3 Mcllvaine buffer at 1 °C/min (d) courgette soup at 1 °C/min (e) pH7 Mcllvaine buffer at 10 °C/min (f) pH5 Mcllvaine buffer at 10 °C/min (g) pH3 Mcllvaine buffer at 10 °C/min (h) Courgette soup at 1 °C/min.

**Table 3**

Root mean square error (RMSE) obtained in the nonisothermal experiments when predicting the survivors with Weibull and Geeraerd models.

	Heating/Cooling rate	Weibull model	Geeraerd model
Mcllvaine pH7	1 °C/min	1.89	1.71
	10 °C/min	0.70	0.44
Mcllvaine pH5	1 °C/min	0.96	0.60
	10 °C/min	1.20	1.13
Mcllvaine pH3	1 °C/min	0.60	0.49
	10 °C/min	0.90	0.99
Courgette soup	1 °C/min	1.70	0.78
	10 °C/min	1.46	0.81
Mcllvaine pH7	-1 °C/min	2.72	2.87
	-10 °C/min	0.76	0.68

data for Weibull and Geeraerd models and the corresponding temperature profiles. For the heating treatments, the initial temperature was 110 °C.

In most cases, the predictions estimated the experimental data quite accurately, both with Weibull and Geeraerd models. However, at pH 7 and 1 °C/min (Fig. 2a), microorganisms were more heat resistant than expected from the isothermal data.

Both models predicted similar lethality values, although Geeraerd model predicted higher survival in all cases, being closer to the experimental data in most cases.

Table 3 shows the goodness of fit of the predictions of the non isothermal treatments to the experimental values in terms of RMSE values. In most cases Geeraerd's model gave lower RMSE values, indicative of more accurate predictions.

Fig. 3 shows the survival curves of *B. sporothermodurans* obtained under nonisothermal cooling conditions at 1 °C/min (Fig. 3a) and at 10 °C/min (Fig. 3b) in pH 7 Mcllvaine buffer together with the expected inactivation derived from the isothermal heat resistance data for Weibull and Geeraerd models and the corresponding temperature profiles. For the cooling treatments, the initial temperatures were 126 °C for the experiments at 1 °C/min and 130 °C for the experiments at 10 °C/min. When exposed to cooling ramps, a rapid decline in the number of survivors was observed, followed by a long and persistent tail when the temperature was too low to inactivate microorganisms.

In these cases, the predictions only fitted the experimental data quite accurately, both with Weibull and Geeraerd models, when the cooling rate was of 10 °C/min (Fig. 3b). When the cooling rate was of 1 °C/min, the experimental values for survivors were well above the predictions with both models.

#### 4. Discussion

The effect of the heating medium on the heat resistance of spore forming bacteria is well known, at least under isothermal

heating conditions. López et al. (1996) showed the great influence of the heating medium pH on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus*, the  $D_{115}$  being increased in more than 20 times when the pH decreased from 7 to 4. No statistical differences were found in  $z$  values with increasing acidity. Similarly, Mafart and Leguerinel (1998) showed a clear interaction between temperature and pH on the heat resistance of spores in all the microorganisms tested except for *Clostridium botulinum*. Our results are in agreement with all these, in the sense that lower pHs lead to a decrease in heat resistance. However, the effect of pH has been scarce, at least compared to that found in other microorganisms, such as *Bacillus licheniformis* (Palop et al., 1996).

Regarding the composition of the heating medium, several authors (Condón and Sala, 1992; Stumbo, 1973) have found differences in the heat resistance of spore forming bacteria, which can be attributed only to the type of medium. The courgette soup had a pH of 6.3, so heat resistance values in between those shown at pH 5 and pH 7 Mcllvaine buffer could have been expected if the effect of the heating medium would have been only due to its pH. However, such heat resistance values were closer to those in pH 7 Mcllvaine buffer, meaning that other characteristics of the heating medium, apart from its pH, have an influence on the heat resistance of this microorganism. Probably, the important lipid component present in courgette soup could be responsible for a protective effect.

The presence of shoulders in the survival curves of *B. sporothermodurans* IC4 spores corroborates previous studies performed with this same strain (van Zuijlen et al., 2010) and confirms that is a common phenomenon in highly heat resistant bacteria spores (Jagannath et al., 2005; Le Jean et al., 1994; Palop et al., 1999; Rodriguez et al., 1992).

Traditionally, linear models have been used to fit the survival curves. But, due to the presence of these shoulders, Van Zuijlen et al. (2010) already found that the linear model was not a good choice for this purpose. Instead, these authors found that two non log linear models, Weibull and Geeraerd, fitted more accurately the survival data. In this research, isothermal data in different heating media were obtained and both models were compared with the purpose of knowing which of them fitted better the data. Also, non isothermal heating and cooling treatments were performed, and the models were used to predict the surviving microorganisms.

According to both the RMSE and  $r^2$  values, Geeraerd model fitted the isothermal survival curves better than the Weibull model (Table 1). A single  $p$  value was used to fit all survival curves performed in the same heating medium with the Weibull model. This procedure slightly worsens the goodness of fit (Couvert et al., 2005). Since Geeraerd model was applied individually to each survival curve, a better goodness of fit could be easily expected under isothermal conditions.

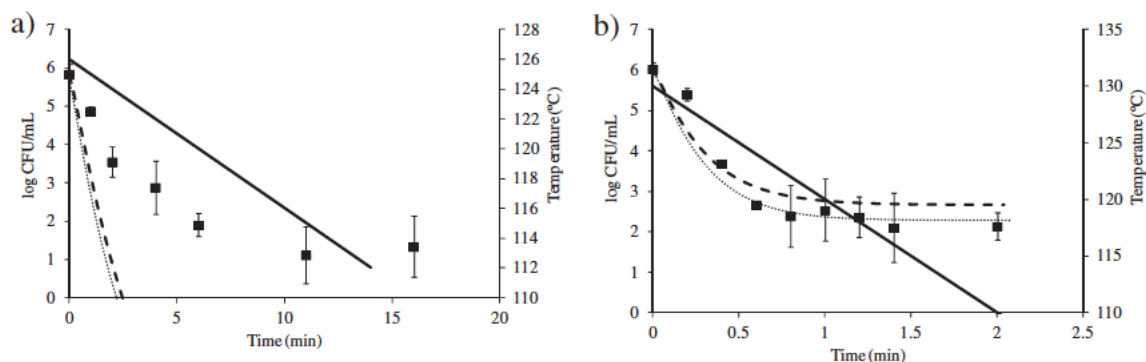


Fig. 3. Survival curves of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores obtained in pH7 Mcllvaine buffer under different nonisothermal cooling rates at (a) 1 °C/min (b) and 10 °C/min together with the expected inactivation lines for Weibull model (dashed lines) and Geeraerd model (dotted lines) and the corresponding temperature profiles (continuous lines).

When *B. sporothermodurans* spores were exposed to non isothermal treatments, a satisfactory goodness of fit was obtained with the predictions performed with both models for most of the heating media and heating/cooling rates. This satisfactory goodness of fit points out, once more, the suitability of this microorganism for thermal process validation (van Zuijlen et al., 2010). The main differences, between the predicted and experimental values, were found at pH 7 buffer and 1 °C/min heating and cooling rates (Figs. 2a and 3a respectively), where higher than expected survival data were found. Valdramidis et al. (2006) developed a dynamic model, based on the Geeraerd model, for *Escherichia coli* in which considered the adaptive response found between heating rate and survivals. Modifications of the Weibull model that account for adaptation have been also proposed (Corradini and Peleg, 2009; Stasiewicz et al., 2008).

Bacterial spores are in a dormant state and no metabolic response is expected along with heating, however slight increases in heat resistance have been found after sublethal heating (Heredia et al., 1997; Sedlak et al., 1993). In this sense, slow heating rates at a neutral pH could have led to the higher than expected survival found. Geeraerd model showed a better goodness of fit, giving slightly lower RMSE values when compared with the Weibull model (Table 3).

When *B. sporothermodurans* IC4 spores were exposed to a cooling treatment at a rate of 1 °C/min, a lower microbial inactivation than what could be expected from isothermal experiments was found (Fig. 3). A short inactivation stage previous to the tail was shown. Probably, the damage accumulated in the first minutes, in which the spores were exposed to higher temperatures, was not enough to cause the cellular death predicted afterwards. However, at a cooling rate of 10 °C/min, the expected inactivation took place (Fig. 3b). Perhaps the higher initial temperature used for this cooling rate experiments (130 °C, in front of 126 °C for the 1 °C/min cooling rate experiments) could explain this behaviour, since this temperature is more lethal. When exposing *E. coli* vegetative cells to cooling rate experiments, Conesa et al. (2009) found the expected inactivation at cooling rates of 2 °C/min but almost no lethal effects at 10 °C/min. Nevertheless, these authors used almost the same initial temperature (62 and 62.5 °C respectively) in both cooling rate experiments.

These results show the suitability of non linear models to predict the thermal resistance of spore forming bacteria exposed to nonisothermal treatments in different media. Modelling the heat resistance of spores by using non linear models has the advantage of taking into account not only several log reductions following first order kinetics but also, the initial shoulder. Hence, the use of simple and robust non linear models may have an interesting application for the optimization of heat processes in the food industry.

## Acknowledgements

This research was financially supported by the Ministry of Science and Technology of the Spanish Government and European Regional Development Fund (ERDF) through Project AGL 2010 19775. M.D. Esteban is grateful to the Ministry of Science and Technology for offering her the fellowship BES 2007 15471.

## References

Brown, K.L., Ayres, C.A., Gaze, J.E., Newman, M.E., 1984. Thermal destruction of bacterial spores immobilized in food/alginate particles. *Food Microbiology* 1, 187–198.

Chen, G., Campanella, O.H., Corvalan, C.M., 2007. A numerical algorithm for calculating microbial survival curves during thermal processing. *Food Research International* 40, 203–208.

Condón, S., Sala, F.J., 1992. Heat resistance of *Bacillus subtilis* in buffer and foods of different pH. *Journal of Food Protection* 55, 605–608.

Conesa, R., Periago, P.M., Esnoz, A., López, A., Palop, A., 2003. Prediction of *Bacillus subtilis* spore survival after a combined nonisothermal-isothermal heat treatment. *European Food Research and Technology* 217, 319–324.

Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A., Palop, A., 2009. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *Journal of Applied Microbiology* 107, 506–513.

Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., Mafart, P., 2006. General model, based on two Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6493–6502.

Corradini, M.G., Peleg, M., 2009. Dynamic model of heat inactivation kinetics for bacterial adaptation. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2590–2597.

Couvert, O., Gaillarda, S., Savy, N., Mafart, P., Leguerinel, I., 2005. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *International Journal of Food Microbiology* 101, 73–81.

De Cordt, S., Vanhoof, K., Hu, J., Maesmans, G., Hendrickx, M., Tobback, P., 1992. Thermostability of soluble and immobilized  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 396–402.

Etoa, F.-X., Michiels, L., 1988. Heat-induced resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Letters in Applied Microbiology* 6, 43–45.

Fernández, A., Ocio, M.J., Fernández, P.S., Rodrigo, M., Martínez, A., 1999. Application of nonlinear regression analysis to the estimation of kinetic parameters for two enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology* 16, 607–613.

Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Van Impe, J.F., 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 59, 185–209.

Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F., 2005. GlnaFIT, a freeware tool to assess non-long-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* 102, 95–105.

Hassani, M., Condón, S., Pagán, R., 2007. Predicting microbial heat inactivation under nonisothermal treatments. *Journal of Food Protection* 70, 1457–1467.

Heredia, N.L., García, G.A., Luévanos, R., Labbé, R.C., García-Alvarado, J.S., 1997. Elevation of the heat resistance of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* Type A by sublethal heat shock. *Journal of Food Protection* 60, 998–1000.

Huemer, I.A., Klijn, N., Vogelsang, H.V.J., Langeveld, L.P.M., 1998. Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *International Dairy Journal* 8, 851–855.

Jagannath, A., Tsuchido, T., Membre, J.M., 2005. Comparison of the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in foods using the modified Weibull and Bigelow. *Food Microbiology* 22, 233–239.

Le Jean, G., Abraham, G., Debray, E., Candau, Y., Piar, G., 1994. Kinetics of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores using a two reaction model. *Food Microbiology* 11, 229–241.

López, M., González, I., Condón, S., Bernardo, A., 1996. Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 28, 405–410.

Mafart, P., Leguerinel, I., 1998. Modeling combined effects of temperature and pH on heat resistance of spores by a linear-Bigelow equation. *Journal of Food Science* 63, 6–8.

Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I., 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution theory. *International Journal of Food Microbiology* 72, 107–113.

Oomes, S., van Zuijlen, A., Hehenkamp, J., Brul, S., 2007. The characterization of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology* 120, 85–94.

Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S., Sala, F.J., 1996. Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenised foods. *International Journal of Food Microbiology* 29, 1–10.

Palop, A., Mañas, P., Condón, S., 1999. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *Journal of Food Safety* 19, 57–72.

Peleg, M., Cole, M.B., 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38, 353–380.

Peleg, M., Normand, M.D., 2004. Calculating microbial survival parameters and predicting survival curves from non-isothermal inactivation data. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44, 409–418.

Periago, P.M., Leontidis, S., Fernández, P.S., Rodrigo, C., Martínez, A., 1998. Kinetic parameters of *Bacillus stearothermophilus* spores under isothermal and non-isothermal heating condition. *Food Science and Technology International* 4, 443–447.

Rodríguez, A.C., Smerage, G.H., Teixeira, A.A., Lindsay, J.A., Busta, F.F., 1992. Population model of bacterial spores for validation of dynamic thermal processes. *Journal of Food Process Engineering* 15, 1–30.

Sedlák, M., Vinter, V., Adamec, J., Vohradský, J., Voburka, Z., Chaloupka, J., 1993. Heat shock applied early in sporulation affects heat resistance of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Bacteriology* 175, 8049–8052.

Stasiewicz, M.J., Marks, B.P., Orta-Ramírez, A., Smith, D.M., 2008. Modelling the effect of prior sublethal thermal history on the thermal inactivation rate of *Salmonella* in ground turkey. *Journal of Food Protection* 71, 279–285.

Stumbo, C.R., 1973. *Thermocacteriology in Food Processing*, second ed. Academic Press, London, New York.

Valdramidis, V.P., Geeraerd, A.H., Bernaerts, K., Van Impe, J.F., 2006. Microbial dynamics versus mathematical model dynamics: the case of microbial heat resistance induction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 7, 80–87.

Valdramidis, V.P., Geeraerd, A.H., Bernaerts, K., Van Impe, J.F., 2008. Identification of non-linear microbial inactivation kinetics under dynamic conditions. *International Journal of Food Microbiology* 128, 146–152.

Van Zuijlen, A., Periago, P.M., Amézquita, A., Palop, A., Brul, S., Fernández, P.S., 2010. Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores; putative indicator microorganism for optimization of thermal processes in food sterilization. *Food Research International* 43, 1895–1901.

## **5.2. CAPITULO II: “Efecto del timol en el medio de calentamiento y de recuperación sobre la resistencia al calor de esporos de *Bacillus* en condiciones isotérmicas y no isotérmicas”**

Este capítulo se corresponde con el siguiente artículo, que está siendo sometido a revisión en la revista Food Microbiology:

Esteban, M.-D., Conesa, R., Huertas, J.P. y Palop, A. Effect of thymol in heating and recovery media on the isothermal and non-isothermal heat resistance of *Bacillus* spores. Food Microbiology, enviado (ref. FM-S-14-00136)



Las empresas agroalimentarias aplican tradicionalmente un sobreprocesado a los productos tratados térmicamente, garantizando de esta forma su seguridad y estabilidad microbiológica. Lamentablemente, esto conlleva un detrimento de las características organolépticas y nutricionales. Existen distintas estrategias para tratar de reducir la intensidad de los tratamientos térmicos. La acidificación de los alimentos previo a su tratamiento térmico se aplica de manera habitual en la industria alimentaria con este objetivo. Su efecto sobre numerosos microorganismos esporulados se conoce desde hace tiempo y en el capítulo anterior se exploró sobre *B. sporothermodurans*. También se investigó el efecto de otro factor menos conocido, como la velocidad de calentamiento, en este mismo microorganismo, si bien en el rango investigado (entre 1 y 10°C/min) no se observó ningún efecto significativo. Otra estrategia consiste en la adición de determinados compuestos de carácter antimicrobiano, cuyo efecto combinado con el calor reduzca notablemente la resistencia microbiana.

Para este estudio se eligió un antimicrobiano natural, el timol. Este tipo de compuestos goza de la confianza de los consumidores, dado su carácter natural. Basándonos en estudios previos de Lekogo et al. (2010), en los que la adición de ácidos grasos mostraba un efecto distinto sobre los microorganismos si se realizaba en el medio de calentamiento o en el de recuperación, en nuestro trabajo, la adición de timol se hizo también en ambos medios. El estudio se realizó en condiciones isotérmicas sobre distintos microorganismos esporulados y, en uno de ellos, se amplió también a condiciones no isotérmicas.

Los resultados obtenidos mostraron un efecto discreto o nulo, dependiendo del microorganismo, cuando el timol se adiciona al medio de calentamiento, y mucho más notable cuando se añadía al medio de recuperación. En el caso del medio de recuperación el efecto era, además, dosis-dependiente, lo que permitió la elaboración de modelos secundarios para todos los microorganismos investigados. La adición simultánea a ambos medios no mostró efectos significativos. Sin embargo, al combinar el timol con tratamientos no isotérmicos el número de supervivientes fue significativamente inferior a lo predicho por los modelos.

Estos resultados, en su conjunto, indican que la combinación de timol con calor permitiría reducir la intensidad de los tratamientos térmicos, manteniendo los mismos niveles de seguridad y estabilidad alimentaria.





*Submitted for publication*

## **Effect of thymol in heating and recovery media on the isothermal and non-isothermal heat resistance of *Bacillus* spores**

Maria-Dolores Esteban, Raquel Conesa, Juan-Pablo Huertas and Alfredo Palop\*

Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum", Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Murcia, Spain

---

### **ABSTRACT**

Members of the genus *Bacillus* include important food-borne pathogen and spoilage microorganisms for in food industry. Essential oils are natural products extracted from herbs and spices, which can be used as natural preservatives in many foods because of their antibacterial, antifungal, antioxidant and anti-carcinogenic properties. The aim of this research was to explore the effect of the addition of different concentrations of thymol to the heating and recovery media on the thermal resistance of spores of *Bacillus cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis*. Experiments were performed at isothermal and non-isothermal heating conditions. While the heat resistance was hardly reduced when thymol was present in the heating medium, the effect in the recovery medium was greater and could be predicted using simple mathematical models.

---

### **1. Introduction**

*Bacillus* are Gram-positive and spore-forming bacteria. Bacterial spores are the main problem in many food industries not only for their ubiquitous nature, but also because of their ability to survive, in some instances, to the industrial sterilisation processes and, what is more, to proliferate under conditions generally presumed to prevent growth (such as low temperatures) (Scheldeman *et al.*, 2006). Over-processing is often applied to the products that have a prolonged shelf life, being detrimental for their quality. Even though, in recent years, highly heat resistant spore-forming bacteria have increased challenges in industrial sterilisation processes to assure food safety and prevent spoilage (Oomes *et al.*, 2007).

Combined processes have been developed in order to ensure microbial safety, affecting to a lesser extent the sensorial and nutritional properties. Different studies have shown the antimicrobial efficacy of essential oils, alone or in combination with other preservation methods, against spoilage and food-borne pathogens (Ultee *et al.*, 2000;

Tiwari *et al.*, 2009; Esteban and Palop, 2011; Huertas *et al.*, 2014).

Essential oils are natural products extracted from herbs and spices used as flavourings in the food industry. Nowadays their use as natural preservatives in many foods is gaining interest because of their antibacterial, antifungal, antioxidant and anti-carcinogenic properties. Thymol is a phenolic compound present in the essential oil fraction of *Oreganum* and *Thymus* plants. The addition of thymol to the foods that are going to be heat treated could reduce processing times and temperatures considerably. The thermal resistance of spores is strongly influenced by the heating and recovery conditions (Gonzalez *et al.*, 1996; Coroller *et al.*, 2001, Lekogo *et al.*, 2010; Esteban *et al.*, 2013). A better knowledge of the effect of the preservation agents in the heating and recovery media on microorganisms would lead to a more rational design of thermal processes. In this regard, no research on the effect of the combination of preservation agents and heat under non-isothermal conditions has been

conducted yet.

The aim of this study was double, on one hand to know and model the influence of different concentrations of thymol in the heating and in the recovery media on the heat resistance of *B. cereus*, *B. licheniformis* and *B. subtilis* spores and, on the other hand, to explore the effect of thymol in both media under non-isothermal heating conditions on *B. subtilis* spores.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains and culture conditions

The strains used in this study were *Bacillus cereus* INRA ATZ421 (kindly supplied by Institut National de la Recherche Agronomique), *Bacillus licheniformis* CECT 4525 and *Bacillus subtilis* CECT 4071 (both supplied by the Spanish Type Culture Collection) and *Bacillus subtilis* AdHC1 (kindly supplied by Unilever Bestfoods Research Vlaardingen). All the strains were prepared on Petri dishes of plate count agar (PCA; Scharlau Chemie, Barcelona, Spain). The agar surface was inoculated with 0.2 mL of a 24 h culture grown in brain heart infusion broth (BHIB; Scharlau Chemie) at 37°C. The agar plates were incubated at 37°C for sporulation. For all microorganisms, once 90% sporulation was achieved, as determined by phase contrast microscopy (Leica, Wetzlar, Germany), spores were collected by flooding the agar plate with sterile distilled water, scratching the surface with a spatula. After harvesting, spores were washed four times by centrifugation and resuspended in sterile, distilled water. The concentration of spores in the final suspension was adjusted at 10<sup>9</sup> spores mL<sup>-1</sup> with sterile distilled water. The spore suspensions were stored at 4°C until used.

### 2.2 Chemicals

Thymol (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) stock solutions 0.5 M were made in 95 % ethanol and stored at 4 °C.

### 2.3 Heat treatment

Heat resistance determinations were carried out in a thermoresistometer Mastia (Conesa *et al.*, 2009). The D values were determined in BHIB at temperatures of 100, 105 and 110°C for isothermal treatments. For non-isothermal treatments the thermoresistometer was programmed to perform a linear temperature profile, starting from an initial temperature of 95°C at a constant heating rate of 1°C min<sup>-1</sup>. Different concentrations of thymol (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 and 0.6 mM) were added to the heating medium, BHIB, and/or to the recovery medium, Brain Heart Infusion Agar (BHIA; Scharlau Chemie). Survival counting was based on duplicate counts, from appropriate dilutions in peptone water (Scharlau Chemie), plated in BHIA and incubated at 37 °C for 24 h. Preliminary experiments showed that longer incubation times did not modify plate counts.

### 2.4. Data analysis

Lineal survival curves were found for all microorganisms tested. D values were estimated from the survival curves as the negative inverse of the slope. z values were estimated from the decimal reduction time curves (DRTCs) as the negative inverse of the slope. All resistance determinations were performed at least twice in independent experiments at different days. Average D values and their associated standard deviation were calculated for each microorganism, thymol concentration and temperature. Differences between data were considered significant when  $p \leq 0.05$ . The effect of the different concentrations of thymol in the recovery media on the D values was modeled by a secondary model based on the model of Lekogo *et al.* (2010).

$$\log D = \log D^* - \frac{[thymol]}{z'_{thymol}} \quad (1)$$

Where  $z'_{thymol}$  is the increase of thymol concentration in the recovery media that lead a 10-fold reduction in the D value and  $D^*$  is the D-value without thymol in the recovery media.

