

## Effect of different technologies (conventional thermal treatment, microwave...) and stress conditions (acid shock) on *Listeria monocytogenes* in food

## Efecto de diferentes tecnologías (tratamiento térmico convencional, microondas,...) y condiciones de estrés (choque ácido) sobre *Listeria monocytogenes* en alimentos

J.A. Sotomayor\*, A. Iguaz, P.M. Periago<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Campus de Excelencia Internacional Regional, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, Cartagena, Murcia, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología Vegetal, Campus de Excelencia Internacional Regional Campus Mare Nostrum. Universidad Politécnica de Cartagena, Spain.

### **Abstract**

Microorganisms have the ability to develop adaptive responses when they are subjected to sublethal conditions, triggering general defense mechanisms which are capable to increase resistance to this and other stresses, among those it's can be found the different methods of food preservation. Among the methods of bacterial inactivation at the industrial level, conventional thermal treatments present many advantages and is one of the most widely used. However, microwave processing, although has also several advantages is not so high employed. Therefore, the present project aims at determining the effect of different stressing conditions like acid shock as well as the effect of the heating medium pH on the inactivation and sublethal damage of *Listeria monocytogenes* treated with technologies such as conventional thermal and microwaves treatments, among others, in food.

**Keywords:** Sublethal damage; microbial inactivation; heat resistance.

### **Resumen**

Los microorganismos poseen capacidad de desarrollar respuestas de carácter adaptativo cuando han sido sometidos a condiciones subletales, activando mecanismos generales de defensa capaces de provocar un aumento en su resistencia a éste y otros estreses, entre los que se encuentran los diferentes métodos de conservación de alimentos. Entre los métodos de inactivación bacteriana a nivel industrial, el tratamiento térmico convencional presenta numerosas ventajas y es uno de los más extensamente utilizados. Sin embargo, el procesado con microondas tiene también ventajas y no es tan empleado. Por lo tanto, el presente proyecto tiene como objetivos la determinación del efecto de diferentes condiciones de estrés, como un choque ácido, así como el efecto del pH del medio de calentamiento sobre la inactivación y daño subletal de *Listeria monocytogenes* sometida a tecnologías como un tratamiento térmico convencional y tratamiento por microondas, entre otros, en alimento.

**Palabras clave:** Daño subletal; inactivación microbiana; resistencia al calor

---

\* E-mail: JAsb1@alu.upct.es

## 1. INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo patógeno, bacilo Gram-positivo, aerobio, anaerobio facultativo y catalasa positivo. La enfermedad causada por la infección, conocida como listeriosis, presenta como síntomas diarrea, fiebre y dolor muscular. Si no se trata, puede desencadenar en septicemia y daño del sistema nervioso central (encefalitis, meningoencefalitis) [1]. Los alimentos epidemiológicamente relacionados con los brotes de infección por *L. monocytogenes* son salchichas, fiambres, leche, leche pasteurizada, derivados lácteos, carne y productos cárnicos y, debido a su presencia en aguas contaminadas, puede encontrarse en vegetales regados con agua no tratada [2]. La presencia de este microorganismo en los alimentos es debida, en parte, a su habilidad de tolerar condiciones ambientales extremas (e.j. altas concentraciones de sal, amplio rango de pH y temperaturas y baja actividad de agua) [3].

Durante muchos años de investigación microbiológica, numerosos son los estudios que demuestran que cuando determinados microorganismos son expuestos, durante un tiempo predeterminado, a una situación adversa (estresante), son capaces de sobrevivir, posteriormente, a una situación letal [4]. Ferrerira y colaboradores [5] observaron que tras la exposición de *Listeria monocytogenes* a un pH ácido, el microorganismo incrementó su resistencia al fluido gástrico, demostrando que la exposición previa a una condición estresante, pero no letal, puede resultar en una adaptación y desarrollo de mecanismos que le permiten sobrevivir a condiciones letales. Este fenómeno es conocido como adaptación al estrés, descrito comúnmente como un aumento de la resistencia de un microorganismo a factores realmente letales tras una leve exposición a una situación de estrés [4].

