Efecto de tratamientos isotérmicos sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* evaluada in vitro.

J.P. Huertas-Baquero[1], L. Guevara-Prieto[1], P.S. Fernández-Escámez[1], A. Palop[1*]

[1] *Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de ingeniería de alimentos y del equipamiento agrícola, Escuela Técnica superior de ingeniería agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena, España*

[*] *alfredo.palop@upct.es*

Resumen: *Uno de los principales patógenos de interés en la industria alimentaria es* Listeria monocytogenes *causante de la listeriosis, la cual presenta una alta incidencia en humanos debido a que se encuentra asociada al consumo de alimentos contaminados con el microorganismo, debido a su presencia en gran cantidad de productos. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de los tratamientos isotérmicos, para el control de* L.monocytogenes. *Para poder determinar el efecto de estos tratamientos se aplicaron tratamientos isotérmicos a 55ºC y 60ºC, sobre la cepa* L.monocytogenes *CETC 4032. Después de cada tratamiento se recuperó el microorganismo en un medio no selectivo y en uno selectivo, obteniéndose una mayor reducción en la población en el medio de recuperación con un factor de inhibición.*

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales patógenos de interés en la industria alimentaria es *Listeria monocytogenes* causante de la listeriosis. La mayor incidencia de esta enfermedad en humanos está asociada al consumo de alimentos contaminados con el microorganismo debido a su presencia en gran cantidad de productos, y a su capacidad de crecimiento y supervivencia a distintos tratamientos y en diversas condiciones de almacenamiento.

De acuerdo con los datos de la organización mundial de la salud, la listeriosis es la enfermedad alimentaria con la segunda tasa más alta de mortalidad, con un porcentaje de mortalidad de entre el 20% y el 30%, y con la mayor tasa de hospitalización (95.5% Low, *et.al.*, 1997).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de los tratamientos térmicos, y las condiciones de recuperación en la inactivación de *Listeria monocytogenes*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismo y crecimiento: Se utilizó la cepa de *Listeria monocytogenes* CETC 4032, procedente de la Colección española de cultivos de tipo CECT (Valencia, España), la cual se incubó en caldo infusión cerebro corazón (B.H.I) (Scharlau, Barcelona, España) por 24 horas a 37ºC. La cepa fue conservada a -80ºC en 30% de glicerol como crioprotector.

2.2 Preparación de la suspensión para el termorresistometro: A partir de un cultivo en BHI se inocularon 100µL en 50 mL de caldo BHI estéril y se incubo durante 24 horas a 37ºC. Una vez incubado el cultivo se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos a 5ºC. El depósito se resuspendió en 1 mL de agua peptonada estéril (Sharlau). De esta última suspensión se realizaron diluciones seriadas en base 10, las cuales se sembraron en agar infusión cerebro corazón (B.H.I.A) (Scharlau) y se incubaron a 37ºC por 24 horas, para determinar la concentración del inoculo.

2.3 Realización de los tratamientos térmicos a 55ºC y 60ºC: El termorresistometro (T.R) usado fue el T.R Mastia patente española 200302529. Para cada tratamiento se adicionaron 350 mL de caldo B.H.I al T.R el cual se esterilizó en el mismo a 135ºC y 2atm por 5 minutos.

2.3.1 Tratamientos isotérmicos: Se programó el T.R. para que estabilizará la temperatura de acuerdo al tratamiento. Cuando la temperatura se estabilizó se inyectó la suspensión en el termorresistometro. Los tratamientos tuvieron una duración de 30 minutos a 55ºC y de 5 minutos a 60ºC y las muestras se tomaron en diferentes intervalos de tiempo durante la aplicación de los tratamientos. Cada tratamiento se realizo por triplicado.

2.7 Análisis de los datos experimentales: A los datos obtenidos se les realizó un ANOVA utilizando el software estadístico Statgraphics para establecer que no existía diferencias significativas entre las diferentes combinaciones probadas y sus replicas. Las curvas obtenidas en los diferentes tratamientos, se generaron graficando el Log de los supervivientes contra el tiempo de tratamiento.

