



UNIVERSIDAD POLITECNICA DE CARTAGENA  
ESCUELA TECNICA SUPERIOR DE INGENIERIA AGRONOMICA  
PASEO ALFONSO XIII, 48  
30203, CARTAGENA



# **Inactivación de *Listeria monocytogenes* por calor en condiciones isotérmicas en un entorno ácido.**

PROYECTO FIN DE CARRERA

Director: Pablo Salvador Fernández Escámez

Co-director: Alberto Garre Pérez

Alumno: Marta Barón Yusty

Marzo, 2018





*Agradecer profundamente al Dr. Pablo S. Fernández Escámez, por su dedicación, disponibilidad y por brindarme la oportunidad de realizar mi Trabajo Final de Carrera. A todos los profesores de Microbiología por transmitirme el interés y la pasión por el mundo de la investigación y de la microbiología; y finalmente, a todos mis compañeros de laboratorio que me han ayudado a lo largo de este camino, especialmente al Dr. Gerardo González Tejedor y al Dr. Juan Pablo Huertas Baquero.*



*A mis padres,*



|  |    |
|--|----|
| RESUMEN .....  | 6  |
| ABSTRACT .....   | 7  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....  | 8  |
| 1.1    Importancia de la microbiología alimentaria .....                   | 8  |
| 1.2    Enfermedad transmitida por alimentos (ETA) .....                    | 8  |
| 1.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....                                    | 9  |
| 1.3.1    Género bacteriano .....   | 9  |
| 1.3.2    Características morfológicas .....                                | 10 |
| 1.3.3    Factores de crecimiento.....                                      | 10 |
| 1.3.4    Principales alimentos afectados por <i>L. monocytogenes</i> ..... | 11 |
| 1.3.1    Listeriosis.....  | 11 |
| 1.4    Inactivación microbiana .....                                       | 13 |
| 1.4.1    Microbiología predictiva .....                                    | 13 |
| 1.4.2    Tratamiento térmico .....   | 13 |
| 1.4.3    Choque ácido.....   | 15 |
| 1.4.4    Tecnologías de las barreras o métodos combinados .....            | 16 |
| 2. JUSTIFICACION.....  | 17 |
| 3. OBJETIVOS .....   | 18 |
| 4. MATERIALES .....  | 19 |
| 4.1 <i>Listeria monocytogenes</i> CEPA 4032 .....                          | 19 |
| 4.2    Medios utilizados para la investigación .....                       | 19 |
| 4.3    Equipos.....  | 19 |
| 4.4    Materiales .....  | 20 |
| 5. METODOLOGIA.....  | 21 |
| 5.1    Preparación del acidulante.....                                     | 21 |
| 5.2    Limpieza y esterilidad del Termorresistómetro Mastia .....          | 21 |
| 5.3    Tratamiento térmico isotérmico .....                                | 22 |
| 5.4    Preparación de inculo y recuento de supervivientes.....             | 22 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 23 |
| 6.1    Termorresistencia en caldo de laboratorio a pH 7.0.....             | 23 |
| 6.2    Termorresistencia en caldo de laboratorio a pH 4.2.....             | 26 |
| 6.3    Termorresistencia en crema de verduras comercial a pH 4.2 .....     | 29 |
| 7. CONCLUSIONES .....  | 32 |



8. BIBLIOGRAFÍA..... 33



## RESUMEN

La creciente demanda por parte del consumidor de productos más naturales ha llevado a las industrias alimentarias a asegurar la destrucción o inhibición de los microorganismos en los alimentos para garantizar la inocuidad de los mismos con el fin de obtener productos alimentarios de alta calidad organoléptica y nutricional que posean fechas de caducidad amplias. La reducción de la intensidad de los tratamientos térmicos mediante la introducción de tratamientos combinados permite avanzar hacia nuevos productos y garantizar su seguridad. *Listeria monocytogenes* es uno de los principales patógenos de interés en la industria alimentaria puesto que puede estar presente en una gama muy variada de alimentos (procesados y no procesados). La termorresistencia de *Listeria monocytogenes* CECT 4032 inoculada en una crema de verduras comercial con pH 4,2 y en un medio de laboratorio (TSB) a dos condiciones de pH (4,2 y 7,0), ha sido estudiada con la finalidad de conocer el efecto de dos factores de estrés (temperatura y pH). Se han aplicado tratamientos isotérmicos a cuatro temperaturas entre 55-62,5°C y a diferentes tiempos de exposición (0-30 min). El comportamiento de *L. monocytogenes* difiere según la temperatura de tratamiento aplicado y el medio de calentamiento utilizado, así como el pH del mismo. Los resultados obtenidos muestran que la resistencia al calor (valor D) de este microorganismo es menor en medios con alta acidez, observándose una reducción de la población más rápida en la crema comercial acidificada, siendo este efecto más acusado a tiempos de exposición mayores. Por tanto, en medios ácidos la sensibilidad al calor (valor z) es mayor que en medios de baja acidez. El análisis de los resultados y la modelización de las curvas de supervivencia y termodestrucción, por los modelos de Bigelow y Mafart, se han llevado a cabo mediante la herramienta computacional *Bionactivation* y los resultados indican que el mejor modelo para las condiciones del estudio realizados es el modelo de Weibull modificado por Mafart.



## ABSTRACT

The growing demand for natural products has led food industries to assure safety in their products by the inactivation of microorganisms in order to obtain organoleptic and nutritional products with a long shelf life. The reduction of harsh heat treatments with hurdle technology ensures innocuity as well as the profile of products demanded (high organoleptic and nutritional qualities). *Listeria monocytogenes* is one of the main pathogens of interest in the food industry and can be present in a wide range of products. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* CECT 4032 inoculated in a commercial vegetable cream (pH 4.2) and in TSB at two pH conditions (4.2 and 7.0), has been investigated in order to study the effect of two stress factors (temperature and pH). Isothermal treatments have been applied using the Mastia Thermoresistometer at four different temperatures between 55-62.5 °C and at diverse exposure times (0-30 min). The response of the pathogen is different depending on the heat treatment applied, the medium used and its pH. However, the microorganism has lower heat resistance as well as thermosensitivity (higher z values) when exposed to an acid environment. Through the Bionactivation computational tool, testing the Bigelow and Mafart models, the analysis of the results and the modelling of the survival curves has been carried out and the results indicate that the best model for the conditions tested is Mafart's model.



## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1 Importancia de la microbiología alimentaria

La microbiología es una rama de las ciencias biológicas que se encarga del estudio de los microorganismos, aquellos seres vivos microscópicos no visibles al ojo humano; de un tamaño de un milímetro de diámetro o inferior. Sin embargo, dentro de este grupo de organismos existen algunas algas y hongos que son visibles, así como una bacteria conocida como *Epulopiscium*. Teniendo en cuenta estas excepciones, el microbiólogo canadiense Roger Stanier propuso definir la microbiología no solo teniendo en cuenta el tamaño de los microorganismos sino también considerando las técnicas empleadas tales como la esterilización y los medio de cultivo (Prescott *et al.*, 2000).

La ciencia que estudia los microorganismos en los alimentos se denomina microbiología alimentaria. La importancia de esta disciplina se debe a la demanda de inocuidad de los alimentos exigida por el consumidor, así como a la importancia económica que aporta dentro de la industria alimentaria, ya que se producen anualmente grandes pérdidas por deterioro de alimentos. Los alimentos han de estar adecuadamente preparados y controlados con el objetivo de que sean aptos para el consumo y con el fin de evitar que actúen como vehículos de transmisión de enfermedades tanto para el hombre como para los animales. Por esta razón, la detección y el control de los patógenos causantes de las enfermedades, así como los microorganismos responsables de la descomposición de los alimentos constituyen partes esenciales de la microbiología alimentaria. No obstante, no todos los microorganismos son indeseables, existe una gran variedad de microorganismos con efectos beneficiosos. Mediante la transformación por la flora natural de la composición de las materias primas de un producto así como a partir de la adición voluntaria de microorganismos se elaboran alimentos, como por ejemplo el vino, los encurtidos, el yogur, el pan, el queso, la cerveza, etc. (Prescott *et al.*, 2000; Madigan *et al.*, 2012).

### 1.2 Enfermedad transmitida por alimentos (ETA)

Los alimentos, además de tener un valor nutricional para quienes los consumen, constituyen un medio de cultivo ideal para la multiplicación microbiana; pudiendo afectar negativamente a la calidad de los alimentos e incluso, en el caso de presencia de patógenos o toxinas, a la salud del ser humano produciéndose una ETA. La contaminación del alimento puede producirse en cualquier punto de la cadena alimentaria y constituyen un problema de salud pública creciente en todo el mundo. Según la OMS (2017), las ETA abarcan un amplio espectro de dolencias aunque la manifestación clínica más común consiste en la aparición de síntomas gastrointestinales. No obstante, entre otras enfermedades, también pueden dar lugar a síntomas neurológicos, ginecológicos o inmunológicos (Prescott *et al.*, 2000; OMS, 2017).

A partir de la década de los años 80 y 90 se han ido detectando nuevos microorganismos asociados a brotes transmitidos por la ingestión de alimentos. Por ejemplo, *Escherichia coli* O157:H7, fue reconocido por primera vez como un patógeno humano en 1982, el cual fue asociado al consumo de hamburguesas contaminadas insuficientemente cocinadas



(Smoot & Cordier 2006); y ya en 2011, la cepa de *E. coli* O104 produjo un importante episodio asociado a brotes germinados en Alemania, en el que hubo 3.830 personas afectadas, de las que 2.821 tuvieron que ser hospitalizadas, con un total de 53 muertes (EFSA, 2011).

Un caso muy reciente de ETA ha sido producido por *Salmonella* Agona (PT 39) en fórmulas infantiles destinadas a niños de entre 6 y 12 meses producidas por el grupo Lactalis en su fábrica ubicada en Craón (Francia). El brote se inicia en Agosto de 2017 y fue comunicado por las Autoridades sanitarias de Francia al Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) el 4 de Diciembre de 2017 y a la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) el 11 de Diciembre de 2017. Los productos de la empresa se distribuyeron a un total de 67 países, de los cuales 13 fueron destinados a la Unión Europea (UE) y 54 a países fuera de la misma. Tras el comunicado a España, se decidió activar la retirada del mercado español de varios lotes de sus fórmulas infantiles para lactantes; no obstante, entre los 39 casos documentados por el brote, en España se ha notificado el 11 de Enero de 2018 un caso de salmonelosis en un niño relacionado con la ingestión de un producto contaminado, verificado tras la secuenciación del genoma completo (WGS). Según AECOSAN, el 17 de enero de 2018 las autoridades francesas han informado que la empresa implicada ha decidido, como medida de precaución, retirar de los mercados las fórmulas infantiles lactantes sin distinción de números de lote y fechas de fabricación procedentes de la planta afectada (EFSA, 2018; AECOSAN, 2018).

### 1.3 *Listeria monocytogenes*

En el año 1926 en Cambridge (Inglaterra), Murray *et al.* describieron por primera vez la bacteria gram-positiva *Bacterium monocytogenes*, actualmente conocida como *Listeria monocytogenes*, como causa de una infección en roedores de laboratorio.. Al año siguiente, en Sudáfrica Lord Joseph Pirie aisló esta bacteria asociada a una infección en jerbos salvajes y como consecuencia propuso el nombre *Listerella hepatolytica*. Murray *et al.* y Lord Pirie se dieron cuenta de que estaban tratando con la misma especie de bacteria y combinaron el nombre, de manera que pasó a denominarse *Listerella monocytogenes*. Posteriormente, por razones taxonómicas el nombre de la bacteria se modificó por *Listeria monocytogenes* (Wagner *et al.*, 2008; Gibbons, 1972).

#### 1.3.1 Género bacteriano

El género bacteriano *Listeria* está constituido por bacilos con extremos redondeados, gram-positivos, de tamaño 0,4-0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 1-1,5  $\mu\text{m}$  de largo. Las células de este género pueden encontrarse como unidades únicas o en cadenas cortas y organizadas en formas de V, Y o en forma de empalizada (Ryser *et al.*, 2007).

Comprende actualmente diez especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* (Previamente conocido como *L. monocytogenes* serotipo 5), *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleichmannii*, *L. weihenstephanensis*. (Liu, 2008). Dentro de ellas *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri* han presentado signos de patogenicidad; *L. monocytogenes* destaca al ser un patógeno intracelular facultativo que afecta tanto a humanos como a rumiantes, *L. ivanovii* se describe estrictamente como un patógeno animal, el cual



afecta principalmente a los rumiantes y *L. seeligeri* ha presentado raramente infecciones humanas (Slaghuis *et al.*, 2007; Dongyou, 2008; Di Ciccio *et al.*, 2015). Por otro lado, en 2007 se reportó un caso de listeriosis asociado a *L. ivanovii* en humanos y desde su estudio han sido 3 los casos informados que están documentados. Dicha rara apariencia de infección en humanos ha suscitado preguntas sobre la especificidad de *L. ivanovii* para los rumiantes. (Guillet *et al.*, 2010).

### 1.3.2 Características morfológicas

*L. monocytogenes* es un patógeno ubicuo causante de listeriosis (enfermedad de transmisión alimentaria) en humanos y animales. Se ha aislado del suelo de vegetación en descomposición, de material vegetal, de diversas fuentes de agua (ejemplo: aguas de ríos y canales, lodos de alcantarillado), y de alimentación animal (Jordan *et al.*, 2015; Liu, 2008).

Las colonias de este patógeno después de 24-48 h alcanzan un tamaño de entre 0,5-2  $\mu\text{m}$  de largo por 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  de grueso y a veces adoptan forma de cocobacilo. Se presenta aislado, en parejas, cadenas corta, o agrupado en "V". Se trata de un patógeno gram-positivo, flagelado (de 1 a 5 flagelos), anaerobio facultativo y no formador de esporas (Adams *et al.*, 2008; Di Ciccio *et al.*, 2015).

### 1.3.3 Factores de crecimiento

El crecimiento de *L. monocytogenes* se ve afectado por varios factores ambientales. No obstante, *L. monocytogenes* puede crecer y sobrevivir adaptándose a diversas condiciones al poseer una amplia gama de mecanismos de respuesta fisiológica (Pellicer & Brusa 2015).

*Listeria monocytogenes* es capaz de sobrevivir en un amplio rango de temperatura (entre -1,5 y 45°C), tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. A diferencia de otras bacterias, este patógeno además de ser capaz de sobrevivir, es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración (4-10°C). La temperatura óptima de crecimiento del microorganismo está entre 30-37°C. (Lorber, 2007; Adams & Moss, 2008; FSAI, 2011).

Pellicer & Brusa (2015), describen que el rango de pH para el crecimiento de *L. monocytogenes* está entre 4,6 y 9,5. Los valores de pH ácido pueden ser inhibitorios o letales para *L. monocytogenes*, pero algunas cepas pueden tolerar medios con pH 4,4. Adams & Moss (2008) indican que todas las cepas de *L. monocytogenes* se inhiben en medios con pH por debajo de 5,5. Sin embargo dependiendo de la cepa y el acidulante, el valor mínimo de pH puede variar, estando entre 4,4 y 5,6. La Autoridad de Seguridad Alimentaria de Irlanda (FSAI) menciona en su informe de Septiembre de 2011, que el rango de pH para el crecimiento de *L. monocytogenes* está entre 4,2 y 9,5 utilizando HCl como acidulante.

Por otro lado, *L. monocytogenes* es muy tolerante a la presencia de cloruro sódico, siendo capaz de crecer en un 10% y sobrevivir durante un año en presencia de un 16% en un pH 6,0 (Adams & Moss, 2008). Según FSAI, el rango tolerante a la presencia de cloruro sódico se halla entre 0,5 y 12%.



### 1.3.4 Principales alimentos afectados por *L. monocytogenes*

La listeriosis humana transmitida por los alimentos está relacionada con diversos productos al ser *L. monocytogenes* un patógeno ubicuo (Hadjilouka *et al.*, 2015). La ubicuidad en el ambiente del patógeno y su capacidad para crecer en una variedad de alimentos ha llevado a la ocurrencia y persistencia frecuente de este patógeno a lo largo de la cadena alimentaria, ya que la ubicuidad del mismo ofrece a este microorganismo abundantes oportunidades para introducirse en ella y multiplicarse. Los alimentos en los que existe más probabilidad de encontrar este microorganismo son productos crudos tanto de origen vegetal como animal y productos procesados, principalmente debido a la contaminación post-procesado y del entorno de procesamiento de alimentos. Se ha aislado de alimentos tales como leche cruda y no pasteurizada, de quesos, helados, vegetales crudos, carnes fermentadas y salchichas cocidas, aves de corral crudas y cocidas, carnes y mariscos crudos y ahumados. (Adams & Moss, 2008; Kieran *et al.*, 2015).

#### 1.3.1 Listeriosis

*L. monocytogenes* ha sido reconocida como un importante patógeno alimentario desde 1985, cuando en el Sur de California (Estados Unidos) tuvo lugar un brote de listeriosis debido a la incorrecta pasteurización de leche utilizada en la producción comercial de quesos mejicanos. Se produjeron al menos 86 casos de infección, de los que 47 personas fallecieron. Se pudo confirmar que el origen del brote se debió a escapes puntuales del intercambiador de calor de una unidad de pasteurización (Prescott *et al.*, 2000; Kyriakides & Bell, 2002).