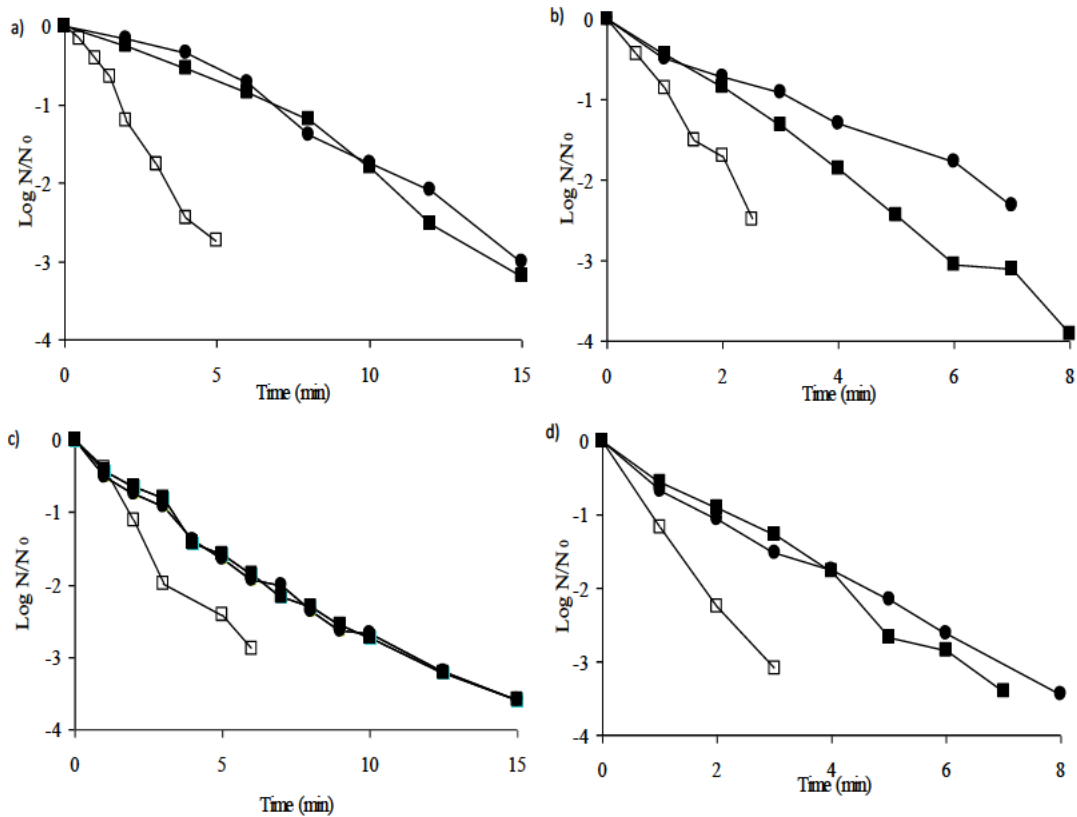
For non-isothermal treatments, experimental data were contrasted against survivor numbers predicted from  $D$  and  $z$  values obtained under isothermal conditions (Conesa *et al.*, 2009). Predictions were based on the integration of heat treatment lethality, which was calculated applying the general method of process calculation (Stumbo, 1973) by means of Eq. (2).

$$F_{TR}^z = \sum 10^{((T - TR)/z)} \times \Delta t \quad (2)$$

where  $F_{TR}^z$  is the time of treatment (min) at the reference temperature  $T_R$  for a microorganism with a specific  $z$  value ( $^{\circ}\text{C}$ );  $\Delta t$  is the time interval at which the temperature  $T$  is assumed to be constant. The time intervals ( $\Delta t$ ) were of 6 s. In this way, temperature always changed  $0.1^{\circ}\text{C}$  in consecutive time intervals.

The total time of treatment,  $F_{TR}^z$ , is then substituted in Eq. (3) to predict the number of survivors.

$$F_{TR}^z = D_R \times (\log N_0 - \log N) \quad (3)$$



**Figure 1.** Survival curves of *Bacillus cereus* (a), *Bacillus licheniformis* (b), *Bacillus subtilis* AdHC1 (c) and *Bacillus subtilis* CECT 4071 spores (d) heated to  $100^{\circ}\text{C}$  and exposed to  $0.5\text{mM}$  thymol in heating and recovery media. ● control; ■  $0.5\text{mM}$  thymol in the heating medium; □  $0.5\text{mM}$  thymol in the recovery medium.

where  $D_R$  is the decimal reduction time at  $T_R$  (min);  $N_0$  is the initial number of microorganisms;  $N$  is the number of survivors.

The parameter values and their associated standard deviation were calculated by an appropriate statistical package (Matlab, The Math Works, Natick, USA).

### 3. Results

The addition of thymol to the heating medium had a rather small effect on the thermal resistance of all the microorganisms tested (Fig. 1). The  $D_{100^{\circ}\text{C}}$  value decreased from 2.86 to 2.06 min in the case of *B. licheniformis* when  $0.5\text{mM}$  thymol was added to the heating medium. Similar or even lower decreases were found for the other microorganisms (Fig. 1). The presence of thymol in the recovery media had a greater effect on all the microorganisms, reducing their  $D_{100}$  values even down to one third for *B. cereus* and *B.*

*subtilis* CECT 4071 when 0.5 mM thymol was added to the recovery medium (Figure 1a and 1d respectively).

other heating temperatures for all microorganisms. Fig. 2 shows, as an example, the survival curves of *B. subtilis*

**Table 1.** D values (min)  $\pm$  standard deviation for *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* *Bacillus subtilis* AdHC1 and *Bacillus subtilis* CECT 4071 heated at 100°C with thymol in the recovery medium.

Thymol concentration (mM)	<i>B. cereus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i> AdHC1	<i>B. subtilis</i> CECT 4071
	D <sub>100</sub> (min) $\pm$ SD	D <sub>100</sub> (min) $\pm$ SD	D <sub>100</sub> (min) $\pm$ SD	D <sub>100</sub> (min) $\pm$ SD
0.0	4.95 $\pm$ 0.15	2.86 $\pm$ 0.78	4.04 $\pm$ 0.66	2.56 $\pm$ 0.54
0.1	4.48 $\pm$ 0.216	2.23 $\pm$ 0.57	N.D.	2.29 $\pm$ 0.29
0.2	N.D.	2.09 $\pm$ 0.28	N.D.	1.87 $\pm$ 0.15
0.3	1.64 $\pm$ 0.29	1.78 $\pm$ 0.64	3.74 $\pm$ 0.88	1.53 $\pm$ 0.09
0.4	N.D.	N.D.	3.29 $\pm$ 0.88	1.03 $\pm$ 0.21
0.5	1.50 $\pm$ 0.14	1.76 $\pm$ 0.44	2.65 $\pm$ 0.84	0.84 $\pm$ 0.22
0.6	N.D.	1.36 $\pm$ 0.77	2.39 $\pm$ 0.75	0.71 $\pm$ 0.36

N.D.: Not determined

When increasing concentrations of thymol were added to the recovery medium after the thermal treatment, increasing effects were shown. Dose dependent effects were found at 100°C for all the microorganisms through all the range of thymol concentrations tested (Table 1), with linear correlations between the log D values and the concentration of thymol in the recovery medium ( $r \geq 0.92$ ).

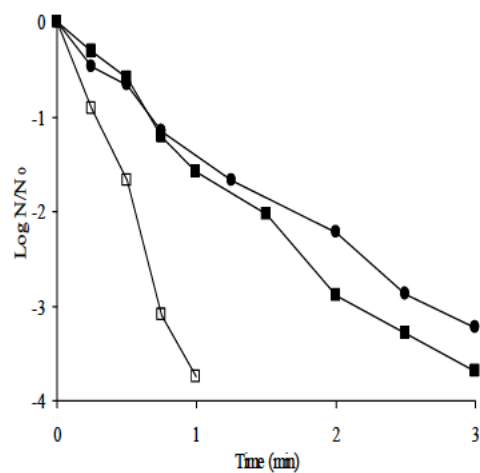
The data on the effect of antimicrobials in the recovery medium were used to build mathematical models to predict the influence of thymol. These models were based on the equation proposed by Lekogo *et al.* (2010) (Eq. 1). The  $z'_{thymol}$  values (Table 2) are the

**Table 2.**  $z'_{thymol}$  values for *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* AdHC1 and *Bacillus subtilis* CECT 4071 at 100°C.

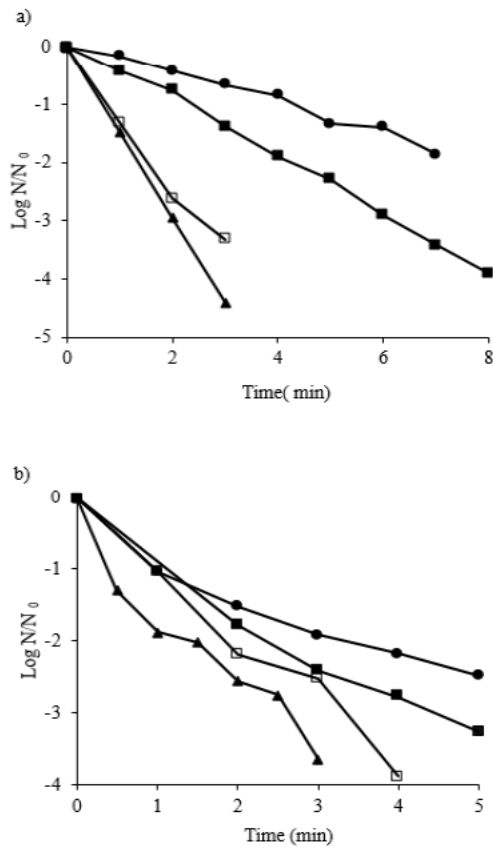
	$z'_{thymol}$	$r$
<i>B. cereus</i>	0.86	0.94
<i>B. licheniformis</i>	1.88	0.95
<i>B. subtilis</i> AdHC1	3.14	0.92
<i>B. subtilis</i> CECT 4071	1.09	0.99

AdHC1 at 105°C.

Fig. 3 shows the combined effect of 0.3 mM thymol in the heating and recovery media for *B. licheniformis* and *B. subtilis* CECT 4071. The D values obtained when thymol was added only to the recovery medium were no significantly different to those obtained when thymol was added to both the recovery and heating media, for both microorganisms. Hence, the addition of thymol in both the heating and the recovery media did not lead to any synergistic effect.



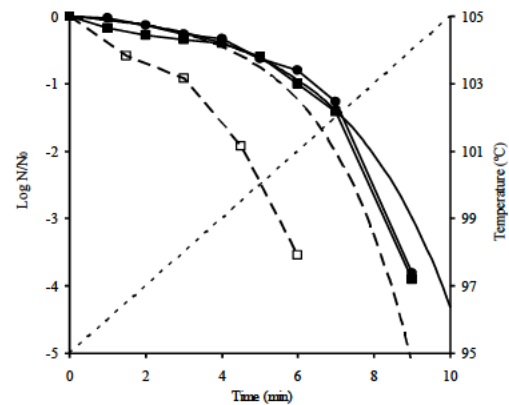
**Figure 2.** Survival curves of *Bacillus subtilis* AdHC1 spores heated to 105°C with thymol in heating and recovery media. ● control; ■ 0.5 mM thymol in the heating medium; □ 0.5 mM thymol in the recovery medium.



**Figure 3.** Survival curves of *Bacillus licheniformis* (a) and *Bacillus subtilis* CECT 4071 spores (b) heated to 100°C and exposed to 0.5mM thymol in heating and/or the recovery media. ● control; ■ 0.5 mM thymol in the heating medium; □ 0.5 mM thymol in the recovery medium.

Figure 4 shows the effect of thymol in nonisothermal heat treatments (at a constant heating rate of 1°C/min) in *B. subtilis* AdHC1 survival curves, the corresponding temperature profiles and the predictions of the survivors based on isothermal data. As in the isothermal treatments the effect of 0.5 mM of thymol in the heating media had no effect on the microorganisms. Both the control and the 0.5 mM thymol survival curves showed the same profile, reducing the counts in 4 log cycles after 9 min of treatment, when the treatment temperature had reached 104°C. When the same amount of thymol was added to the recovery

medium the effect was greater again, reducing considerably the number of survivors. In this case, almost the same log reductions were reached in 6 min. According to the predictions (from isothermal data), the control and the heating medium survival curves were quite accurate, while the recovery medium prediction curve was overestimating the number of survivors.



**Figure 4.** Survival curves of *Bacillus subtilis* AdHC1 under 1°C/min nonisothermal heating rate with thymol in the heating and recovery media. ● control; ■ 0.5 mM thymol in the heating medium; □ 0.5 mM thymol in the recovery medium; dotted line: temperature profile; continuous line: predicted microbial inactivation for control and thymol in the heating medium; dashed line: predicted microbial inactivation for thymol in the recovery medium.

#### 4. Discussion

The influence of different concentrations of thymol in the heating and in the recovery media on the heat resistance of different strains of *Bacillus* spores was studied. These microorganisms have been shown to survive to very high temperatures of treatment and to other stressing conditions or treatments, such as low temperature or pH (André *et al.*, 2013). Hence, the addition of natural antimicrobial compounds could help to decrease the intensity of the thermal treatment and to improve the food quality. The effect of the addition of thymol was different in the heating and in the recovery

media. Thymol showed a scarce when added to the heating medium, at concentrations up to 0.5 mM for any of the microorganisms studied at 100°C (Fig. 1). Similar low effects have been found by other authors when adding antimicrobial compounds to the heating medium (Tremoulet *et al.*, 2002; Lekogo *et al.*, 2010; Ungaretti *et al.*, 2012). However, when thymol was added to the recovery medium, dose dependent effects were observed for all the microorganisms (Table 1). The  $D_{100^\circ\text{C}}$  value was reduced down to one third when 0.5 mM thymol was added to the recovery medium for *B. cereus* and *B. subtilis* CECT 4071. These effects were also observed at other heating temperatures (Fig. 2). Other authors have found similar effects when adding different compounds to the heating and the recovery media. Leguerinel and Mafart (2001) found the same effect for *B. cereus* with free fatty acids. Also, Lekogo *et al.* (2010) found similar effects for several spore-formers, and Huertas *et al.* (2013) found similar effects for *Alicyclobacillus acidoterrestris* with combinations of nisin and citral. Thymol is a phenolic compound present in the essential oil fraction of many aromatic herbs and spices. According to its hydrophobic nature, its primary site of toxicity is the cytoplasmic membrane (Juven *et al.*, 1994; Helander *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 2001), increasing its permeability. It also decreases the activity of several enzymatic systems (Nychas, 1995). Bacterial spores are protected against chemicals agents because of their envelopes. Hence, no effect of the antimicrobials added to the heating medium is to be expected. However outgrowing spores are even more susceptible to antimicrobials than vegetative cells (Setlow, 2006). This increased sensitivity would explain the effect found in the recovery medium.

Lekogo *et al.* (2010) found a relationship between the concentration of different fatty acids in the recovery medium and decrease in heat resistance, which enabled them to describe this effect on *B. cereus* and *Clostridium sporogenes*. These authors developed a predictive model, using the  $z$

concept based on a Bigelow-like model as a secondary model, to describe the effect of the fatty acid concentration. This model was also valid for thymol added to the recovery medium for all the microorganisms in this research (Table 2). The  $z'_{\text{thymol}}$  concept helps to quantify the effect of thymol concentration on the apparent heat resistance of these microorganisms, and to sort their sensitivity to this compound. In this sense, *B. cereus* was the most sensitive microorganism (lower  $z'_{\text{thymol}}$  value) and *B. subtilis* AdHC1 the most resistant one.

During thermal treatments applied currently in the food industry, the composition of heating and recovery media are identical. Although no significant effect on the thermal resistance was found when thymol was added to the heating medium, experiments were performed to explore the combined effect of thymol in both the heating and the recovery media. No further decrease in the heat resistance was observed when thymol was present in both media (Fig. 3). These results are in disagreement with those of Lekogo *et al.* (2010), who found cumulative effects when free fatty acids were added to heating and recovery media. However, these authors did find that free fatty acids enhanced thermal inactivation of bacterial spores, when present in the heating medium.

Under non isothermal heating conditions, the absence of effect of thymol added to the heating medium was also observed on the thermal resistance of *B. subtilis* AdHC1 spores. The survivors of this thermal treatment (Fig. 4) were accurately predicted using the data obtained under isothermal conditions. The addition of thymol to the recovery medium lead to a remarkable synergistic effect, since the survivors found were even lower than those expected from the isothermal data. No data have been found in literature reporting the effect of antimicrobials under non isothermal heating conditions to which our results can be compared. This finding may have interesting applications for the food processing industry, since a combination of antimicrobials with a non isothermal

treatment (as those currently applied) would enhance the inactivation of bacterial spores.

## 5. Conclusions

It has been shown that thymol helps to reduce the thermal resistance of different spore-formers, including the food-borne pathogen *B. cereus*. The effect on the resistance to heat of the presence of this antimicrobial in the recovery medium is dose dependent and can be predicted using simple mathematical models. The combination of antimicrobials with thermal treatments could be of interest for the food processing industry, since it would help to decrease the intensity of thermal treatments, while keeping the same levels of food safety and stability.

## Acknowledgements

This research was financially supported by the Ministry of Science and Technology of the Spanish Government and European Regional Development Fund (ERDF) through Projects AGL-2006-10280 and AGL-2010-19775. M.D. Esteban is grateful to the Ministry of Science and Technology for offering her the fellowship BES 2007-15471.

## References

- André, S., Zuber, F., Remize, F. 2013. Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *International Journal of Food Microbiology* 165, 134-143.
- Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A., Palop, A. 2009. Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *Journal of Applied Microbiology* 107, 506-513.
- Coroller, L., Leguerinel, I., Mafart, P. 2001. Effect of water activities of heating and recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 341-347.
- Esteban, M.D., Palop, A. 2011. Nisin, carvacrol and their combinations against the growth of heat-treated *Listeria monocytogenes* cells. *Food Technology and Biotechnology* 49, 89-95.
- Esteban, M.D., Huertas, J.P., Fernández, P., Palop, A. 2013. Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores. *Food Microbiology* 34, 158-163.
- González, I., López, M., Mazas, M., Bernardo, A., Martín R. 1996. Effect of pH of the recovery medium on the apparent heat resistance of three strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 31, 341-347.
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., Kyösti, L.K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I.E., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., von Wright, A. 1998. Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46, 3590-3595.
- Huertas, J.P., Esteban, M.D., Antolinos, V., Palop, A. 2014. Combined effect of natural antimicrobials and thermal treatments on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Food Control* 35, 73-78.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituent. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 626-631.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453-462.
- Leguerinel, I., Mafart, P. 2001. Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 63, 29-34.
- Lekogo, B.M., Coroller, L., Mathot, A.G., Mafart, P., Leguerinel, I. 2010.

- Modelling the influence of palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids on apparent heat resistance of spores of *Bacillus cereus* NTCC 11145 and *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3. *International Journal of Food Microbiology* 141, 242-247.
- Nychas, G.J.E. 1995. Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W. (ed.), *New methods of food preservation*. London: Blackie Academic Professional. pp. 58-89.
- Oomes, S., van Zuijlen, A., Hehenkamp, J., Brul, S. 2007. The characterization of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology* 120, 85-94.
- Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., Heyndrickx, M. 2006. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology* 101, 542-555.
- Setlow, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514-525.
- Stumbo, C.R. 1973. *Thermocacteriology in food processing*. (2nd ed.). Academic Press, London, New York.
- Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen P.J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5987-6000.
- Tremoulet, F., Rabier, P., Gas, G. 2002. Inhibition of *Bacillus stearothermophilus* spores in liquid medium by free fatty acids with and without heat: possible mechanism for the microbiological stability of canned fat-duck liver. *Journal of Food Science* 67, 1144-1148.
- Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174, 233-238.
- Ungaretti, L., da Silva, C.A., Martins, B.C., Falcão G.M. 2012. *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oil and heat. *LWT - Food Science and Technology* 46, 267-273.



### **5.3. CAPITULO III: “Nisina carvacrol y sus combinaciones en el crecimiento de células de *Listeria monocytogenes* tratadas termicamente.”**

Este capítulo se corresponde con el siguiente artículo, publicado en la revista Food Technology and Biotechnology:

Esteban, M.-D., y Palop, A. Nisin, carvacrol and their combinations against the growth of heat-treated *Listeria monocytogenes* cells. Food Technology and Biotechnology, 49: 89–95 (2011)



En función del tipo de microorganismo que queramos controlar, los tratamientos térmicos aplicados en la industria alimentaria son: pasterización y esterilización. Hasta ahora, en el desarrollo de esta tesis doctoral se han tratado los tratamientos de esterilización y los problemas relacionados con ellos, planteándose distintas alternativas para tratar de disminuir la intensidad de los mismos. Una de estas alternativas consistía en combinar los tratamientos térmicos con los antimicrobianos naturales. En este capítulo se planteó una estrategia similar sobre células vegetativas de bacterias Gram positivas. No obstante, en el caso de las bacterias vegetativas, se dispone ya de abundante información previa sobre el efecto de distintos antimicrobianos, incluso combinados con calor. Por ejemplo, en nuestro mismo laboratorio abordamos hace ya algunos años el estudio del efecto combinado de distintos antimicrobianos naturales sobre la viabilidad de células vegetativas de *B. cereus* sometidas a un calentamiento subletal previo (Periago et al., 2001). Por todos estos motivos, el planteamiento del presente estudio consistía en explorar como afectaba al crecimiento de los supervivientes a un tratamiento térmico de otro microorganismo de interés sanitario, *L. monocytogenes*, la combinación de dos antimicrobianos naturales, nisina y caracol. Se trata de una situación que podría darse en la industria alimentaria, por lo que la investigación, además de realizarse en un medio de cultivo, también se extendió a un alimento.

Los resultados mostraron unos efectos sinérgicos interesantes cuando se combinaron los dos compuestos antimicrobianos con el tratamiento térmico previo. Además, estos efectos se mantenían incluso en la matriz alimentaria.



## Nisin, Carvacrol and Their Combinations Against the Growth of Heat-Treated *Listeria monocytogenes* Cells

María Dolores Esteban and Alfredo Palop\*

Department of Food Engineering and Agricultural Machinery,  
Technical University of Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, ES-30203 Cartagena, Murcia, Spain

Received: June 17, 2009

Accepted: April 23, 2010

### Summary

*Listeria monocytogenes* is a Gram-positive microorganism responsible for one of the most serious food-borne diseases in the world, listeriosis. The aim of this study is to evaluate the combined effect of a heat pretreatment with the use of antimicrobials, nisin and carvacrol, on the growth of *L. monocytogenes*, and their potential uses as food preservatives. Carvacrol showed a dose-dependent inhibitory effect, while nisin did not, it decreased the growth rate of *L. monocytogenes* up to 20 %, and it increased lag time for approx. 25 % at any of the concentrations tested (0.13–0.39  $\mu\text{M}$ ). When both antimicrobials were combined, a synergistic effect was observed. This effect was further increased when they were combined with a heat pretreatment for 15 min at 55 °C, where no growth was observed for at least 15 days, even at the lowest concentration tested. The effect was proved both in tryptic soy broth and in carrot juice. This study indicates the potential use of carvacrol and nisin applied simultaneously for preservation of minimally processed foods.

**Key words:** nisin, carvacrol, *Listeria monocytogenes*, combined antimicrobial processes

### Introduction

*Listeria monocytogenes* has become one of the most important foodborne pathogens in the last 20 years (1). Several foodborne disease outbreaks, which have caused severe and often fatal infections in susceptible human hosts, have been linked to this pathogen (2).

*Listeria* can be inactivated by exposure to a variety of food processing treatments including heating at high temperatures, freezing and exposure to acids or sanitizing compounds, but also it may survive adverse conditions, such as vacuum, ultraviolet rays and conventional pasteurisation (3). Heat inactivation is one of the most frequently used preservation techniques to extend the shelf life of food products. Lately, an increased interest in mild heat treatments is observed because of the increased market demand for minimally processed food. *L. monocytogenes* is one of the most heat-resistant non-sporeforming pathogenic microorganisms present in food (4).

