

Effect of the synergy of electric pulses and oregano essential oil in the inactivation of *L. monocytogenes*

Efecto de la sinergia de pulsos eléctricos y aceite esencial de orégano en la inactivación de *L. monocytogenes*

M. Clemente-Carazo^{1*}, A. Garre¹, V. Sánchez², I. Clemente³, S. Condón-Abanto⁴, P.S. Fernández¹, P.M. Periago¹, J.G. Lyng³

¹Departamento de Ingeniería Agronómica, Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena (ETSIA), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, España. Spain

²Departamento de Tecnología de los Alimentos, Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Alimentarios (ASPA), Universitat Politècnica de València, 46022, Valencia. Spain

³School of Agriculture and Food Science, University College Dublin, Belfield, Dublin 4. Ireland

⁴Grupo Nuevas Tecnologías de Conservación de Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Calle Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza. Spain

*marta.clemente@edu.upct.es

Abstract

Nowadays *Listeria monocytogenes* is one of the main concerns of the food industry. The number of cases reported in the European Union is relatively low it is very serious, with rates of hospitalization and mortality of 97% and 16.7%, respectively. Due to the ubiquity of this organism and its capacity to grow in many food matrices, agri-food companies must apply treatments that inactivate the cells of *L. monocytogenes*.

In this work, it was studied the kinetics of inactivation of *L. monocytogenes* isolated from marine products subjected to a combined treatment of PEF with an essential oil of oregano. The results show this synergy, since it got a greater inactivation microbial with a field of 20 KV/cm, 1 Hz frequency, 150 pulses and an oregano concentration of 1/2 MIC, higher than that obtained in control samples. Concluding that the PEF promote the effect of oregano on the bacterial cell membrane.

Keywords: field; frequency; PEF.

Resumen

Listeria monocytogenes es actualmente una de las principales preocupaciones de la industria alimentaria. Aunque el número de casos reportados en la Unión Europea es relativamente, tiene una gran gravedad, con unas tasas de hospitalización y mortandad del 97% y del 16,7%, respectivamente. Debido a la ubicuidad de este microorganismo y su capacidad de crecer en numerosas matrices alimentarias, las empresas agroalimentarias deben aplicar tratamientos que inactiven las células de *L. monocytogenes*.

En este trabajo, se estudió la cinética de inactivación de *L. monocytogenes* aislada de productos marinos sometida a un tratamiento combinado de PEAV con un aceite esencial de orégano. Los resultados demuestran esta sinergia, ya que se consiguió una mayor inactivación microbiana con un campo de 20 kV/cm, 1 Hz de frecuencia, 150 pulsos y una concentración de orégano de 1/2 MIC, superior a la obtenida en las muestras control.

Llegando a la conclusión de que los PEAV impulsan el efecto del orégano sobre la membrana de la bacteria.

Palabras clave: campo; frecuencia; PEAV.

1. INTRODUCCIÓN

El 99% de los casos de listeriosis se asocian al consumo de alimentos listos para su consumo (RTE, del inglés ready to eat). La prevalencia de *Listeria monocytogenes* en el ambiente de la industria alimentaria hace muy difícil, si no imposible, su erradicación [1].

En el último siglo han emergido una gran cantidad de nuevas tecnologías basadas en la no utilización de calor, como alternativa a los tratamientos convencionales. La tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje es un tratamiento no térmico de descontaminación que da lugar a la inactivación y deterioro de algunas bacterias patógenas [2, 3, 4, 5, 6]. Consiste en aplicar pulsos de alto voltaje (kV) y de una corta duración (μ s) a una matriz colocada entre dos electrodos. Esto da lugar a una reorganización de las cargas de la membrana incrementando la permeabilidad de esta al paso de los iones y moléculas, lo que provocará poros en la membrana, a este fenómeno se le denomina electroporación.

Los aceites esenciales son considerados como metabolitos secundarios y poseen propiedades antimicrobianas [7]. En este estudio se evaluó el efecto del antimicrobiano ante una cepa salvaje de *Listeria monocytogenes* previamente sometida a pulsos eléctricos de alto voltaje.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Medios y reactivos

Se utilizaron agar tripticasa-soja (TSA) y caldo tripticasa-soja (TSB). Estos medios fueron enriquecidos con un 0,6% de extracto de levadura (TSA+YE y TSB+YE, respectivamente). Para hacer diluciones se utilizó maximum recovery diluent (MRD).

Se preparó tampón McIlvaine citrato-fosfato ajustando el pH a 7,0 y una conductividad de 6 mS/cm para simular la de una matriz de pescado.

2.2 Microorganismos

La cepa de *Listeria monocytogenes* que se utilizó para el estudio, es una cepa aislada de un producto marino por el departamento: The Food and Health Section in the School of Agriculture and Food Science at UCD.

2.3 Preparación de las suspensiones

Desde el cultivo fresco, compuesto por TSA+YE, se pasó una colonia a un tubo de ensayo con 5 mL de TSB+YE estéril y se incubó durante 18 horas en una estufa a 37°C. A continuación, se inocularon 0,1 mL de los tubos de ensayo en 50 mL TSB+YE estéril para alcanzar una concentración microbiana de 10⁶ UFC/mL y se volvieron a incubar durante 24 horas en una estufa a 37°C.