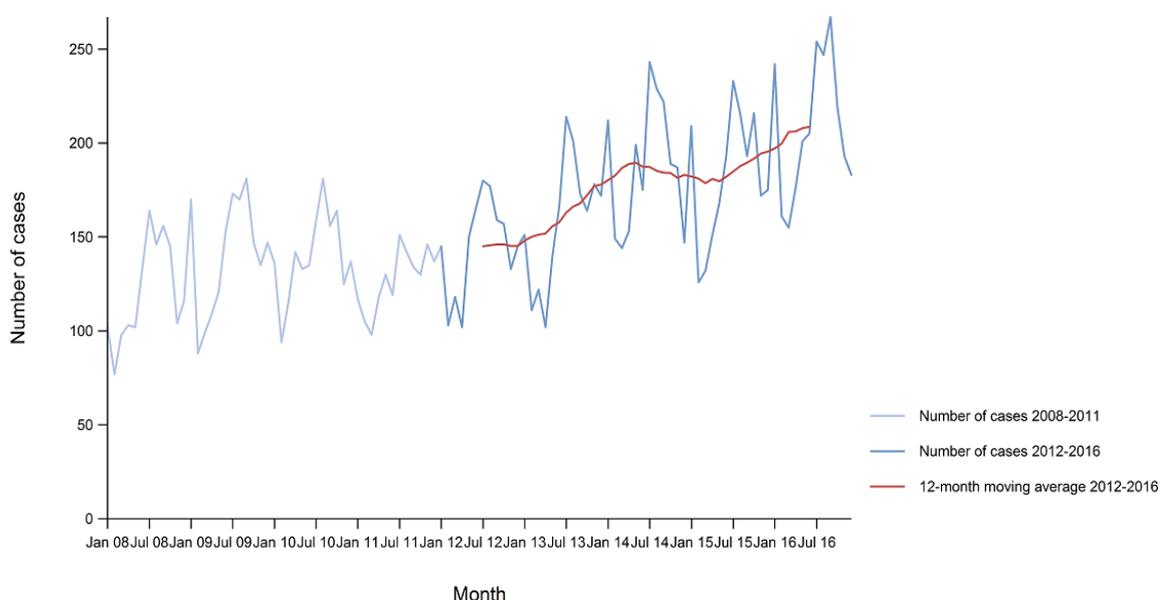
La principal vía de infección por *L. monocytogenes* es el consumo de alimentos o piensos contaminados. En menor frecuencia, la infección también puede llegar a transmitirse, en humanos, por contacto directo con el medio ambiente, con animales infectados o mediante una infección cruzada entre recién nacidos (Mortarjemi & Adams, 2007). Tiene una tasa de mortalidad elevada (20-30%), que afecta sobre todo a poblaciones de riesgo: mujeres embarazadas, recién nacidos, fetos, personas inmunodeprimidas, ancianos, enfermos de cáncer y personas con trasplante de órganos (Di Ciccio *et al.*, 2015). Se trata de una enfermedad relativamente rara en comparación con otras ETAs, como por ejemplo la salmonelosis. Sin embargo, debido a su alta tasa de mortalidad, la listeriosis se encuentra entre las causas más frecuentes de muerte transmitida por los alimentos (Allerberger, 2007). La dosis infectiva de *L. monocytogenes* no está claramente establecida, aunque se estima que se encuentra en torno a  $10^6 - 10^7$  UFC/mL en poblaciones sanas y muy inferior en la población de riesgo. En la Unión Europea se admiten hasta 100 UFC/g en el alimento si sus condiciones no permiten el crecimiento de *L. monocytogenes*. (D'Orazio, 2014; Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios).

La notificación de listeriosis humana está incluida en el sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) en la mayoría de los estados miembros de la UE así como de Islandia, Noruega y Suiza, con excepción de los siguientes países: Bélgica, Luxemburgo, España, y Reino Unido, ya que la notificación de los casos en estos países se basan en un sistema voluntario. En 2016 se han notificado, según el Sistema de Información Microbiológica (SIM)



del Centro Nacional de Epidemiología (CNE) un total de 137 casos de listeriosis procedentes de 9 Comunidades Autónomas en 2015 (227 casos con dos fuentes de información: EDO y Sim); sin embargo el número de casos notificados por la EFSA para el mismo año asciende a un valor de 363 casos (EFSA, 2016; CNE, 2016), lo que refleja la complejidad de los sistemas de recogida de información y la necesidad de una mayor coordinación.

Dentro de la UE, en el periodo comprendido entre 2008-2016 (Gráfica 1) se ha observado un preocupante incremento en los casos de listeriosis; el cual ha cobrado más importancia a lo largo de los últimos 5 años, al mostrar una tendencia creciente significativa en la UE. En 2016, se notificaron 2536 casos confirmados de listeriosis por 28 Estados Miembros. (EFSA, 2016)



**Gráfica 1.** Tendencia en los casos confirmados de listeriosis humana confirmados en la UE / EEE, 2008-2016. Fuente: EFSA, 2016

El caso de ETA más reciente presuntamente asociado a *Listeria monocytogenes* ha tenido lugar en la Comunidad de Madrid. El 5 de febrero de 2018 a través del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI) la AECOSAN ha sido informada de la existencia de un afectado por meningitis, que evolucionaba favorablemente, en la Comunidad de Madrid posiblemente vinculado a una intoxicación por la bacteria *Listeria monocytogenes* y asociado al consumo de queso de leche cruda de oveja de pasta blanda, fabricado por la empresa Ohian Txiki Koop (Gipuzkoa, País Vasco). Los productos presuntamente implicados (tres tipos de quesos: Gutizia, queso de leche cruda de oveja; Txuria, queso de pasta blanda de leche cruda de oveja y Beltza, queso láctico-rulo de leche cruda de oveja) han sido distribuidos en las Comunidades Autónomas de Madrid, Cataluña y País Vasco (AECOSAN, 2018).



## 1.4 Inactivación microbiana

La destrucción de los microorganismos y/o la inhibición de su crecimiento son fundamentales para minimizar los efectos destructivos de las actividades microbianas indeseables; como la putrefacción de los alimentos y el desarrollo de enfermedades. (Prescott *et al.*, 2000).

### 1.4.1 Microbiología predictiva

El propósito de la microbiología predictiva es la utilización de ecuaciones matemáticas para explicar el comportamiento de las poblaciones bacterianas expuestas a determinadas condiciones ambientales (Garre *et al.*, 2017).

Bigelow *et al.* (1920), Bigelow (1921) y Esty and Meyer (1922), a principios del siglo XX, propusieron los primeros modelos predictivos de inactivación térmica de microorganismos. Estos modelos estaban basados en cinéticas de primer orden (modelos lineales), los cuales tenían como premisa que todas las células de una población tenían la misma probabilidad de morir. Debido a los avances tecnológicos se observó que las poblaciones microbianas también presentaban comportamientos no lineales cuando eran expuestos al calor (presencia de fenómenos de hombros y/o colas), por lo que se propusieron nuevos modelos predictivos que explican y modelan este tipo de comportamientos (Pérez-Rodríguez & Valero 2013; McMeekin *et al.*, 2007; Huertas, 2015).

El avance de la informática ha permitido la creación de aplicaciones y herramientas computacionales (software) que permiten el análisis de los datos experimentales de forma más rápida y sencilla, sin importar el tipo de cinética (lineal o no lineal). *Bioinactivation* es un ejemplo de software de microbiología predictiva, especialmente elaborado para modelizar experimentos no isotérmicos (Garre *et al.*, 2017).

### 1.4.2 Tratamiento térmico

El tratamiento térmico, además de ser el método más utilizado en la actualidad para la preservación de los alimentos, es una de las principales técnicas utilizadas en la industria alimentaria para garantizar la destrucción de los patógenos, reducir los riesgos microbianos a niveles seguros, y proporcionar seguridad alimentaria (Doyle *et al.*, 2001; Van Zuijlen *et al.*, 2010; Garre *et al.*, 2017). Sin embargo, la aplicación de un tratamiento térmico conlleva una reducción de las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos tratados, lo cual colide con tendencias actuales del mercado (demanda de productos mínimamente procesados) (McMeekin *et al.*, 2007).

#### 1.4.2.1 Cinética de destrucción microbiana por choque térmico. Primer orden

Basándose en la teoría mecanicista que expone la homogeneidad de la población microbiana Bigelow, Ball y Stumbo (1973) desarrollaron un modelo matemático de inactivación térmica de microorganismos, denominado “*Modelo clásico de los valores D y z*” o “*Modelo de Bigelow*”, el cual sigue una cinética de reacción de primer orden (Ec.1). Al tratarse de un modelo lineal, su representación durante un tratamiento isoterma es una línea recta



denominada curva de supervivencia representada por el logaritmo de microorganismos supervivientes frente al tiempo del tratamiento (Peleg, 2006; Van Boekel, 2002).

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-kt} \quad (\text{Ec. 1})$$

Siendo:

- $N(t)$  - Número de microorganismos tras un tiempo “ $t$ ” de tratamiento.
- $N_0$  - Número inicial de microorganismos.
- $k$  - Constante de inactivación ( $s^{-1}$ ).
- $t$  - Tiempo de tratamiento (*min o s*).

Esta ecuación posteriormente se reformula como:

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = \log S(t) = -\frac{t}{D} \quad (\text{Ec. 2})$$

Siendo:

- $N(t)$  - Número de microorganismos tras un tiempo “ $t$ ” de tratamiento.
- $N_0$  - Número inicial de microorganismos.
- $S(t)$  - Fracción de supervivientes en un tiempo “ $t$ ” de tratamiento
- $t$  - Tiempo de tratamiento (*min o s*).
- $D$  - tiempo de reducción decimal ( $D = 2.303 / k$ , *unidades en min o s*).

Prescott *et al.*, 2000 define el tiempo de muerte térmica (TMT) como el tiempo más corto necesario para destruir todos los organismos de una suspensión microbiana, a una temperatura específica y en condiciones específicas. No obstante, al tratarse de una destrucción logarítmica, no es posible “destruir completamente” los microorganismos por lo que es más preciso el uso del tiempo de reducción decimal (valor D) (Ec. 3), definido como el tiempo necesario para reducir en un 90% la población microbiana (Prescott *et al.*, 2000).

El valor D representado gráficamente por la población microbiana superviviente frente al tiempo de exposición del tratamiento se define como el tiempo necesario para que la línea disminuya un ciclo logarítmico o 10 veces. El valor  $z$  (Ec. 4) es el aumento de temperatura necesario para reducir D a 1/10 de su valor, o en un ciclo logarítmico cuando se representa D frente a la temperatura (Prescott *et al.*, 2000).

$$D = D(T_{ref}) 10^{\frac{T_{ref}-T}{z}} \quad (\text{Ec. 3})$$



$$z = \frac{T_{ref} - T}{\log D - \log D(T_{ref})} \quad (\text{Ec. 4})$$

Siendo:

- $D(T)$  - Número de microorganismos a la temperatura “T” del tratamiento.
- $D(T_{ref})$  - Valor D a la temperatura de referencia.
- $T_{ref}$  - Temperatura de referencia (°C).
- $T$  - Temperatura del tratamiento (°C).
- $z$  - Aumento de temperatura necesario para un ciclo logarítmico (°C).

#### 1.4.3 Choque ácido

Un estrés puede inactivar, causar daños sub-letales o incrementar la resistencia al mismo estrés o a otros en los microorganismos. La exposición de los microorganismos a condiciones restrictivas pero no letales (que no causan su inactivación completa) o también denominado estrés subletal, puede conllevar a la sensibilización o al incremento de la resistencia (resistencia cruzada) de las células microbianas a estreses subsiguientes. En el caso de la sensibilización, puede deberse al daño de algún componente celular (membrana, proteínas, ADN, etc), mientras que el incremento de la resistencia puede presentarse por la inducción de mecanismos de respuesta al estrés (Heat Shock Proteins, Acid Shock Proteins, etc) (Cotter & Hill, 2003; Richter *et al.* 2010).

*Listeria monocytogenes* posee una gran capacidad de adaptación y supervivencia en una amplia gama de condiciones de estrés, tales como entornos ácidos, bajos niveles de actividad de agua y bajas temperaturas, lo que supone un grave problema en la industria alimentaria. Dichas condiciones de estrés también ocasionan un desafío de supervivencia significativo para los microorganismos. Entre ellos, la capacidad de resistencia en entornos ácidos que posee *L. monocytogenes* cobra gran importancia al estar presente naturalmente en tales ambientes como en parte de la biota intestinal (O’Driscoll *et al.* 1996; Phan-Thanh, *et al.* 2000). Phan-Thanh *et al.* (2000). En estos estudios concluyeron que el valor de pH más bajo que *L. monocytogenes* podría resistir dependía de la cepa y del tipo de ácido utilizado, siendo los compuestos orgánicos volátiles más dañinos que los ácidos inorgánicos.

O’Driscoll *et al.* (1996) y Davis *et al.* (1996) confirmaron la presencia de la respuesta a la tolerancia ácida (Acid Tolerance Response; ATR) en *L. monocytogenes*, un mecanismo de defensa celular; además O’Driscoll *et al.* (1996), demostró en su estudio como las células del microorganismo adaptadas al entorno ácido al que se sometió la bacteria (pH 5.5 tratamiento sub-letal, pH 3.5 tratamiento letal) incrementó su resistencia a otros estreses, tales como el estrés térmico y osmótico y los compuestos cristal violeta y etanol (O’Driscoll *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1996).



#### 1.4.4 Tecnologías de las barreras o métodos combinados

La “Teoría de las Barreras” de Leistner plantea la inactivación microbiana como una carrera de obstáculos que las células bacterianas deben superar para poder ser viables tras el procesamiento del alimento. En la industria alimentaria, estas “barreras” son las condiciones ambientales a las que se someten los alimentos que pueden producir la inactivación microbiana (temperatura, pH, alta presión, etc.). Según esta teoría, el alimento puede ser procesado usando una gran barrera que destruya todos los microorganismos presentes o mediante la combinación de obstáculos más pequeños. Existen tanto defensores como detractores de esta teoría. Por un lado, la combinación de varios tratamientos suave suele conllevar beneficios económicos y un menor impacto en la calidad final del producto. Sin embargo, la combinación de varios agentes inactivantes requiere el control de la tecnología con mayor precisión. Además, la aplicación de un estrés sub-letal puede inducir una adaptación bacteriana que incremente su resistencia a tratamientos posteriores. Por ello, es indispensable conocer con precisión la respuesta de las células microbianas a los factores ambientales, tanto individualmente como cuando se combinan (Richter *et al.* 2010).

La exposición de las células de *L. monocytogenes* Scott A a los tipos de estrés subletal que estudiaron (escasez de nutrientes, etanol,  $H_2O_2$  y ácido) aumentó en gran medida su resistencia al calor (Lou & Yousef, 1995). En otro estudio, demostraron que la resistencia máxima alcanzada por la bacteria se observaba tras su exposición a un 4-8 % de etanol, pH 4,5, y 500 ppm de  $H_2O_2$  en forma individual y concluyeron que la adaptación bacteriana de *L. monocytogenes* varía dependiendo del tipo de estrés subletal y del factor letal aplicado (Lou & Yousef, 1997)



## 2. JUSTIFICACION

---

La demanda por parte del consumidor de productos más naturales con calidad organoléptica y nutricional que posean una vida útil larga va en aumento, por lo tanto, para poder satisfacer los requisitos alimentarios de los consumidores, la industria alimentaria ha de ir innovándose y optimizando los procesos de transformación de alimentos. La sociedad de hoy en día tiene menos tiempo para elaborar la comida, por lo que es esencial que la industria realice alimentos listos para su consumo que cumplan las expectativas de los consumidores mencionadas y que se conserven el máximo periodo de tiempo posible. La conservación, por lo tanto juega un papel crucial en el sector alimentario y uno de los métodos más utilizados para ello es el tratamiento térmico. No obstante, para asegurar la destrucción o inhibición de los microorganismos en los alimentos y tener un control más exhaustivo en los mismos se precisa la combinación de dos tratamientos. Esto permite que se apliquen de manera menos intensa, preservando la calidad organoléptica del alimento.

*Listeria monocytogenes* es uno de los principales patógenos de interés en la industria alimentaria puesto que puede estar presente en una gama muy variada de alimentos, siendo éstos la vía principal de la transmisión de listeriosis. La justificación de este proyecto se basa en garantizar la seguridad de los alimentos mediante una combinación de tratamientos para la inactivación de *L. monocytogenes* que permita una vida útil prolongada.



### 3. OBJETIVOS

---

- General

Caracterizar la inactivación del patógeno *Listeria monocytogenes* CECT 4032 mediante un tratamiento isotérmico en un entorno ácido, en medio de laboratorio y en un alimento y modelización de los datos obtenidos.

- Específicos

- Estudio de la inactivación de *L. monocytogenes* en medio de laboratorio a pH neutro a temperaturas entre 55 y 62.5°C.
- Estudio de la inactivación de *L. monocytogenes* en medio de laboratorio a pH ácido (pH 4.2) a temperaturas entre 55 y 62.5°C.
- Estudio de la inactivación de *L. monocytogenes* en una crema comercial con un pH ácido (pH 4.2) a temperaturas entre 55 y 62.5°C.
- Análisis de los resultados, modelización de las curvas de supervivencia e interpretación de datos.



## 4. MATERIALES

---

### 4.1 *Listeria monocytogenes* CEPA 4032

El microorganismo con el que se llevó a cabo el estudio es *Listeria monocytogenes* CECT 4032, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España), la cual se inoculó en caldo B.H.I y luego se realizó aislamiento en placas de agar Oxford. Estas placas se mantuvieron en refrigeración durante la experiencia y se criopreservó el microorganismo en tubos Ependorf a -80°C, para garantizar su conservación correcta hasta su uso.

### 4.2 Medios utilizados para la investigación

- **Caldo B.H.I (Brain Heart Infusion):** extracto de cerebro 12.5 g/L, extracto de corazón 5 g/L, peptona 10 g/L, dextrosa 2 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, y fosfato di-sodio 2.5 g/L.
- **Agua de peptona:** Peptona de caseína 10 g/L, NaCl 5 g/L.
- **Caldo Tripticasa de Soja (Tryptone Soy Broth, TSB):** Peptona de caseína 17 g/L, peptona de soja 3 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, fosfato dipotásico 2.5 g/L, y dextrosa 2.5 g/L.
- **Caldo Tripticasa de Soja con Agar (Tryptone Soy Agar, TSA):** Peptona de caseína 17 g/L, peptona de soja 3 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, y agar 15 g/L.
- **Crema comercial:** “*Soupe chaude: patate douce carotte & noix de muscade*” de la empresa Alvalle. Composición: Batata (41%), agua, cebolla, zanahoria (6%), azúcar, aceite de oliva virgen extra, sal, cardamomo, nuez moscada, pimienta blanca

### 4.3 Equipos

- Autoclave
- Estufa programada a 37°C
- Campana de seguridad biológica
- Baño termostático
- Vortex
- Contador de placas
- Termorresistómetro Mastia

Los tratamientos térmicos se llevaron a cabo en el termorresistómetro Mastia (Figura 1) (Conesa et al., 2009). Mediante el uso del Termorresistómetro Mastia, un equipo patentado por la Universidad Politécnica de Cartagena, Los tratamientos térmicos se han llevado a cabo la realización de de los ensayos. Dicho instrumento ha sido diseñado para determinar la resistencia de los microorganismos al calor a lo largo del tiempo en medios líquidos o bien en alimentos con una consistencia semi-líquida o finamente particulados (como por ejemplo una crema, un batido, etc.); además permite estudiar tanto el comportamiento de los microorganismos en condiciones isotérmicas como en dinámicas. (Fernández *et al.*, 2006).



### Descripción física del equipo

El termorresistómetro consiste en un tanque de acero presurizado, calentado por una resistencia eléctrica y homogeneizado mediante una hélice de agitación. La temperatura del instrumento se controla mediante un autómata programable. Está dotado de un puerto para adicionar los microorganismos, por medio de una jeringuilla y una aguja estéril tipo Hamilton. En él se pueden realizar tratamientos isotérmicos (temperatura constante a través del tiempo) y no isotérmicos (rampas de temperatura, la temperatura aumenta de manera gradual y constante durante el tiempo deseado hasta una temperatura final) (Fernández *et al.*, 2006).



**Foto 1.** Fotografía del Termorresistómetro Mastia en el laboratorio de calidad y seguridad alimentaria de la Escuela Técnica de Ingenieros Agrónomos en la Universidad Politécnica de Cartagena.