Lactic acid bacteria produce a wide range of antimicrobial substances including bactericidal peptides known as bacteriocins. Nisin, produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, can have bactericidal effects against a broad range of Gram-positive bacteria including some lactic acid bacteria, *L. monocytogenes* and spore-forming bacteria like *Clostridium* and *Bacillus* species (5,6). Nisin inhibits the outgrowth of germinating spores and causes lysis of vegetative cells (7). Its primary target is the cytoplasmic membrane of vegetative cells. Nisin permeabilizes the cytoplasmic membrane by forming pores in the membrane, resulting in a rapid efflux of small molecules (8–10). Pore formation caused by this cationic lantibiotic involves the local perturbation of the bilayer structure and a membrane potential-dependent or pH gradient-dependent reorientation of these molecules from a surface-bound into a membrane-inserted configuration (5,11,12). The efflux of cellular constituents results in a complete collapse of the proton motive force (8,13–15). Nisin is Generally Recognized As Safe (GRAS status), it is the only bacteriocin

\*Corresponding author; Phone: ++34 968 325 762; Fax: ++34 968 325 433; E mail: alfredo.palop@upct.es

that has been approved by the World Health Organization (WHO) as a food preservative and is currently permitted in over 50 countries (6). Nisin can be used in processed cheese, canned food, and other food products, but the practical application is still limited because of its low stability and activity at high pH and its limited efficacy in certain food matrices (16).

Many herbs and spices have been used for millennia to provide distinctive flavours, but they also exhibit antimicrobial activity (17). Carvacrol is a phenolic compound present in the essential oil fraction of *Origanum* (18), commonly known as oregano. These sorts of phenolic compounds are hydrophobic and their primary site of toxicity is the membrane. They accumulate in the lipid bilayer according to a partition coefficient that is specific for the applied compound, leading to disruption of the membrane structure and function (19,20). As a result, the permeability increases and the activity of the enzymatic systems, including those involved in energy production and structural component synthesis, is affected (21–23). A critical concentration of the compound is needed to cause leakage of cellular constituents (24). In practice, carvacrol is added to different products, e.g. baked goods (15.75 ppm), nonalcoholic beverages (28.54 ppm), or chewing gum (8.42 ppm) (17,25).

By combining nisin with plant essential oils, the restrictions in its use as a food preservative might be overcome and the range of applications could be expanded. Since both compounds act on the cytoplasmic membrane, an additive or synergistic effect and lower dosage of both compounds would be necessary to cause an inhibitory effect (16). Synergism is observed when the effect of the combined substances is greater than the sum of the individual effects, while an additive effect is observed when the combined effect is equal to the sum of the individual effects, and antagonism corresponds to a lesser effect of one or both compounds when they are applied together than when they are applied individually (26). The synergistic antimicrobial effect of nisin and carvacrol on the viability of *L. monocytogenes* cells has been observed before (16). The actual mechanism of synergy is not known. It has been proposed that carvacrol might enhance the action of nisin by increasing the life time of pores created by nisin or by increasing the number or size of the formed pores (16). The effect of a heat pretreatment on the sensitivity of *Bacillus cereus* to antimicrobials has also been investigated (27). So far, the viability of heat-treated *L. monocytogenes* cells exposed to the combination of nisin and carvacrol has not been studied. The aim of this study is to evaluate the combined effect of a heat pretreatment with the use of antimicrobials nisin and carvacrol on the growth of *L. monocytogenes* and their potential uses as preservatives of minimally processed foods.

## Materials and Methods

### *Bacterial strains and culture conditions*

The strain of *L. monocytogenes* CECT 4031 used in this study was supplied by the Spanish Type Culture Collection. During this investigation it was maintained on slants of tryptic soy agar (TSA) supplemented with

0.6 % (*m/V*) yeast extract (TSAYE) (both from Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) at 4 °C.

The culture was grown for 24 h at 37 °C in tryptone soy broth (Scharlau Chemie) supplemented with 0.6 % (*m/V*) yeast extract (TSBYE). The strains were then subcultured in TSBYE for another 24 h at 37 °C, until the stationary phase of growth was reached, at a concentration of approx.  $10^9$  cells/mL. Working cultures were then divided into two aliquots of which one served as the nonthermal control culture and the other was subjected to a heat treatment. The nonthermal control culture was appropriately diluted to  $10^3$  cells/mL, while the culture exposed to the thermal treatment was diluted to  $10^6$  cells/mL. In this way, both cultures had the same initial number when starting growth.

### *Chemicals*

Nisin and carvacrol (both from Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) stock solutions (0.3 mM and 0.5 M, respectively) were made in 95 % ethanol and stored at 4 °C.

### *Preparation of carrot juice*

Carrot juice was prepared from fresh raw carrots of the Nantesa variety provided by a local factory of minimally processed foods. They were peeled, washed, minced and filtered through a metal sieve. The juice was dispensed in tubes, heated with steam for 15 min, and stored at 40 °C. Natural inhibitors present in carrots were likely to be destroyed by this heat treatment (28). The final pH was  $6.14 \pm 0.10$ . Just before experiments, the tubes were heated again with steam for 15 min and the temperature was adjusted to 37 °C.

### *Heat treatment*

A mild heat pretreatment for 15 min at 55 °C was selected as it resulted in a three-log reduction of cells. This heat treatment was applied to the culture grown in TSBYE for 24 h at 37 °C by placing the test tubes in a preheated water bath (Frimengruppe Press-Daimier, Dresden, Germany). Plate counts in TSAYE of the appropriate dilutions in buffered peptone water (BPW) (Scharlau Chemie) were performed before and after the thermal treatment, in order to check the extent of the achieved inactivation. Plates were incubated for 24 h at 37 °C.

### *Growth curves of L. monocytogenes in TSBYE*

The effect of nisin and carvacrol, individually and combined, on the growth of *L. monocytogenes* CECT 4031 suspended in TSBYE at 37 °C was studied. Controls without the addition of natural compounds but with the same concentration of ethanol were prepared. Cell suspensions were exposed to different concentrations of nisin (0.13, 0.26 and 0.39  $\mu$ M) or carvacrol (0.11, 0.22, 0.33, 0.44 and 0.66 mM) alone and to combinations of both compounds (0.13  $\mu$ M nisin plus 0.11 mM carvacrol, and 0.13  $\mu$ M nisin plus 0.22 mM carvacrol). In order to study the effects of these compounds on *L. monocytogenes* lag time duration and growth rate, the natural compounds were added to the growth medium prior to the inocula ( $10^3$  CFU/mL). Absorbance ( $A_{620 \text{ nm}}$ ) was measured with a spectrophotometer (ZUZI 4110RS, Auxilab, Beriáin, Spain) at differ-

ent time intervals during exposure. At least three replicate experiments per condition were performed.

Growth curves were obtained by plotting the  $A_{620\text{ nm}}$  against exposure time. Although the measurement of the absorbance of a culture is only an estimation of its growth, it might help to compare the growth rate and lag phase duration under different conditions. For this purpose, growth curves were fitted with the function of Baranyi *et al.* (29) in order to obtain the main growth parameters (*i.e.* specific growth rate and lag time). Only growth curves with at least 10 points were used for modelling, as suggested by the authors.

When no growth was observed after 15 days of incubation, plate counts were performed in order to check the number of microorganisms present in the culture. If the plate counting showed some growth, the culture was further incubated.

Analysis of variance and Duncan's multiple range test were done using the statistical program Statgraphics Plus v. 5.1 (Statpoint Technologies, Inc, Warrenton, VA, USA). Differences between data were considered significant when  $p \leq 0.05$ . The experiments were replicated three times for each treatment.

#### Growth curves of *L. monocytogenes* in carrot juice

The effect of nisin and carvacrol, individually and combined, on the growth of *L. monocytogenes* CECT 4031 in carrot juice at 37 °C was studied. Controls without the addition of natural compounds but with the same concentration of ethanol were prepared. Tubes with 4.5 mL of carrot juice were exposed to different concentrations of nisin (0.13 µM) or carvacrol (0.33 and 0.66 mM) alone or combined for 24 h at 37 °C to verify their inhibitory effect. In order to study the effects of these compounds on *L. monocytogenes* growth, the natural compounds were added to the growth medium prior to the inocula ( $10^3$  CFU/mL). Appropriate dilutions in BPW were poured in TSAYE and incubated at 37 °C for 24 h.

## Results

#### Effect of nisin and carvacrol on the growth of *L. monocytogenes* cells in TSBYE

When *L. monocytogenes* CECT 4031 in lag phase without a heat pretreatment was exposed in TSBYE to increasing concentrations of nisin alone (0.13, 0.26 and 0.39 µM; Fig. 1a), or carvacrol alone (0.11, 0.22, 0.33, 0.44 and 0.66 mM; Fig. 1b), both the onset of growth was delayed and the growth rate decreased (Table 1). Nevertheless, the behaviour was different for each antimicrobial agent. When exposed to 0.13 µM of nisin, the lag phase increased from 13.84 to 17.03 h and the growth rate decreased from 0.26 to 0.23 h<sup>-1</sup>. However, when the concentration of nisin was further increased, up to 0.39 µM, growth parameters were not largely affected and no significant differences were found between lag phases at these concentrations (Table 1).

On the contrary, the behaviour of *L. monocytogenes* was more carvacrol concentration-dependent (Table 1). Concentrations higher than 0.11 mM progressively in-

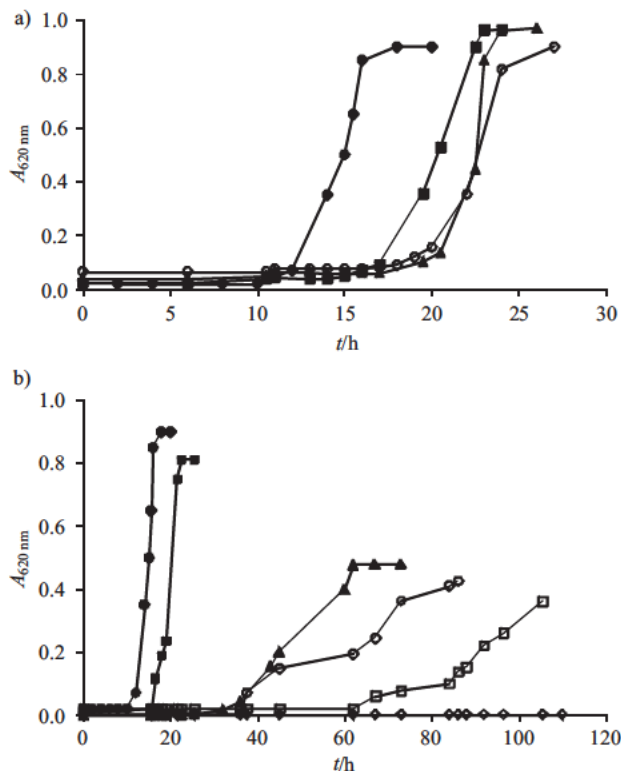


Fig. 1. Effect of different concentrations of: a) nisin and b) carvacrol on the growth of *L. monocytogenes* CECT4031 in TSBYE at 37 °C. a) ● control, ■ 0.13 µM nisin, ▲ 0.26 µM nisin, ○ 0.39 µM nisin; b) ● control, ■ 0.11 mM carvacrol, ▲ 0.22 mM carvacrol, ○ 0.33 mM carvacrol, □ 0.44 mM carvacrol, ◇ 0.66 mM carvacrol

creased the lag phase and decreased growth rate, to 0.66 mM, which not only inhibited growth, but even inactivated microorganisms, as indicated by plate counts performed after a 15-day incubation. Increasing concentrations of carvacrol also had an effect on the maximum absorbance, which was progressively lower.

An exponential correlation was observed for both the lag time and the growth rate in relation to the concentration of carvacrol in the growth medium (Fig. 2), with correlation coefficients ( $R^2$ ) higher than 0.95 in both cases. This means that the growth of this strain of *L. monocytogenes* could be easily predicted as a function of carvacrol concentration by simply substituting this concentration in Eqs. 1 and 2:

$$\log \lambda = 1.556 \times c + 1.135 \quad /1/$$

$$\log \mu = 4.285 \times c - 0.620 \quad /2/$$

where  $\lambda$  is the lag phase duration (h),  $c$  is the carvacrol concentration (mM) and  $\mu$  the growth rate (h<sup>-1</sup>).

The effect of nisin and carvacrol added simultaneously on the growth of *L. monocytogenes* CECT 4031 in lag phase in TSBYE broth at 37 °C was also studied. When *L. monocytogenes* was exposed to 0.13 µM nisin and 0.11 mM carvacrol, the onset of growth was significantly delayed (from 13.84 to 57.54 h) and the growth rate significantly reduced (from 0.26 to 0.09 h<sup>-1</sup>), leading to an important synergistic effect, at least in the lag time duration: 0.13 mM nisin alone only increased lag time

Table 1. Growth parameters (lag time and growth rate) of *L. monocytogenes* CECT 4031 in TSBYE at 37 °C, with or without heat pre-treatment, exposed to different concentrations of nisin and carvacrol added separately or simultaneously

		<i>t</i> /h		$\mu$ /h <sup>-1</sup>	
		Without HT	With HT	Without HT	With HT
<i>c</i> (nisin)/ $\mu$ M	0	(13.84±0.02) <sup>Aa</sup>	(14.84±0.18) <sup>Ab</sup>	(0.26±0.0005) <sup>Ga</sup>	(0.25±0.01) <sup>Da</sup>
	0.13	(17.03±1.46) <sup>Ba</sup>	(23.31±0.5) <sup>Bb</sup>	(0.23±0.003) <sup>Eb</sup>	(0.07±0.001) <sup>Aa</sup>
	0.26	(18.42±1.90) <sup>B</sup>	>15 days	(0.24±0.003) <sup>F</sup>	N.G.
	0.39	(18.60±1.83) <sup>B</sup>	>15 days	(0.21±0.027) <sup>D</sup>	N.G.
<i>c</i> (carvacrol)/mM	0	(13.84±0.02) <sup>Aa</sup>	(14.84±0.18) <sup>Ab</sup>	(0.26±0.0005) <sup>Ga</sup>	(0.25±0.01) <sup>Da</sup>
	0.11	(18.96±0.93) <sup>Bb</sup>	(13.95±0.5) <sup>Aa</sup>	(0.11±0.0007) <sup>Ca</sup>	(0.26±0.01) <sup>Db</sup>
	0.22	(33.18±4.52) <sup>Ca</sup>	(32.57±0.001) <sup>Ca</sup>	(0.015±0.003) <sup>Ba</sup>	(0.16±0.01) <sup>Cb</sup>
	0.33	(41.37±9.43) <sup>C</sup>	n.d.	(0.009±0.001) <sup>A</sup>	N.D.
	0.44	(67.19±7.92) <sup>Eb</sup>	(39.89±3.53) <sup>Da</sup>	(0.004±0.002) <sup>Aa</sup>	(0.12±0.011) <sup>Bb</sup>
	0.66	>15 days	>15 days	N.G.	n.d.
<i>c</i> (nisin)/ $\mu$ M+ <i>c</i> (carvacrol)/mM	0	(13.84±0.02) <sup>Aa</sup>	(14.84±0.18) <sup>Ab</sup>	(0.26±0.0005) <sup>Ga</sup>	(0.25±0.01) <sup>Da</sup>
	0.13+0.11	(57.54±5.33) <sup>D</sup>	>15 days	(0.09±0.04) <sup>C</sup>	N.G.
	0.13+0.22	>15 days	>15 days	N.G.	N.G.

n.d.=not determined, N.G.=no growth after 15 days, HT=heat treatment at 55 °C for 15 min. The results represent mean values±standard deviation of three replicates; the same capital letter indicates that there are no significant differences in columns; the same lower case letter indicates that there are no significant differences in rows between lag times or growth rate of the heat treated and non treated cells

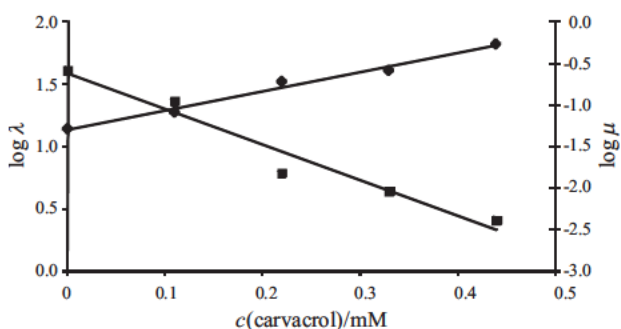


Fig. 2. Growth parameters of *L. monocytogenes* CECT 4031 in TSBYE at 37 °C as a function of carvacrol concentration. ◆ lag time ( $\lambda$ ), ■ growth rate ( $\mu$ )

for approx. 4 h, and 0.11 mM carvacrol alone for approx. 5 h, but the combination of both antimicrobials increased lag time for more than 40 h, which is much more than the addition of both increases. Regarding growth rate, the effect was only additive at these concentrations. When increasing concentrations of carvacrol were combined with this same concentration of nisin (0.13  $\mu$ M), the growth of *L. monocytogenes* was completely inhibited for at least 15 days. Plate counts performed after this 15-day incubation indicated that not only the growth was inhibited, but the microorganisms were even inactivated, as microbial counts were under the detection limit (<1 CFU/mL). Again, synergistic effects were observed.

#### Effect of a heat pretreatment on the growth of *L. monocytogenes* cells in TSBYE

*L. monocytogenes* cells grown in TSBYE at 37 °C were exposed to a thermal treatment for 15 min at 55 °C. This thermal treatment decreased the counts by three log

cycles. When these heat-treated *L. monocytogenes* cells were grown in TSBYE at 37 °C, the growth rate did not significantly differ from that obtained with the cells not previously exposed to a heat treatment and lag phase was only increased for 1 h (Table 1 and Fig. 3).

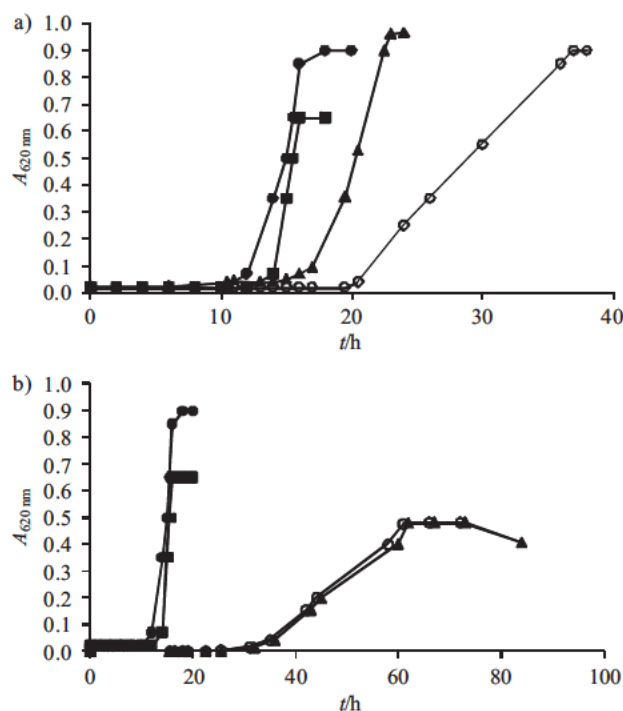


Fig. 3. Effect of combined concentrations of: a) nisin and b) carvacrol on the growth in TSBYE at 37 °C of heat treated (HT: 15 min at 55 °C) or non treated *L. monocytogenes* CECT 4031 cells. a) ● control, ■ HT, ▲ 0.13  $\mu$ M nisin, ○ 0.13  $\mu$ M nisin+HT; b) ● control, ■ HT, ▲ 0.22 mM carvacrol, ○ 0.22 mM carvacrol+HT



### Effect of nisin and carvacrol on the growth of heat-treated *L. monocytogenes* cells in TSBYE

The growth of heat-treated *L. monocytogenes* cells was dramatically affected by exposure to nisin. At the lowest nisin concentration tested (0.13  $\mu\text{M}$ ), growth rate was significantly reduced (Fig. 3a). At higher concentrations, the growth was completely inhibited for at least 15 days (Table 1). Again, plate counts performed after the incubation showed microbial counts under the detection limit.

Regarding the growth of heat-treated *L. monocytogenes* cells exposed to carvacrol, the behaviour was completely different. The growth was even faster than that of non-treated cells, at concentrations of carvacrol up to 0.44 mM (Table 1 and Fig. 3b). At 0.66 mM the growth was inhibited for at least 15 days, similarly to what happened to the cells not exposed to a heat treatment.

The effect of nisin and carvacrol added simultaneously on the growth of heat-treated *L. monocytogenes* CECT 4031 cells in TSBYE at 37 °C during lag phase was also studied. When the heat-treated *L. monocytogenes* CECT 4031 cells were exposed to different combinations of nisin and carvacrol in TSBYE, the growth was inhibited for at least 15 days even at the lowest concentration tested (0.13  $\mu\text{M}$  nisin plus 0.11 mM carvacrol).

### Effect of nisin and carvacrol on the growth of *L. monocytogenes* cells in carrot juice

The effect of the combinations of different concentrations of nisin and carvacrol on the viable counts of *L. monocytogenes* CECT 4031 during lag phase cultured at 37 °C in carrot juice (pH=6.14) exposed to a heat pretreatment or not was studied. This part of the research was conducted using plate counts instead of absorbance measurements, because the latter cannot be performed in turbid food media. Hence, plate counts were performed after inoculation and incubation for 24 h at 37 °C. *L. monocytogenes* CECT 4031 showed different behaviour at the different concentrations of the antimicrobials and their combination with a heat pretreatment (Fig. 4). The results showed that *L. monocytogenes* reached the stationary phase of growth at a concentration of  $6 \cdot 10^8$  CFU/mL in carrot juice, in 24 h or less at 37 °C with neither heat pretreatment nor antimicrobials added. No significant differences were observed between the control and the

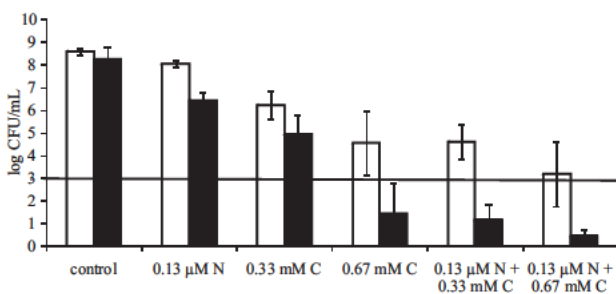


Fig. 4. Effect of different concentrations of nisin and carvacrol alone or combined on the growth of *L. monocytogenes* CECT4031 during 24 h at 37 °C in carrot juice (pH=6.14). White columns, non heated *L. monocytogenes* cells; black columns, heat treated *L. monocytogenes* cells (15 min at 55 °C). N=nisin, C=carvacrol. Horizontal line represents the initial concentration of the inocula

heat-pretreated cells, although these showed a higher variability in the replicates.

When *L. monocytogenes* was grown in the presence of 0.13  $\mu\text{M}$  nisin, significant differences were observed regarding control, even though these differences were small (half a logarithmic cycle). For microorganisms incubated with carvacrol at concentrations of 0.33 and 0.66 mM, a significant and progressive inhibition of growth was observed. When nisin and carvacrol were combined, a further inhibition of growth was observed. A bacteriostatic effect was even shown when the higher concentration of carvacrol (0.66 mM) was combined with 0.13  $\mu\text{M}$  nisin, since no growth was detected after 24 h of incubation (Fig. 4). The application of a heat pretreatment to cells incubated with either nisin or carvacrol resulted in a significant decrease in plate count with respect to non-treated cells incubated with the same amounts of antimicrobials (Fig. 4). The combinations of heat plus 0.66 mM carvacrol resulted in even lower counts than before the incubation.

## Discussion

*L. monocytogenes* showed different behaviour when exposed to increasing concentrations of nisin than when exposed to increasing concentrations of carvacrol. While both antimicrobials inhibited the growth, the effect of carvacrol was progressive as the concentration of this compound increased, while the effect of nisin was less dependent on its concentration. Actually, a good exponential correlation was found between both lag time and growth rate and carvacrol concentration ( $R^2 > 0.95$ ), which enabled the building of a secondary growth model. This deterministic model predicts the growth of *L. monocytogenes* as a function of carvacrol concentration. Other authors have also found a dose-dependent inhibitory effect of carvacrol and other phenolic compounds on *L. monocytogenes* and other Gram-positive bacteria (17,30–32). This different behaviour could depend on the mode of action on the bacterial envelopes for each antimicrobial compound: nisin forms pores in the bacterial membrane (33), while phenolic compounds cause disruption of the membrane function (17). The different modes of action for nisin and carvacrol could explain, at least in part, the synergistic effect observed when both antimicrobials were combined: while a concentration of 0.11 mM carvacrol alone and 0.13  $\mu\text{M}$  nisin alone had little effect on the growth of *L. monocytogenes* in TSBYE broth, the combination of both compounds at these concentrations increased the synergistic effect by more than four times in lag time, and when higher concentrations of carvacrol were combined with nisin, the growth was completely inhibited for at least 15 days, showing an even bactericidal effect. Pol *et al.* (34) also found synergistic effects in the combination of nisin and carvacrol in germinating spores of *Bacillus cereus*.