Las curvas de supervivencia obtenidas en los diferentes tratamientos se obtuvieron representando el logaritmo de los supervivientes frente el tiempo de tratamiento. A partir de las gráficas de supervivencia se calcularon los valores D, como el tiempo necesario para reducir el número de supervivientes un ciclo logarítmico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos que se presentarán y discutirán a continuación se les una prueba de ANOVA, utilizando el software estadístico Statgraphics, obteniéndose como resultado que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre las replicas de los tratamientos aplicados.

Como puede observase en la tabla 1, en el medio BHIA se obtuvo un D_{55}=23,19 min, conllevando a deducir que el microorganismo posee una alta termorresistencia a esta temperatura.

En comparación, en el medio de recuperación selectivo se obtuvo un D_{55NaCl}=7,30 min, indicando que se necesita mucho menos tiempo para disminuir la población en un ciclo logarítmico, si tras el tratamiento el microorganismo es incubado en un medio con un factor de inhibición adicional como el cloruro de sodio, en estas condiciones la población disminuyo 4 unidades en 30 minutos de tratamiento, como se puede observar en la figura 1. La población se reduce 4 ciclos logarítmicos más que el control debido a los daños sub-letales por el tratamiento térmico aplicado, debido a que en el medio selectivo solo crece la mitad de la población inoculada y que de la del medio no selectivo, sugiriendo esto que el daño causado a la población es a nivel de factores vitales de crecimiento y de recuperación, pudiendo ser estos enzimas o proteínas. Los resultados anteriores se asemejan a los obtenidos por Miller, *et al.*, 2006, en su investigación, en la cual determino que el D_{55} para *Listeria innocua* en un medio selectivo es de 10,66 minutos con un R^2 de 0,97 corroborándose así uno de los principios de la teoría probabilística el cual postula que *"en un cultivo puro existe una heterogeneidad entre las células"* (Van Boekel, 2002).

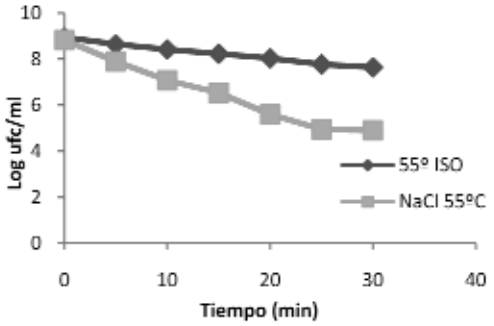

Figura 1. Supervivencia de L.monocytogenes CETC 4032 en condiciones isotérmicas (55ºC) en medio de recuperación BHIA y BHIA+NaCl.

El tratamiento a 60ºC presento resultados muy diferentes a los de 55ºC, siendo este tratamiento mucho más efectivo en la destrucción del microorganismo. Como puede observase en la tabla 2, los valores D estimados indican que el microorganismo es termosensible a este tratamiento y como se puede observar en la figura 2 tras 5 minutos de tratamiento se disminuyo casi el 90% de la población. Cabe resaltar que la población de *L.monocytogenes* CETC 4032 disminuyo 1 unidad logarítmica durante el contacto del microorganismo con el medio, sugiriendo que el daño letal producido pudo haber sido sobre componentes celulares vitales. Estos valores no se asemejan a los obtenidos por Miller, *et al.*, 2006, en su investigación con *Listeria innocua* donde obtuvo un D_{60} de 2,73 en un medio no selectivo y de 1,08 en un medio, apuntando esto a que posiblemente *L.monocytogenes* es menos termorresistente que *L.innocua* en un tratamiento isotérmico a 60ºC.