### 4.4 Materiales

- Pipetas automáticas de 100 -1000  $\mu\text{L}$  y de 10-100  $\mu\text{L}$
- Puntas para las pipetas automáticas
- Tubos ependorf de 1mL de capacidad
- Tubos estériles de muestreo
- Gradillas
- Mechero
- Frascos de tapa rosca de vidrio de 500 mL
- Frascos de tapa rosca de vidrio de 100 mL
- Tarros de vidrio
- Jeringuilla Hamilton
- Alcohol
- Agua estéril
- Placas Petri



## 5. METODOLOGIA

---

### 5.1 Preparación del acidulante

Para acidificar el medio de calentamiento utilizado en los ensayos se ha optado por el ácido inorgánico, ácido clorhídrico (HCl) 2M. Su preparación depende de la concentración de HCl comercial, el cual disponíamos al 37% de pureza. Tras la realización de los cálculos necesarios, se concluyó que se requieren 41,4 mL de HCl al 37% p/p para obtener una solución de 500 mL 2M. El resto, es decir, los 458,6 mL restantes se adicionan de agua destilada. Su preparación se realizó en la campana de seguridad biológica tomando las precauciones de seguridad necesarias.

### 5.2 Limpieza y esterilidad del Termorresistómetro Mastia

El termorresistómetro antes de su utilización debe de seguir un protocolo de limpieza y esterilidad que asegure que se esté trabajando en condiciones estériles para evitar contaminaciones durante el desarrollo de los experimentos. El protocolo que se ha seguido ha sido el siguiente:

En primer lugar se procede con un enjuague del vaso principal de acero inoxidable de capacidad 400 mL del termorresistómetro. Para ello se ha de desenroscar dicho vaso y enjuagarlo con agua tibia tanto por fuera como por dentro. Una vez enjuagado, se le adiciona aproximadamente unos 10-20 mL de amoníaco. Seguidamente, se enrasa con agua tibia dejando un hueco en torno a 1,5 cm hasta la altura superior del vaso. Con esta solución se sumergen las partes del termorresistómetro de manera que limpie y desinfecte la hélice. Tras el enjuague con amoníaco, se repite el mismo proceso tres veces pero exclusivamente con agua. Una vez limpio, se enrosca el vaso principal en el termorresistómetro lleno de agua tibia con una holgura de 1,5 cm hasta la parte superior del vaso. Se enciende el aparato y para esterilizar los conductos y limpiarlos, se programa el termorresistómetro a una temperatura de 135°C. Se enciende el motor para iniciar la agitación, se conecta la fuente de calor y la de frío y se abre la válvula de presión. Una vez programado se le da a "RUN" de manera que se inicia la subida de la temperatura. Cuando se alcanza la temperatura programada se deja a esa temperatura dos minutos para que esterilice bien los componentes. Para la esterilización del conducto de toma de muestra es esencial purgar con vapor para esterilizar su interior. Finalmente se programa el termorresistómetro a una temperatura de unos 25°C, para poder realiza las manipulaciones de preparación del experimento. Para poder introducir el medio para el estudio se apaga el motor, las fuentes de calor y frío y la válvula de presión y se desconecta el conector rápido de presión que está conectado a la fuente de presión externa (nitrógeno seco), de manera que la presión sea cero. Posteriormente, se vuelve a conectar el cable y se desenrosca el vaso principal de acero inoxidable, se desecha el agua y se rellena del medio a estudiar.



### 5.3 Tratamiento térmico isotérmico

El vaso del termorresistómetro se llena con 400 mL del medio de calentamiento. Como medio de calentamiento se utilizó caldo TSB a dos pH diferentes, pH 7 o 4,2 (acidulante HCL 2 M) y la crema comercial previamente descrita. El medio de calentamiento se esterilizó previamente a la inoculación del microorganismo en autoclave, a excepción de la crema comercial. Posteriormente se trató, el medio de laboratorio, a 135°C durante 2 minutos en el termorresistómetro, mientras que la crema comercial se llevó a una temperatura de 90 °C. Tras la esterilización, se enfrió hasta la temperatura de tratamiento.

Las temperaturas estudiadas, han sido 55°C, 57,5°C, 60°C y 62,5°C para las siguientes investigaciones:

- Tratamiento térmico en TSB pH 7,0 en *Listeria monocytogenes*.
- Tratamiento térmico en TSB pH 4,2 en *Listeria monocytogenes*.
- Tratamiento térmico en crema comercial “*Soupe chaude: patate douce carotte & noix de muscade*” pH 4,2 en *Listeria monocytogenes*.

### 5.4 Preparación de inóculo y recuento de supervivientes

La preparación del inóculo se realizó en condiciones de esterilidad. Para ello, se sacó un tubo eppendorf de -80 °C, se descongeló y se sembraron 100 µL en el Caldo Tripticasa de Soja (TSB) (Sharlau, Barcelona). Se incubó a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente de insertar el inóculo en la estufa a 37°C ya estaba listo para su uso. Según estudios previo en el grupo de microbiología se conoce que el inóculo de *Listeria monocytogenes* está listo para su uso después de 18-24 horas, no superando ese rango.

Una vez estabilizada la temperatura de tratamiento en el termorresistómetro se procedió a la inyección del microorganismo mediante el uso de una jeringuilla tipo Hamilton, inyectándose 200 µL del inóculo. Tras inyectar el inóculo se inicia un cronometro para medir el tiempo y tomar las muestras en los tiempos estipulados. Antes de tomar una muestra se purga el conducto de muestreo para limpiar el mismo. Dependiendo de los tiempos en los que se quiera examinar la muestra se toman las muestras necesarias en tubos de ensayos estériles para su posterior estudio microbiológico.

Para la realización de la siembra se requiere hacer diluciones. Las diluciones se realizan en agua de peptona (10 g/L de peptona de caseína (Sharlau, Barcelona) y 5 g/L NaCl (Panreac, Barcelona)). A cada muestra se le hicieron las diluciones apropiadas para sembrarlas en Agar Tripticasa de Soja (TSA) (Sharlau, Barcelona). Tras la solidificación del medio se incubaron las placas a 37 °C por 48 h para su recuento. El recuento se utilizó un contador de colonias automático tal como está descrito por Condón et al., 1996.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos obtenidos del estudio de la termorresistencia de *Listeria monocytogenes* CECT 4032 procedieron de una serie de tratamientos isotérmicos en el Termorresistómetro Mastia (Conesa *et al.*, 2009), con distintos medios de calentamiento (un medio de laboratorio y una crema de verduras comercial) y entornos (pH 7 y pH 4,2) a diferentes temperaturas (55°C, 57,5°C, 60°C y 62,5°C). El análisis de los datos experimentales se ha llevado a cabo mediante el uso de una herramienta computacional o software denominado Bioinactivation (Garre *et al.*, 2017), lo que ha permitido su modelización.

### 6.1 Termorresistencia en caldo de laboratorio a pH 7.0

Las figuras 1 y 2 representan las curvas de supervivencia y de termodestrucción de *Listeria monocytogenes* CECT 4032, observadas bajo condiciones isotérmicas en caldo de laboratorio pH 7.0 a cuatro temperaturas: 55°C, 57,5°C, 60°C y 62,5°C.

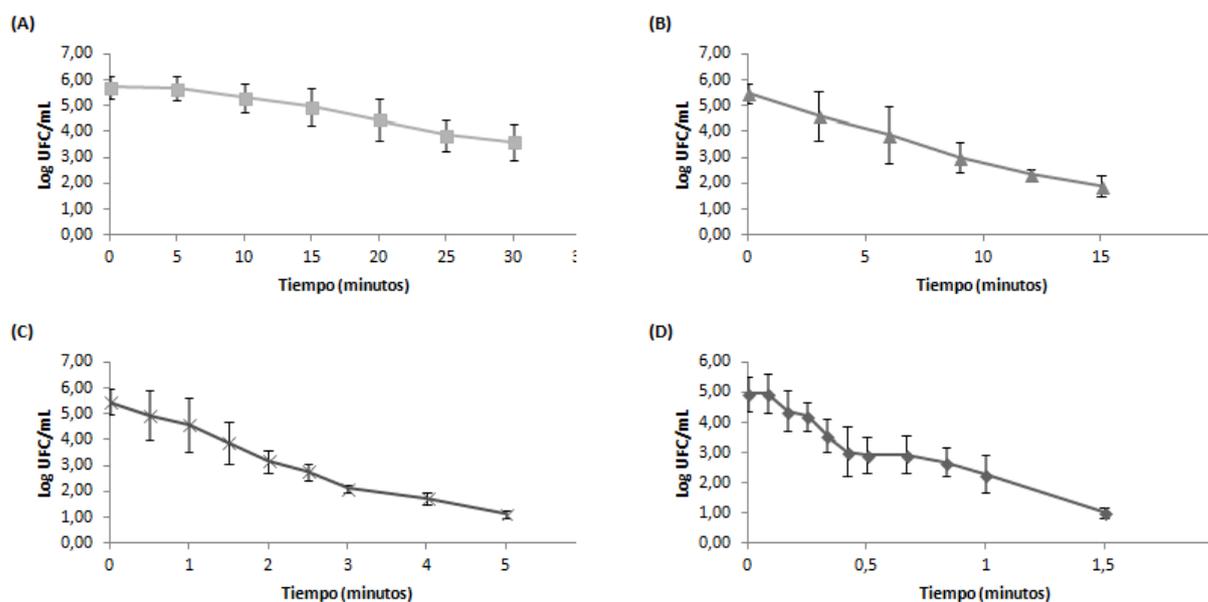


Figura 1. Curvas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en TSB a pH 7,0 con un tratamiento aplicado (A) 55°C, (B) 57.5°C, (C) 60°C, (D) 62.5°C

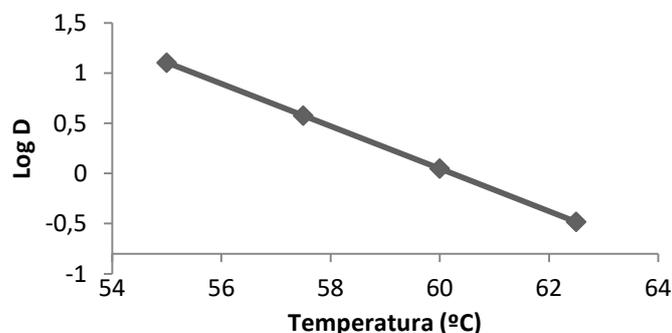


Figura 2. Curvas de termodestrucción de *Listeria monocytogenes* en TSB a pH 7,0



Mediante *Bioinactivation* se ha modelizado la termorresistencia en TSB a pH neutro con dos modelos (Bigelow y Mafart) y la obtención de los resultados se ven reflejados en la Tabla 1. De acuerdo a los resultados obtenidos por el modelo de Bigelow, a una temperatura de 55°C como referencia, obtenemos un Valor D de 12,69 minutos y un valor z de 4,74 °C. En cuanto a los resultados del modelo de Mafart, se ha calculado un valor  $\delta_{ref}$  (tiempo en alcanzar la primera reducción decimal) de 11,28 minutos y un valor z de 4,69°C. Como se puede observar en la Tabla 1, la forma de las curvas de supervivencia para todas las temperaturas presentaron una cierta concavidad ascendente ( $p < 1$ ) y, por lo tanto, las últimas células supervivientes presentan cierta resistencia al tratamiento aplicado. Este fenómeno, muy común en inactivación isoterma, se suele denominar “cola” (Peleg, 2006). Con el modelo de Mafart se obtuvo un valor  $\delta_{ref}$  y z semejantes al modelo de Bigelow, además de un valor RMSE sin diferencias significativas. Sin embargo, el AIC (Criterio de información de Akaike) y el AICc difieren de un modelo a otro. Este índice evalúa la calidad de la predicción teniendo en cuenta tanto la precisión (la diferencia entre las predicciones y las observaciones) como el número de parámetros, detectando una posible sobreparametrización del modelo (Akaike, 1974). Un menor valor de AIC (o AICc) indica una mejor calidad de las predicciones del modelo. Por lo tanto, en base a este criterio, la inclusión de la curvatura de la curva de inactivación (por medio del valor p) mejora significativamente la descripción de los datos obtenidos. De manera que el modelo que mejor ajustó los datos de la curva de inactivación de *L. monocytogenes* a pH 7 fue el modelo de Mafart.

|                          | Bigelow               |         |        |      |        |        | Mafart         |        |      |      |        |        |
|--------------------------|-----------------------|---------|--------|------|--------|--------|----------------|--------|------|------|--------|--------|
|                          | T <sub>ref</sub> (°C) | D (min) | Z (°C) | RMSE | AIC    | AICc   | $\delta$ (min) | Z (°C) | p    | RMSE | AIC    | AICc   |
| Crema comercial a pH 7,0 | 55                    | 12,69   |        |      |        |        | 11,28          |        |      |      |        |        |
|                          | 57,5                  | 3,77    |        |      |        |        | 3,31           |        |      |      |        |        |
|                          | 60                    | 1,12    | 4,74   | 0,52 | 214,35 | 214,43 | 0,97           | 4,69   | 0,88 | 0,50 | 210,18 | 210,36 |
|                          | 62,5                  | 0,33    |        |      |        |        | 0,28           |        |      |      |        |        |
| TSB a pH 4,2             | 55                    | 3,30    |        |      |        |        | 3,62           |        |      |      |        |        |
|                          | 57,5                  | 1,31    |        |      |        |        | 1,45           |        |      |      |        |        |
|                          | 60                    | 0,52    | 6,24   | 0,74 | 422,40 | 422,47 | 0,58           | 6,32   | 1,10 | 0,74 | 421,61 | 421,74 |
|                          | 62,5                  | 0,21    |        |      |        |        | 0,23           |        |      |      |        |        |
| Crema comercial a pH 4,2 | 55                    | 2,87    |        |      |        |        | 2,00           |        |      |      |        |        |
|                          | 57,5                  | 1,31    |        |      |        |        | 0,89           |        |      |      |        |        |
|                          | 60                    | 0,60    | 7,35   | 0,69 | 342,17 | 342,25 | 0,39           | 7,07   | 0,76 | 0,62 | 313,41 | 313,56 |
|                          | 62,5                  | 0,27    |        |      |        |        | 0,17           |        |      |      |        |        |

**Tabla 1.** Parámetros obtenidos para la modelización de Bigelow y Mafart de la determinación de la termorresistencia de la *Listeria monocytogenes* CEPA 4032, a diferentes temperaturas en TSB pH 7,0, TSB pH 4,2 y en crema comercial de verduras con pH 4,2.



Huertas (2008) usó el modelo de Bigelow mediante el programa informático Excel para determinar la resistencia térmica de *L. monocytogenes* CECT 4032 en caldo B.H.I., estimando un valor  $D_{55}$  de 23,19 minutos con un  $R^2$  muy cercano a 1, lo cual indica que la cinética de inactivación fue lineal. Determinó además un valor  $z$  de 3,51 °C. El valor  $D_{55}$  de su estudio difiere del obtenido en la presente investigación. Pese a haber utilizado la misma cepa y la misma temperatura de tratamiento se observaron diferencias significativas en los valores  $D$  y  $z$ . Las diferencias han podido deberse a que los medios de calentamiento no son los mismos, pese a ser ambos caldos de laboratorio ampliamente utilizados. En el caso de Huertas (2008) fue caldo B.H.I., mientras que en este estudio se utilizó T.S.B. Asimismo, la curva de supervivencia según este autor seguía una tendencia lineal mientras que la obtenida por el presente estudio tiene un valor de  $p$  de 0,88 ( $p < 1$ ), lo cual indica que las células supervivientes tienen menos probabilidad de morir. Por otro lado, Sotomayor (2015) determinó la termorresistencia de *L. monocytogenes* CECT 4032 en agua de peptona a pH 7,0 utilizando el modelo de Geeraerd. Este autor calculó un valor  $D_{55}$  de 6,56 minutos con una tendencia lineal al no observarse la presencia de fenómenos de hombros ni colas, a dicha temperatura. En las demás curvas de supervivencia, se observó que el microorganismo se comportaba de manera diferente (presencia de hombros, colas y curvas sigmoideas). En dicha investigación el valor  $z$  estimado fue de 3,93°C, similar al de Huertas (2008) y algo inferior al de este estudio. Las diferencias entre las termorresistencias en condiciones, en principio muy similares, pueden ser debidas a que las células de *L. monocytogenes* no se encontraban en el mismo estado fisiológico (Muñoz-Cuevas et al, 2013). Estos resultados ponen de manifiesto que pueden presentarse diferencias significativas en los valores  $D$  y  $z$  de este microorganismo en función de las condiciones experimentales usadas. También muestran que, en función de los resultados obtenidos, puede ser más adecuado uno u otro modelo; dado que el software Bioinactivation permite ajustar distintos modelos bajo un entorno común, permite basar la elección de uno u otro en unos criterios uniformes.

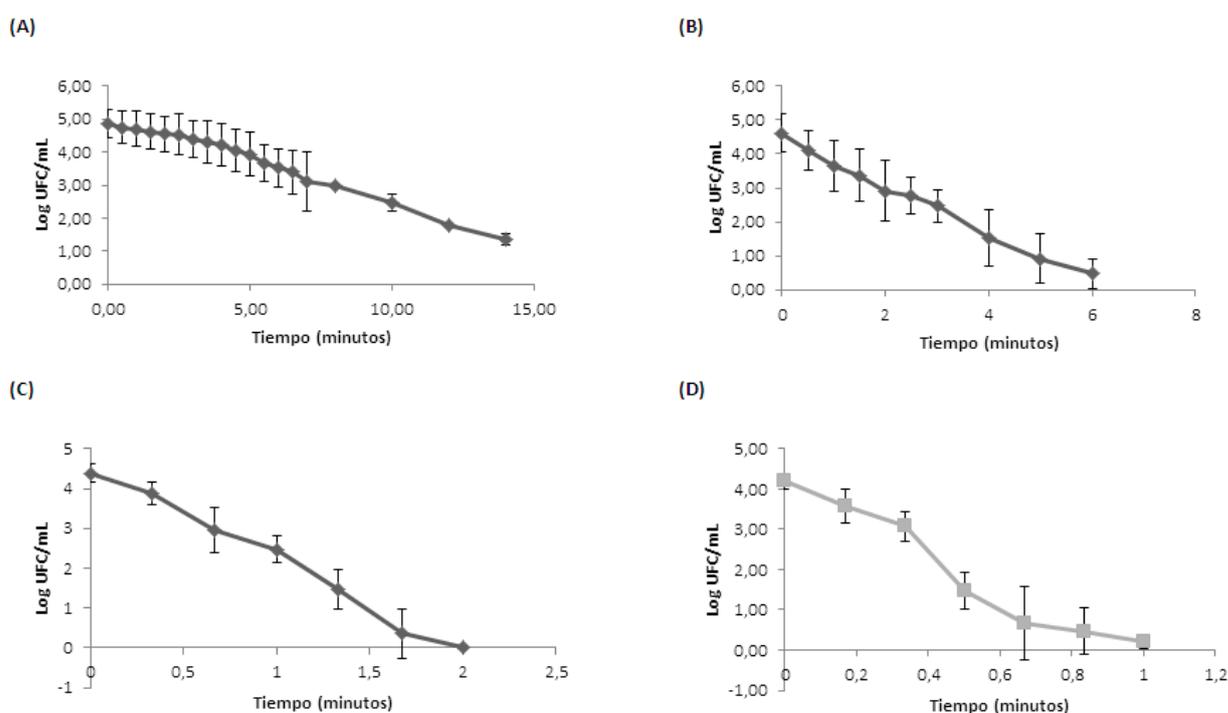
Li et al., (2017) investigaron el efecto de la sal y temperatura (57,5°C, 60°C, 62,5 °C y 65°C) sobre la supervivencia de tres cepas de *L. monocytogenes* (F2365, F4260, y V7). Los resultados demostraron que la termorresistencia de este patógeno en huevos de salmón (pH 6,15) dependen de la cepa utilizada, la temperatura y la concentración de sal aplicada. Los tratamientos realizados fueron isotérmicos y *L. monocytogenes* disminuyó de forma lineal sugiriendo una cinética de primer orden. En base a sus datos, concluyeron que la cepa más resistente de esta investigación era *L. monocytogenes* F2365 y *L. monocytogenes* V7 la más sensible. Los valores  $D$  de *L. monocytogenes* F4260, a todas las temperaturas estudiadas, fueron significativamente mayores en comparación con la presente investigación. Asimismo, la cepa *L. monocytogenes* V7 presenta valores muy semejantes con este estudio.