A heat pretreatment did not affect the growth of the survivors, which grew in a similar way as the non-heated cells. However, the heat pretreatment had an obvious effect on the survivors when they were exposed to antimicrobials, *i.e.* in that case their behaviour was different. The application of a heat pretreatment had a synergistic

effect with nisin, but it was antagonistic with carvacrol. Again, this fact supports the hypothesis of different targets for nisin and carvacrol. While heat damage affects the targets for nisin, hampering the growth of cells exposed to this compound, it seems to cross-protect against carvacrol. Other authors have also found that sequential combinations of mild heat and nisin resulted in significant synergistic decreases in viable counts of *Lactobacillus plantarum* (33) and *B. cereus* (35). However, Periago *et al.* (36) found that *B. cereus* cells developed cross-resistance to nisin after a mild heat treatment. Heat shock proteins may be involved in this antagonistic effect and in the cross-protective effect (37).

However, when combining both antimicrobials, at the lowest concentrations tested for both of them (which only showed slight inhibitory effect against *L. monocytogenes* growth when applied separately), with a heat pretreatment (which did not show any inhibitory effect), the growth was inhibited for at least 15 days. Again, a strong synergistic effect was shown. The synergism between carvacrol and nisin has already been shown in non-heated cells of *B. cereus* (16,27,36) and *L. monocytogenes* (16) and in heat-pretreated cells of *B. cereus* (36). Heat can damage the RNA, ribosomes, cytoplasmic membranes and enzymes. Despite the increased resistance to carvacrol observed after the exposure to heat, the combination of heat, carvacrol and nisin caused irreversible injury to the membrane, as well as to those structures damaged by heat, which was caused by the observed synergistic effect. Synergies, like these described in this research, can be used in the food industry to prevent food spoilage and ensure food safety, while maintaining a high standard of food quality.

When nisin, carvacrol and a heat pretreatment were applied in a food matrix such as carrot juice, the behaviour of *L. monocytogenes* resembled somehow that observed in TSBYE, although with some important differences. Heat-treated cells grew as fast as the control cells (not exposed to a heat pretreatment), and nisin slightly reduced the counts after 24 h of incubation at 37 °C in carrot juice. When nisin was applied after the heat treatment, a stronger inhibitory effect was observed. Carvacrol had a progressive inhibitory effect. However, in this case, the combination of carvacrol with a heat pretreatment had a stronger inhibitory effect, which was even bactericidal when 0.66 mM of carvacrol were combined with the heat pretreatment.

When carvacrol and nisin were combined in the carrot juice, the growth of *L. monocytogenes* was also inhibited and a synergistic effect was observed. The growth was completely inhibited for at least 24 h with a combination of 0.13 µM nisin plus 0.66 mM carvacrol. Similar effects were also found by Periago *et al.* (30) when combining carvacrol and cymene against the growth of *L. monocytogenes* in carrot juice.

## Conclusions

Nisin and carvacrol showed inhibitory effects on *L. monocytogenes* growth. When both antimicrobials were combined, synergistic effects were observed. These synergistic effects were even increased when a heat pretreat-

ment was also applied. These effects were observed in a laboratory medium but also in a food matrix such as carrot juice. These synergisms could be applied in the food industry to prevent the growth of *L. monocytogenes* in processed food exposed to mild heat treatments, intended to provide better quality foods.

## Acknowledgements

This research was financially supported by the Ministry of Science and Technology of the Spanish Government and European Regional Development Fund (ERDF) through Projects AGL-2003-00996 and AGL-2006-10280. M.D. Esteban is grateful to the Ministry of Science and Technology for offering her the fellowship BES 2007 15471.

## References

1. P.S. Mead, L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin, R.V. Tauxe, Food related illness and death in the United States, *Emerg. Infect. Dis.* 5 (1999) 607-625.
2. E.T. Ryser, E.H. Marth: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA (2007).
3. S.I. Dimitrijević, K.R. Mihajlovski, D.G. Antonović, M.R. Milanović Stevanović, D.Ž. Mijin, A study of the synergistic antilisterial effects of a sub lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L., *Food Chem.* 104 (2007) 774-782.
4. T.B. Hansen, S. Knöchel, Factors influencing resuscitation and growth of heat injured *Listeria monocytogenes* 13 249 in sous vide cooked beef, *Int. J. Food Microbiol.* 63 (2001) 135-147.
5. R.W. Jack, J.R. Tagg, B. Ray, Bacteriocins of Gram positive bacteria, *Microbiol. Rev.* 59 (1995) 171-200.
6. L.J. Harris, H.P. Fleming, T.R. Klaenhammer, Developments in nisin research, *Food Res. Int.* 25 (1992) 57-66.
7. U. Schillinger, R. Geisen, W.H. Holzapfel, Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods, *Trends Food Sci. Technol.* 7 (1996) 158-164.
8. A.D. Crandall, T.J. Montville, Nisin resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC700302 is a complex phenotype, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 231-237.
9. J. Delves Broughton, M.J. Gasson: Nisin. In: *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*, V.M. Dillon, R.G. Board (Eds.), CAB International, Wallingford, UK (1994) pp. 99-131.
10. B. Ray: Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as Food Bio preservative. In: *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, B. Ray, M.A. Daeschel (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA (1992) pp. 207-264.
11. A.J. Driessen, H.W. van den Hooven, W. Kuiper, M. van Kamp, H.G. Sahl, R.N. Konings, W.N. Konings, Mechanistic studies of lantibiotic induced permeabilization of phospholipid vesicles, *Biochemistry*, 34 (1995) 1606-1614.
12. F.H. Gao, T. Abee, W.N. Konings, Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase containing proteoliposomes, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 2164-2170.
13. T. Abee, F.M. Rombouts, J. Hungenholtz, G. Guihard, L. Letellier, Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 1962-1968.

14. L.J. Harris, H.P. Fleming, T.R. Klaenhammer, Developments on nisin research, *Food Res. Int.* 25 (1992) 57-66.
15. O.P. Kuipers, H.S. Rollema, W.M.G.J. Yap, H.J. Boot, R.J. Siezen, W.M. de Vos, Engineering dehydrated amino acid residues in the antimicrobial peptide nisin, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 24340-24346.
16. I.E. Pol, E.J. Smid, Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*, *Lett. Appl. Microbiol.* 29 (1999) 166-170.
17. A. Ultee, L.G. Gorris, E.J. Smid, Bactericidal activity of carvacrol towards the food borne pathogen *Bacillus cereus*, *J. Appl. Microbiol.* 85 (1998) 211-218.
18. V. Lagouri, G. Blekas, M. Tsimidou, S. Kokkini, D. Boskou, Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, 197 (1993) 20-23.
19. I.M. Helander, H.L. Alakomi, K. Latva Kala, T. Mattila Sandholm, I. Pol, E.J. Smid, L.G.M. Gorris, A. von Wright, Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3590-3595.
20. B.J. Juven, J. Kanner, F. Schved, H. Weisslowicz, Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents, *J. Appl. Bacteriol.* 76 (1994) 626-631.
21. D.E. Conner: Naturally Occurring Compounds. In: *Antimicrobials in Foods*, P.M. Davidson, A.L. Branen (Eds.), Marcel Dekker, New York, NY, USA (1993) pp. 441-468.
22. G.J.E. Nychas: Natural Antimicrobials from Plants. In: *New Methods of Food Preservation* G.W. Gould (Ed.), Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK (1995) pp. 58-89.
23. J. Sikkema, J.A.M. de Bont, B. Poolman, Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 8022-8028.
24. M.J. Mendoza Yepes, L.E. Sanchez Hidalgo, G. Maertens, F. Marin Iniesta, Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese, *J. Food Safety*, 17 (1997) 47-55.
25. A. Ultee, R.A. Slump, G. Steging, E.J. Smid, Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice, *J. Food Prot.* 63 (2000) 620-624.
26. P.M. Davidson, M.E. Parish, Methods for testing the efficacy of food antimicrobials, *Food Technol.* 43 (1989) 148-155.
27. P.M. Periago, R. Moezelaar, Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*, *Int. J. Food Microbiol.* 68 (2001) 141-148.
28. M. Valero, S. Leontidis, P.S. Fernández, A. Martínez, M.C. Salmerón, Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30 °C, *Food Microbiol.* 17 (2000) 605-612.
29. J. Baranyi, T.A. Roberts, P. McClure, A non autonomous differential equation to model bacterial growth, *Food Microbiol.* 10 (1993) 43-59.
30. P.M. Periago, B. Delgado, P.S. Fernández, A. Palop, Use of carvacrol and cymene to control growth and viability of *Listeria monocytogenes* cells and predictions of survivors using frequency distribution functions, *J. Food Prot.* 67 (2004) 1408-1416.
31. A. Ultee, E.P.W. Kets, E.J. Smid, Mechanism of action of carvacrol on the food borne pathogen *Bacillus cereus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 4606-4610.
32. K. Ettayebi, J. El Yamani, B.D. Rossi Hassani, Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*, *FEMS Microbiol. Lett.* 183 (2000) 191-195.
33. J.E. Ueckert, P.F. ter Steeg, P.J. Coote, Synergistic antibacterial action of heat in combination with nisin and magainin II amide, *J. Appl. Microbiol.* 85 (1998) 487-494.
34. I.E. Pol, W.G.C. van Arendonk, H.C. Mastwijk, J. Krommer, E.J. Smid, R. Moezelaar, Sensitivities of germinating spores and carvacrol adapted vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* to nisin and pulsed electric field treatment, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 1693-1699.
35. L.R. Beuchat: Antimicrobial Properties of Spices and Their Essential Oils. In: *Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation*, V.M. Dillon, R.G. Board (Eds.), CAB International, Wallingford, UK (1994) pp. 167-179.
36. P.M. Periago, A. Palop, P.S. Fernández, Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat treated vegetative cells, *Food Sci. Technol. Int.* 7 (2001) 487-492.
37. P.M. Periago, A. Palop, A. Martínez, P.S. Fernández, Exploring new mathematical approaches to microbiological food safety evaluation: An approach to more efficient risk assessment implementation, *Dairy Food Environ. Sanit.* 22 (2002) 18-23.



#### **5.4. CAPITULO IV: “Efecto combinado effect of nisin, carvacrol and a previous thermal treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella senftenberg*.”**

Este capítulo se corresponde con el siguiente artículo, publicado en la revista Food Science and Thechnology International:

Esteban, M.-D., Aznar, A. Fernández, P.S. y Palop, A. Combined effect of nisin, carvacrol and a previous thermal treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella senftenberg*. Food Science and Thechnology International ,19: 357-364 (2013)



Las bacterias Gram negativas, debido a las características estructurales de su pared celular, con una membrana externa rodeando al peptidoglicano, muestran una mayor resistencia que las Gram positivas frente a los compuestos químicos. Sin embargo, el calor afecta a la integridad de la membrana externa (Boziaris y Adams, 2001), por lo que cabría esperar una mayor sensibilidad de las bacterias Gram negativas a los antimicrobianos al ser sometidas a un tratamiento térmico previo. De hecho, Álvarez et al. (2007) ya observaron un mayor efecto del calor al ser aplicado en presencia de compuestos antimicrobianos.

Por esto, en este capítulo se pretendía realizar un estudio similar al llevado a cabo en el capítulo anterior, pero con una bacteria Gram negativa. El objetivo era determinar si las diferencias fisiológicas existentes entre una bacteria Gram negativa y una Gram positiva afectarían al crecimiento en presencia de antimicrobianos naturales de los supervivientes a un tratamiento térmico. En este caso, como microorganismos de estudio se seleccionó la cepa tipo de *Salmonella* y otra cepa, *Salmonella* Senftenberg, por ser una cepa termorresistente.

Los resultados mostraron que, si bien el tratamiento térmico previo también sensibilizaba a los supervivientes frente a la presencia de antimicrobianos, los efectos en este caso eran solamente aditivos.







# Combined effect of nisin, carvacrol and a previous thermal treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella senftenberg*

María-Dolores Esteban<sup>1</sup>, Arantxa Aznar<sup>1</sup>, Pablo S Fernández<sup>1,2</sup>  
and Alfredo Palop<sup>1,2</sup>

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the combined effect of a previous mild heat treatment (15 min at 55 °C) with the use of antimicrobials, nisin and carvacrol, on the growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella senftenberg*. Natural antimicrobials, alone or combined with a previous mild heat treatment, affected the growth of these two serovars in Tryptone Soy Broth at 37 °C. Increasing concentrations of carvacrol had a significant effect on both growth rate and lag phase duration of both strains. The time to reach stationary phase was almost doubled in the case of *S. enteritidis* when a concentration of 0.77 mM in carvacrol was added. For *S. senftenberg* the effect was smaller. The effect of nisin and of heat, applied individually, was lower for both microorganisms. A combination of 1.2 µM nisin with 0.77 mM carvacrol significantly delayed the growth of heat treated cells, compared to the control without antimicrobials, showing additive effects.

## Keywords

Nisin, carvacrol, *Salmonella*, antimicrobials, combined preservation processes

Date received: 23 January 2012; revised: 13 April 2012

## INTRODUCTION

*Salmonella* is a pathogenic microorganism responsible for one of the most frequent foodborne diseases. *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* are the serovars most frequently involved in food poisoning outbreaks (EFSA, 2012). However, other very high heat-resistant serovars, such as *Salmonella senftenberg* (Mañas et al., 2003; Muñoz-Cuevas et al., 2011), have been involved in different outbreaks (L'Ecuyer et al., 1996; Rushdy et al., 1998).

Food manufacturers and consumers demand additive free, fresher and more natural taste food products while maintaining microbiological safety. This increasing demand could be accomplished by the use of natural antimicrobial systems in combination with mild

heat for preservation of foods. The use of natural antimicrobials for food safety assurance has received increasing attention in the last few years.

Nisin is a bacteriocin that can have bactericidal effects against a broad range of Gram-positive bacteria (Harris et al., 1992; Jack et al., 1995). It permeabilizes the cytoplasmic membrane by forming pores in the membrane, resulting in a rapid efflux of small molecules (Crandall and Montville, 1998; Delves-Broughton and Gasson, 1994; Ray, 1992). Nisin is Generally Recognized As Safe (GRAS status) and is the only bacteriocin that has been approved by the World Health

<sup>1</sup>Departamento Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, Spain

## Corresponding author:

Alfredo Palop, Departamento Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Spain.  
Email: alfredo.palop@upct.es

Organization (WHO) as a food preservative and is currently permitted in over 50 countries (Harries et al., 1992). Typical concentrations of nisin (2.5 to 12.5 ppm) are used by the food industry (Delves-Broughton et al., 1992).

Many herbs and spices have been used for millennia to provide distinctive flavors, but they also exhibit antimicrobial activity (Ultee et al., 1998). Carvacrol is a phenolic compound present in the essential oil fraction of *Origanum* (Lagoury et al., 1993), commonly known as oregano. These sort of phenolic compounds are hydrophobic and their primary site of toxicity is the membrane (Helander et al., 1998; Juven et al., 1994). Carvacrol is a GRAS flavoring and it is typically used in the minimum concentration required to produce the intended effect. In practice, carvacrol is added to different products, e.g. baked goods (15.75 ppm), nonalcoholic beverages (28.54 ppm), or chewing gum (8.42 ppm) (Ultee et al., 1998, 2000).

By combining nisin with plant essential oils, the restrictions in the use as food preservatives might be overcome and the range of application could be expanded. Since both compounds act on the cytoplasmic membrane an additive or synergistic effect at lower dosage of both compounds would be necessary to cause an inhibitory effect (Pol and Smid, 1999). The synergistic antimicrobial effect of nisin and carvacrol has been observed before on *Listeria monocytogenes* (Esteban and Palop, 2011; Pol and Smid, 1999) and *Bacillus cereus* (Periago and Moezelaar, 2001; Periago et al., 2001; Pol and Smid, 1999). The effect of a previous heat treatment on the sensitivity of *B. cereus* and *L. monocytogenes* to antimicrobials has also been investigated (Periago and Moezelaar, 2001; Periago et al., 2001). Esteban and Palop (2011) showed that the survivors of *L. monocytogenes* cells to a previous heat treatment, which were able to grow at the same rate than native cells when cultured without antimicrobials, increased largely their sensitivity to nisin and carvacrol when applied together.

Gram-negative bacteria are somehow protected against this sort of antimicrobials because of the outer membrane of their cell wall, which covers the cytoplasmic membrane and peptide-glycan layer acting as a barrier against hydrophobic macromolecules (Holey and Patel, 2005). However, heat is known to disrupt the outer membrane of these bacteria (Bozaris and Adams, 2001), and an additive or even synergistic effect could be expected when combining these agents. Alvarez et al. (2007) showed that *Salmonella* cells were more rapidly inactivated by irradiation and heat when treated in presence of nisin and carvacrol. These authors studied the simultaneous effect of heat and antimicrobials, but they did not test the growth of the survivors in presence of

antimicrobials. When antimicrobials are added to heat treated foods, they may show their effect during the thermal treatment but also afterwards, during the storage of these products. However, the growth in the presence of nisin and carvacrol of *S. enteritidis* and *S. senftenberg* cells surviving to a thermal treatment has not been studied. Survivors after heating could be somehow damaged (Arroyo et al., 2009), and this damage could affect the growth under stressful conditions, such as those imposed by the presence of antimicrobials in the growth medium. The aim of this study was to evaluate the combined effect of a previous heat treatment with the use of antimicrobials, nisin and carvacrol, on the growth of *S. enteritidis* and *S. senftenberg*. These data could be useful for food processors to ensure the safety along the shelf-life of heat-treated foods.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains and culture conditions

The strains of *Salmonella enterica* serovar Senftenberg (CECT 4565, ATCC 43845) and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (CECT 4300, ATCC 13076, type strain) used in this study were supplied by the Spanish Type Culture Collection (CECT). During this investigation they were maintained on slants of Tryptic Soy Agar (TSA) (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) supplemented with 0.6% (w/v) yeast extract (Scharlau Chemie) (TSAYE) at 4 °C. *S. enteritidis* type strain was chosen as a reference strain of this species and *S. senftenberg* because it is a well-known heat-resistant strain.

Cultures were grown at 37 °C in Tryptone Soy Broth (Scharlau Chemie) supplemented with 0.6% (w/v) yeast extract (TSBYE) as described elsewhere (Esteban and Palop, 2011).

### Chemicals

Nisin (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) and carvacrol (Sigma Aldrich Chemie) stock solutions (0.3 mM and 0.5 M, respectively) were made in 95% ethanol and stored at 4 °C.

### Heat treatment

A previous heat treatment of 15 min at 55 °C was selected as it resulted in three log reductions of *S. enteritidis* cells and in one log reduction of *S. senftenberg* (data not shown). This heat treatment was applied to the culture (~10<sup>9</sup> CFU/mL) grown in TSBYE for approximately 18 h at 37 °C, in this same medium, by placing the test tubes in a preheated water bath (Frimengruppe Press-Daimier, Dresden, Germany).

## Growth curves of *S. senftenberg* and *S. enteritidis* in TSBYE broth

The effect of nisin and carvacrol, individually and combined, on the growth of *S. senftenberg* and *S. enteritidis* suspended in TSBYE at 37°C was studied. Controls without the addition of natural compounds but with the same concentration of ethanol (up to 18 µL ethanol/mL TSBYE broth) were prepared. Both suspensions, control and pre-heated cells, were exposed to different concentrations of nisin (0.13, 0.26, 0.39 and 1.2 µM) or carvacrol (0.11, 0.33, 0.55 and 0.77 mM) alone and to combinations of both compounds (1.2 µM nisin + 0.77 mM carvacrol). These concentrations of antimicrobials only produce slight changes in colour (less than 0.1 optical density units) and odor. The natural compounds were added to the growth medium prior to the inocula (10<sup>3</sup> CFU/mL). When pre-heated cells were assayed, a similar concentration of viable cells was added to the tubes with the antimicrobials just after the heat treatment.

The growth at 37°C was estimated through absorbance measurements in microtiter plates at 420–580 nm in a Bioscreen C analyzer running under the low shaking mode (Lab Systems, Helsinki, Finland). The individual and combined effect of each factor (heat treatment and incubation with carvacrol and nisin) on the growth of both serovars was observed.

Growth curves were obtained by plotting the absorbance against exposure time, using the method of Smelt et al. (2002) to convert Optical Density readings (OD) into estimated lag phase (equation (1)). As suggested by these authors, the following assumptions were made to estimate real lag times from growth curves obtained from OD measurements. Lag time is considered as the time needed for cells to adapt to the new environmental conditions and divide into two daughter cells. After division, cells were considered to be growing immediately at maximum growth rate,  $\mu_{\max}$ . Generation time ( $g_t$ ) was calculated for the different antimicrobials and concentrations tested. The first signs of turbidity were observed when the number of cells was 10<sup>6</sup>, which corresponded to 9.97 generations ( $Ng$ ). Thus, the true lag time ( $\lambda_t$ ) was calculated as

$$\lambda_t = t_t - (g_t * Ng) \quad (1)$$

where  $t_t$  is the time when first signs of turbidity appeared.

OD readings were performed twice per hour until the stationary phase of growth was reached. The growth curves were fitted with the function of Baranyi (Baranyi et al., 1993; equation (2)) in order to obtain

the main growth parameters (i.e. specific growth rate and lag time).

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} * A(t) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m\mu_{\max}A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad (2)$$

where  $y(t)$  denotes the OD of the culture,  $y_0$  denotes the initial OD,  $m$  is a curvature parameter to characterise the transition of the exponential growth phase to the stationary growth phase,  $\mu_{\max}$  denotes the maximum growth rate and  $y_{\max}$  the maximum OD.  $A(t)$  plays the role of a gradual delay on time to describe the transition of the lag phase to the exponential growth phase (equation (3))

$$A(t) = t + \frac{1}{v} \ln(e^{-vt} + e^{h_0} - e^{-vt - h_0}) \quad (3)$$

where  $v$  is another curvature parameter to characterise the transition of the lag phase to the exponential growth phase and  $h_0$  is a parameter to characterise the physiological state of the cells.

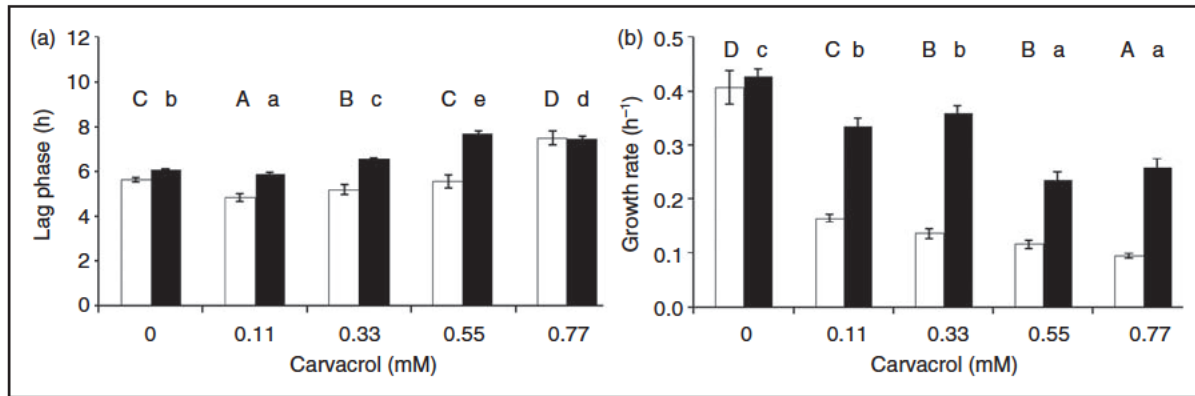
## Data analysis

Analysis of variance and Duncan's multiple range test were done using the statistic program Statgraphics v. Plus 5.1 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Differences between lag phase duration and growth rate were considered significant when  $p \leq 0.05$ . The experiments were replicated three times for each treatment.