Pero, no sólo presentan la capacidad de desarrollar un incremento contra esa situación letal, sino también frente a otros agentes estresantes, entre los que se encontrarían los diferentes métodos de conservación de alimentos. Se ha observado que la inducción de la tolerancia a un determinado tipo de estrés, conlleva la tolerancia a otros tipos de estrés, aunque éstos sean letales en ausencia de una inducción previa (resistencia cruzada) [6, 7]. Por esa razón, es necesario investigar en las respuestas adaptativas a diferentes condiciones de conservación individualmente y en conjunto para poder determinar la aplicación adecuada de los factores de conservación [8].

*Listeria monocytogenes* es capaz de expresar proteínas del choque térmico cuando desarrolla resistencias subletales al calor, aunque este mecanismo continúa sin esclarecerse totalmente para este microorganismo [9]. Son muchos los factores que influyen en la resistencia al calor de *Listeria monocytogenes*, como serían el tipo de cepa, las condiciones de crecimiento previas, exposiciones previas a otros estreses, tipo de alimento en el que se encuentre, el diseño experimental llevado a cabo, entre otros.

El principal objetivo de cualquier proceso de conservación es minimizar el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos. Por lo tanto, las investigaciones de hoy en día están encaminadas hacia la búsqueda de técnicas que cada vez garanticen más la calidad y seguridad alimentaria con la mínima alteración de las cualidades nutritivas y organolépticas del producto.

Durante las últimas décadas, una gran variedad de tecnologías han sido investigadas como métodos de inactivación de agentes patógenos presentes en los alimentos. Entre estas tecnologías, se encuentra el tratamiento térmico convencional y por microondas. El calentamiento por microondas tiene lugar como resultado de la fricción molecular entre las moléculas de agua presentes en el alimento, bajo un campo eléctrico oscilante a una frecuencia específica [10].

En los últimos años, el uso del calentamiento por microondas para mejorar la seguridad microbiológica de los alimentos ha sido probado con éxito en varios productos alimenticios de

origen animal y vegetal. La tecnología de microondas se ha utilizado en el procesado de alimentos durante varias décadas, como en el secado, la descongelación y la esterilización, entre otros [11].

Por lo tanto, el presente proyecto de tesis doctoral tiene como objetivos la determinación del efecto de distintas condiciones de estrés (como un choque ácido, ...) sobre la inactivación y daño subletal de *Listeria monocytogenes* sometida a tratamientos por diferentes tecnologías como un térmico convencional y por microondas, entre otros, en alimentos.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 2.1. Microorganismo

Los microorganismos que serán usado en este estudio serán patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes*, entre otros, proporcionados por Colecciones de Cultivo como la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Las cepas serán almacenadas a - 80 °C (20% glicerol) hasta su uso. Para los experimentos de crecimiento y supervivencia, se prepararan medios de cultivo apropiados como el caldo tripticasa de soja (TSB).

### 2.2 Aplicación de un choque ácido y otras condiciones de estrés

Se aplicarán choques ácidos siguiendo la metodología especificada por Sotomayor Ballesta [12] y otros tipos de estreses.

### 2.3. Determinación de la termorresistencia/inactivación de *L. monocytogenes*

#### 2.3.1 Tratamiento térmico convencional

La determinación de la termorresistencia del microorganismo se llevará a cabo en un termorresistómetro Mastia [13]. Los tratamientos térmicos se llevaran a cabo a diferentes temperaturas, en diferentes medios de calentamiento, a diferentes pHs, en alimentos (ácidos y neutros) y bajo diferentes condiciones (isotermas y no-isotermas).

#### 2.3.1 Tratamiento por microondas

Se utilizarán equipos de microondas del grupo GEM del Laboratorio de Electromagnetismo y Materia (Edificio ELDI - UPCT) provistos de sensores de fibra óptica que registran la temperatura que se está alcanzando en diferentes puntos de la muestra.