Por tanto, existen otros factores que pueden influir en las diferencias observadas en termorresistencia, tales como sustrato, cepas utilizadas y factores medioambientales. Por tanto, es conveniente realizar estudios de termorresistencia en condiciones isotérmicas que permitan conocer los parámetros cinéticos en condiciones óptimas antes de realizar ensayos en condiciones más estresantes.



## 6.2 Termorresistencia en caldo de laboratorio a pH 4.2

Las figuras 3 y 4 representan las curvas de supervivencia y de termodestrucción de *Listeria monocytogenes*, CECT 4032, observadas bajo condiciones isotérmicas en caldo de laboratorio pH 4,2 a cuatro temperaturas: 55°C, 57,5°C, 60°C y 62,5°C. Mediante el uso del software *Bioinactivation* se ha modelizado la termorresistencia de este patógeno bajo las condiciones mencionadas con los modelos de Bigelow y Mafart (Tabla 1). Según los resultados obtenidos por el modelo de Bigelow, el valor  $D_{55}$  fue de 3,30 minutos y el valor  $z$  fue 6,24°C. En cuanto a los resultados del modelo de Mafart, se obtuvieron unos valores muy similares al modelo de Bigelow puesto que el valor de  $\delta_{ref}$  fue de 3,62 minutos y un valor  $z$  de 6,32°C. A diferencia de las curvas de supervivencia a pH neutro (concavidad ascendente:  $p=0,88$ ), la termodestrucción en pH ácido presenta una concavidad descendente ( $p=1,10$ ), logrando en este último caso una mayor probabilidad de muerte al presentar las células supervivientes poca resistencia al tratamiento aplicado.



**Figura 3.** Curvas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* a pH 4,2 con un tratamiento aplicado (A) 55°C, (B) 57,5°C, (C) 60°C, (D) 62,5°C

El modelo óptimo seleccionado, dentro de los dos estudiados, para la determinación de la termorresistencia ha sido el modelo de Mafart. La selección del modelo óptimo radica en el menor valor del parámetro AIC, el cual se obtiene en dicho modelo. No obstante, y teniendo en cuenta que el modelo de Bigelow sigue una cinética de primer orden, ambas modelizaciones propuestas se ajustan bien al tener el parámetro  $p$  en torno a 1.

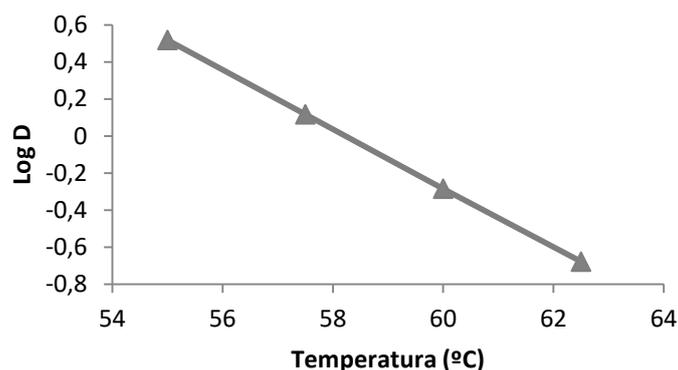


Figura 4. Curvas de termodestrucción de *Listeria monocytogenes* en TSB a pH 4,2

El efecto del pH inicial en el tratamiento térmico en *Listeria monocytogenes* CECT 4032 se vio reflejado tanto en el número inicial de microorganismos a tiempo cero dentro del termorresistómetro a las temperaturas de tratamiento (Figura 5) como en el resultado final de la inactivación tras la aplicación de un tratamiento isotérmico. La densidad microbiana en el tiempo cero sin tratamiento (s.t), es decir, en un entorno neutro en el medio de calentamiento, permanece estable teniendo dependencia con el inoculo inicial. Sin embargo, el número inicial de la población microbiana disminuirá gradualmente en función de la temperatura, si se realiza un tratamiento térmico en *Listeria monocytogenes* CECT 4032 sobre un medio de calentamiento con un entorno ácido. En base a los datos obtenidos, se puede deducir que el número inicial de microorganismos a tiempo cero en un entorno ácido (Nc.t) se ve directamente afectado o dañado por el tratamiento ácido así como por el choque térmico según la temperatura recibida, obteniéndose una diferencia más significativa conforme aumenta la temperatura del tratamiento aplicado.

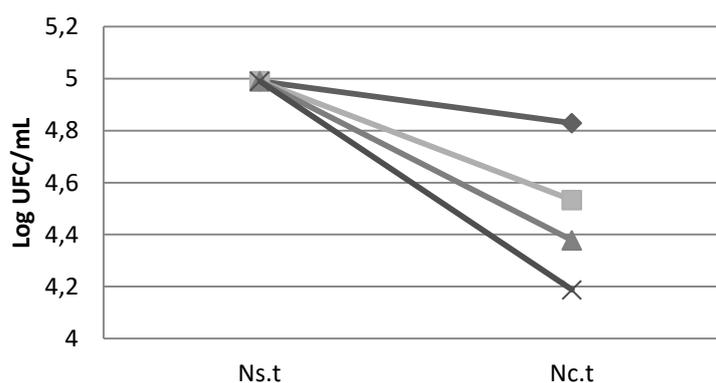
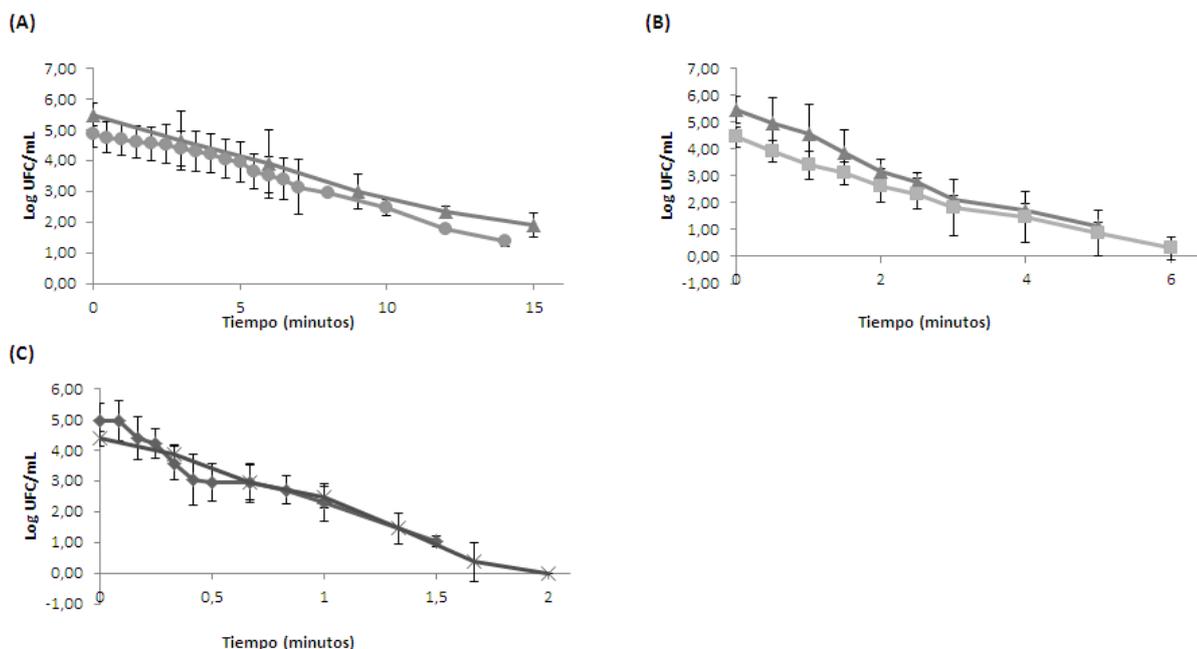


Figura 5. Efecto del pH inicial en los tratamientos térmicos aplicados en *Listeria monocytogenes*, —◆— 55°C, —■— 57,5°C, —▲— 60°C y —×— 62,5°C



Al comparar las curvas de supervivencia del microorganismo a pH neutro con pH 4,2, se observó que esta última presentaba una menor termorresistencia, viéndose una disminución en los valores de D a todas las temperaturas en comparación con los valores obtenidos en un entorno neutro (Tabla 1). Si se comparan las gráficas de supervivencia a 55°C (pH 4,2) y 57,5 °C (pH 7,0) (Figura 6A) se puede observar cómo se reducen 4 ciclos logarítmicos en 14 minutos para ambos. Esto indica que el entorno ácido actúa como una barrera intrínseca que ha de superar el microorganismo. Al obtenerse prácticamente la misma reducción logarítmica se puede deducir que para un mismo producto se podrían aplicar ambos tratamientos, requiriendo el de pH de 4,2 una menor temperatura de tratamiento, lo que puede ser beneficioso para la calidad del alimento si solo considerásemos *L. monocytogenes* como indicador. Este mismo comportamiento se ha observado con otras combinaciones de tiempo-temperatura: 60°C a pH 7,0 con 57,5 °C a pH 4,2; a 62,5°C a pH 7,0 con 60 °C a pH 4,2 (Figuras 6B y 6C, respectivamente); siendo entre las comparaciones, los dos últimos aquellos tratamientos menos perjudiciales en cuanto a la calidad del alimento por ser de menor duración. Además, al igual que en la investigación llevada a cabo por Fernández *et al.*, 1994 en esporos de *Bacillus stearothermophilus* el efecto del pH sobre la inhibición del microorganismo disminuía a medida que la temperatura de tratamiento aplicado aumentaba; obteniéndose también un incremento significativo en los valores z para los tratamientos isotérmicos sobre caldo de laboratorio de pH 4,2. Por otro lado y de acuerdo a los resultados obtenidos, si se comparan los valores D en un entorno neutro (pH 7,0) con aquellos valores obtenidos en entorno ácido (pH 4,2), se puede deducir que en el rango de temperaturas estudiado, la acidificación permitió reducir 2,5°C la temperatura de tratamiento térmico para obtener la misma inactivación. Por tanto, en aquellos productos sensibles a temperaturas elevadas y que puedan acidificarse, esta combinación puede ser beneficiosa para la calidad final.



**Figura 6.** Comparación entre las curvas de supervivencia de *L. monocytogenes* a pH 4,2 con pH 7,0 a diferentes temperaturas. (A) ● 55°C pH 4,2 con ▲ 57,5°C pH 7 (B) ■ 57,5°C pH 4,2 con ▲ 60°C pH 7 y (C) × 60°C pH 4,2 con ◆ 62,5°C pH 7



Vega *et al.*, (2015) usaron el modelo de Weibull mejorado por Mafart, entre otros, para determinar la resistencia térmica de *L. innocua* CECT 910 en un zumo de verdura con un pH de 4,25, estimando un valor  $\delta$  a 55°C de 3,635 minutos, el cual es prácticamente igual al obtenido en el presente estudio ( $\delta=3,62$ ) con el mismo modelo matemático. En este caso difiere el microorganismo y el medio de calentamiento, aunque el pH es prácticamente el mismo. Esto demuestra que, para ambos microorganismos, el comportamiento combinado de tratamiento térmico con choque ácido actuó de la misma manera.

### 6.3 Termorresistencia en crema de verduras comercial a pH 4.2

Las figuras 7 y 8 representan las curvas de supervivencia y de termodestrucción de *Listeria monocytogenes* CECT 4032, observadas bajo condiciones isotérmicas en crema comercial a pH 4,2 a cuatro temperaturas: 55°C, 57,5°C, 60°C y 62,5°C. La termorresistencia para estos ensayos, al igual que en los anteriores, se ha modelizado con dos modelos (Bigelow y Mafart) mediante el software *Bioinactivation* y la obtención de los resultados se ven reflejados en la Tabla 1. De acuerdo a los resultados obtenidos por el modelo de Bigelow, a una temperatura de 55°C como referencia, se obtuvo un valor  $D_{55}$  de 2,87 minutos y un valor  $z$  de 7,35 °C . En cuanto a los resultados del modelo de Mafart, se obtuvo un valor  $\delta_{55}$  de 2,0 minutos, un valor de  $z$  de 7,07°C y una  $p$  con un valor 0,76. Al igual que en los demás ensayos, el modelo que se ajusta mejor es el de Mafart al presentar una mejor calidad de las predicciones del modelo.

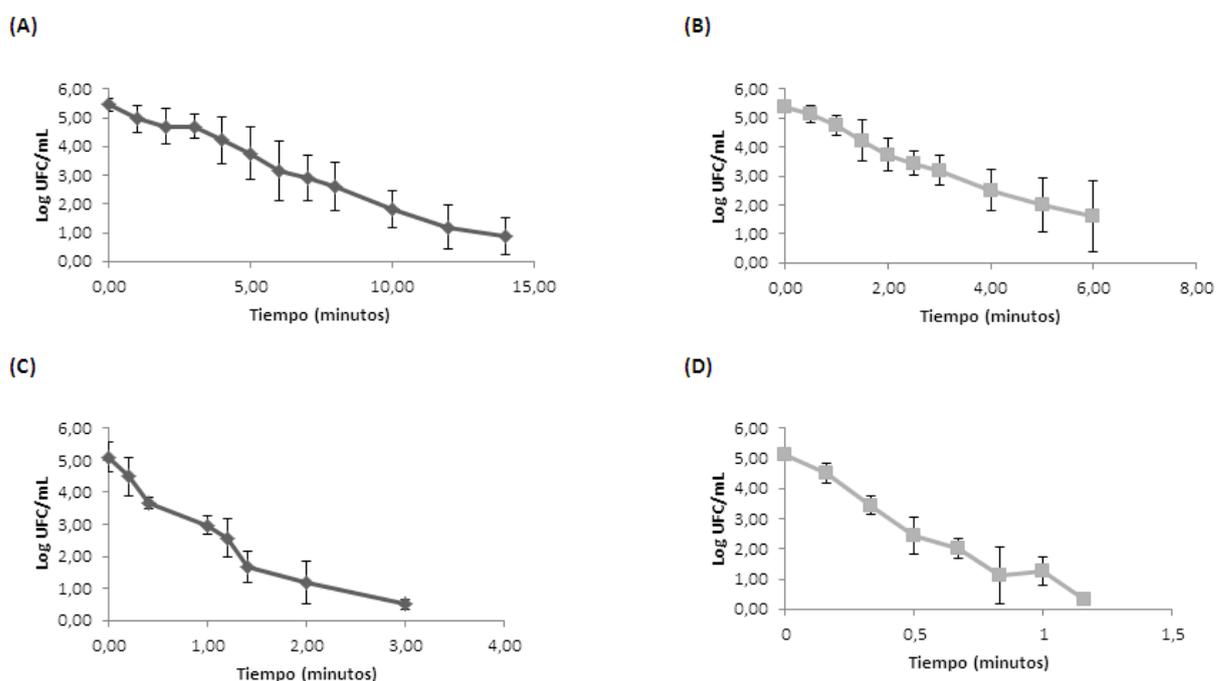
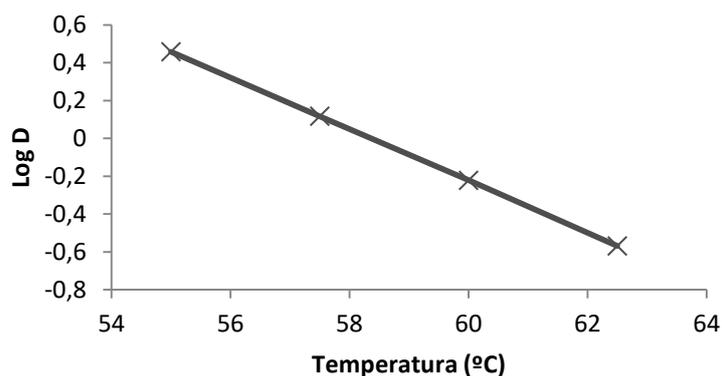


Figura 7. Curvas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en crema comercial de verduras a pH 4,2 con un tratamiento aplicado (A) 55°C, (B) 57,5°C, (C) 60°C, (D) 62,5°C

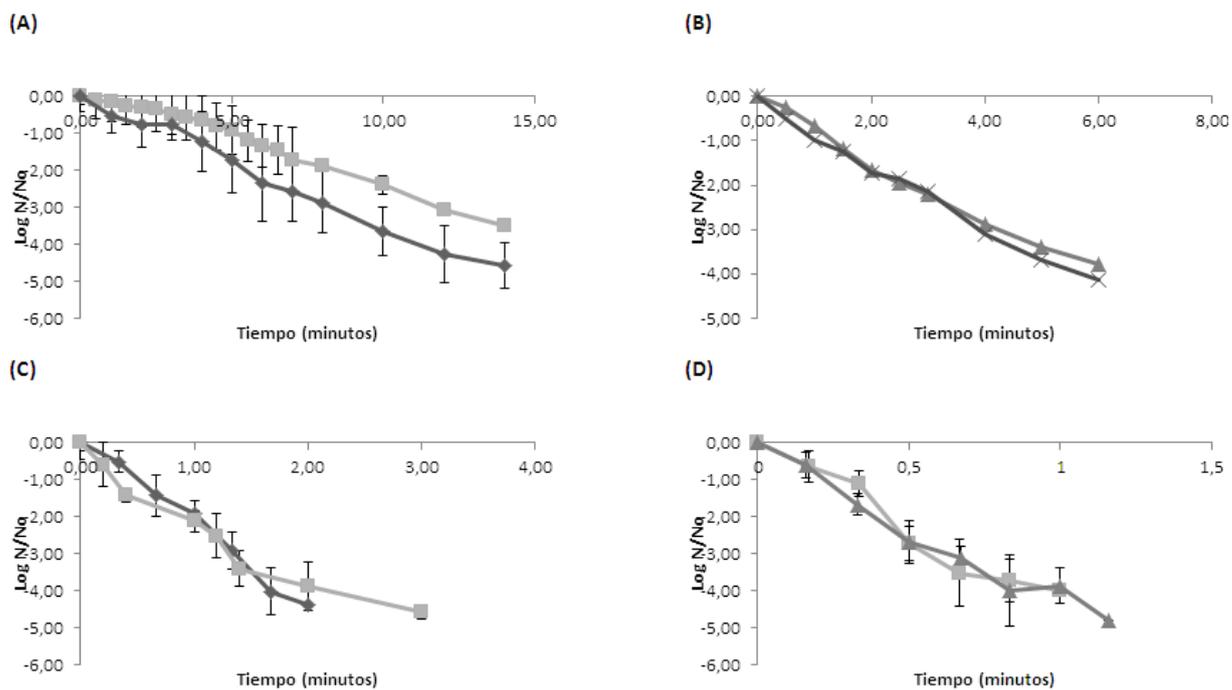


**Figura 8.** Curvas de termodestrucción de *Listeria monocytogenes* en crema de verduras comercial a pH 4,2

A diferencia del ensayo realizado en caldo de laboratorio pH 4,2, el efecto del pH inicial sobre *Listeria monocytogenes* CECT 4032 no se ve reflejado en el número inicial de microorganismos a tiempo cero en el termorresistómetro sobre las diferentes temperaturas de tratamiento en la crema comercial con un pH ácido. Este comportamiento puede deberse a que el tratamiento aplicado se ha realizado sobre un producto alimentario.