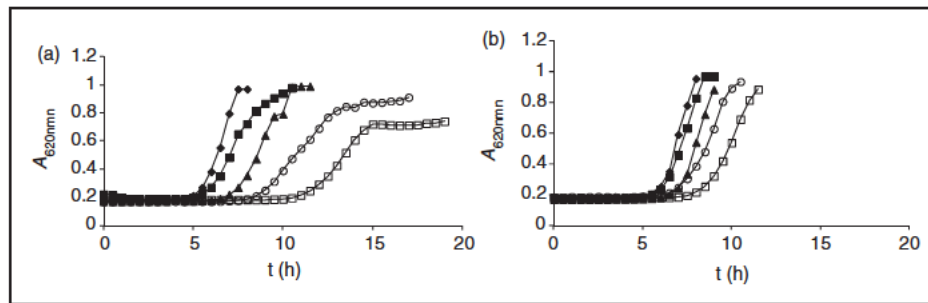
## RESULTS

### Effect of nisin and carvacrol on the growth of *S. senftenberg* and *S. enteritidis*

Increasing concentrations of carvacrol had a significant effect on both growth rate and lag phase duration of *S. enteritidis* and *S. senftenberg* (Figure 1). The effect on the lag phase was significant in both serovars tested (Figure 1(a)), being increased in 2 h approximately at the maximum concentration tested, 0.77 mM. The effect on the growth rate was different for both serovars (Figure 1(b)). In the case of *S. enteritidis*, a concentration of 0.11 mM carvacrol reduced the growth rate to less than half its original value, from  $0.40 \pm 0.03$  to  $0.17 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$ , and when the concentration of carvacrol was increased up to 0.77 mM the growth rate was further decreased to  $0.09 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$ . For *S. senftenberg* the effect was smaller, with 0.77 mM carvacrol reducing growth rate from  $0.43 \pm 0.01$  to  $0.26 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ . Controls without the addition of carvacrol but with the same concentration of ethanol grew at a similar rate than the control without ethanol, so the



**Figure 1.** Lag phase (a) and growth rate (b) in tryptone soy broth supplemented with 0.6% yeast extract (TSBYE) at 37 °C in presence of different concentrations of carvacrol (□: *Salmonella enteritidis*; ■: *Salmonella senftenberg*). Same capital letters indicate that there are no significant differences between growth parameters of *Salmonella enteritidis*. Same lower case letters indicate that there are no significant differences between growth parameters of *Salmonella senftenberg*.



**Figure 2.** Growth curves of *Salmonella enteritidis* (a) and *Salmonella senftenberg* (b) in tryptone soy broth supplemented with 0.6% yeast extract (TSBYE) at 37 °C in different conditions (◆: control; ■: 1.2 μM nisin; ▲: previous heat treatment 15 min at 55 °C; ○: 0.77 mM carvacrol; ◇: heat treatment + 1.2 μM nisin + 0.77 mM carvacrol).

antimicrobial effect could not be attributed to the presence of ethanol (data not shown).

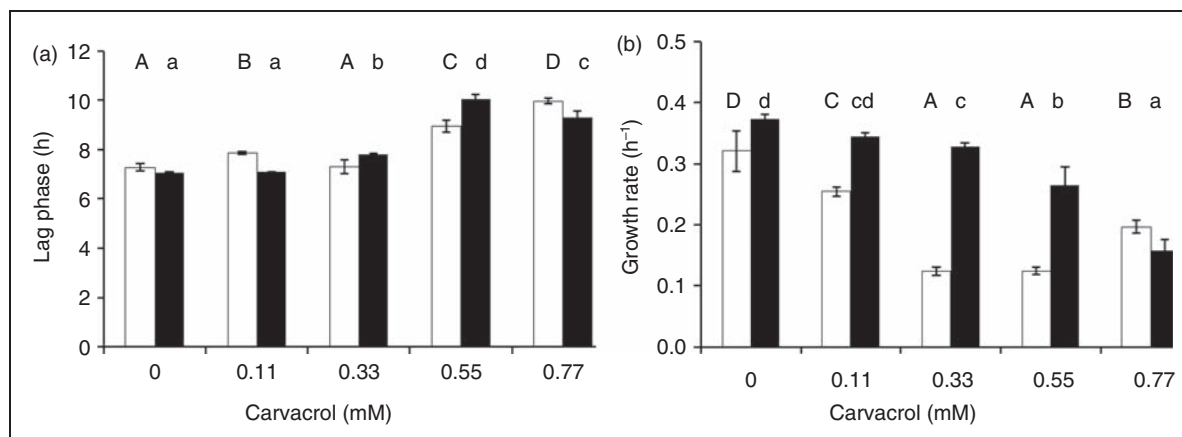
The overall effect of the maximum concentration of carvacrol tested (0.77 mM) on the whole growth curve of both strains of *Salmonella* can be seen in Figure 2. The time to reach stationary phase (i.e. approximately 0.9 absorbance units) was almost doubled, from 7 to 15 h, in the case of *S. enteritidis* (Figure 2(a)) but only increased in approximately 2 h for *S. senftenberg* (Figure 2(b)) when the control was compared with the growth in presence of 0.77 mM carvacrol.

The effect of nisin was lower for both microorganisms, with no significant differences in the lag phase compared to the control, whereas there were significant differences in the growth rate at the highest level tested, at a concentration of 1.2 μM (Figure 2). At this concentration (1.2 μM nisin), the growth rate was reduced from  $0.40 \pm 0.03$  to  $0.17 \pm 0.008$  h<sup>-1</sup> for *S. enteritidis*. Again, the effect was smaller for *S. senftenberg*, with the growth rate being reduced from  $0.43 \pm 0.01$  to  $0.33 \pm 0.02$  h<sup>-1</sup>. Again, controls without the addition

of nisin but with the same concentration of ethanol grew at a similar rate than the control without ethanol (data not shown). The combination of both nisin and carvacrol, at the same concentrations tested, had additive effects on the growth of both serovars of *Salmonella* (data not shown).

### Effect of a previous heat treatment on the growth of *S. senftenberg* and *S. enteritidis*

*Salmonella* cells grown in TSBYE at 37 °C were exposed to a thermal treatment for 15 min at 55 °C. When *S. enteritidis* heat-treated cells were grown in TSBYE at 37 °C just after the thermal treatment, the growth rate was decreased from  $0.40 \pm 0.03$  to  $0.32 \pm 0.03$  h<sup>-1</sup> and the lag phase increased from  $5.64 \pm 0.08$  h to  $7.27 \pm 0.15$  h, with an overall effect on the growth curve of an increase in the time to reach full growth of approximately 3 h (Figure 2(a)). In the case of *S. senftenberg* the effect was again smaller, with the growth rate not being significantly different ( $p \leq 0.05$ )



**Figure 3.** Lag time (a) and growth rate (b) in tryptone soy broth supplemented with 0.6% yeast extract (TSBYE) at 37 °C after a thermal treatment of 55 °C/15 min in presence of different concentrations of carvacrol (□ :*Salmonella enteritidis*; ■ :*Salmonella senftenberg*). Same capital letters indicate that there are no significant differences between growth parameters of *Salmonella enteritidis*. Same lower case letters indicate that there are no significant differences between growth parameters of *Salmonella senftenberg*.

from that obtained with the cells not exposed to a previous heat treatment and the lag phase being increased in only 1 h (Figure 2(b)).

#### Effect of nisin and carvacrol on the growth of heat-treated *S. senftenberg* and *S. enteritidis*

The effect of carvacrol on the growth of heat-treated cells of both serovars of *Salmonella* was not significantly different from its effect on the growth of unheated cells (Figure 3). Again, lag phase was increased in approximately 2 h at the maximum concentration tested (0.77 mM) for both serovars. The growth rate of heat-treated *S. enteritidis* cells was reduced to almost one-third (from  $0.32 \pm 0.03$  to  $0.12 \pm 0.06$  h<sup>-1</sup>) when 0.33 mM carvacrol was added to the growth medium. However, a further increase in the carvacrol concentration did not mean a decrease in the growth rate. In the case of heat-treated cells of *S. senftenberg*, the growth rate was decreased from  $0.37 \pm 0.007$  to  $0.16 \pm 0.02$  h<sup>-1</sup> when 0.77 mM carvacrol was added to the growth medium.

The combination of all three treatments, nisin, carvacrol and a previous heat treatment, had additive effects on the growth of both serovars of *Salmonella* (Figure 2). The lag phase was further increased and the growth rate further decreased showing, for both serovars, the slowest growth. This can contribute to a control strategy against *Salmonella* growth, and it should be taken into account that the incubation factors for growth after the thermal treatment (incubation temperature, nutrients and pH) were optimal for its growth in our study, so it can be considered as a worst-case-scenario.

## DISCUSSION

The addition of carvacrol to the growth medium had a significant effect on the growth of both strains of *Salmonella* tested. Carvacrol is known to increase the permeability of the cytoplasmic membrane and to decrease the activity of the enzymatic systems, including those involved in energy production and structural component synthesis will be affected (Conner, 1993; Nychas, 1995; Sikkema et al, 1994). A critical concentration of the compound is needed to cause leakage of cellular constituents (Mendoza-Yepes et al., 1997). Periago et al. (2004) found that increasing concentrations of carvacrol had significant effects on the growth of *L. monocytogenes*. However, Gram-negative bacteria are naturally resistant to these antimicrobials because of the protective effect of the outer membrane (Holey and Patel, 2005). Still, Burt et al. (2007) found a similar dose-dependent effect of carvacrol on the growth of *S. enteritidis*. Our results did not show such a dose-dependent effect in none of the serovars studied, although there was a trend in delaying growth when increasing concentration of carvacrol in both serovars.

Our results showed a scarce, although significant effect ( $p \leq 0.05$ ) of 1.2 μM nisin on the growth of both serovars of *Salmonella*. The low effect of nisin on the growth of *Salmonella* spp. has already been described in other reports (Rattanachaiakunsopon and Phumkhachorn, 2010), and it is probably due to the protection conferred by the outer membrane of Gram-negative bacteria (Helander and Mattila-Sandholm, 2000).

Since nisin and carvacrol act on the cytoplasmic membrane, an additive or synergistic effect of both compounds could have been expected. A synergistic antimicrobial effect of nisin and carvacrol has been observed before *in vitro* on *L. monocytogenes* and *B. cereus* (Periago and Moezelaar, 2001; Periago et al., 2001; Pol and Smid, 1999) and in carrot juice on *L. monocytogenes* (Esteban and Palop, 2011). However, the combination of nisin with carvacrol did not lead to increased significant effects on the growth of both serovars of *Salmonella*. The lack of synergism in the growth of *Salmonella* serovars could be easily explained, again, in terms of the protective effect of the outer membrane. Actually, these two antimicrobials are mainly used against Gram-positive bacteria (Burt et al., 2007; Rattanachaiakunsopon and Phumkhachorn, 2010).

When nisin has been applied together with other treatments altering the outer membrane of Gram-negative bacteria, their growth has been inhibited. *Salmonella* species treated with the chelating agent EDTA become sensitive to nisin (Stevens et al., 1991). Treatment with trisodium phosphate increased the nisin sensitivity of *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas fluorescens* and *Salmonella* enteritidis (Carneiro de Melo et al., 1998). It has been shown that a mild thermal treatment of 55 °C for 10 min is also able to disrupt the outer membrane of Gram-negative bacteria (Bozariis and Adams, 2001), enabling chemical compounds to reach peptide-glycan and cytoplasmic membrane and, as a consequence, a synergistic reduction of *Salmonella* population in samples containing 2500 IU nisin/mL while heating (Bozariis et al., 1998). Álvarez et al. (2007) also found a synergistic reduction of *Salmonella* population in samples containing 100 IU nisin/mL and 0.5 mM carvacrol. But these authors applied the antimicrobials in the heating media, during the thermal treatments at 57 °C and 60 °C. In our experiments the thermal treatment was applied just before growth in presence of carvacrol and nisin. This thermal treatment was supposed to sensitise the surviving microorganisms against the antimicrobials, leading then to synergistic effects. In this sense Arroyo et al. (2009) found a great proportion of heat injured cells after the application of a thermal treatment. However, the results showed that the combination only had an additive effect on the growth of both serovars of *Salmonella*. Actually, Arroyo et al. (2011) found a great complexity on the adaptative responses depending on the stress applied, leading to the protective, sensitizing or even no effect. Then, an adaptive response of the survivors of the thermal treatment could have lead to the development of higher resistance to the antimicrobials, explaining the lack of synergism. In fact, other authors have found development of cross-

resistance to nisin after a mild heat treatment in *B. cereus* vegetative cells (Periago et al., 2001). Heat shock proteins may be involved in the cross-protective effect (Periago et al., 2002) and could have diminished the extent of the combined effect. However, Lee et al. (2002) found that a concentration of 100 IU/mL nisin significantly inhibited the growth of *E. coli* previously heated at 50 °C for 15 min and similar experiments have shown a synergistic effect of a previous heat treatment on the sensitivity of the Gram-positives *B. cereus* and *L. monocytogenes* to antimicrobials (Esteban and Palop, 2011; Periago and Moezelaar, 2001).

The effect on growth of carvacrol, nisin and a previous heat treatment was different on both serovars of *Salmonella*. Differences in the resistance to heat, acid or hydrogen peroxide have been found even among different isolates of the same phage type 4 of *S. enteritidis* (Humphrey et al., 1995). *S. senftenberg* was, in general, less sensitive to all three antimicrobial agents. *S. senftenberg* is the most heat-resistant serovar of the genus *Salmonella* (Metrick et al., 1989). This fact could suggest similar resistance mechanisms against both carvacrol and heat. Analogous relationships between heat and pulse electric field resistance mechanisms were found by Álvarez et al. (2003). The behavior of different strains is important to establish the potential risk and its variability to establish processing conditions.

The combination of a previous thermal treatment with the presence of carvacrol and nisin could be a feasible alternative to increase the microbial safety of processed foods. This is relevant from a processing point of view, where the preservation factors present or applied to the food have to be studied in depth to avoid food safety concerns. New combinations (low temperature, other compounds, etc.) should be studied in future research for efficient preservation strategies. Also, experiments in food systems appropriate for the application of these natural antimicrobial compounds should be conducted in order to observe if the additive effects are still kept.

## CONCLUSIONS

In summary, our results show a trend in delaying growth when increasing concentration of carvacrol in both microorganisms. The individual effect of nisin was lower and only significant at the highest concentration tested. Heat also had a rather low effect. The combined effect of these three treatments were additive on both serovars of *Salmonella*. These results can be considered as a worst-case-scenario in terms of bacterial growth, since all the conditions for growth after the thermal treatment, except those being tested, were optimal. In food products, where suboptimal conditions for

growth usually take place (i.e. low pH, lower temperature, etc.) further growth inhibition could be expected.

## FUNDING

This research was financially supported by the Ministry of Science and Technology of the Spanish Government and European Regional Development Fund (ERDF) through Projects AGL 2010 19775 and 08795/PI/08 from Fundacion Seneca.

## ACKNOWLEDGMENTS

M. D. Esteban is grateful to the Ministry of Science and Technology for offering her the fellowship BES 2007 15471.

## REFERENCES

- Álvarez I, Mañas P, Condón S and Raso J. (2003). Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. *Journal of Food Science* 68: 2316 2320.
- Álvarez I, Niemira BA, Fan X and Sommers CH. (2007). Inactivation of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Senftenberg in liquid whole egg using generally recognize as safe additives, ionizing radiation, and heat. *Journal of Food Protection* 70: 1402 1409.
- Arroyo C, Cebrián G, Condón S and Pagán R. (2011). Development of resistance in *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 to thermal and nonthermal processes after exposure to stressing environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology* 112: 561 570.
- Arroyo C, Condón S and Pagán R. (2009). Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii*. *International Journal of Food Microbiology* 136: 110 118.
- Baranyi J, Roberts TA and McClure P. (1993). A non autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* 10: 43 59.
- Boziaris IS and Adams MR. (2001). Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. *Journal of Applied Microbiology* 91: 715 724.
- Boziaris IS, Humpheson L and Adams MR. (1998). Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT4. *International Journal of Food Microbiology* 43: 7 13.
- Burt SA, Fledderman MJ, Haagsman HP, van Knapen F and Veldhuizen EJA. (2007). Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour. *International Journal of Food Microbiology* 119: 346 350.
- Carneiro de Melo AMS, Cassar CA and Miles RJ. (1998). Trisodium phosphate increases sensitivity of Gram negative bacteria to lysozyme and nisin. *Journal of Food Protection* 61: 839 844.
- Conner DE. (1993). Naturally occurring compounds. In: PM Davison and AL Branen (eds) *Antimicrobials in Foods*. New York: Marcel Dekker, pp. 441 468.
- Crandall AD and Montville TJ. (1998). Nisin resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC70302 is a complex phenotype. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 231 237.
- Delves Broughton J and Gasson MJ. (1994). Natural antimicrobial systems for food preservation. In: Dillon VM and Board RG (eds) *Natural Antimicrobial Systems for Food Preservation*. Wallingford: Cab International, pp. 99 131.
- Delves Broughton J, Williams GC and Wilkinson S. (1992). The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in pasteurized liquid whole egg. *Letters in Applied Microbiology* 15: 133 136.
- Esteban MD and Palop A. (2011). Nisin, carvacrol and their combinations against the growth of heat treated *Listeria monocytogenes* cells. *Food Technology and Biotechnology* 49: 89 95.
- European Food Safety Authority. (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10: 2597 3039.
- Harris LJ, Fleming HP and Klaenhammer TR. (1992). Developments in nisin research. *Food Research International* 25: 57 66.
- Helander IM and Mattila Sandholm TM. (2000). Permeability barrier of the Gram negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *International Journal of Food Microbiology* 60: 153 161.
- Helander IM, Alakomi HL, Kyösti LK, Mattila Sandholm T, Pol IE, Smid EJ, et al. (1998). Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 3590 3595.
- Holey RA and Patel D. (2005). Improvement in shelf life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22: 273 292.
- Humphrey TJ, Slater E, McAlpine K, Rowbury RJ and Gilbert RJ. (1995). *Salmonella* enteritidis phage type 4 isolates more tolerant to heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3161 3164.
- Jack RW, Tagg JR and Ray B. (1995). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 59: 171 200.
- Juven BJ, Kanner J, Schved F and Weisslowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituent. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 626 631.
- Lagouri V, Blekas G, Tsimidou M, Kokkini S and Boskou D. (1993). Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece. *Z Lebensmittel Untersuchung und Forschung A* 197: 20 23.
- L'Ecuyer PB, Diego J, Murphy D, Trovillion E, Jones M, Sham DF, et al. (1996). Nosocomial outbreak of gastroenteritis due to *Salmonella* Senftenberg. *Clinical Infectious Diseases* 23: 734 742.
- Lee JI, Lee HJ and Lee MH. (2002). Synergistic effect of nisin and heat treatment on the growth of *Escherichia coli* 0157:H7. *Journal of Food Protection* 65: 408 410.
- Mañas P, Pagán R, Álvarez I and Condón S. (2003). Survival of *Salmonella senftenberg* 775 W to current liquid whole egg pasteurization treatments. *Food Microbiology* 20: 593 600.

- Mendoza Yepes MJ, Sanchez Hidalgo LE, Maertens G and Marin Iniesta F. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety* 17: 47-55.
- Metrick C, Hoover DG and Farkas DF. (1989). Effects of high hydrostatic pressure on heat resistant and heat sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science* 54: 1547-1549.
- Muñoz Cuevas M, Metris A and Baranyi J. (2011). Predictive modelling of *Salmonella*: from cell cycle measurements to models. *Food Research International* DOI:10.1016/j.foodres.2011.04.033.
- Nychas GJE. (1995). Natural antimicrobials from plants. In: Gould GW (ed.) *New Methods of Food Preservation*. London: Blackie Academic Professional, pp. 58-89.
- Periago PM and Moezelaar R. (2001). Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 68: 141-148.
- Periago PM, Delgado B, Fernández PS and Palop A. (2004). Use of carvacrol and cymene to control growth and viability of *Listeria monocytogenes* cells and predictions of survivors using frequency distribution functions. *Journal of Food Protection* 67: 1408-1416.
- Periago PM, Palop A and Fernández PS. (2001). Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat treated vegetative cells. *Food Science and Technology International* 7: 487-492.
- Periago PM, van Schaik W, Abee T and Wouters JA. (2002). Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3486-3495.
- Pol IE and Smid EJ. (1999). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 29: 166-170.
- Rattanachaikunsopon P and Phumkhachorn P. (2010). Synergistic antimicrobial effect of nisin and  $\rho$ -cymene on *Salmonella enterica* serovar Thiphya *in vitro* and ready to eat food. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 74: 520-524.
- Ray B. (1992). Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as food biopreservative. In: Ray B and Daeschel MA (eds) *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. Boca Raton: CRC Press, pp. 207-264.
- Rushdy AA, Stuart JM, Ward LR, Bruce J, Threlfall EJ, Punia P, et al. (1998). National outbreak of *Salmonella* Senftenberg associated with infant food. *Epidemiology and Infection* 120: 125-128.
- Sikkema J, de Bont JA and Poolman B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269: 8022-8028.
- Smelt JPPM, Otten GD and Bos AP. (2002). Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology* 73: 207-212.
- Stevens KA, Klapes NA, Sheldon BW and Klaenhammer TR. (1991). Nisin treatment for the inactivation of *Salmonella* species and other Gram negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3613-3615.
- Ultee A, Gorris LGM and Smid EJ. (1998). Bactericidal activity of carvacrol towards the food borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology* 85: 211-218.
- Ultee A, Slump RA, Stering G and Smid EJ. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection* 63: 620-624.



## **5.5. CAPITULO V: “Evaluación de la viabilidad de *Listeria monocytogenes* expuesta a calor y antimicrobianos naturales mediante citometría de flujo”**

Este capítulo se corresponde con el siguiente artículo, que está siendo preparado para su envío a una revista incluida en el Science Citation Index:

Esteban, M.-D., Ros-Chumillas, M., Huertas, J.P. y Palop, A. Assesment of viability of *Listeria monocytogenes* exposed to heat and natural antimicrobials by flow cytometry.



Además de conocer el efecto de los distintos agentes antimicrobianos investigados, así como de sus combinaciones, sobre distintos microorganismos, y de poder cuantificarlos y predecirlos mediante el empleo de diferentes modelos matemáticos, otro de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral era el de tratar de desvelar los mecanismos de acción de dichos agentes. Para ello se disponía de la técnica de la citometría de flujo que, junto con el empleo de fluorocromos, permite distinguir entre subpoblaciones de microorganismos según su estado fisiológico. El estudio se planteó sobre las células vegetativas de *Listeria monocytogenes* y de *Salmonella* sometidas a tratamientos térmicos en presencia o no de compuestos antimicrobianos, si bien en este capítulo únicamente se exponen aquellos resultados obtenidos con la primera especie.

Los resultados mostraron mecanismos de acción netamente distintos para el calor y para los compuestos antimicrobianos. Mientras que en el caso de los antimicrobianos, nisina y carvacrol, se podía correlacionar el porcentaje de células dañadas (evidenciadas mediante citometría de flujo) con el descenso de los recuentos en placa, en el caso del tratamiento térmico, dicho descenso de los recuentos no se acompañaba del correspondiente aumento de células dañadas. En cualquier caso, estos resultados ponen de manifiesto la utilidad de la citometría de flujo como técnica rápida que permite, además de cuantificar poblaciones, detectar diferencias en los mecanismos de acción.