### 2.4. Determinación del daño subletal

Para detectar los daños de las envolturas celulares se utilizará la técnica del medio selectivo. Tras los tratamientos, las células se cultivarán en un medio no selectivo y otro selectivo, estimando el porcentaje de células dañadas por comparación de la fracción de supervivientes en ambos medios. Como medio selectivo se utilizará TSA, conteniendo la concentración máxima no inhibitoria de cloruro sódico.

## **3. RESULTADOS**

Con el trabajo a llevar a cabo para el desarrollo de esta tesis doctoral se pretende alcanzar la optimización de tratamientos de diferentes tecnologías, como el calentamiento convencional y por microondas, teniendo en cuenta distintas condiciones de estrés y tratamiento, para garantizar la seguridad microbiológica minimizando la alteración de la calidad organoléptica y nutricional del producto tratado.

#### 4. CONCLUSIONES

El presente estudio pretende avanzar en la investigación sobre la validación de tratamientos térmicos suaves para la conservación de alimentos: el establecimiento de la seguridad microbiológica.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación está siendo posible gracias al apoyo financiero proporcionado por el Ministerio de Economía y Competitividad, a través del proyecto AGL-2013- 48993-C2-1-R.

#### 6. REFERENCIAS

- [1] Food and Drug Administration (FDA). (2003). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>.
- [2] Guevara, L., Antolinos, V., Palop, A., Periago P. M. (2015). Impact of moderate heat, carvacrol, and thymol treatments on the viability, injury, and stress response of *Listeria monocytogenes*. BioMed Research Investigation, 1-10.
- [3] Gandhi, M., Chikindas, M.L. (2007). Review: Listeria: a food borne pathogen that knows how to survive. Int. J. Food Microbiol. 113, 1–15.
- [4] Ahmed, E., Vijay, K. (2002). Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. En: Microbial Stress Adaptation and Food Safety, 1<sup>st</sup> ed, A. E. Yousef, V.K. Juneja, eds. (CRC Press Taylor & Francis Group), p. 1–31.
- [5] Ferreira, A., O'Byrne, C.P., Boor, K.J. (2001). Role of sigma (B) in heat, ethanol, acid, an oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4454–4457.
- [6] Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D., Gahan, C. G. M. (2002). Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. Int. Dairy J. 12, 273–283.
- [7] Van Schaik, W., Van der Voort, M., Molenaar, D., Moezelaar, R., De Vos, W. M., Abee, T. (2007). Identification of the  $\sigma$ B Regulon of *Bacillus cereus* and Conservation of  $\sigma$ B-Regulated Genes in Low-GC-Content Gram-Positive Bacteria. J. Bacteriol. 12, 4384–4390.
- [8] Abee, T., Wouters, J.A. (1999). Microbial stress response in minimal processing. Int. J. Food Microbiol. 50, 65–91.
- [9] Sergelidis, D., Abraham, A. (2009). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. Food Control 20, 1-10.
- [10] Pucciarelli, A. B., F. O. Benassi (2005). Inactivation of *Salmonella enteritidis* on raw poultry using microwave heating. Braz. Arch. Biol. Techn. 48, 939–945.
- [11] Huang Y., Nandini K.E., Lakshmi M.C., Subramanian R. (2007). Effect of enzyme inactivation by microwave and oven heating on preservation quality of green tea. J. Food Eng. 78, 687–692.
- [12] Sotomayor Ballesta, J.A. (2015). Efecto de un choque ácido y del pH del medio de calentamiento sobre la termorresistencia de *L. monocytogenes*. Proyecto fin de Máster. Universidad Politécnica de Cartagena, Departamento de Ingeniería de los Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Cartagena, España.
- [13] Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A., Palop, A. (2009). Nosisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia. J. Appl Microbiol. 107, 506–513.