Gurtler *et al.*, (2005) y Huertas *et al.*, (2015) Juneja & Eblen (2000), observaron que la termorresistencia en los alimentos, al tratarse de matrices complejas, suele ser superior en comparación con los medios de laboratorio. Propusieron que la presencia de lípidos, carbohidratos, proteínas y la baja actividad de agua, entre otros factores, afecta la resistencia térmica de los microorganismos pudiendo tener factores inhibidores de crecimiento para los mismos. A diferencia de estos autores, la termorresistencia de *Listeria monocytogenes* CECT 4032 en la crema comercial de verduras estudiada fue inferior al medio de laboratorio (Figura 9) a las temperaturas más bajas, siendo similares a las temperaturas de tratamiento más elevadas. Esto indica que el efecto del alimento (dando lugar a una mayor inactivación para el mismo valor de pH) era dependiente del tiempo de exposición, por lo que fue mayor a las temperaturas bajas, con mayores tiempos de tratamiento. Este comportamiento también se observó entre el medio de laboratorio a pH 7 y 4,2, donde las diferencias en valores D fueron mucho mayores a bajas temperaturas que a altas (Tabla 1).

Benlloch-Tinoco *et al.*, (2014) investigaron la termorresistencia de *L. monocytogenes* CECT 4032 en puré de Kiwi con un pH de 4,5 a tres temperaturas diferentes (50°C - 60°C) mediante un tratamiento térmico de pasteurización convencional (conventional thermal pasteurization, CTP) y un tratamiento microondas a diferentes niveles de potencia (600 W, 900W y 1000 W). El análisis de los datos experimentales se hizo mediante un modelo cinético de primer orden. A 55°C obtuvieron un valor  $D_{55}$  de 2,89 minutos con una bondad de ajuste ( $R^2$ ) de 0,976, es decir, con una cinética de inactivación lineal. Este valor fue muy  $D_{55}$  obtenido por el presente estudio es muy similar al nuestro ( $D_{55} = 2,87$ ). En general, los valores D obtenidos en la presente investigación se encuentran en el rango comúnmente observado para esta bacteria en diversos productos alimenticios (Benlloch-Tinoco *et al.*, 2014, Gabriel & Nakano 2009 y Van Asselt & Zwietering, 2006).



**Figura 9.** Comparación entre las curvas de supervivencia de *L. monocytogenes* a pH 4,2 con crema comercial a pH 4,2 a diferentes temperaturas. (A) 55°C: —■— TSB —◆— Crema comercial (B) 57,5°C: —×— TSB —▲— Crema comercial, (C) 60°C: —◆— TSB —■— Crema comercial y (D) 62,5°C: —■— TSB —▲— Crema comercial



## 7. CONCLUSIONES

---

- La respuesta de *Listeria monocytogenes* CECT 4032 a los tratamientos térmicos es diversa y depende de las condiciones de temperatura aplicadas, del medio de calentamiento y del pH del mismo.
- El entorno ácido (pH 4,2) en el medio de calentamiento de laboratorio (TSB) afectó al número inicial de los microorganismos a tiempo cero del inicio de un tratamiento térmico; sin embargo, este efecto no se ha observado en la crema comercial.
- *Listeria monocytogenes* CECT 4032 presentó menor termorresistencia cuando se encontraba en un medio con entorno ácido (pH 4,2). Sin embargo, este efecto fue más evidente a las temperaturas más bajas, debido al mayor tiempo de exposición a las condiciones ácidas; ello se reflejó en un mayor valor z en medios de pH ácido.
- La termorresistencia de *L. monocytogenes* en el alimento ensayado fue menor incluso que en el medio de laboratorio acidificado, si bien su efecto ha dependido del tiempo de exposición, necesitando más tiempo para inactivar el microorganismo a las temperaturas más bajas. El valor z ha sido el más alto de entre todas las condiciones ensayadas.
- En las condiciones estudiadas, el modelo de Weibull propuesto por Mafart ha sido el más adecuado para la modelización de la inactivación de *Listeria monocytogenes*, CEPA 4032.
- La combinación de un pH ácido y un alimento desfavorable para el microorganismo puede permitir reducir la intensidad de tratamientos térmicos calculados en condiciones de laboratorio y contribuye al desarrollo de nuevos productos mediante procesos combinados efectivos.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

Akaike, H., (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control* 19, 716–723.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). (2018). Retirada de fórmulas infantiles fabricadas en Francia (actualizado 23/01/2018). URL: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/noticias\\_y\\_actualizaciones/temas\\_de\\_interes/lactalis\\_francia.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/noticias_y_actualizaciones/temas_de_interes/lactalis_francia.htm) Última visualización: 25/01/2018.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). (2018). Intoxicación por *Listeria monocytogenes* atribuida a quesos de leche cruda de oveja procedentes de España. URL: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/ampliacion/quesos.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/quesos.htm) Última visualización: 07/02/2018.

Adams, M. R., & Moss, M.O., (2008). *Food Microbiology*. Third Edition. UK, RSC Publishing.

Bell, C., & Kyriakides, A., (2002). *Listeria monocytogenes*. In: *Foodborne pathogens Hazards, risk analysis and control*. Blackburn, C.W., & Peter, J. M. (eds.) CRC Press, Florida, USA.

Benlloch-Tinoco, M., Pina-Pérez M.C., Martínez-Navarrete N., Rodrigob D., (2014) *Listeria monocytogenes* inactivation kinetics under microwave and conventional thermal processing in a kiwifruit puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 22, 131–136

Burnham, K.P., & Anderson, D.R., (2002). Avoiding Pitfalls When Using Information-Theoretic Methods. *The Journal of Wildlife Management*. Vol. 66, No. 3, 912-918.

Centro Nacional de Epidemiología (2016). Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles informe anual. Año 2015. Madrid, España. URL: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=12/12/2017-05863fc4dd>; URL: [http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/pdf\\_2017/RENAVE\\_INFORME\\_ANUAL\\_2015.pdf](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/pdf_2017/RENAVE_INFORME_ANUAL_2015.pdf)

Corradini, M.G., & Peleg, M., (2007) The non-linear kinetics of microbial inactivation and growth in foods. In: *Modelling microorganisms in food*. Brul, S., Van Gerwen, S., & Zwietering, M. (eds.) CRC Press, Florida, USA.

Cotter, P.D., Hill, C. (2003) Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low Ph. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 67, No. 3, p. 429–453

Davis, M.J., Coote, P.J., O'Byrne, C.P., (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology*, Vo. 142, 2975-2982

Di Ciccio, P., Meloni, D., & Ianieri, A. (2015). *Listeria monocytogenes*: Growth in Biofilms in the Food Industry. In: *Listeria Monocytogenes: Incidence, Growth Behavior and Control*. Vicario, T. (ed.). NY. Nova Biomedical.



D’Orazio, S.E.F., 2014. Animal models for oral transmission of *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 4, No. 15.

Doyle, E.M., Mazzotta, A.S., Wang, T., Wiseman, D.W., & Scott, V.H, (2001). Heat Resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, Vol. 64, No. 3, 410–429.

European Food Safety Authority (EFSA). (201). Panel on Biological Hazards. Scientific Opinion on the risk posed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds. Vo. 9(11):2424.

European Food Safety Authority (EFSA). (2016). EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2015. Vo. 14, No. 12

European Food Safety Authority (EFSA). (2018). Update on Salmonella Agona outbreak. URL: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180117-0>

Food Safety of Ireland (FSAI). (2011). *Listeria monocytogenes*. URL: <file:///C:/Users/pc%20micro/Downloads/Listeria%20monocytogenes%20Factsheet%20FINAL.pdf>

Fernandez, P.S., Ocio, M.J, Sanchez, T., & Martinez, A., (1994) Thermal Resistance of *Bacillus stearothermophilus* Spores Heated in Acidified Mushroom Extract. *Journal of Food Protection*: January 1994, Vol. 57, No. 1, pp. 37-41.

Garre, A., Fernández, P.S., Lindqvist, R., & Egea, J.A., (2017). Bioinactivation: Software for modelling dynamic microbial inactivation. *Journal of Food Protection*, Vol. 93, 66-74.

Gibbons, N. E. (1972). *Listeria* Pirie-Whom Does It Honor? *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 22, 1-3.

Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M-F., Bielecka, M.K., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O., & Lecuit, M. (2010) Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*. Vo. 16, No. 1.

Gurlter, J. B., Kormnacki, J. L., & Beuchat, L. R. (2005). *Enterobacter sakazakii* : A coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 1–34.

Juneji, V.K & Eblen, B.S (2000) Heat inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in beef as affected by fat content. *Letters in applied Microbiology*. Vo. 30, Issue 6, 461–467

Li, C., Huang, L., Hwang C-A., (2017) Effect of temperature and salt on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in salmon roe. *Food Control*. Vo. 73, Part B, 406-410

Hadjilouka, G., Andritsos, N.D., Paramithiotis, S., Mataragas, M., & Drosinos, E.H., (2014) *Listeria monocytogenes* Serotype Prevalence and Biodiversity in Diverse Food Products. *Journal of Food Protection*: Vol. 77, No. 12, 2115-2120.



Huertas Baquero, J.P (2008) Efecto de tratamientos térmicos en combinación con los aceites esenciales de clavo y tomillo sobre la supervivencia de listeria monocytogenes evaluada in vitro y en una sopa comercial. Trabajo Fin de Grado.

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. *International Dairy Journal*, NIZO Dairy Conference on Food Microbes 2001 12, 273–283.

Huertas J.P., Alvarez-Ordoñez, A., Morissey, R., Ros-Chumillas M., Esteban, M.D., Maté J., Palop, A., & Hill, C., (2015) Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behavior in reconstituted powdered infant formula. *Food Research International* Vo. 69, 401-409

Huertas, J.P (2015). Tesis doctoral: Effect of isothermal and non-isothermal treatments on the viability and stress response of foodborne pathogen and spoilage microorganisms.

Kieran, J., Dara, L., & Avelino Álvarez, Ordonéz (2015). *Listeria monocytogenes* in the Food Processing Environment. Springer.

Kyriakides, A., & Bell, C. (2002). *Listeria monocytogenes*. In: *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control*. (C.W. Blackburn and P.J. McClure, eds.)

Liu, D. (2013). Molecular Approaches to the Identification of Pathogenic and Nonpathogenic *Listeriae*. *Microbiology Insights*, 6, 59-69.

Liu, D., Hogzhi, T., Zhanglin, L., & Ping, X., (2015). Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnology Advances*, Vo. 33, 1484–1492.

Leistner L., (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*. Vo. 55, 181–186

Lou, Y., &Yousef, A.E., (1995). Resistance of *Listeria monocytogenes* to Heat after Adaptation to Environmental Stresses. *Journal of Food Protection*, Vol. 59, No.5, 1996, 465-471.

Lou, Y., Yousef, A.E., (1997). Adaptation to Sublethal Environmental Stresses Protects *Listeria monocytogenes* against Lethal Preservation Factors. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 63, No.4, 1996, 1252-1255.

Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., & Stahl, D.A., (2012). *Brock Biology of Microorganisms*, Global Edition, 15 edition. (ed.) Pearson, S.I

McMeekin, T.A., Mellefont, L.A., & Ross, T., (2007) Predictive microbiology: past, present and future In: *Modelling microorganisms in food*. Brul, S., Van Gerwen, S., & Zwietering, M. (eds.) CRC Press, Florida, USA.

Mortarjemi, Y., & Adams, M., (2007). *Emerging foodborne pathogens*. Florida, USA. CRC Press

Muñoz-Cuevas, M., Guevara, L., Aznar, A., Martínez, A., Periago, P.M., Fernández, P.S., (2013). Characterisation of the resistance and the growth variability of *Listeria monocytogenes* after high hydrostatic pressure treatments. *Food Control* 29, 409–415.



O'Driscoll, B., Cormac, G., Gahan, M., & Hill, C., (1996). Adaptive Acid Tolerance Response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an Acid-Tolerant Mutant Which Demonstrates Increased Virulence. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 5, 1693–1698

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Enfermedades de transmisión alimentaria. URL: [http://www.who.int/topics/foodborne\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/) Última visualización: 25/01/2018.

Phan-Thanh, L., Mahouin, F., & Aligé, S., (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. Vo. 55, No. (1-3), 121-6.

Peleg, M., (2006). *Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems*. Florida, CRC Press Inc.

Pellicer, K. & Brusa, V. (2015). *Listeria monocytogenes* Outbreaks: Epidemiological Update and Control Possibilities. In: *Listeria Monocytogenes: Incidence, Growth Behavior and Control*. Vicario, T. (ed.). NY. Nova Biomedical.

Pérez-Rodríguez, F., & Valero, A., (2013) *Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems: Models for Predicting Growth and Inactivation*. NY,USA, CRC Press

Prescott, L.M., Harley J.P., & Klein, D.A. (2000). *Microbiología* (Aparicio, J.L., Aguirre, J., Fernández, O., & Bleiberg, E). Madrid, España, McGraw-Hill. (Libro original publicado en 1999).

Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J., (2010). The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell* . Vo. 40, No. 2, 253-266

Ryser, E.T & Marth, E.H (2007). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition. CRC Press

Smoot, L., & Cordier, J-L., (2006). Industrial food microbiology and emerging foodborne pathogens. In: *Emerging foodborne pathogens*. Motarjemi, Y., & Adams M. (eds.) CRC Press, Florida, USA.

Sotomayor, J.A (2015). Efecto de un choque ácido y del pH del medio de calentamiento sobre la termorresistencia de *Listeria monocytogenes*. Trabajo final de Master. UPCT

Stoica, P., Selen., Y., (2004). Model-order selection: a review of information criterion rules. *IEEE Signal Processing Magazine*. Vo. 21, Issue: 4, 36-47

Van Asselt, D., & Zwietering, H., (2006) A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. Vo 107, Issue 1, 73-82

Vega, S., Saucedo, D., Rodrigo, D., Pina, C., Armero, C., Martínez, A., (2015) Modeling the isothermal inactivation curves of *Listeria innocua* CECT 910 in a vegetable beverage under low-temperature treatments and different pH levels. *Food Science and Technology International*



Van Boekel, M.A.J.S., (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. Vo. 74, 139–159

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 optimisation of thermal processes in food sterilisation. *Food Research International*, Vo. 43, 1895–1901.

Wagner, M., & McLauchlin, J. (2008). In D. Liu (Ed.), Chapter 1: Biology in handbook of listeria monocytogenes (pp. 3). Boca Raton, Florida: CRC Press.