# Assessment of viability of *Listeria monocytogenes* exposed to heat and natural antimicrobials by Flow Cytometry

Maria-Dolores Esteban<sup>1</sup>, María Ros-Chumillas<sup>1</sup>, Juan-Pablo Huertas<sup>1</sup> and Alfredo Palop<sup>1,2\*</sup>

Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Campus de Excelencia Internacional Regional "Campus Mare Nostrum", Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, Murcia, Spain

---

## ABSTRACT

Flow cytometry (FCM) analysis provides high-speed information at real time on damage at single cell level. The application of mild inactivation treatments follows with the addition of nisin and carvacrol on exponential and stationary *Listeria monocytogenes* cells. The aim of this research was to explore the effect of the combination of nisin and/or carvacrol with a previous heat treatment in stationary and exponential cells. Experiments were carried out in a flow cytometry and cells labelled with a Backlight kit containing SYTO9 and propidium iodide (PI). This dual stained allows us to know the mode of action of different treatments. The FCM analyses were in agreement with classical viable plate count, although were not directly correlated. *Listeria monocytogenes* heat-treated and recovery in TSA supplemented with NaCl shown a sublethal injury.

---

## 1. Introduction

Several foodborne disease outbreaks, which have caused severe and often fatal infections in susceptible human hosts, have been linked to *Listeria monocytogenes* (Ryser & Marth, 2007). Heat inactivation is one of the most frequently used preservation techniques to extend the shelf life of food products. Lately, an increased interest in mild heat treatments is observed because the consumers' demand for higher quality food products. Moreover, these products should be free of chemical additives. *L. monocytogenes* is one of the most heat-resistant non-spore-forming pathogenic microorganisms present in food (Hansen & Knøchel, 2001). In order to decrease the intensity of thermal treatments, combined processes, such as those consisting in the application of a mild heat treatment previous to the addition of natural antimicrobials, have been studied (Esteban & Palop, 2011). Traditionally, the determination of the impact of these treatments on microorganisms was assessed through

the use of viable plate count methods. In these methods viability is defined as the ability to reproduce and form a visible colony. Nevertheless, this classic culture technique does not give any information about the changes induced on cellular integrity or metabolic activities as well as differences in a population (Ananta & Knorr, 2009). Flow cytometric analysis is a very valuable method, which enables simultaneous evaluation of multiple cellular parameters, both structural and functional, on microorganisms. Flow cytometry is a rapid technique that has been applied for evaluating biological threats, water cleanliness, processed meat hygiene or the efficacy of antiseptics or bacteriocins (Berney, Weilenmann, Ihssen, Bassin & Egli, 2006a; Berney, Weilenmann, Simonetti & Egli, 2006b; Boulos, Prevost, Barbeau, Coallier & Desjardins, 1999). Flow cytometric methods for assessing cell viability frequently use one or more fluorescent probes for parameters such

as membrane integrity, enzymatic activity, nucleic acid content, and membrane potential. In general, two or more probes are used simultaneously. It is desirable to combine a probe that is positive for a vital parameter (e.g. enzymatic activity) with one that is negative for another (e.g. membrane integrity) (Hernlem & Hua, 2010).

*BacLight* is a mixture of two stains, propidium iodide (PI), which is a red intercalating stain that is membrane impermeant and is therefore excluded by healthy cells, binding only dead cells, and SYTO 9, which is a green intercalating membrane permeant stain and will stain all cells, provided they contain nucleic acid. The manufacturers argue that, when the two stains are present within a cell, PI has a stronger affinity for nucleic acid than SYTO9, which will be displaced from nucleic acid and the cells will fluoresce in red (Stocks, 2004). When *BacLight* is compared to traditional viable plate count methods, good correlations are frequently found, at least for single species (Berney, et al., 2006a; Boulos, et al., 1999). Moreover, it can advantageously report viable but non-culturable cells as live and therefore correctly identifies them as potentially harmful (Rigsbee, Simpson, & Oliver, 1997)

The aim of this study was to assess, by means of flow cytometry, the viability of stationary and exponential heat-treated *Listeria monocytogenes* cells subsequently exposed to different concentrations of nisin and/or carvacrol.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains and culture conditions

The strain used in this experiment was *Listeria monocytogenes* Scott A NCTC

11994 kindly supplied by Institute of Food Research. For stationary cells a loop of the deep frozen glycerol tube was taken and transferred into a 5 mL Tryptic Soy Broth with 0.6% of yeast extract (TSBYE) (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain), and incubated for 6-8 hours at 37°C. From this culture 50 µL were subcultured in 50 mL of TSBYE in a 250 mL Erlenmeyer culture flask at 37°C (200 rpm) for 18 h. After this incubation time, cells were at their stationary phase of growth, at a final concentration of approximately  $10^9$  cells/mL. For exponential cells, 100 µL from the overnight culture were transferred into 50 mL into a TSBYE 250 mL Erlenmeyer culture flask at 37°C (200 rpm) for 3 h. After this incubation time, cells were at their exponential phase of growth, at a concentration of approximately  $10^6$  cells/mL. Working cultures were then aliquoted, one of which served as the nonthermal control culture and the other was subjected to a heat treatment.

To prepare the samples for flow cytometry analyses, both cultures, stationary and exponential, were centrifuged at 3500 rpm twice and washed with phosphate buffered saline (PBS; Panreac, Barcelona, Spain). For stationary cells, the first time, the pellet was resuspended in the same volume of PBS (50 mL) and the second one in 2 mL of PBS and put on ice before being used. 250 µL of this suspension was added to 50 mL of PBS at a final O.D.<sub>680nm</sub> of 0.2, which corresponds to a final concentration of approx.  $10^6$  cfu/mL. For exponential cells, the pellet was resuspended both times in the same volume of PBS (50 mL) with a final O.D.<sub>680nm</sub> of 0.2, which corresponds to a final concentration of  $10^6$  cfu/mL.

### 2.2. Chemicals

Nisin and carvacrol (both from Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) stock solutions (0.3 mM and 0.5 M, respectively) were made in 95 % ethanol and stored at 4 °C.

### 2.3. Heat treatment

A previous mild heat treatment of 15 min at 55 °C was selected as it results in a sublethal injury. This heat treatment was applied to both, stationary and exponential cultures, grown in TSBYE at 37 °C, by placing the test tube in a preheated water bath (Frimengruppe Press- Daimier, Dresden, Germany). Plate counts in Tryptic Soy Agar (TSA) (Scharlau Chemie) of the appropriate dilutions in buffered peptone water (BPW) (Scharlau Chemie) were performed before and after the thermal treatment, in order to check the extent of the achieved inactivation. Plates were incubated for 48 h at 37 °C.

### 2.4. Effect of antimicrobials in the destruction of *L. monocytogenes*

The different concentrations of antimicrobial tested (0.13 µM nisin, 0.66 mM carvacrol and 0.13 µM nisin + 0.66 mM carvacrol ) were added to 5 mL PBS of 10<sup>6</sup> cfu/mL each culture, stationary or exponential, heat treated or not and were incubated at room temperature for 15 minutes.

### 2.5. Flow cytometry

Flow cytometry (FCM) was used to assess antilisterial activity of nisin and carvacrol and their possible additive or synergistic effect when they were combined and the influence of a previous heat treatment.

Cells of *L. monocytogenes* pre-heated or not, placed in 5 mL PBS tubes after being incubated in the presence of the

different concentrations tested (0, 0.13 µM nisin, 0.66 mM carvacrol and 0.13 µM nisin + 0.66 mM carvacrol), were stained with a *Baclight* kit (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Samples of 1 mL were aliquoted in 1mL Eppendorf and then were centrifuged at 3000rpm and resuspended in and analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry was performed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson) with a 488-nm excitation laser, using CellQuest Pro software (Becton-Dickinson) for data acquisition and analysis. The FCM analyses were performed with the following detector settings: FSC, E03; SSC, 400; FL1, 400; FL3, 400 using logarithmic gains. The threshold was set at an SCC signal of 67. FCM samples were adjusted to an event rate of 1,000 cells per second and a total of 10,000 events were registered per sample.

### 2.6. Viable plate counts

In addition, viable plate counting, as a traditional method to assess viability, was used.

One sample of each condition tested was taken, and plate counts in TSA of the appropriate dilutions in BPW were performed. Plates were incubated for 48 h at 37 °C.

### 2.7. Detection of sublethal injury

In order to determine microbial cell injury, treated samples were also plated onto TSA+YE containing 5% NaCl (Panreac). Plates were incubated for 48 h at 37 °C. Previous experiments showed that longer incubation times did not influence in survival counts.

## 4. Results

Bacterial viability analyses by FCM were performed by dual staining with SYTO9 and PI of *L. monocytogenes*. Cells treated and stained revealed three different cell populations, living, compromised and dead. The compromised cells were those stained with both stains as previously described (Hernlem, & Hua, 2010).

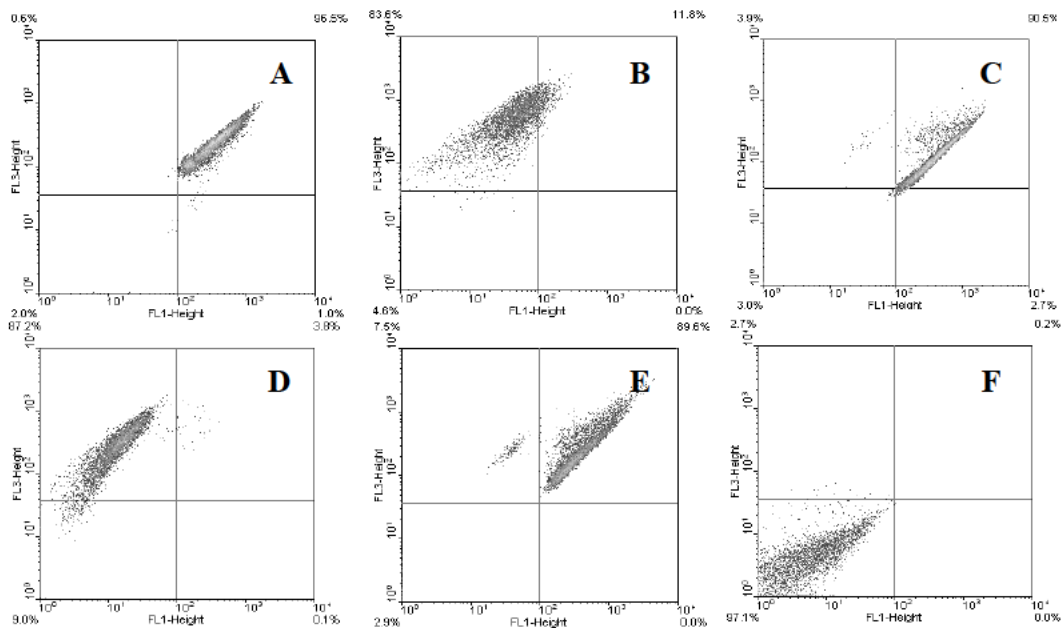
*Microbial inactivation by combining nisin and/or carvacrol and a previous heat treatment on stationary L. monocytogenes cells*

The exposure of *L. monocytogenes* stationary cells to 0.13  $\mu\text{M}$  of nisin during 15 min in PBS at 37°C showed an inhibitory effect, decreasing the population from a 96 % to a 3% in the upper right quadrant. The increasing population in upper left quadrant indicated that a certain percentage of cells were becoming compromised. These cells are not dead but they allow PI diffusion into their cytoplasm. This decrease in viable population is in relationship with a decrease of more than 1 cycle log in agar plate counts.

	Stationary		Exponential
	TSA + 0,6% YE	TSA + 5% NaCl	TSA + 0,6% YE
	log cfu/ml	log cfu/mL	log cfu/mL
Control	7,84E+ A	7,93E+00	7,98E+00
0,13 $\mu\text{M}$ Nisin (N)	6,62E+00	6,32E+00	4,90E+00
0,66mM Carvacrol (C)	8,00E+00	7,95E+00	7,95E+00
Heat treatment (HT)	7,18E+00	4,63E+00	6,27E+00
N+C+HT	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

The exposure to 0.66 mM carvacrol led to very different results. The population percentage in the upper right quadrant remained approx. similar (Fig. 1C), so no decrease in viable cells or increase in compromised cells was detected.

When both antimicrobials were added together, a reduction of a 4 % was found in live population (Fig. 1D). A light synergistic effect was then observed when both nisin and carvacrol were present at the same time, since the combined effect led to a further reduction than the addition of the separated effects. On the other hand, no compromised cells after exposition to this combination of antimicrobials were observed. This same light decrease in the counts was observed when nisin and carvacrol were added simultaneously.



**Figure 1.** Fluorescence density plots of *L. monocytogenes* stationary cells stained with SYTO9 and PI after been exposed to nisin (A), carvacrol(B), nisin and carvacrol(C), previous heat treatment and nisin, carvacrol and a previous heat treatment(F).



The application of a previous thermal treatment of 55°C for 15 min led to similar results than carvacrol alone: no decrease in viable cells or increase in compromised cells was detected, suggesting that no effect was found (Fig. 1E). According to counts, a decrease of less than 1 cycle log was observed.

However, when both antimicrobials, nisin and carvacrol, were added to previously heat treated *L. monocytogenes* cells a further synergistic effect was shown, leading to a complete inactivation of the population.

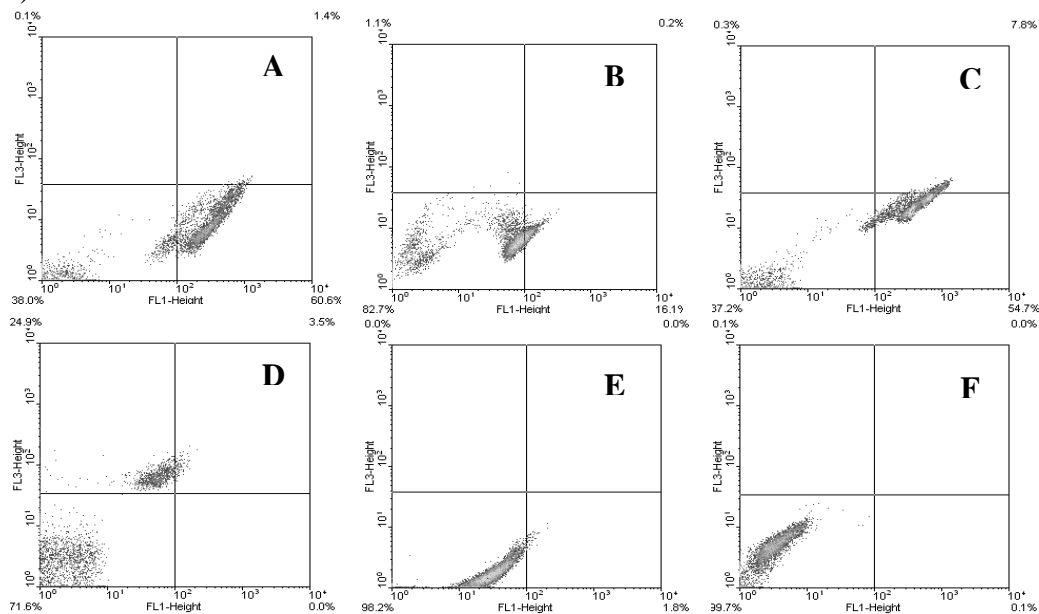
*Microbial inactivation by combining nisin and/or carvacrol and a previous heat treatment on exponential L. monocytogenes cells*

The addition of 0.13 µM nisin headed to a similar effect on *L. monocytogenes* exponential cells than that found in stationary cells, since only the 4% of the population remained still alive (Fig. 2A).

According to counts, a 3 log cycle reduction was found when nisin was added to exponential cells, opposite to the 1 log reduction for stationary cells. Nevertheless, carvacrol showed more effect for exponential than for stationary cells, reducing the live population in a 40% for exponential cells. Still, no decrease was shown in counts (Table1). What is more, the effect of the heat treatment was higher for exponential cells too, decreasing the population in 45%, whereas for stationary cells only decreased the live population in 12% (Fig. 2). Contradictory, counts were only reduced in nearly 1 cycle log was observed.

When the three treatments were combined complete inactivation of exponential cells was also shown.

*Occurrence of sublethal injury after treatments on Listeria monocytogenes stationary cells*



**Figure 2.** Fluorescence density plots of *L. monocytogenes* exponential cells stained with SYTO9 and PI after been exposed to nisin (A), carvacrol(B), nisin and carvacrol(C), previous heat treatment and nisin, carvacrol and a previous heat treatment(F).

No differences between counts of *L. monocytogenes* stationary cells treated with nisin and with carvacrol alone were found by comparing data obtained with selective and nonselective media. When 0.13  $\mu\text{M}$  of nisin was added, 1.5 cycle of inactivation in both selective and nonselective medium was observed. These results are quite close to the 90% reduction in live cells shown by FCM. On the other hand, a high proportion of sublethally injured cells was seen when *L. monocytogenes* was heated at 55°C for 15 minutes. In this case, on FCM results, no increase in compromised cells was observed.

#### 4. Discussion

Nisin pore formation involves the local perturbation of the bilayer structure and a membrane potential-dependent or pH gradient-dependent reorientation of these molecules from a surface-bound into a membrane-inserted configuration. The efflux of cellular constituents results in a complete collapse of the proton motive force (Abee, Klaenhammer, & Letelier, 1994; Verheul, Russel, Hoff, Pombouts, & Abee, 1997). Different methods have probed that nisin permeabilizes the cytoplasmic membrane by forming pores in the membrane, resulting in a rapid efflux of small molecules, with agar assays and enumeration of viable microorganisms as the most commonly used techniques (Lehtinen, Nuutila, & Lilius, 2004; Crandall, & Montville, 1998; Delves-Broughton, & Gasson, 1994; Ray, 1992). Moreover, methods based in ATP changes, intracellular pH, and membrane potentials have also been applied in order to evaluate the effect of several bacteriocins (Shapiro, 2000; Novo, Perlmutter, Hunt, & Shapiro, 1999).

Many authors have investigated the mechanism of action of essential oils. Most of them agree that carvacrol, and, in general essential oils are hydrophobic compounds, which primary site of toxicity is the membrane. They accumulate in the lipid bilayer according to a partition coefficient that is specific for the compound applied, leading to disruption of the membrane structure and function (Helander, Alakomi, & Latva-Kala, 1998; Juven, Kanner, Schved, & Weisslowicz, 1994; Sikkema, De Bont, & Poolman, 1994). A critical concentration of the essential oils is needed to cause leakage of cellular constituents (Mendoza-Yepes, Sanchez-Hidalgo, Maertens, & Marin-Iniesta, 1997). However, our results showed no decrease in viable population for *L. monocytogenes* stationary cells, which were coupled with a no decrease in counts when 0.66 mM carvacrol was added.

When nisin and carvacrol were added simultaneously a light synergistic effects was found. The different modes of action for nisin and carvacrol could explain, at least in part, the synergistic effect observed. Esteban & Palop, 2011 found synergistic effect on *L. monocytogenes* showing an even bactericidal effect. Pol, van Arendonk, Mastwijk, Krommer, Smid, & Moezelaar, 2001 also found synergistic effects in the combination of nisin and carvacrol in germinating spores of *Bacillus cereus*.

The heat treatment of 55°C during 15 minutes reduced the population in 1 cycle log, but did not affect the membrane integrity, since PI could not pass into *L. monocytogenes* cells, so the population after heat treatment remained still stained by SYTO9 (Fig. X). These results are in agreement with dose obtained by Ananta et al. (2009) who, after applying a heat treatment that

reduced the population in 6 log cycles, only found that as many as 4.5% of the whole population was stained with PI.

Published data have shown that bacteriocins and phenolic compounds present additive or even synergistic inactivation effects in combination with other technologies as a previous heat treatment (Esteben & Palop, 2011) or high hydrostatic pressure treatments (Garriga, Aymerich, Costa, Monfort, & Hugas, 2002; Masschalk, García-Graells, van Haver, & Michiels, 2000; Vurma, Chung, Shelhammer, Turek, & Yousef, 2006). Our outcomes are in agreement with these authors: the combination of a previous heat treatment with the presence of nisin and carvacrol showed a bactericidal effect against *L. monocytogenes* cells (Figure 1).

Our results show that stationary cells are more resistant to the different treatment than exponential cells (Fig. 1 and 2). These outcomes are in agreement with those found by Mañas & Mackey (2004), in which exponential cells were inactivated under high pressure by irreversible damage to the cell membrane. In contrast, stationary cells had a robust enough membrane to withstand pressurization up to very intense treatments. These authors concluded that this capacity of stationary cells to maintain an intact membrane had to be related to their ability to repair gross changes in cellular structures. In our case, the enhanced loss of viability of exponential cells was shown by the increased uptake of PI by cells treated with carvacrol and heat treated (Fig. 1 and 2 respectively) that is quite higher for exponential than for stationary cells (Fig. 1).

The fact that the counts for exponential cells are not in correlation with the FCM results for the case of nisin could

be explained on one hand with the sensibility of the cytometer due to the fact that a minimum concentration of  $10^5$  cfu/mL are necessary to be detected, so a decrease of 3 cycle log in the plate counts and only a 6% of difference in live population would be explain. On the other hand, Chawla, Chen, & Donnelly (1996) found that a *Listeria* population containing as many as 99.8% injured cells can repair completely and grow under favourable conditions. Our outcomes agree with these researches, since, a decrease in live population of a 40% of the population of *L. monocytogenes* exponential cells became compromised, although, there was no decrease in plate counts was found. The fact that PI would pass through membrane and bind DNA could be explained by both, the membrane fluidity due to the portion of unsaturated fatty acids in the membrane or to the capacity of carvacrol of disrupting membrane, which should be big enough to allowed PI to pass, but not to kill cells, allowing even the cells to grow in agar plates. In order to check the ability of carvacrol to form pores, higher concentration and longer incubation time were tested and up to 4 cycle log reduction were found in the counts after incubating *L. monocytogenes* exponential cells with a concentration of 132 mM carvacrol for 24h at 37°C (data not shown). Ultee, Gorris, & Smid (1998) found that the antimicrobial activity of carvacrol was dependent on the concentration tested, as well as on exposure time, pH and temperature for *Bacillus cereus*. Sikkema, Bont, & Poolman (1994) and Enonto (1991), found that a change in the composition of the cell membrane as a result of altered partition characteristics of the lipophilic compound (carvacrol) may have affected the sensitivity.

According to sublethal injury after the addition of nisin to *L. monocytogenes* stationary cells, FCM results shown that antimicrobial compound forms pores in the membrane which allows to PI to pass through and bind DNA, replacing SYTO9 and staining compromised cells.

According to our results a decrease in cell viability would not led to an uptake of PI. Something similar occurred to Ananta et al. (2009), who found that cells reached the thermal death in absence of membrane degradation. Bunthof, van der Braack, Breeuwer, Rombouts, & Abee, (1999) also demonstrated that heat treated *Lactococcus lactis* cells, as much as 69% were not PI labeled, although these cells could not be recovered on plates.

## 5. Conclusion

The ability of heat injured *L. monocytogenes* to repair sublethal damage in different environments is of great interest for the food industry. Many published reports have demonstrated the occurrence of sublethal injured after heat treatment using a differential plating technique. Due to the fact that heat treatment may enhance sensibility to natural antimicrobials, a combined process should be developed.

Fluorescence intensity is the most sensitive measure of bacteriocin activity, since is possible to observe a decrease in the fluorescence intensity before detecting a decrease in the plate counting. Within the area of bacteriocin research, flow cytometry has potential as a powerful for the investigation of cell membrane damage and repair mechanism.

Other authors have concluded that specific changes related to membrane

integrity associated with exponential cells are correlated with the loss of viability of these cells. From our data we can concluded that this loss of membrane integrity makes exponential cells be more sensitive to carvacrol and heat treatment than stationary cells are, due to the ability of stationary cells to repair membranes damages.

## Acknowledgements

This research was financially supported by the Ministry of Science and Technology of the Spanish Government and European Regional Development Fund (ERDF) through Projects AGL-2006-10280 and AGL-2010-19775. M.D. Esteban is grateful to the Ministry of Science and Technology for offering her the fellowship BES 2007-15471.