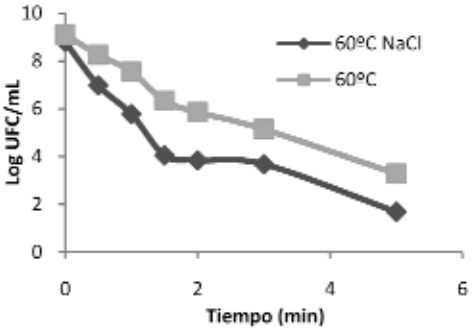

Figura 2. Supervivencia de L.monocytogenes CETC 4032 en condiciones isotérmicas (60ºC) en medio de recuperación BHIA y BHIA+NaCl.

Tabla 1. Valores D y z estimados de *L.monocytogenes* CETC 4032 en tratamientos isotérmicos.

Temperatura (ºC)	No selectivo		Selectivo	
	BHIA		BHIA+NaCl	
	D(min)[a]	R^2	D(min)[a]	R^2
55	23,1931	0,993	7,3044	0,958
60	0,87688	0,973	0,7831	0,834
z (ºC)	3,51515		5,15597	

[a] Media de tres réplicas.

Tras 5 min a 60ºC muere el 99,99% de la población, si se siembra sin NaCl y el 99,9999% de la población si se siembra con NaCl.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la aplicación de tratamientos isotérmicos sugieren que un tratamiento a 55ºC es efectivo en la termodestrucción de *L.monocytogenes* CETC 4032, pero si es combinado con otros factores de inhibición de crecimiento tales como NaCl al medio de recuperación, el tratamiento es más efectivo, produciendo una reducción significativa en el valor D y el tiempo de tratamiento, siendo muy interesante su evaluación en un alimento. Caso contrario para 60ºC donde la reducción es del 50% sin la combinación de otro factor de inhibición y del 90% en combinación, siendo el tratamiento propicio para ser evaluado en un alimento y observar el comportamiento del microorganismo.

10. Bibliografía

[1] **Conesa., R., Periago, P., Esnoz, A., Lopéz, A., Palop, A.** 2003. Prediction of *Bacillus subtilis* spore survival after a combined non-isothermal-isothermal heat treatment. Eur food res tecchnol 217, 319-324.

[2] **Cunha, L., Oliveira, F., Brandão, T., Oliveira, J.** 1997. Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of the bigelow model. Journal of food engineering 33, 111-128.

[3] **Doyle, M., Mazzotta, A.S., Wang, T., Wiseman, D.W., Scott, V.N.** 2001. Review: Heat Resistance of *Listeria monocytogenes.* Journal of Food Protection, Vol. 64, No. 3, 2001,410–429.

[4] **Doyle, M.**1999. Literature survey of the various techniques used in *Listeria* intervention. Food research institute. Version online http://www.wisc.edu/fri/bries.html.

[5] **Lin, Y., Chou, C.** 2003. Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses. Food Microbiology 21 605–610.

[6] **Low, J. C., Donachie, W.** 1997. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *The I"eterinau.Journal* 153, 9-29.

[7] **Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs, Paul A.** 2003. Incidence of Listeria monocytogenes in different food products commercialized in Portugal. Food Microbiology 21, 213 216.

[8] **Miller, F.A., Brandão, T.R.S., Teixeira, P.., Silva, C.L.M.** 2006. Recovery of heat-injured Listeria innocua. International Journal of Food Microbiology 112, 261–265.

[9] **Peleg, M.** 1999. On calculating sterility in thermal and non-thermal preservation methods. Food research international 32, 271-278.

[11] **Peleg, M., Penchina, C.M., Cole, M.B.** 2001 A. Estimation of the survival curve of *Listeria monocytogenes* during non-isothermal heat treatments. Food research international 34, 383-388.

[12] **Periago, P.M., Conesa, R., Delgado, B., Fernández., P.S., Palop. A.**2006. *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. Food technol. Biotechnol. 44(1), 17-23.

[13] **Periago, P.M., Delgado, B., Fernández, P.S., 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 vol.67 No7, 1408-1416.

[14] **Stumbo, C.R.** 1973. Thermobacteriology in food processing. Segunda edición. Ed. Academic press. New York and London. Páginas 130-133.

[15] **Van Boekel, Martinus a.j.s.** 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. International journal of food microbiology 74, 139-159.