# ANEXO I

GRAFICAS Y PARAMETROS OBTENIDOS A PARTIR DEL SOFTWARE BIOINACTIVATION



## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow.....   | 42 |
| Tabla 1. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow. ....                | 43 |
| Figura 2. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart.....    | 44 |
| Tabla 2. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart. ....                 | 46 |
| Figura 3. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow..... | 47 |
| Tabla 3. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow. ....              | 47 |
| Figura 4. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart.....  | 48 |
| Tabla 4. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart. ....               | 50 |
| .....  | 51 |
| Figura 5. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow.....   | 51 |
| .....  | 51 |
| Tabla 5. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow. ....                | 52 |
| .....  | 52 |
| Figura 6. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Mafart.....    | 53 |
| .....  | 53 |
| Tabla 6. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow. ....                | 54 |
| .....  | 54 |

---

|   |    |
|---|----|
| Figura 7. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow.....  | 55 |
| .....   | 56 |
| Tabla 7. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow. ....               | 56 |
| .....   | 56 |
| Figura 8. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart.....   | 57 |
| .....   | 57 |
| Tabla 8. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart. ....                | 58 |
| .....   | 58 |
| Figura 9. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow.....    | 59 |
| .....   | 59 |
| Tabla 9. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow. ....                 | 60 |
| .....   | 60 |
| Figura 10. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart.....    | 61 |
| .....   | 61 |
| Tabla 10. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart. ....                 | 62 |
| .....   | 62 |
| Figura 11. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow..... | 63 |
| .....   | 64 |
| Tabla 11. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow. ....              | 64 |
| .....   | 65 |
| Figura 12. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart.....  | 65 |

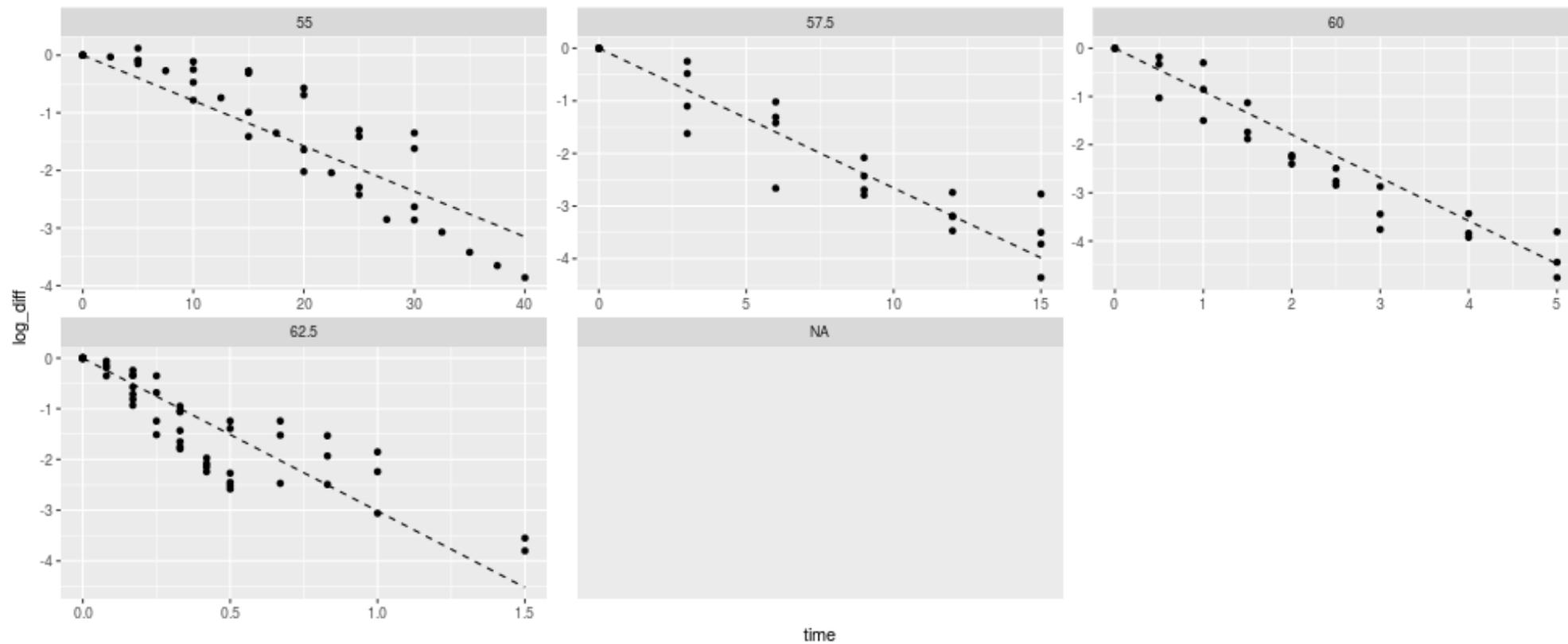
---

|   |    |
|---|----|
| .....   | 66 |
| Tabla 12. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart. ....   | 66 |
| .....   | 67 |
| Figura 13. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow. ....                              | 67 |
| .....   | 67 |
| Tabla 13. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow. ....  | 68 |
| .....   | 68 |
| Figura 14. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Mafart.....                                | 69 |
| .....   | 70 |
| Tabla 14. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Mafart. ....   | 70 |
| .....   | 71 |
| Figura 15. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow. ....                            | 71 |
| .....   | 72 |
| Tabla 15. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow. ....  | 72 |
| .....   | 72 |
| Figura 16. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart.....                              | 73 |
| .....   | 73 |
| Tabla 16. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart. ....   | 74 |
| .....   | 75 |
| Figura 17. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow..... | 75 |
| .....   | 76 |

|   |    |
|---|----|
| Tabla 17. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow. ....                | 76 |
| .....   | 77 |
| Figura 18. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart. ....   | 77 |
| .....   | 77 |
| Tabla 18. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart. ....                 | 78 |
| .....   | 78 |
| Figura 19. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow..... | 79 |
| .....   | 80 |
| Tabla 19. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow. ....              | 80 |
| .....   | 81 |
| Figura 20. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart. .... | 81 |
| .....   | 82 |
| Tabla 20. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart. ....               | 82 |
| .....   | 83 |
| Figura 21. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow.....   | 83 |
| .....   | 84 |
| Tabla 21. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow. ....                | 84 |
| .....   | 84 |
| Figura 22. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Mafart. ....   | 85 |

|   |    |
|---|----|
| .....   | 85 |
| Tabla 22. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Mafart. ....                 | 86 |
| .....   | 87 |
| Figura 23. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow..... | 87 |
| .....   | 88 |
| Tabla 23. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow. ....              | 88 |
| .....   | 88 |
| Figura 24. Curvas de supervivencia obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart. .... | 89 |
| .....   | 89 |
| Tabla 24. Parámetros obtenidos por el software <i>Bioinactivation</i> de <i>L.monocytogenes</i> en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart. ....               | 90 |

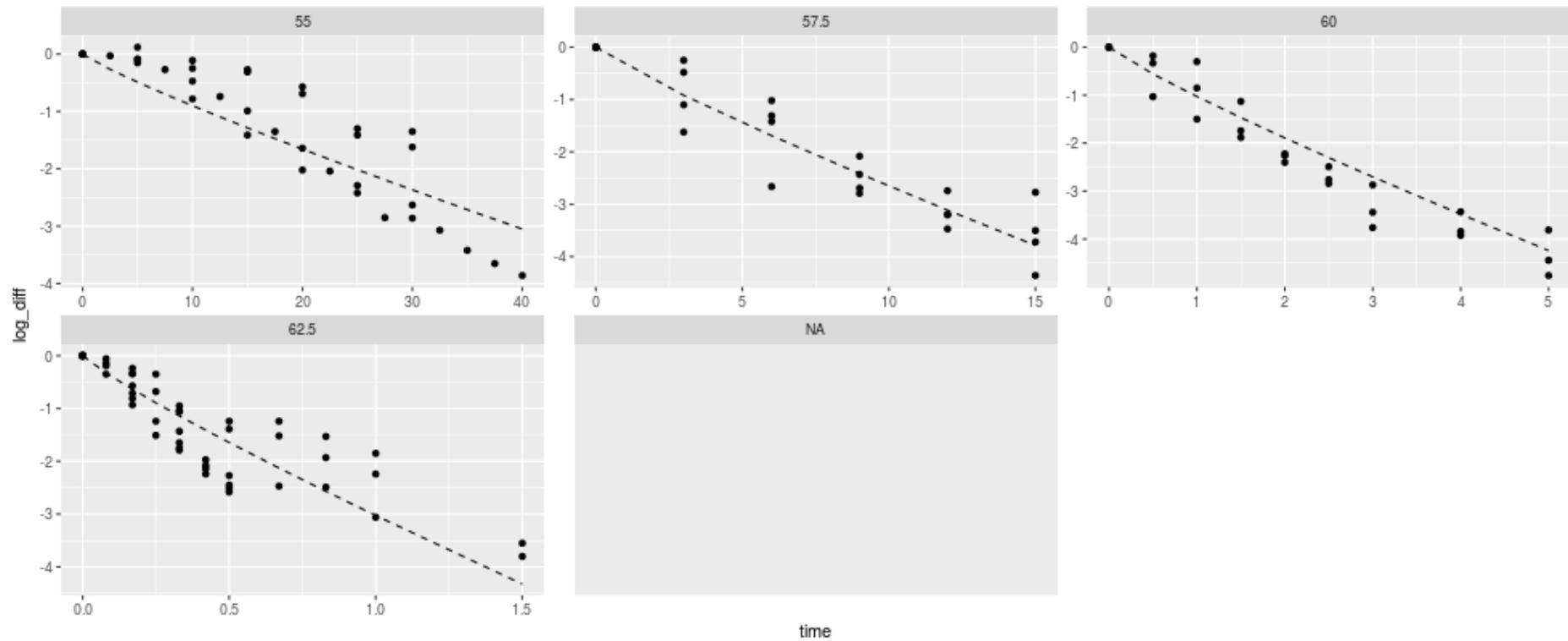
pH 7. Gráficas y parámetros obtenidos tras la modelización por el Software *Bioinactivation*.



**Figura 1.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow.

| Fitted parameters |          |                |                |                |        |      |      |
|-------------------|----------|----------------|----------------|----------------|--------|------|------|
| Parameter         | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |        |      |      |
| D_R               | 12.69    | 0.52           | 11.66          | 13.73          |        |      |      |
| z                 | 4.74     | 0.08           | 4.57           | 4.90           |        |      |      |
| ME                | RMSE     | loglik         | AIC            | AICc           | BIC    | Af   | Bf   |
| -0.03             | 0.52     | -105.17        | 214.35         | 214.43         | 220.21 | 3.28 | 0.93 |

**Tabla 1.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow.



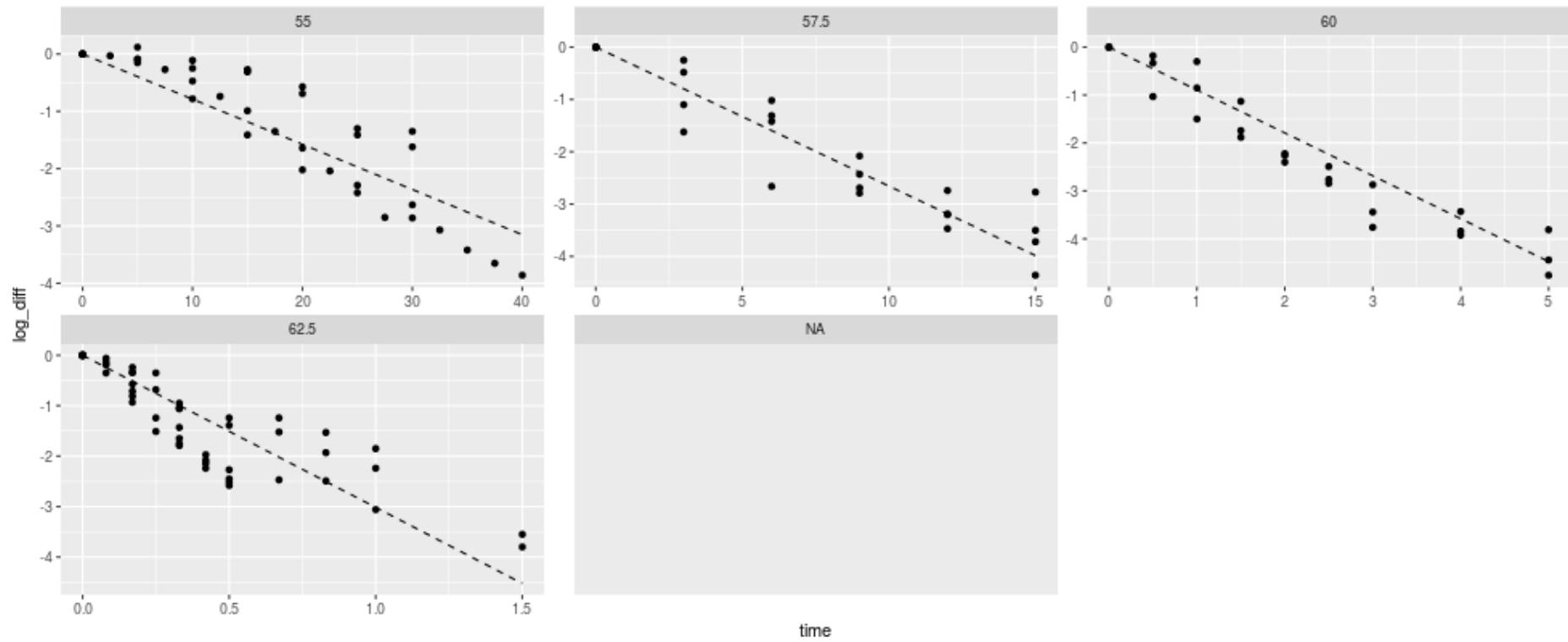
**Figura 2.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| delta_ref | 11.28    | 0.81           | 9.68           | 12.88          |
| z         | 4.69     | 0.09           | 4.51           | 4.87           |
| p         | 0.88     | 0.05           | 0.79           | 0.97           |

| ME   | RMSE | loglik  | AIC    | AICc   | BIC    | Af   | Bf   |
|------|------|---------|--------|--------|--------|------|------|
| 0.02 | 0.50 | -102.09 | 210.18 | 210.36 | 218.99 | 3.19 | 1.04 |

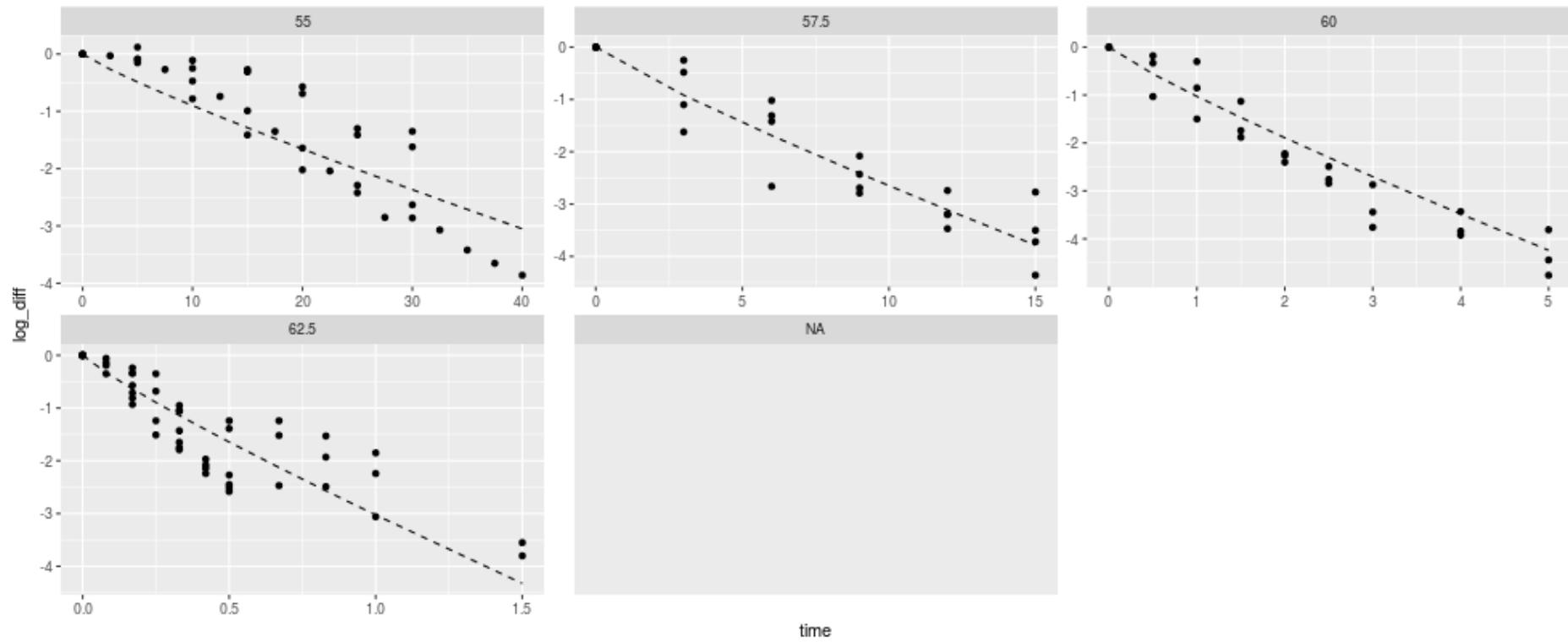
**Tabla 2.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart.



**Figura 3.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |        |      |      |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|--------|------|------|
| D_R       | 3.77     | 0.10           | 3.57           | 3.96           |        |      |      |
| z         | 4.74     | 0.08           | 4.57           | 4.90           |        |      |      |
| ME        | RMSE     | loglik         | AIC            | AICc           | BIC    | Af   | Bf   |
| -0.03     | 0.52     | -105.17        | 214.35         | 214.43         | 220.21 | 3.28 | 0.93 |

**Tabla 3.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow.



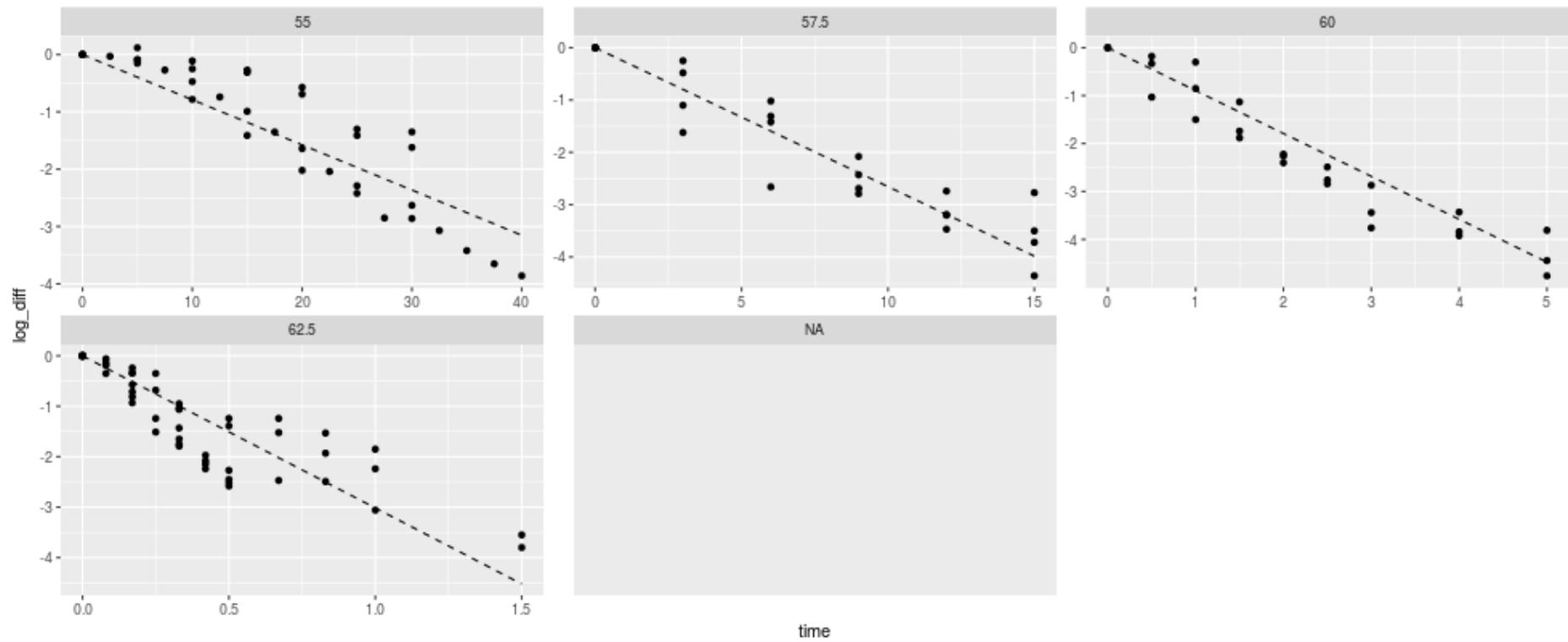
**Figura 4.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software Bioinactivation de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| delta_ref | 3.31     | 0.22           | 2.88           | 3.73           |
| z         | 4.69     | 0.09           | 4.51           | 4.87           |
| p         | 0.88     | 0.05           | 0.79           | 0.97           |

| ME   | RMSE | loglik  | AIC    | AICc   | BIC    | Af   | Bf   |
|------|------|---------|--------|--------|--------|------|------|
| 0.02 | 0.50 | -102.09 | 210.18 | 210.36 | 218.99 | 3.19 | 1.04 |