## References

- Abee, T., Klaenhammer, T.R., & Letelier, L. (1994). Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactococcus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1006-1013.
- Ananta, E. & Knorr, D. (2009). Comparison of inactivation pathways of thermal and high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food microbiology*, 26, 542-546.
- Berney, M., Weilenmann, H.U., Ihssen, J., Bassin, C., & Egli, T. (2006a). Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2586-2593.
- Berney, M., Weilenmann, H.U., Simonetti & Egli, T. (2006b). Efficacy of solar disinfection of *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella*

- typhimurium* and *Vibrio cholerae*. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 828-836.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J., & Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal Microbiology Methods*, 101, 828-836.
- Bunthof, C.J., van der Braack, S., Breeuwer, O., Rombouts, F.M. & Abee, T. (1999). Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental microbiology*, 65, 3681-3689.
- Chawla, C.S., Chen, H., & Donnelly (1996). Mathematically modeling the repair of heat-injured *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH, and salt concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 231-242.
- Crandall, A.D., & Montville, T.J. (1998). Nisin resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC700302 is a complex phenotype, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 231-237.
- Delves-Broughton, J. & Gasson, M.J. (1994): Nisin. In: Natural antimicrobial systems and food preservation. Dillon, V.M., & Board, R.G. (Eds.). CAB International, Wallingford, UK, pp. 99-131.
- Helander, I.M., Alakomi, H.L., & Latva-Kala, K. (1998). Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.
- Esteban, M.D. & Palop, A. (2011). Nisin, carvacrol and their combinations against the growth of heat-treated *Listeria monocytogenes* cells. *Food Technology and Biotechnology*, 49, 89-95.
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M. & Hugas, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food microbiology*, 19, 509-518.
- Hansen, T.B. & Knøchel, S. (2001). Factors influencing resuscitation and growth of heat injured *Listeria monocytogenes* 13-249 in sous vide cooked beef, *International Journal of Food Microbiology*, 63, 135-147.
- Hernlem, B. & Hua, S-S. (2010). Dual fluorochrome flow cytometric assessment of yeast viability. *Current Microbiology*, 61, 57-63.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituent. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 626-631.
- Lehtinen, J., Nuutila, J., & Lilius, E-M. (2004). Green fluorescence protein-propidium iodide (GFP-PI) based assay for flow cytometric measurement of bacterial viability, *Cytometry*, 60, 165-172.
- Mañas, P., & Mackey B.M. (2004). Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: Relationship with Cell Death. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1545-1554
- Masschalk, M., García-Graells, C., van Haver, E., & Michiels C.W. (2000). Inactivation of high pressure resistant *Escherichia coli* by lysozyme and nisin under high pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 39-47.
- Mendoza-Yepes, M.J., Sanchez-Hidalgo, L.E., Maertens, G., & Marin-Iniesta, F. (1997). Inhibition of *Listeria*

- monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety*, 17, 47-55.
- Novo, D., Perlmutter, N.G., Hunt, R.H., & Shapiro, H.M. (1999). Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique. *Cytometry*, 35, 55-63.
- Pol, I.E. & Smid, E.J. (1999). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 166-170.
- Pol, I.E., van Arendonk, W.G.C., Mastwijk, H.C., Krommer, J., Smid, E.J., & Moezelaar, R. (2001). Sensitivities of germinating spores and carvacrol-adapted vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* to nisin and pulsed-electric-field treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1693-1699.
- Ray, B. (1992): Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as Food Biopreservative. In: Food biopreservatives of microbial origin, Ray, B. & Daeschel, M.A. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 207-264.
- Rigsbee, W., Simpson, L.M. & Oliver, J.D. (1997). Detection of the viable but non-culturable state in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Safety*, 16, 255-262.
- Ryser, E.T. & Marth, E.H. (2007). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Shapiro, H.M. (2000). Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods*, 21, 271-279.
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M., & Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 8022-8028.
- Stocks, S. M. (2004). Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry A*, 61, 189-195.
- Ultee, A., Gorris, L.G.M., & Smid, E.J. (1998). Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 211-218.
- Verheul, A., Russel, N.J., Hoff, R.R., Pombouts, F.M., & Abee, T. (1997). Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3451-3457.
- Vurma, M., Chung, Y.-K., Shelhammer, T.H., Turek, E.J., & Yousef, A. E. (2006). Use of phenolic compounds for sensitizing *Listeria monocytogenes* to high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 263-269.

## **6. CONCLUSIONES**





1. **Las características del medio de calentamiento afectan significativamente a la termorresistencia de *Bacillus sporothermodurans*.** El valor D<sub>120</sub> se redujo a la tercera parte al reducir el pH del medio de 7 a 3. Además, los valores obtenidos en la crema de calabacín (pH 6,3) fueron similares a aquéllos obtenidos a pH 7.

2. **En condiciones isotérmicas, las curvas de supervivencia de *B. sporothermodurans* mostraron fenómeno de hombro y se ajustaron adecuadamente con los modelos no lineales de Weibull y Geeraerd.**

3. **Velocidades de calentamiento de 1 y 10°C/min no afectan a la resistencia al calor de este microorganismo.** Para estos tratamientos las predicciones de supervivientes, basadas en los modelos de Weibull y Geeraerd, se ajustaron adecuadamente a los datos experimentales.

4. **En condiciones no isotérmicas de enfriamiento los modelos sólo ajustan bien para velocidades de 10°C/min. En el caso de 1°C/min, los microorganismos son más resistentes de lo predicho por los modelos.**

5. **La adición de timol al medio de calentamiento tiene un efecto pequeño o inexistente en la termorresistencia de esporos de *Bacillus*.** El mayor efecto se observó en *B. licheniformis*, cuyos valores D<sub>100°C</sub> disminuyeron de 2,86 a 2,06 minutos cuando se añadió una concentración 0,5 mM de timol al medio de calentamiento.

6. **La adición de timol al medio de recuperación presenta un efecto dosis dependiente sobre la termorresistencia de todos los microorganismos estudiados.** Se han desarrollado modelos matemáticos que permiten predecir el efecto de la concentración de timol en el medio de recuperación. El mayor efecto se observó en *Bacillus subtilis* AdHC1 que presentó un valor  $z_{\text{timol}} = 3.14$ .

7. **La combinación de timol en los medios de calentamiento y recuperación no tiene un efecto significativo sobre la termorresistencia de *B. licheniformis* ni *B. subtilis* CECT 4071.**

8. **En condiciones no isotérmicas de calentamiento, el número de supervivientes de *B. subtilis* AdHC1 es inferior al esperado cuando se añade timol al medio de recuperación.**

9. **La nisina tiene un efecto pequeño sobre el crecimiento en caldo de *L. monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Senftenberg.** La fase de latencia aumentó de 13,84 a 17,03 horas para *L. monocytogenes* cuando se añadió 0,13  $\mu\text{M}$  de nisina. En el caso de ambas cepas de *Salmonella* no varió incluso a la concentración más alta ensayada (1,2  $\mu\text{M}$ ). La velocidad de crecimiento se redujo ligeramente para los tres microorganismos.

10. **El carvacrol muestra un efecto significativo sobre el crecimiento en caldo de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Senftenberg, doblando casi el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria cuando se añadió una concentración 0.77mM. En el caso de *L. monocytogenes*, el carvacrol mostró un efecto dosis dependiente, que se pudo predecir mediante modelos matemáticos secundarios sencillos.**

11. **La combinación de nisina y carvacrol con un tratamiento térmico previo muestra un efecto sinérgico sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en caldo y zumo de zanahoria y un efecto aditivo sobre el crecimiento de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Senftenberg en caldo.** Una combinación de 0,13  $\mu\text{M}$  nisina y 0,11 mM carvacrol fue capaz de inhibir el crecimiento en caldo de *L. monocytogenes*, expuestas previamente a un tratamiento térmico de 15 minutos a 55°C, durante al menos 15 días.

12. **La citometría de flujo es una técnica rápida que permite, además de cuantificar subpoblaciones según su estado fisiológico, detectar a que nivel se produce el daño causado por el agente en cuestión.**

**Los tratamientos y modelos utilizados en esta Tesis Doctoral evidencian la posibilidad de desarrollar y optimizar tratamientos térmicos combinados con antimicrobianos naturales, que permitan a la industria alimentaria obtener productos seguros y de mayor calidad.**



## **7. CONCLUSIONS**



1. **The heat resistance of *Bacillus sporothermodurans* is significantly affected by the medium characteristics.**  $D_{120}$  value was decreased down to one third when the medium pH was reduced from 7 to 3. The D values in a courgette puree (pH 6.3) were similar to those obtained at pH 7.

2. **Under isothermal heating conditions, *B. sporothermodurans* survival curves showed shoulders and were accurately predicted using Weibull and Geeraerd non-linear models.**

3. **The heat resistance of *B. sporothermodurans* is not affected by heating rates of 1 and 10°C/min.** Survivors after these treatments were accurately predicted using Weibull and Geeraerd models.

4. **Under non-isothermal cooling conditions, models only predicted accurately for 10°C/min rates. For 1°C/min rates, survivors were underestimated.**

5. **The addition of thymol to the heating medium has a slight or non-existing effect in the heat resistance of *Bacillus* spores.** The greatest effect was observed for *Bacillus licheniformis*, which  $D_{100\text{C}}$  values decreased from 2.86 to 2.06 minutes when 0.5 mM thymol was added to the heating medium.

6. **The addition of thymol to the recovery medium has a dose-dependent effect in the heat resistance of all the microorganisms tested.** Mathematical models were developed in order to predict the effect of the thymol concentration in the recovery medium. The greatest effect was observed for *Bacillus subtilis* AdHC1, that showed a  $Z_{\text{thymol}}$  value of 3.14.

7. **The combination of thymol in the heating and recovery media does not have a significant effect in the heat resistance of *B. licheniformis* and *B. subtilis* CECT 4071.**

8. **Under non-isothermal heating conditions, survivors of *B. subtilis* AdHC1 are overestimated when thymol is added to the recovery medium.**

9. **Nisin has a slight effect on the growth in broth of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Senftenberg.** Lag phase was increased from 13.84 to 17.03 hours for *L. monocytogenes* when 0.13  $\mu\text{M}$  nisin was added. For both strains of *Salmonella*, even the highest concentration tested (1.2  $\mu\text{M}$ ) had no effect on the lag phase. The growth rate was slightly reduced for all three microorganisms tested.

10. **Carvacrol had a significant effect on the growth in broth of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Senftenberg.** The time to reach stationary phase was almost doubled, from 7 to 15 h, in the case of *S. Enteritidis* when 0.77 mM carvacrol was added. **Carvacrol showed a dose-dependent effect on the growth of *L. monocytogenes* in broth.** This effect could be predicted by simple secondary models.

11. **The combination of nisin, carvacrol and a previous heat treatment shows a sinerystic effect on the growth of *L. monocytogenes* in broth and in carrot juice and an additive effect on the growth in broth of *S. Enteritidis* and *S. Senftenberg*.** A combination of 0.13  $\mu\text{M}$  nisina and 0.11 mM carvacrol was enough to inhibit the growth in broth of *L. monocytogenes*, previously exposed to a heat treatment of 15 minutes to 55°C, at least for 15 days.

12. **Flow cytometry is a rapid technique which enables not only quantify poblations according to their physiological state, but also detect in what level, structural or functional, cells are damaged.**

13.

**The treatments and models used in this Thesis show the possibility to developpe and optimize heat treatments in combination with natural antimicrobials, which would allow the food industry to get safer and better quality products.**



## **8. REFERENCIAS**



## A

Abee, T., Rombouts, F.M., Hungenholtz, J., Guihard, G., y Letellier, L. (1994). Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high/low temperatures. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 1962–1968.

Abee, T., Klaenhammer, T.R., y Letelier, L. (1994). Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactococcus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1006-1013.

Abbe, T. (1995). Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria: self-protection mechanism of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters*, 129, 1-10.

Abee, T., y Wonters, J.A. (1999). Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 65-91.

Alderton, G., Thompson, P.A., y Snell, N. (1964). Heat adaptation/ion exchange in *Bacillus megaterium* spores. *Science*. 143,141-143.

Álvarez I., Mañas P., Condón S., y Raso J. (2003). Resistance variation of *Salmonella enterica* Serovars to pulsed electric fields treatments. *Journal of Food Science*, 68, 2316-2320.

Álvarez I., Niemira B.A., Fan X., y Sommers C.H. (2007). Inactivation of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Senftenberg in liquid whole egg using generally recognize as safe additives, ionizing radiation, and heat. *Journal of Food Protection*, 70, 1402-1409.

André, S., Zuber, F., y Remize, F. (2013). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food: their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 134-143.

Ananta, E. y Knorr, D. (2009). Comparison of inactivation pathways of thermal and high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. *Food microbiology*, 26, 542-546.

Arroyo C., Cebrián G., Condón S., y Pagán R. (2011). Development of resistance in *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 to thermal/nonthermal processes after exposure to stressing environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 561-570.

Arroyo C., Condón S., y Pagán R. (2009). Thermobacteriological characterization of *Enterobacter sakazakii*. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 110-118.

Ávila-Sosa, R., Gastélum-Franco, M. G., Camacho-Dávila, A., Torres-Muñoz, J. V., Nevárez-Moorillón, G. V. (2008). Extracts of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *Food Bioprocess Technology*, 3, 434-440.

## B

Baranyi, J., Roberts, T.A., y McClure, P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10, 43-59.

Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E. y Swanson, B.G. (ed.). 1998. Nonthermal preservation of foods. Marcel Dekker, Nueva York, Estados Unidos.

Bean, P.G., Dallyn, H., Ranjith, H.M.P. (1979a). Food Microbiology Technology. Reviews of the International Meeting on Food Microbiology Technology. Parma, Italia. Edit.: Jarvis, Christian, Michener.

Berney, M., Weilenmann, H.U., Ihssen, J., Bassin, C., y Egli, T. (2006a). Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2586-2593.

Berney, M., Weilenmann, H.U., Simonetti y Egli, T. (2006b). Efficacy of solar disinfection of *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio cholerae*. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 828-836.

Beuchat: L.R. (1994). Antimicrobial properties of spices and their essential oils. In: Natural Antimicrobial Systems in Food Preservation. Eds. Dillon Y. M. y Board, R. G. CAB International, Oxon, pp. 167-179.

Berg, R.W. y Sandine, W.E. (1970). Activation of bacterial spores. A review. *Journal of Milk Food Technology*, 33, 435-441.

Bigelow, W.D. (1921). The logarithmic nature of thermal death time curves. *Journal Infection Disease*, 29, 528-536.

Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J., y Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct

enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal Microbiology Methods*, 101, 828-836.

Brown, K.L., Ayres, C.A., Gaze, J.E., y Newman, M.E. (1984). Thermal destruction of bacterial spores immobilized in food/alginate particles. *Food Microbiology*, 1, 187-198.

Boziaris, I.S., y Adams M.R. (2001). Temperature shock, injuryytransient sensitivity to nisin in Gram negatives. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 715-724.

Boziaris I.S., Humpheson L., y Adams M.R. (1998). Effect of nisin on heat injuryyinactivation of *Salmonella enteritidis* PT4. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 7-13.

Bunthof, C.J., van der Braack, S., Breeuwer, O., Rombouts, F.M. y Abee, T. (1999). Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Aplied and Environmental microbiology*, 65, 3681-3689.

Burt S.A., Fledderman M.J., Haagsman H.P., van Knapen F., y Veldhuizen E.J.A. (2007). Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agaryraw chicken by carvacrol vapour. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 346-350.

## C

Carneiro de Melo A.M.S., Cassar C.A., y Miles R.J. (1998). Trisodium phosphate increases sensitivity of Gram-negative bacteria to lysozymeynisin. *Journal of Food Protection*, 61, 839-844.

Carson, C.F., Mee, B.J., y Riley, T.V.(2002). Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46, 1914–1920.

Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M. y Boor, K.J. (2008). Modulation of stressyvirulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in microbiology*, 16, 388-396.

Chawla, C.S., Chen, H., y Donnelly (1996). Mathematecally modeling the repair of heta-injured *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH, and salt concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 231-242.

Chen, G., Campanella, O.H., y Corvalan, C.M. (2007). A numerical algorithm for calculating microbial survival curves during thermal processing. *Food Research International*, 40, 203-208.

Conner D.E. (1993). Naturally occurring compounds. In: Davison, P.M.yBranen, A.L. (eds), *Antimicrobials in foods*. New York: Marcel Dekker. pp. 441-468.

Crandall A.D.yMontville T.J. (1998). Nisin resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC70302 is a complex phenotype. *Applied Environmental Microbiology* 64: 231-237.

Cole, M.B., Davies, K.W., Munro, G., Holyoak, C.D. y Kilsby, D.C. (1993). A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 12, 232-239.

Condón, S., Oria, P., y Sala, F.J. (1993). Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC. Improvement of this methodology. *Journal Microbiology Methods*, 18, 357-366.

Condón, S., y Sala, F.J. (1992). Heat resistance of *Bacillus subtilis* in bufferyfoods of different pH. *Journal of Food Protection* 55, 605-608.

Conesa, R. Periago, P.M., Esnoz, A., López A. y Palop A. (2003). Prediction of *Bacillus subtilis* spore survival after a combined nonisothermal-isothermal heat treatment. *European Food ResearchyTechnology*, 217, 319-324.

Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A. y Palop, A. (2009). Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 506–513.

Conner: D.E. (1993) Naturally Occurring Compounds. In: *Antimicrobials in Foods*. Davidson, P.M., y Branen. A.L. (Eds.). Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp. 441–468.

Coroller, L., Leguerinel, I., y Mafart, P. (2001). Effect of water activities of heatingy recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Applied Environmental Microbiology*, 31, 341-347.

Coroller, L., Leguerinel, I., Mettler, E., Savy, N., y Mafart, P. (2006). General model, based on two Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 6493-6502.

Corradini, M.G., y Peleg, M. (2009). Dynamic model of heat inactivation kinetics for bacterial adaptation. *Applied Environmental Microbiology*, 75, 2590-2597.

Couvert, O., Gaillard, S., Savy, N., y Mafart P. (2005). Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 73-81.

Couvert, O., Gaillard, S., Savy, N., Mafart, P., y Leguerinel, I. (2005). Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *International Journal of Food Microbiology*. 101, 73-81.

Crandall, A.D., y Montville, T.J. (1998). Nisin resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC700302 is a complex phenotype. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 231–237.

Cunha, L.M., Oliveira, F.A.R., Oliveira, J.C. (1988). Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by the Weibull probability distribution function. *Journal of Food Engineering*, 37, 175-191.

## D

Davidson, P.M., y Parish, M.E. (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*, 43, 148–155.

Davidson, P.M. 2000. Conservantes químicos y compuestos antimicrobianos naturales. En *Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y fronteras*. M.P. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville (ed.). Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp. 543-581.

Davidson, P.M. (2001). Chemical preservatives and naturally antimicrobial compounds, In Doyle, M.P. Beuchat, L.R., y Montville, T.J., Eds., *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. 2<sup>nd</sup> ed. ASM Press, Washington, DC, pp. 593-628.

Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. y Ginsberg, H.S. (1996). Tratado de microbiología, 4<sup>a</sup> edición. Editorial Masson S.A., Barcelona.

De Cordt, S., Vanhoof, K., Hu, J., Maesmans, G., Hendrickx, M. y Tobback, P. (1992), Thermostability of soluble immobilized  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 396–402.

Delgado, B., Palop, A., Fernández, P.S., y Periago, P.M.(2004). Combined effect of thymolycymene to control the growth of *Bacillus cereus* vegetative cells. *European Food ResearchTechnology*, 218, 188-193.

Delves-Broughton, J., y Gasson M.J. (1994). Nisin. In: Natural Antimicrobial SystemsyFood Preservation. Dillon, V.M., y Board, R.G. (Eds.). CAB International, Wallingford, UK, pp. 99–131.

Delves-Broughton, J., Williams G.C., y Wilkinson, S. (1992). The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in pasteurized liquid whole egg. *Letters in Applied Microbiology*, 15, 133-136.

Dimitrijević, S.I., Mihajlovski, K.R., Antonović, D.G., Milanović-Stevanović, M.R., y Mijin, D. Ž. (2007). A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acidyessential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L.y*Origanum vulgare* L..*Food Chemistry*, 104, 774–782.

Dodd, C.E.R. y Aldsworth, T.G. (2002). The importance of RpoS in the survival of bacteria through food processing. *Internationa Journal of Food Microbiology*, 74, 189,194.

Doyle M.E. y Mazzotta. A.S. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae* *Journal of Food Protectionk*, 63, 779-795.

Driessen, A.J., van den Hooven, H.W., Kuiper, W., van Kamp, M., Sahl, H.G., Konings, R.N., y Konings, W.N. (1995). Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 34, 1606–1614.

Du, W.X., Olsen, C.E., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Levin, C.E., Friedman, M. (2008). Storage stabilityyantibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3082–8.

## E

Esteban, M.D. y Palop A. (2011). Effect of NisinyCarvacrol on *Listeria monocytogenes*. *Food TechnologyyBiotechnology*, 49, 89–95.



Esteban M.D. y Palop A. (2011). Nisin, carvacrol y sus combinaciones contra el crecimiento de células tratadas con calor de *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotechnology*, 49, 89-95.

Esteban, M.D., Huertas, J.P., Fernández, P., y Palop, A. (2013). Efecto de las características del medio y las tasas de calentamiento y enfriamiento sobre la resistencia al calor no isotérmica de las esporas de *Bacillus sporothermodurans* IC4. *Food Microbiology*, 34, 158-163.

Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* 1, 117-126 <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro750>

Etoa, F.-X. y Michiels, L. (1988). Resistencia inducida por el calor de las esporas de *Bacillus stearothermophilus*. *Letters in Applied Microbiology*, 6, 43-45.

Ettayebi, K., El-Yamani, J., y Rossi-Hassani, B.D. (2000). Efectos sinérgicos de la nisin y el timol sobre las actividades antimicrobianas en *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 183, 191-195.

European Food Safety Authority (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10, 2597-3039.

## F

Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M. y El-Baroty G.S.A. (1989). Actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales de especias egipcias. *Journal of Food Protection*, 52, 665-667.

Farber, J.M. y Peterquin, P.I. (2000). “*Listeria monocytogenes*” en *The microbiological safety and quality of food*. B.M. Lund, T.C. Baird-Parker y G.W. Gould (ed.). Aspen Publishers, Inc, Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos, Vol II. Pp.1178-1233.

Fellows, P. (1994). Tecnología del procesamiento de los alimentos: Principios y prácticas. Editorial Acribia S.A., Zaragoza.

Fernández, A., Ocio, M.J., Fernández, P.S., Rodrigo, M., y Martínez, A. (1999). Aplicación de análisis de regresión no lineal a la estimación de parámetros cinéticos para dos cepas enterotoxigénicas de *Bacillus cereus* esporas. *Food Microbiology*, 16, 607-613.

Foster, S. J. y Johnstone, K. (1989). The trigger mechanism of bacterial spore germination. En: Regulation of prokaryotic development (I. Smith, R. A. Slepecky y P. Setlow, eds) Am. Soc. Microbiol., Washington D. C, pp: 89-108.

## G

Gao, F.H., Abee, T., y Konings, W.N. (1991). Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomescytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 2164–2170.

Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M. y Hugas, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food microbiology*, 19, 509-518.

Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., y Van Impe, J.F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 185–209.

Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., y Van Impe, J.F. (2005). GIaFIT, a freeware tool to assess non-long-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 95-105.

## H

Han, Y.W. (1975). Death rates of bacterial spores: nonlinear survivor curve. *Canadian Journal of Microbiology*, 21, 1464-1467.

Han, Y.W., Schuyten, H.A., Callihan, C.D. (1971). Combined effect on heatyalkali in sterilizing sugarcane bagasse. *Journal of Food Science*, 36, 335-338.

Han, Y.W., Zhang, H.I., Krochta, J.M. (1976). Death rates of bacterial spores: mathematical models. *Canadian Journal of Microbiology*, 22, 295-300.

Hansen, T.B., y Knøchel, S. (2001). Factors influencing resuscitationygrowth of heat injured *Listeria monocytogenes* 13–249 in sous vide cooked beef. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 135– 147.

Harris, L.J., Fleming H.P., y Klaenhammer T.R. (1992). Developments in nisin research. *Food Research International*, 25, 57-66.

Hassani, M., Condón, S., y Pagán, R. (2007). Predicting microbial heat inactivation under nonisothermal treatments. *Journal of Food Protection*, 70, 1457-1467.