2.4 Tratamiento PEAV

2.4.1 Equipo de PEAV y preparación de la muestra

Se preparó un tubo eppendorf con 1000 μ l de los cuales: 900 μ l de tampón McIlvaine y 100 μ l del microorganismo, se introdujeron en una cubeta y posteriormente fue llevado al equipo de PEAV. El equipo usado en este estudio fue un ELCRACK HVP5 (German Institute for Food Technologies (DIL), Quakenbrück, Germany). Se estudió la cinética de inactivación con las

siguientes condiciones del equipo: 1 Hz, 0,2 cm anchura de los electrodos y un tiempo entre pulsos de 2 μ s. Se llevaron a cabo muestras control sin tratamiento por PEAV.

2.4.2 Preparación del antimicrobiano

Fueron preparadas diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano, en ellas se resuspendieron 100 μ l del tratamiento PEAV. Y se dejó actuar el orégano durante 20 minutos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se determinó el efecto de la intensidad de campo eléctrico en la inactivación microbiana en ausencia de antimicrobiano. La Fig. 1 muestra las curvas de supervivientes obtenidas para diferentes configuraciones del tratamiento. Con 10 pulsos en un campo de 20 kV/cm, el tratamiento ya es capaz de reducir 0,5 ciclos logarítmicos. Con una frecuencia de 300 pulsos en este mismo campo eléctrico se alcanzó una inactivación de aproximadamente 6 ciclos logarítmicos, alcanzando el límite de detección. La formación de poros en la membrana citoplasmática microbiana requiere campos eléctricos superiores a 15 kV/cm [8].

En la Fig. 2 se ilustran las curvas de inactivación obtenidas cuando se añade un aceite esencial de orégano al medio de recuperación tras el tratamiento. Se observa una mayor inactivación con respecto al tratamiento de PEAV (Fig. 1). Esto es debido a que después del tratamiento con PEAV se han dañado un porcentaje de células y la interacción del orégano en estas da lugar a dañar las demás células a lo largo del tratamiento. Se comprobó que cuando se aplicaba el orégano durante 20 minutos con la muestra resuspendida tras el tratamiento con PEAV, hay una gran reducción de hasta aproximadamente 6 ciclos logarítmicos según la concentración de orégano, esto puede ser debido a que el orégano necesita un tiempo de actuación para poder interceder en la célula microbiana (Fig. 2).

Finalmente, en la Fig. 3, se muestra que el efecto de los tratamientos combinados de PEAV a 20 kV/cm resuspendido en 1/2MIC de aceite esencial de orégano, puede llegar a inactivar más del doble de UFC/mL que si se llevan a cabo los tratamientos por separado.

4. CONCLUSIONES

Un campo eléctrico de 20 kV/cm y 1/2 MIC de orégano es suficiente para llegar a inactivar la mayor parte de la población microbiana de esta cepa de *L. monocytogenes*. Los PEAV potencian el efecto del orégano en las células dañadas.

5. AGRADECIMIENTOS

Investigación apoyada por el MICINN (es) y FEDER a través de los proyectos AGL2017-86840-C2-1-R y AGL2016-82014-REDT.

6. REFERENCIAS

- [1] Buchanan, R.L., Gorris, L.G., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C., 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* 75, 1–13.
- [2] Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S., Raso, J., 2003. The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 87–95.
- [3] Amiali, M., Ngadi, M.O., Smith, J.P., Raghavan, G.S.V., 2007. Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *J. Food Eng.* 79, 689–694.

- [4] Grahl, T., Märkl, H., 1996. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 148–157.
- [5] Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O., 2008. Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 328–340.
- [6] Wan, J., Coventry, J., Swiergon, P., Sanguansri, P., Versteeg, C., 2009. Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety–pulsed electric field and low-temperature plasma. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 414–424.
- [7] Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199–1218.
- [8] Maza, M., Martínez Rodríguez, J.M., Saldaña, G., Ballesteros, F., Álvarez, I., Raso, J., 2017. Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF), una tecnología innovadora en el proceso de elaboración de vinos.

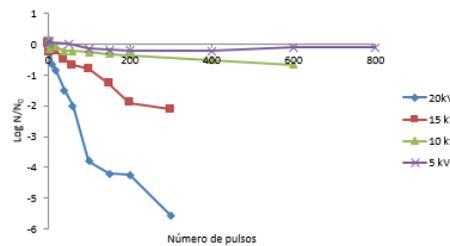


Figura 1 Relación de la fracción de supervivientes para en distintos campos eléctricos.

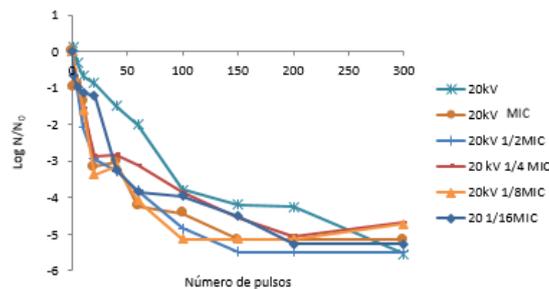


Figura 2 Relación de la fracción de supervivientes a distintas concentraciones de orégano a 20 kV/cm.

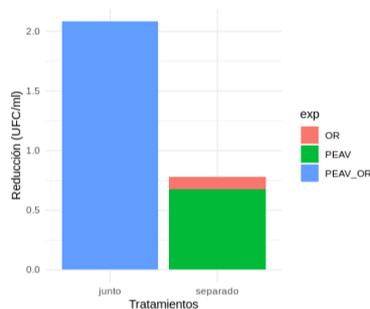


Figura 3 Sinergia entre los tratamientos conjuntos y los tratamientos por separado para 10 pulsos a 20 kV/cm.