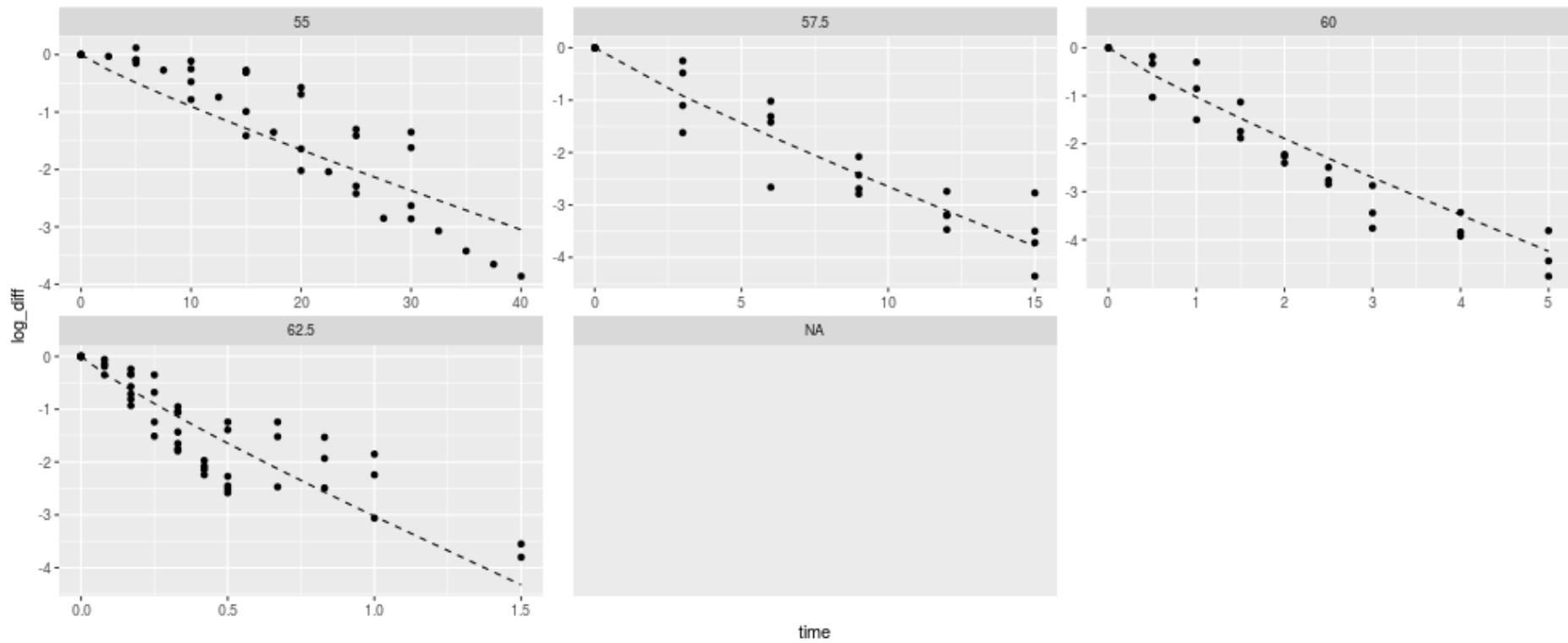
**Tabla 4.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart.



**Figura 5.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |        |      |      |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|--------|------|------|
| D_R       | 1.12     | 0.03           | 1.06           | 1.17           |        |      |      |
| z         | 4.74     | 0.08           | 4.57           | 4.90           |        |      |      |
| ME        | RMSE     | loglik         | AIC            | AICc           | BIC    | Af   | Bf   |
| -0.03     | 0.52     | -105.17        | 214.35         | 214.43         | 220.21 | 3.28 | 0.93 |

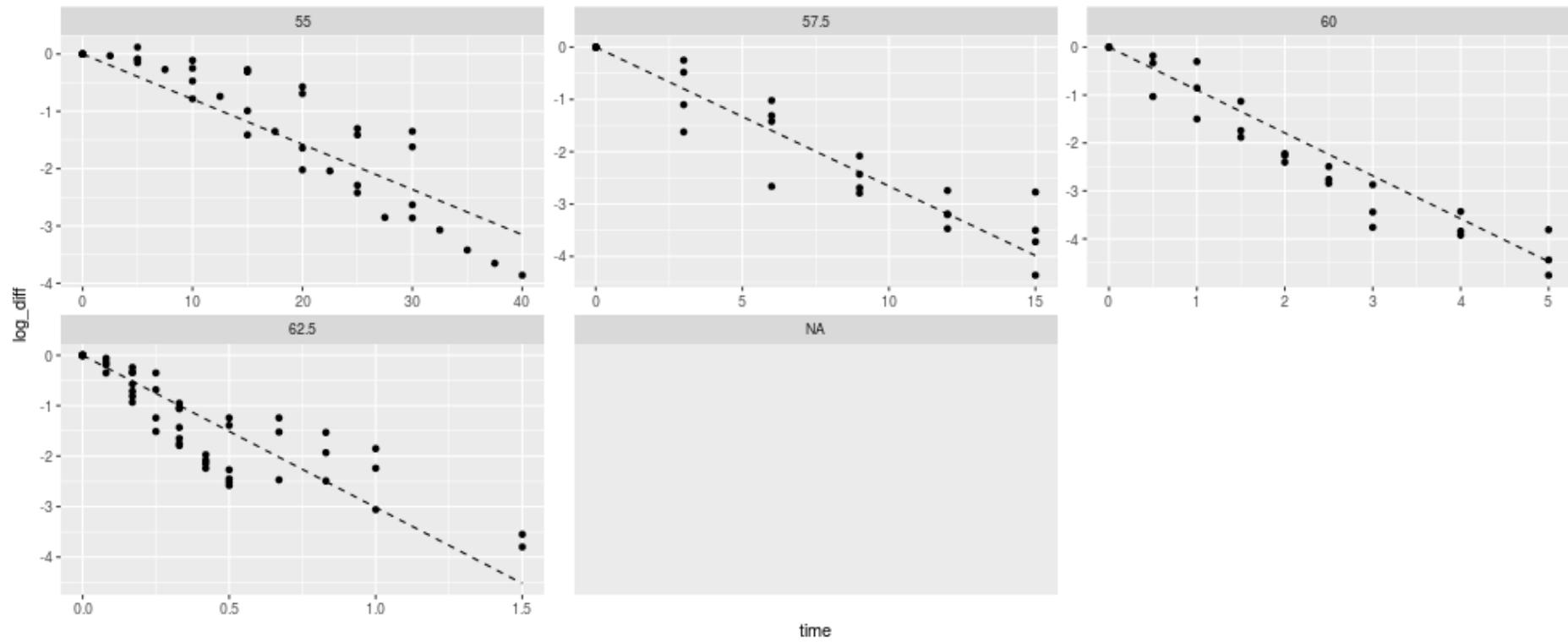
**Tabla 5.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow.



**Figura 6.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Mafart.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |        |      |      |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|--------|------|------|
| delta_ref | 0.97     | 0.06           | 0.84           | 1.10           |        |      |      |
| z         | 4.69     | 0.09           | 4.51           | 4.87           |        |      |      |
| p         | 0.88     | 0.05           | 0.79           | 0.97           |        |      |      |
| ME        | RMSE     | loglik         | AIC            | AICc           | BIC    | Af   | Bf   |
| 0.02      | 0.50     | -102.09        | 210.18         | 210.36         | 218.99 | 3.19 | 1.04 |

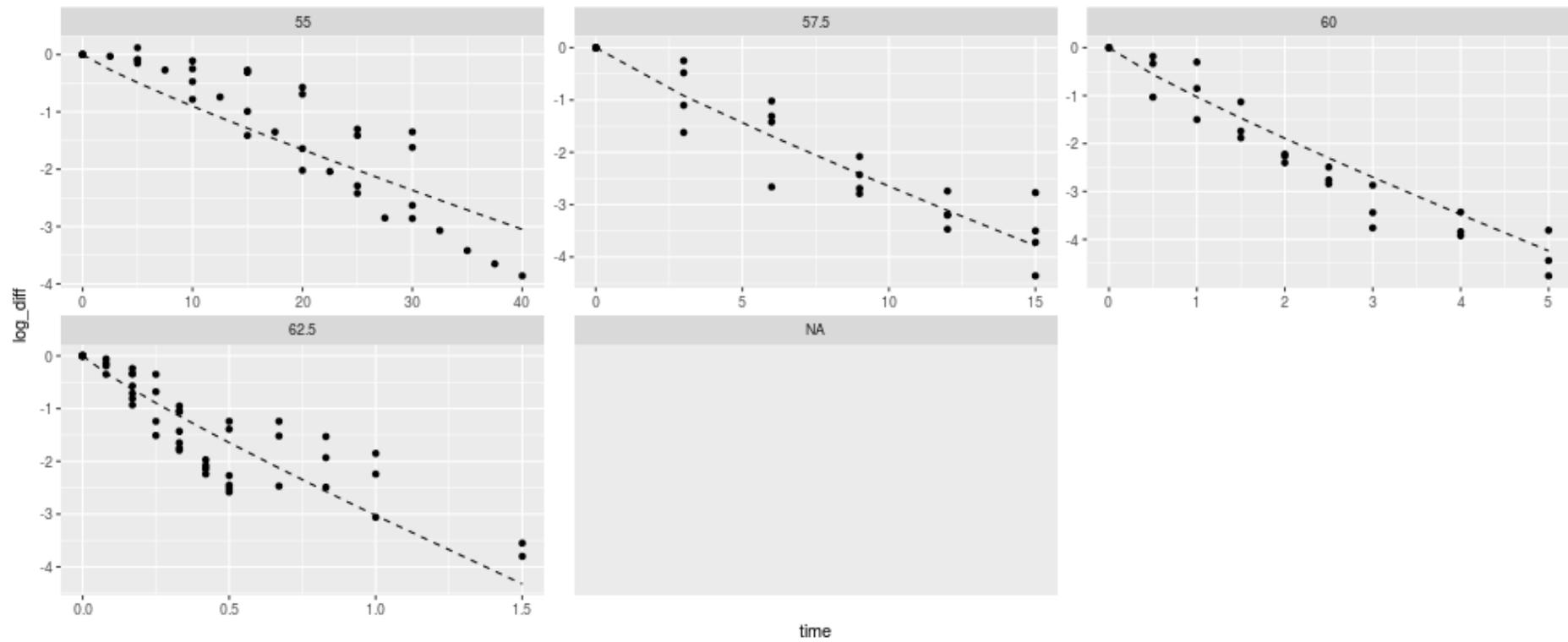
**Tabla 6.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow.



**Figura 7.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |        |      |      |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|--------|------|------|
| D_R       | 0.33     | 0.01           | 0.31           | 0.36           |        |      |      |
| z         | 4.74     | 0.08           | 4.57           | 4.90           |        |      |      |
| ME        | RMSE     | loglik         | AIC            | AICc           | BIC    | Af   | Bf   |
| -0.03     | 0.52     | -105.17        | 214.35         | 214.43         | 220.21 | 3.28 | 0.93 |

**Tabla 7.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow.



**Figura 8.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart.

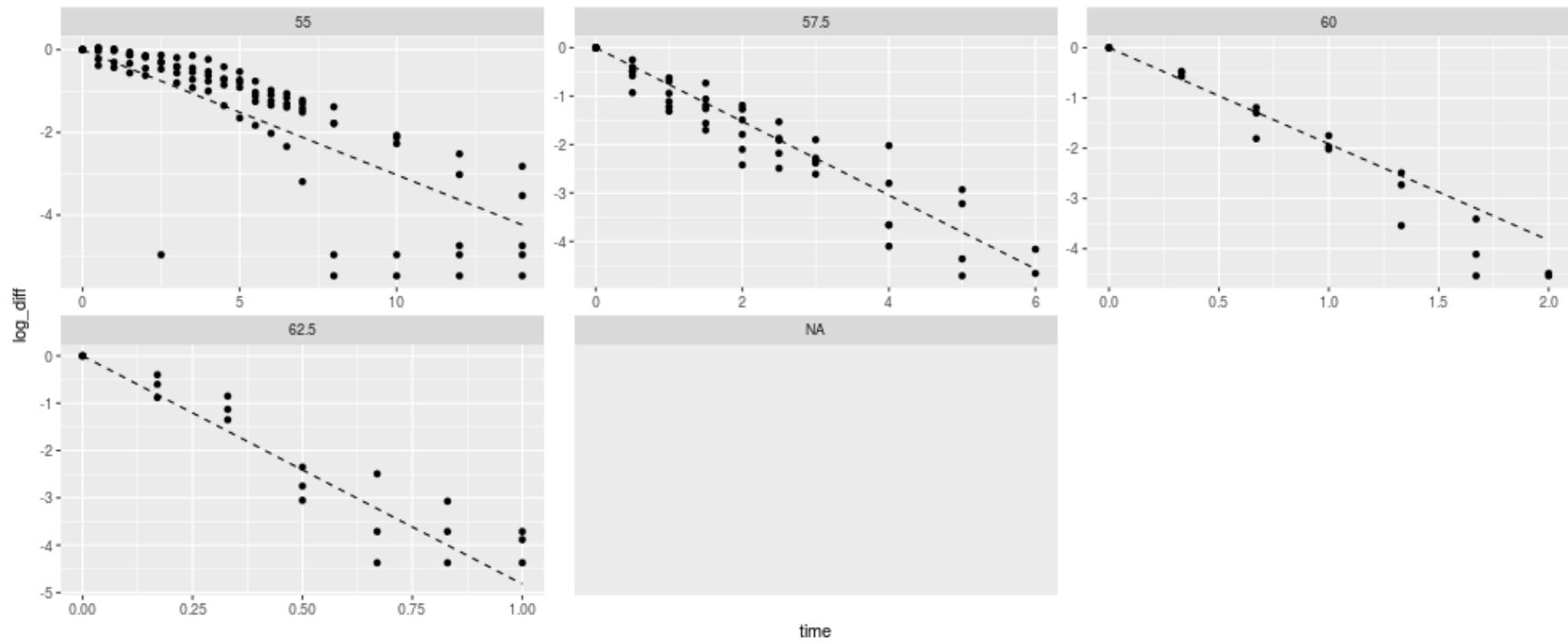
| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| delta_ref | 0.28     | 0.02           | 0.24           | 0.33           |
| z         | 4.69     | 0.09           | 4.51           | 4.87           |
| p         | 0.88     | 0.05           | 0.79           | 0.97           |

| ME   | RMSE | loglik  | AIC    | AICc   | BIC    | Af   | Bf   |
|------|------|---------|--------|--------|--------|------|------|
| 0.02 | 0.50 | -102.09 | 210.18 | 210.36 | 218.99 | 3.19 | 1.04 |

**Tabla 8.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 7,0 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart.

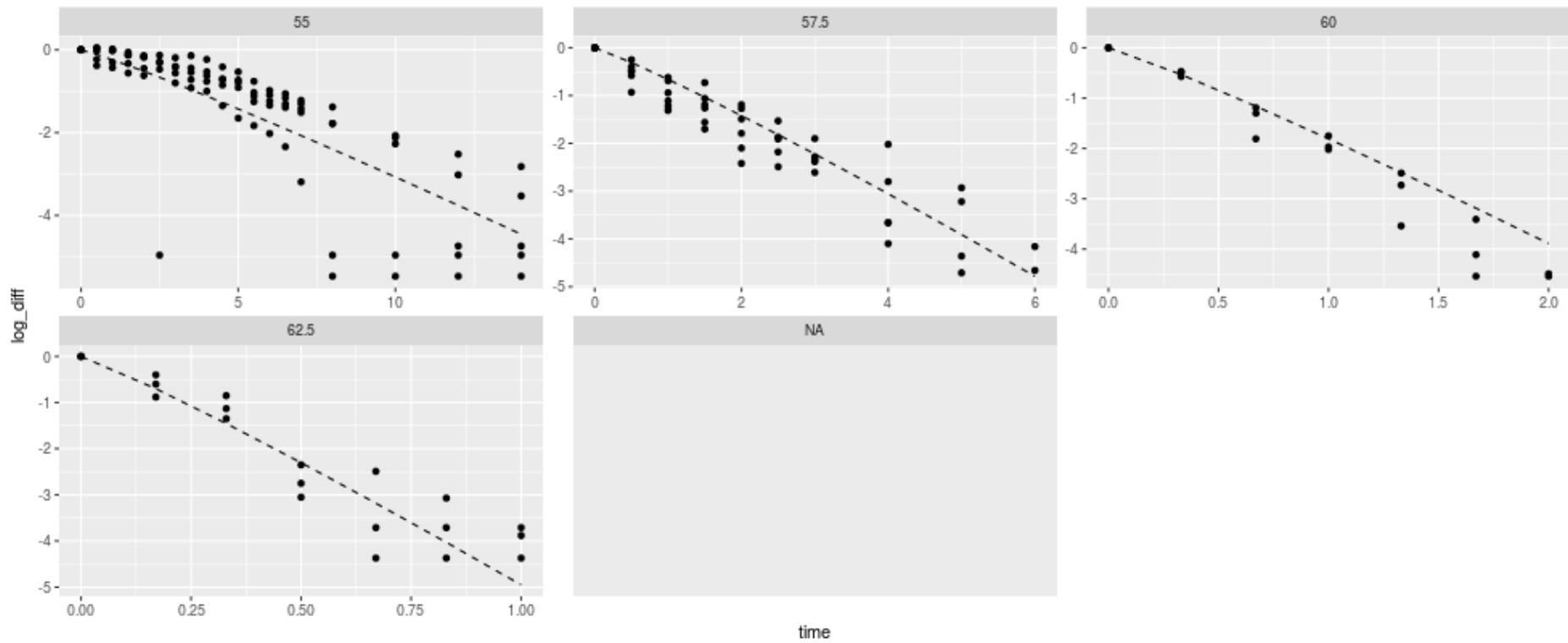
pH 4,2. Gráficas y parámetros obtenidos tras la modelización por el Software *Bioinactivation*.