Hauben, K. J. A., Wuytack, E. C., Soontjens, G. C. F., y Michiels, C. W. (1996). High pressure transient sensitization of *Escherichia coli* to lysomzymeynisin by disruption of outer membrane permeability. *Journal of. Food Protection*, 59, 350–355.

Hayakawa, K., Matsuda, N., Komaki, K., Matsunawa, K., (1981). Computerized estimation of reaction kinetic parameters for thermal inactivation of microorganism. *Food ScienceyTechnology*, 14, 70-78.

Helander I.M., y Mattila-Sandholm T.M. (2000). Permeability barrier of the Gram negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 153-161.

Helander I.M., Alakomi H.L., Kyösti L.K., Mattila-Sandholm T., Pol I.E., Smid E.J., Gorris L.G.M.yvon Wright A. (1998). Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of AgricultureyFood Chemistry* 46: 3590-3595.

Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila- -Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., y von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of AgriculturalyFood Chemistry*, 46, 3590–3595.

Heredia, N.L., García, G.A, Luévanos, R, Labbé, R.G. y García-Alvarado, J.S. (1997). Elevation of the heat resistance of vegetative cells spores of *Clostridium perfringes* Type A by sublethal heat shock. *Journal of Food Protection*, 60 998-1000.

Hernlem, B. y Hua, S-S. (2010). Dual fluorochrome flow cytometric assessment of yeast viability. *Current Microbiology*, 61, 57-63.

Hersom, A.C. y Hutland, E.D. (1985). *Conservas alimenticias*. Ed. Acribia, Zaragoza.

Hill, C., Cotter, P.D., Sleator, R.D. y Gahan, C.G.M. (2002). Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdless imposed by minimal processing. *International Dairy Journal*, 12, 273-283.

Hills, BP., y Mackey, B.M. (1995). Multi-compartment kinetic models for injury, resuscitation induced logygrowth in bacterial cell populations. *Food Microbiology*, 12, 333-346.

Hill, C., Deegan, L. H., Paul, D. Cotter, P. D. Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058–1071.

Holdsworth, S.D. (1997). Thermal Processing of Packaged Foods. XIVy283 pages, numerous figuresytables. Blackie Academic y Professional, an imprint of Chapman y Hall, London.

Holey R.A.yPatel D. (2005). Improvement in shelf-lifeysafety of perishable foods by plant essential oilsymoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22: 273-292.

Huemer, I.A., Klijn, N., Vogelsang, H.W.J. y Langeveld, L.P.M. (1998). Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *International Dairy Journal*, 8, 851–855.

Huertas, J.P., Esteban, M.D., Antolinos, V., y Palop, A. (2014). Combined effect of natural antimicrobialsythermal treatments on *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Food Control*, 35, 73-78.

Huisman, G.W., Siegele. D.A., Zambrano, M.M. y Kolter, R. (1996). Morfologicalyphysiological changes during stationary phase. In: *Escherichia coliySalmonella. CellularyMolecular Biology* ed.Neidhardt, F.C.pp.1672-1688. Washington: ASM Press.

Humphrey T.J., Slater E., McAlpine K., Rowbury, R.J.yGilbert R.J. (1995). Salmonella enteritidis phage type 4 isolates more tolerant to heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. *AppliedyEnvironmental Microbiology* 61: 3161-3164.

## I

Invitrogen. 2012. The molecular probes handbook. En: [www.invitrogen.com/handbook](http://www.invitrogen.com/handbook)

## J

Jack, R.W., Tagg, J.R., y Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59, 171–200.

Jagannath, A., Tsuchido, T., y Membré J.M. (2005). Comparison of the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in foods using the modified WeibullyBigelow. *Food microbiology*, 22, 233-239.

Jay, J.M. (1996). Modern Food Microbiology. 5th Edition. Chapman y Hall. New York, NY.

Johnstone, K (1994).The trigger mechnism of spore gemination: current concepts *Journal of Applied Bacteriology, Symposium supplement*, 76, 17-24.

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., y Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oilyits active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 626–631.

## K

Katzin, L.I., Sandholzer, L.A., Strong, M.E. (1943). Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization. *Journal of Bacteriology*, 45, 256-272.

Kalchayanand, N., Hanlin, M. B., y Ray, B. (1992). Sublethal injury makes Gram-negativeyGram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH,ynisin. *Letters.in Applied. Microbiology*, 15, 239–243.

Keynan, A. (1978). Spore structureyits relation to resistance, dormancyygermination. En: Spores VII (G. Chambliss y J.C. Vary, eds) Am. Soc. Microbiol., Washington D. C. pp: 43-53.

King, A.D., Bayne, H.G. y Alderton, G. (1979). Non logarithmic death rate calculation for *Bysoclamys fulvayother* microorganism. *AppliedyEnvironmental Microbiology*, 37, 596-600.

Komemushi, S. (1983). On the changes on death rates constant of bacterial spores in the course of heat steriliation. En Heat steriliation of food. Edit.: Motohiro, T.; Hayakawa, K.I.K. Publishers Tokio. Japón.

Komitopoulou, E., Boziaris, I., Davies, E., Delves-Broughton, J., y Adams, M. (1999). *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juicesyits control by nisin. *International Journal of Food ScienceyTechnology*, 34, 81-85.

Kuipers, O.P., Rollema, H.S., Yap, W.M., Boot, H.J. Siezen, R.J. y de Vos, W.M. (1992). Engineering dehydrated amino acid residues in the antimicrobial peptide nisin, *Journal of Biological Chemistry*, 267, 24340–24346.

## L

Lagouri, V., Blekas, G., Tsimidou, M., Kokkini, S., y Boskou, D. (1993). Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. *Z Lebensm Unters Forsch*, 197, 20–23.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., y Nychas, G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.

Le Jean, G., Abraham, G., Debray, E., Candau, Y., y Piar G. (1994). Kinetics of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores using a two reaction model. *Food Microbiology*, 11, 229-241.

L'Ecuyer, P.B., Diego, J., Murphy, D., Trovillion, E., Jones, M., Sham, D.F., y Fraser, V.J. (1996). Nosocomial outbreak of gastroenteritis due to *Salmonella* Senftenberg. *Clinical Infectious Diseases*, 23, 734-742.

Lee J.I., Lee H.J., y Lee M.H. (2002). Synergistic effect of nisin and heat treatment on the growth of *Escherichia coli* 0157:H7. *Journal of Food Protection*, 65, 408-410.

Leguerinel, I., y Mafart, P. (2001). Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 29-34.

Lehtinen, J., Nuutila, J., y Lilius, E-M. (2004). Green fluorescence protein-propidium iodide (GFP-PI) based assay for flow cytometric measurement of bacterial viability, *Cytometry*, 60, 165-172.

Leistner, L. (2000). Use of combined preservative factors in food of developing countries. En *The Microbiological safety and quality of food*. B.M. Lund, T.C. Baird-Parker y G.W. Gould (ed.). Aspen publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos. Vol I. pp. 294-314.

Lekogo, B.M., Coroller, L., Mathot, A.G., Mafart, P., y Leguerinel, I. (2010). Modelling the influence of palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids on apparent heat

resistance of spores of *Bacillus cereus* NTCC 11145 y *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 242-247.

Licciardello, J. J. y Nickerson, J. T. R. (1963) Effect of radiation environment on the thermal resistance of irradiated spores of *Bacillus subtilis*. *Applied Environmental Microbiology*, 11, 216-219.

Linton, R.H., Carter, W.H., Pierson, M.D., y Hackney, C.R. (1995). Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *L. monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, 58, 946-951.

López, M., González, I., Condón, S., y Bernardo, A. (1996). Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 405–410.

González, I., López, M., Mazas, M., Bernardo, A., y Martín R. (1996), Effect of pH of the recovery medium on the apparent heat resistance of three strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 341-347.

López-Malo, A., Alzamora, S. M., y Guerrero, S. 2000. Natural antimicrobial from plants, In Alzamora, S. M. Tapia, M. S., y López-Malo, A., Eds., *Minimally processed Fruits y vegetables. Fundamentals Aspects y Applications*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, pp. 237-264

Lück, E. y Jager, M. (ed.) (1995). Antimicrobial food additives. Characteristics, uses, effects. Springer, Berlín, Alemania.

## M

Mackey, B.M. (2000). Injured bacteria. In *The Microbiological Safety y Quality of Foods*, Vol.I, ed. Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. y Gould G.W. pp.315-341. Aspen Publishers, Inc, Gaithersburg.

Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., y Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107-113.

Mafart, P. y Leguerinel, I. (1998). Modeling Combined Effects of Temperature y pH on Heat Resistance of Spores by a Linear-Bigelow Equation. *Journal of Food Science*, 63, 6-8.

- Mansour, M. y Millière, J. B. (2001). An inhibitory synergistic effect of nisin-monolaurin combination on *Bacillus* sp, vegetative cell in milk. *Food Microbiology*, 18, 87-94.
- Mañas, P., y Mackey B.M. (2004). Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: Relationship with Cell Death. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1545-1554
- Mañas P., Pagán R. (2005). A review: Microbial Inactivation by New Technologies of Food Preservation. *Journal of Applied microbiology*, 98, 1387-1399.
- Mahadeo, M.; Tatini, S. R. (1994). The potential use of nisin to control *L. monocytogenes* in poultry. *Letters in Applied Microbiology*, 18, 323–326.
- Mañas P., Pagán R., Álvarez I. y Condón, S. (2003). Survival of *Salmonella senftenberg* 775 W to current liquid whole egg pasteurization treatments. *Food microbiology*, 20, 593-600.
- Marquis, R.E. y Shin, S.Y. (1994). Mineralization responses of bacterial spores to heat-oxidative agents. *FEMS Microbiological Reviews*, 14, 375-9.
- Masschalk, M., García-Graells, C., van Haver, E., y Michiels C.W. (2000). Inactivation of high pressure resistant *Escherichia coli* by lysozyme and nisin under high pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 39-47.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., y Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness/death in the United States. *Emerging Infectious Disease*, 5, 607– 625.
- Meghrou, J., Lacroix, C., y Simard, R. E. (1999). The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 16, 105-114.
- Mendoza-Yepes, M.J., Sanchez-Hidalgo, L.E., Maertens, G., y Marin-Iniesta, F. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety*, 17, 47–55.
- Metrick C., Hoover D.G. y Farkas D.F. (1989). Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant/heat-sensitive strains of *Salmonella*. *Journal of Food Science*, 54, 1547-1549.
- Moats, W.A. (1971). Kinetics of thermal death of bacteria. *Journal of Bacteriology*, 105, 165-171.



Muñoz-Cuevas, M., Metris, A. y Baranyi, J. (2011). Predictive modelling of *Salmonella*: from cell-cycle measurements to e-models. *Food Research International* doi:10.1016/j.foodres.2011.04.033.

## N

Nassar, A., Farrag, S. A. (1995). Nisin as inactivator to *L. monocytogenes* in broth in ground beef. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 32, 198–206.

Novo, D., Perlmutter, N.G., Hunt, R.H., y Shapiro, H.M. (1999). Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxycarbocyanine and a ratiometric technique. *Cytometry*, 35, 55-63.

Nychas G.J.E. (1995). Natural Antimicrobials from Plants. In: *New Methods of Food Preservation*. Gould, G.W. (Ed.). Blackie Academic/Professional, Glasgow, UK, pp. 58–89.

Núñez, R. (2001). *Flow cytometry for research scientists principles and applications*. Horizon Scientific Press, Norwich.

## O

Oomes, S., van Zuijlen, A., Hehenkamp, J., y Brul, S. (2007). The characterization of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 85-94.

## P

Pagán, R., Condón, S. y Raso, J. (2005). Microbial inactivation by pulsed electric fields. En *Novel Foods Processing Technologies*. G.V. Barbosa-Cánovas, M.S. Tapia y P. Cano (ed.). Marcel Dekker/CRC press, Nueva York, Estados Unidos. Pp. 45-68.

Palop, A., Mañas, P., y Condón, S. (1999). Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *Journal of Food Safety*, 19, 57-72.

Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S., y Sala, F.J. (1996). Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in bufferyhomogenised foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 1-10.

Palop, A., Rutherford, G.C. y Marquis, R.E., (1998). Inactivation of enzymes within spores of *Bacillus megaterium* ATCC 19213 by hidroperoxides. *Canadian Journal of Microbiology*, 44,465-470.

Paparella, A., Taccogna, L., Aguzzi, I., Chaves-López, C., Serio, A., Marsilio, F., Suzzi, G. (2008). Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 19, 1174-1182.

Peleg, M. y Cole, M.B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food ScienceyNutrition*, 38, 353-380.

Peleg, M., y Normand, M.D. (2004). Calculating microbial survival parametersypredicting survival curves from non-isothermal inactivation data. *Critical Reviews in Food ScienceyNutrition*, 44, 409-418.

Periago P.M. y Moezelaar R. (2001). Combined effect of nisinycarvacrol at different pHytemperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 141-148.

Periago P.M., Delgado B., Fernández P.S. y Palop A. (2004). Use of carvacrolycymene to control growthyviability of *Listeria monocytogenes* cellspredictions of survivors using frequency distribution functions. *Journal of Food Protection*, 67, 1408-1416.

Periago P.M., Palop A. y Fernández P.S. (2001). Combined effect of nisin, carvacrolythymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food ScienceyTechnology International*, 7, 487-492.

Periago P.M., van Schaik W., Abee T. y Wouters J.A. (2002). Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *AppliedyEnvironmental Microbiology*, 68, 3486-3495.

Periago, P.M., Delgado, B., Fernández, P.S., Palop, A. (2004) Use of carvacrolycymene to control growthyviability of *Listeria monocytogenes* cellspredictions of survivors using frequency distribution functions. *Journal of. Food Protection*, 67, 1408–1416.

Periago, P.M., Leontidis, S., Fernández, P.S., Rodrigo, C., y Martínez, A. (1998). Kinetic parameters of *Bacillus stearothermophilus* spores under isothermal/nonisothermal heating condition. *Food Science & Technology International*, 4, 443-447.

Periago, P.M., Palop, A., Martínez, A., y Fernández, P.S. (2002) Exploring new mathematical approaches to microbiological food safety evaluation: An approach to more efficient risk assessment implementation. *Dairy Food & Environment Sanitation*, 22, 18–23.

Perkin, A.G., Burton, H., Underwood, H.M., y Davis, F.L. (1977). Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures II. Effect of heating period on experimental results. *International Journal of Food Science & Technology*, 12, 131-148.

Pflug, I.J. y Smith, G.M. (1977). En Spore research. Vol II. Edit: Barker, A.N., Wolf, J., Ellar, D.J., Dring, G.D, Gould, G.W. Academic Press, Londres.

Philips, C.A. (1999). The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate/sodium lactate alone/in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri*. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 424-428.

Pol, I.E. y Smid, E.J. (1999). Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 166–170.

Pol, I.E., (2001). Improved availability of nisin in novel combinations with other food preservation factors. Ph.D thesis. Wageningen University, The Netherlands.

Pol, I.E., Willy, G.C. van Arendonk, Mastwijk, H.C., Krommer, J., Smid, E.J., y Moezelaar, R. (2001) Sensitivities of germinating spores of carvacrol-adapted vegetative cells/spores of *Bacillus cereus* to nisin/pulsed-electric-field treatment. *Applied & Environmental Microbiology*, 67, 1693–1699.

Pol, I.E., y Smid, E.J. (1999). Combined action of nisin/carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 166–170.

Prittjarvi, T. S. M., Wahlstrom, G., Rainey, F. A., Saris, P. E. J., y Salinoja-Salonen, M. S. (2001). Inhibition of bacilli in industrial starches by nisin. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26, 107-114.

## R

Rahn, O. (1929). The size of bacteria as a cause of a logarithmic order of death. *Journal of Genetic and Physiology*, 13, 179-182.

Rahn, O. (1945a). Injury and death of bacteria by chemical agents. Biodynamic. Monograph. nº3, Edit: Cuyet, B.J., Normandy, Missouri, Usa.

Rahn, O. (1945b). Physical methods of sterilization of microorganisms. *Bacteriological Review*, 9, 1-50.

Raso, J. y Barbosa-Cánovas, G.V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science*, 43, 265-285.

Rattanachaiakunsothon, P. y Phumkhachorn, P. (2010). Synergistic antimicrobial effect of nisin and cymene on *Salmonella enterica* serovar *Thiophy* in vitro ready-to-eat food. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74, 520-524.

Ray, B. (1992). Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as Food Biopreservative. In: Food Biopreservatives of Microbial Origin. Ray, B., Daeschel, M.A. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, USA pp. 207-264.

Rigsbee, W., Simpson, L.M. y Oliver, J.D. (1997). Detection of the viable but non-culturable state in *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Safety*, 16, 255-262.

Rocourt, J. y Cossart, P. (2000) "Listeria monocytogenes". En *Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y fronteras*. M.P. Doyle, L.R. Beuchart y T.J. Montville (ed.). Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp. 355-371.

Rodriguez, A.C., Smerage, G. H., Teixeira, A.A. y Busta, F.F. (1988). Kinetic effect of lethal temperature on population dynamics of bacterial spores. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 31, 1594-1601, 1606.

Rodriguez, A. C., Smerage, G. H., Teixeira, A. A., Lindsay, J. A., y Busta, F. F. (1992). Population model of bacterial spores for validation of dynamic thermal processes. *Journal of Food Process Engineering*, 15, 1-30.

Rushdy A.A., Stuart J.M., Ward L.R., Bruce J., Threlfall E.J., Punia P. y Bailey J.R. (1998) National outbreak of *Salmonella* Senftenberg associated with infant food. *Epidemiology and Infection*, 120, 125-128.

Ryser, E.T., y Marth, E.H. (2007). *Listeria, Listeriosis, y Food Safety*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

## S

Salkinoja-Salonen S., Vuorio R., Andersson M.A., Kämpfer P., Andersson M.C., Honkanen-Buzalski T., y Scoging A.C. (1999). Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 4637–4645.

Schillinger, U., Geisen, R., y Holzapfel, W.H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms/bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology* 7, 158–164.

Sedlák, M., Vinter, V., Adamec, J., Vohradský, J., Voburka, Z., y Chaloupka, J. (1993). Heat shock applied early in sporulation affects heat resistance of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Bacteriology*, 175, 8049-8052.

Shapiro, H.M. (2000). Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods*, 21, 271-279.

Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K. y Nychas G.-J. E. (2001). Oregano essential oil with and without the addition of EDTA was tested against *Escherichia coli*. *Italian Journal of Food Science*, 13, 65-75.

Skandamis, P.N. y Nychas G.-J.E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1011-1022.

Setlow, P., (2000). Resistance of bacterial spores. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Eds.), *Bacterial Stress Responses*. American Society of Microbiology, Washington D.C., pp. 217-230.

Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to killing by radiation, heat, and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 514-525.

Shull, J. J., Cargo, G. T. y Ernst R.R. (1963). Kinetics of heat activation/thermal death of bacterial spores. *Applied Microbiology*, 11, 485-487.

Sikkema, J., de Bont, J.A. y Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 8022–8028.

Sing B., Falahee, M. B. y Adams, M. R. 2001. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiology*, 18, 133-139

Smelt J.P.P.M., Otten G.D. y Bos A.P. (2002). Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology* 73, 207-212.

Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., y Heyndrickx, M. (2006). *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 542-555.

Shelef, L. A. 1983. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, 27, 370-374.

Stasiewicz. M.J., Marks, B.P., Orta-Ramírez, A., y Smith, D.M. (2008). Modelling the effect of prior sublethal thermal history on the thermal inactivation rate of *Salmonella* in ground turkey. *Journal of Food Protection*, 71, 279-285.

Stevens K.A., Klapes N.A., Sheldon B.W. y Klaenhammer T.R. (1991). Nisin treatment for the inactivation of *Salmonella* species y other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3613-3615.

Stocks. S. M. (2004). Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytometry A*, 61, 189-195.

Stumbo, C.R. (1973). *Thermocacteriology in food processing*. (2nd ed.). Academic Press, London, New York.

## T

Tabit F. T., y Buys E.M (2010). The effect of wet heat treatment on the structural y chemical components of *Bacillus sporothermodurans* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 207-213.

Texeira, A. (1992). Thermal processing calculations. In D.R. Heldman, y L.B. Lund, *Handbook of food engineering*. New York: Marcel Dekker.

Tiwari, B.K., Vasilis V.P., O' donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P. y Cullen, P.J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural y Food Chemistry*, 57, 5987-6000.

Toledo, R.T. (1999). *Fundamental of food process engineering* (2<sup>nd</sup> ed.) Aspen. Gaithersburg M.D.pp, 315-397.

Thomas, L. V. y Delves-Broughton, J. (2001). New advances in the application of the food preservative nisin. *ResearchyAdvances in Food Science*, 2, 11-22.

Thomas, L. V. y Delves-Broughton, J. (2005). Nisin. In P. M. Davidson, J. N. Sofos, y A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 237e262). Florida: CRC Press.

Tremoulet, F., Rabier, P., y Gas, G. (2002). Inhibition of *Bacillus stearothermophilus* spores in liquid medium by free fatty acids withywithout heat: possible mechanism for the microbiological stability of canned fat-duck liver. *Journal of Food Sciences*, 67, 1144–1148.

## U

Ueckert, J.E., ter Steeg, P.F., y Coote, P.J. (1998). Synergistic antibacterial action of heat in combination with nisinymagainin II amide, *Journal of Applied Microbiology*, 85, 487–494.

Ultee A., Slump R.A., Stering G.ySmid E.J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, 63, 620-624.

Ultee, A., Gorris, L.G., y Smid, E.J. (1998). Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 211–218.

Ultee, A., Kets, E.P.W., y Smid, E.J. (1999) Mechanism of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*, *AppliedyEnvironmental. Microbiology*, 65, 4606–4610.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J. (2000) Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, 174, 233-238.

Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G., y Smid, E.J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, 63, 620–624.

Ultee, A., Smid, E.J. (2001). Influence of carvacrol on growthytoxin production by *Bacillus cereus*. *International. Journal of. Food Microbiology*, 64, 373–8.

Ungaretti, L., da Silva, C.A., Martins, B.C., y Falcão G.M. (2012). *Bacillus coagulans* spore inactivation through the application of oregano essential oilyheat. *LWT - Food ScienceyTechnology*, 46, 267-273.

## V

Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology Reviews*, 56, 395.

Valdramidis, V.P., Geeraerd, A.H., Bernaerts, K. y Van Impe, J.F. (2006). Microbial dynamics versus mathematical model dynamics: The case of microbial heat resistance induction. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 7, 80-87.

Valdramidis, V.P., Geeraerd, A.H., Bernaerts, K. y Van Impe, J.F. (2008). Identification of non-linear microbial inactivation kinetics under dynamic conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 146-152.

Valero, M., Leontidis, S., Fernández, P.S., Martínez, A., y Salmerón, M.C. (2000). Growth of *Bacillus cereus* in naturallyacidified carrot substrates over the temperature range 5–30 °C. *Food Microbiology* 17,605–612.

Van Zuijlen, A., Periago P.M., Amézquita, M., Palop, A., Brul, S., y Fernández, P.S. (2010). Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores; putative indicator microorganism for optimization of termal processes in food sterilization. *Food Res International*,43, 1895-1901.

Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. y Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesisymolecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*, 14,584-640.

Verheul, A., Russel, N.J., Hoff, R.R., Pombouts, F.M., y Abee, T. (1997). Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3451-3457.

Vurma, M., Chung, Y.-K., Shelhammer, T.H., Turek, E.J., y Yousef, A. E. (2006). Use of phenolic compounds for sensitizing *Listeria monocytogenes* to high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 263-269.



W

Warth, A.D., (1980). Heat stability of *Bacillus cereus* enzymes within spores in extracts, *Journal of Bacteriology*, 143, 27-34.

Wiedeman, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Biermaum, G., de Kruijff, B., y Shal, H.-G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation with inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 1772-1779.

World Health Organization. Food Safety. An Essential Public Health for the New Millennium. Issue 1999 [En línea]. <http://www.who.org/fsf/brochure/foodsafety/fsbroe2.pdf> [consulta: 30 agosto 1999].

Y

Yokoya, F., York, G.K. (1965). Effect of several environmental conditions on the thermal death rate of endospores of aerobic thermophilic bacteria. *Applied Microbiology*, 13, 993-999.