**Figura 9.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |        |      |      |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|--------|------|------|
| D_R       | 3.30     | 0.12           | 3.07           | 3.54           |        |      |      |
| z         | 6.24     | 0.15           | 5.94           | 6.53           |        |      |      |
| ME        | RMSE     | loglik         | AIC            | AICc           | BIC    | Af   | Bf   |
| 0.05      | 0.74     | -209.20        | 422.40         | 422.47         | 428.87 | 5.50 | 1.12 |

**Tabla 9.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow.



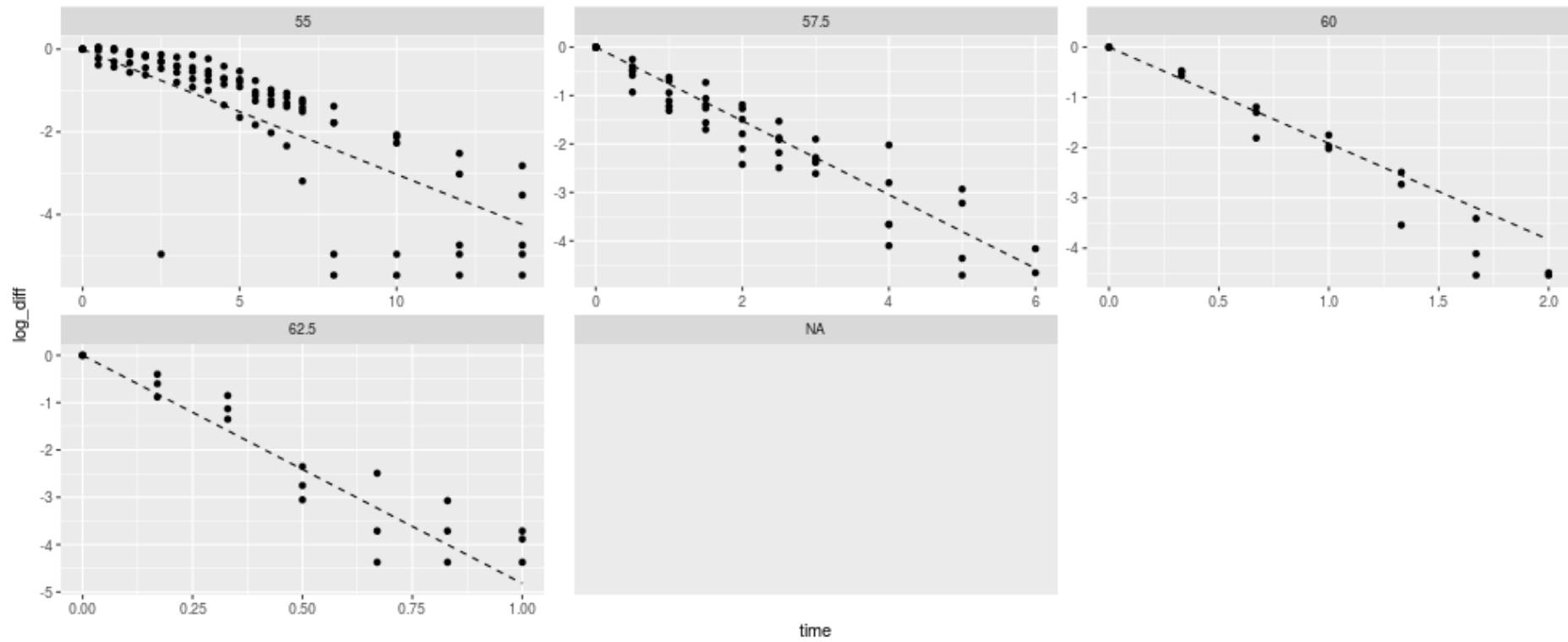
**Figura 10.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| delta_ref | 3.62     | 0.23           | 3.17           | 4.07           |
| z         | 6.32     | 0.14           | 6.04           | 6.59           |
| p         | 1.10     | 0.07           | 0.98           | 1.23           |

| ME   | RMSE | loglik  | AIC    | AICc   | BIC    | Af   | Bf   |
|------|------|---------|--------|--------|--------|------|------|
| 0.01 | 0.74 | -207.80 | 421.61 | 421.74 | 431.30 | 5.43 | 1.02 |

**Tabla 10.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart.



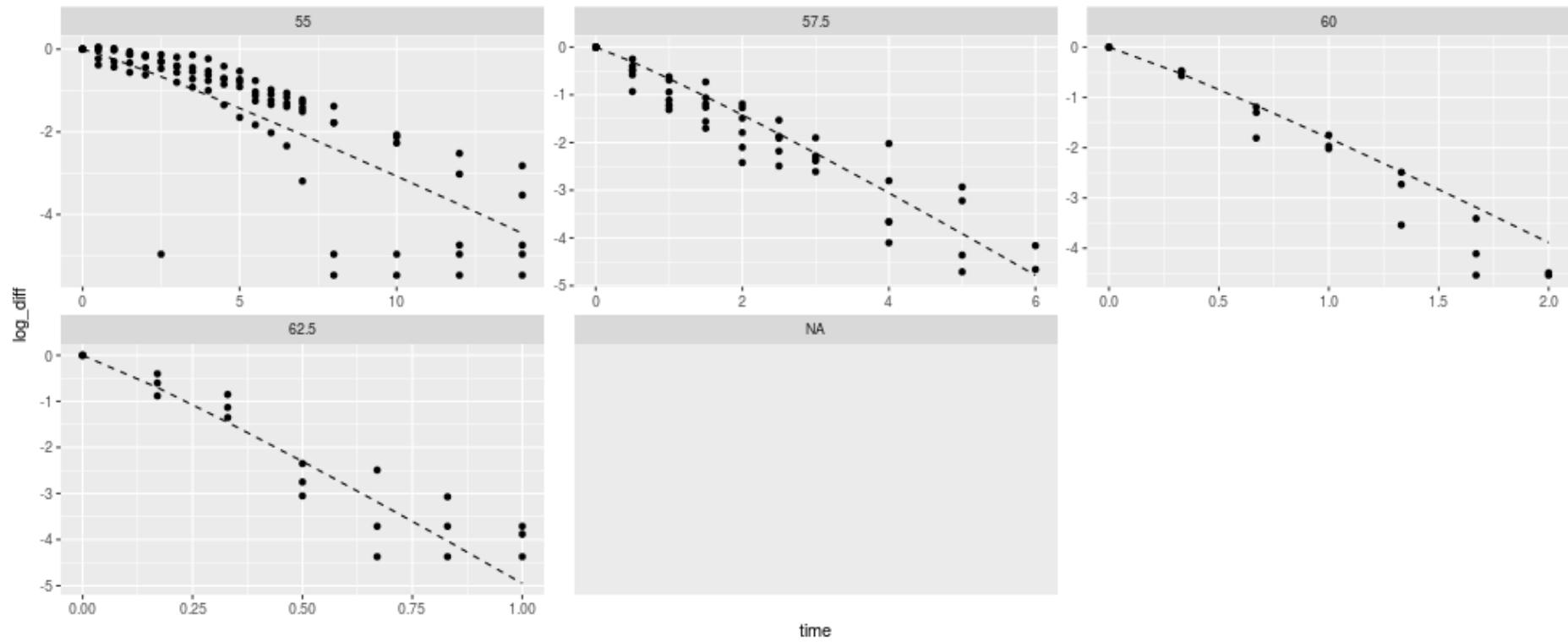
**Figura 11.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| D_R       | 1.31     | 0.03           | 1.25           | 1.38           |
| z         | 6.24     | 0.15           | 5.94           | 6.53           |

| ME   | RMSE | loglik  | AIC    | AICc   | BIC    | Af   | Bf   |
|------|------|---------|--------|--------|--------|------|------|
| 0.05 | 0.74 | -209.20 | 422.40 | 422.47 | 428.87 | 5.50 | 1.12 |

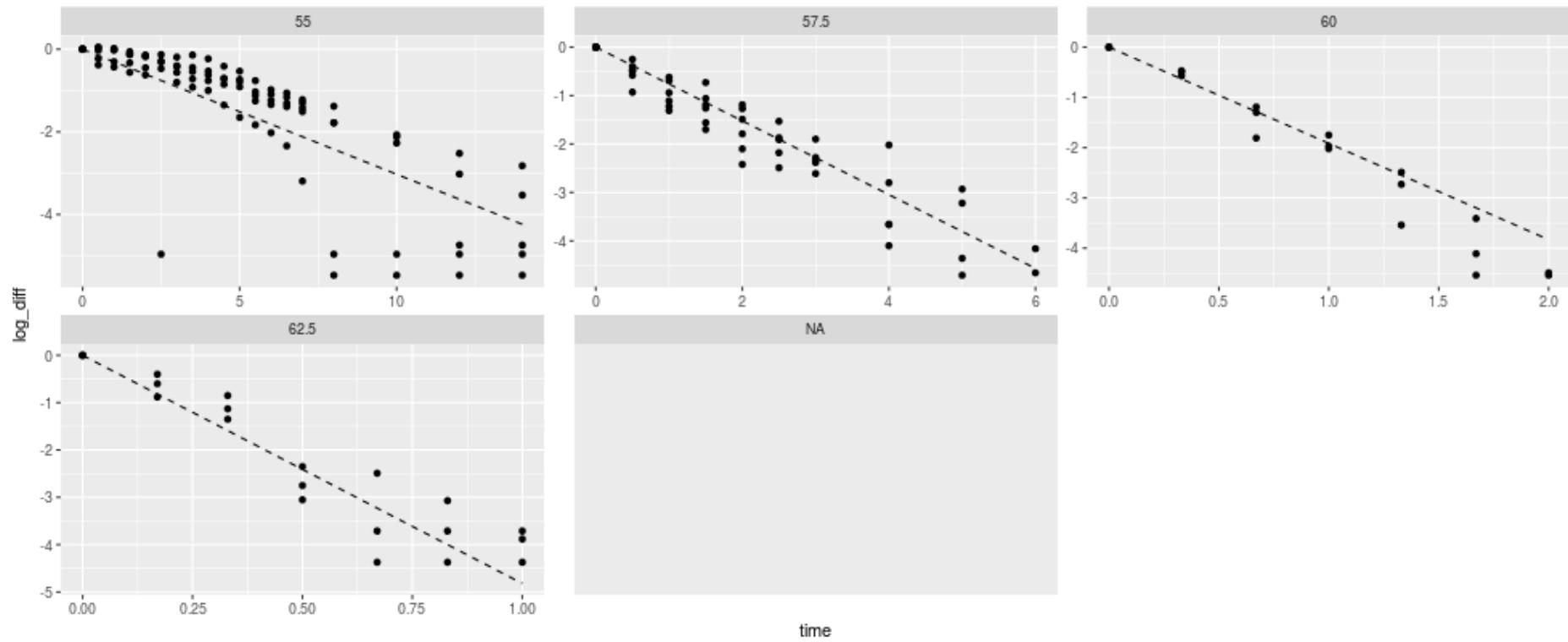
**Tabla 11.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow.



**Figura 12.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart.

| <b>Parameter</b> | <b>Estimate</b> | <b>Std. deviation</b> | <b>lower CI (95%)</b> | <b>Upper CI (95%)</b> |            |           |           |
|------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|-----------|-----------|
| delta_ref        | 1.45            | 0.09                  | 1.27                  | 1.64                  |            |           |           |
| z                | 6.32            | 0.14                  | 6.04                  | 6.59                  |            |           |           |
| p                | 1.10            | 0.07                  | 0.98                  | 1.23                  |            |           |           |
| <b>ME</b>        | <b>RMSE</b>     | <b>loglik</b>         | <b>AIC</b>            | <b>AICc</b>           | <b>BIC</b> | <b>Af</b> | <b>Bf</b> |
| 0.01             | 0.74            | -207.80               | 421.61                | 421.74                | 431.30     | 5.43      | 1.02      |

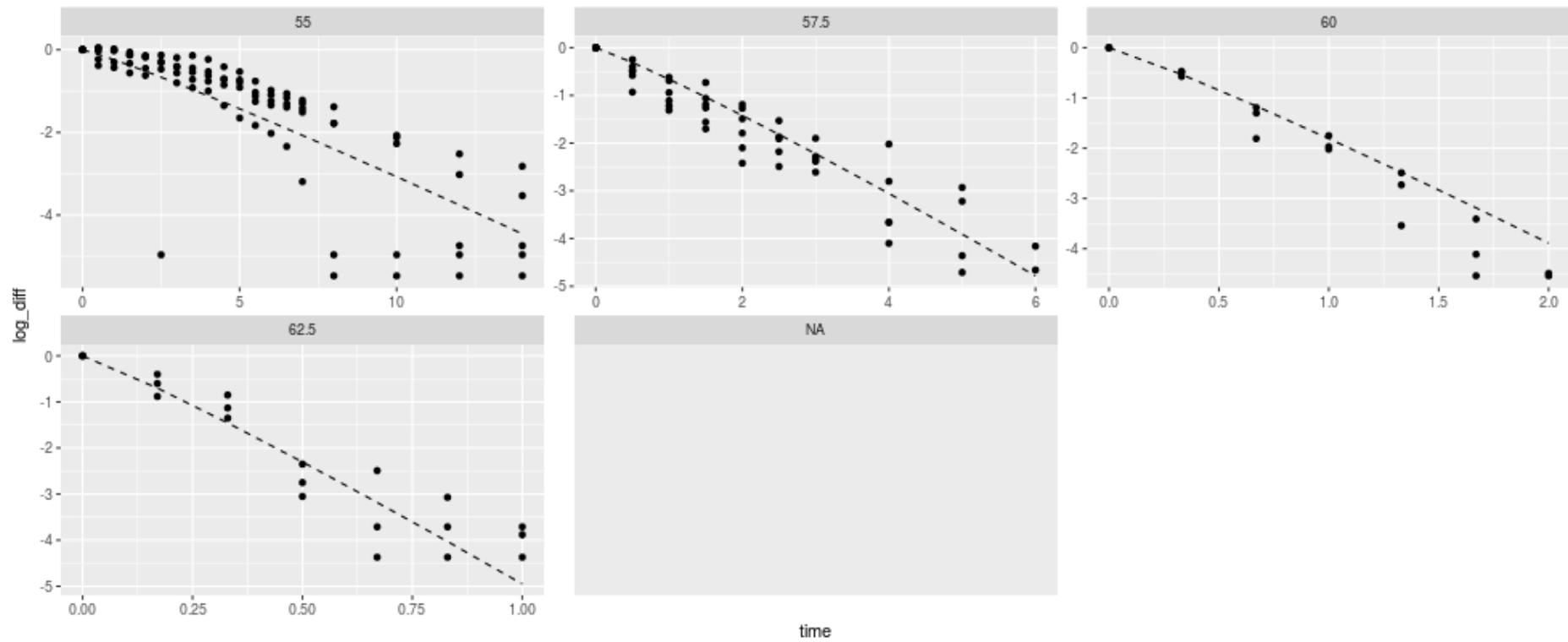
**Tabla 12.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart.



**Figura 13.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow.

| <b>Parameter</b> | <b>Estimate</b> | <b>Std. deviation</b> | <b>lower CI (95%)</b> | <b>Upper CI (95%)</b> |            |           |           |
|------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|-----------|-----------|
| D_R              | 0.52            | 0.02                  | 0.49                  | 0.56                  |            |           |           |
| z                | 6.24            | 0.15                  | 5.94                  | 6.53                  |            |           |           |
| <b>ME</b>        | <b>RMSE</b>     | <b>loglik</b>         | <b>AIC</b>            | <b>AICc</b>           | <b>BIC</b> | <b>Af</b> | <b>Bf</b> |
| 0.05             | 0.74            | -209.20               | 422.40                | 422.47                | 428.87     | 5.50      | 1.12      |

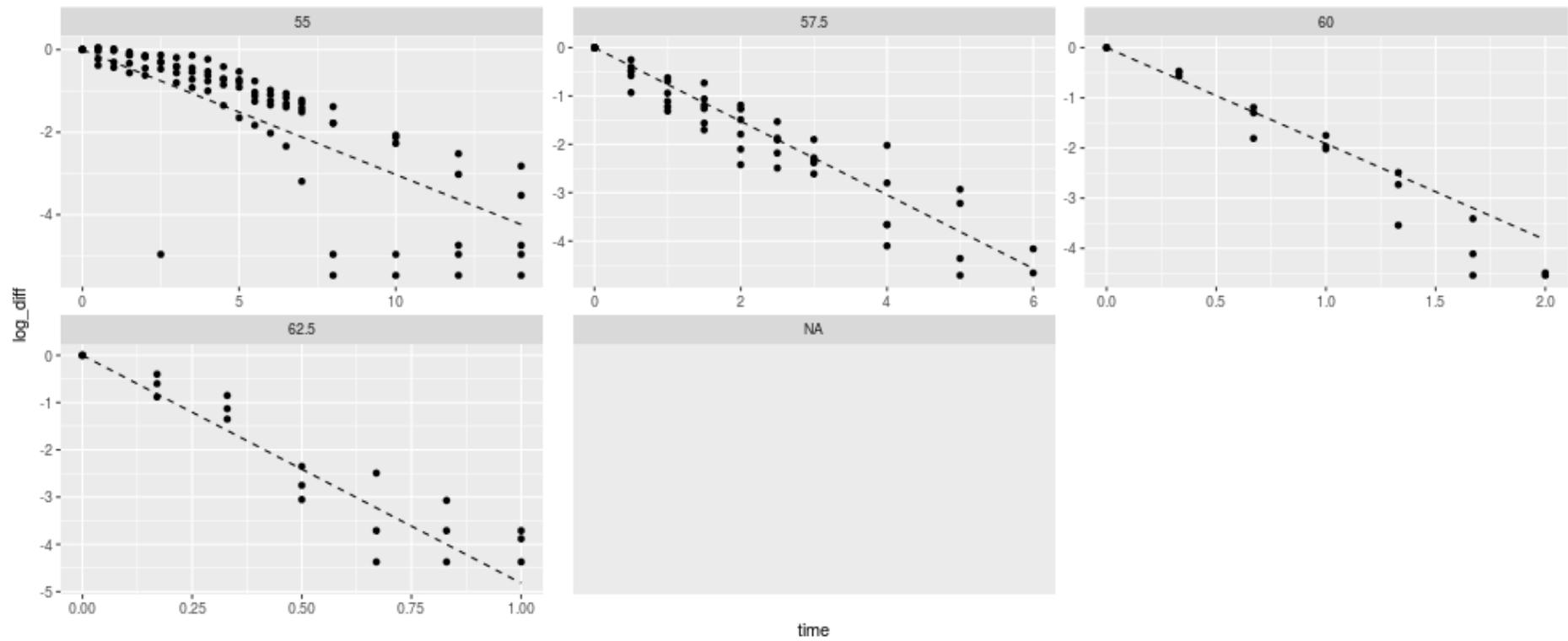
**Tabla 13.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow.



**Figura 14.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Mafart.

| <b>Parameter</b> | <b>Estimate</b> | <b>Std. deviation</b> | <b>lower CI (95%)</b> | <b>Upper CI (95%)</b> |            |           |           |
|------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|-----------|-----------|
| delta_ref        | 0.58            | 0.04                  | 0.50                  | 0.67                  |            |           |           |
| z                | 6.32            | 0.14                  | 6.04                  | 6.59                  |            |           |           |
| p                | 1.10            | 0.07                  | 0.98                  | 1.23                  |            |           |           |
| <b>ME</b>        | <b>RMSE</b>     | <b>loglik</b>         | <b>AIC</b>            | <b>AICc</b>           | <b>BIC</b> | <b>Af</b> | <b>Bf</b> |
| 0.01             | 0.74            | -207.80               | 421.61                | 421.74                | 431.30     | 5.43      | 1.02      |

**Tabla 14.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Mafart.



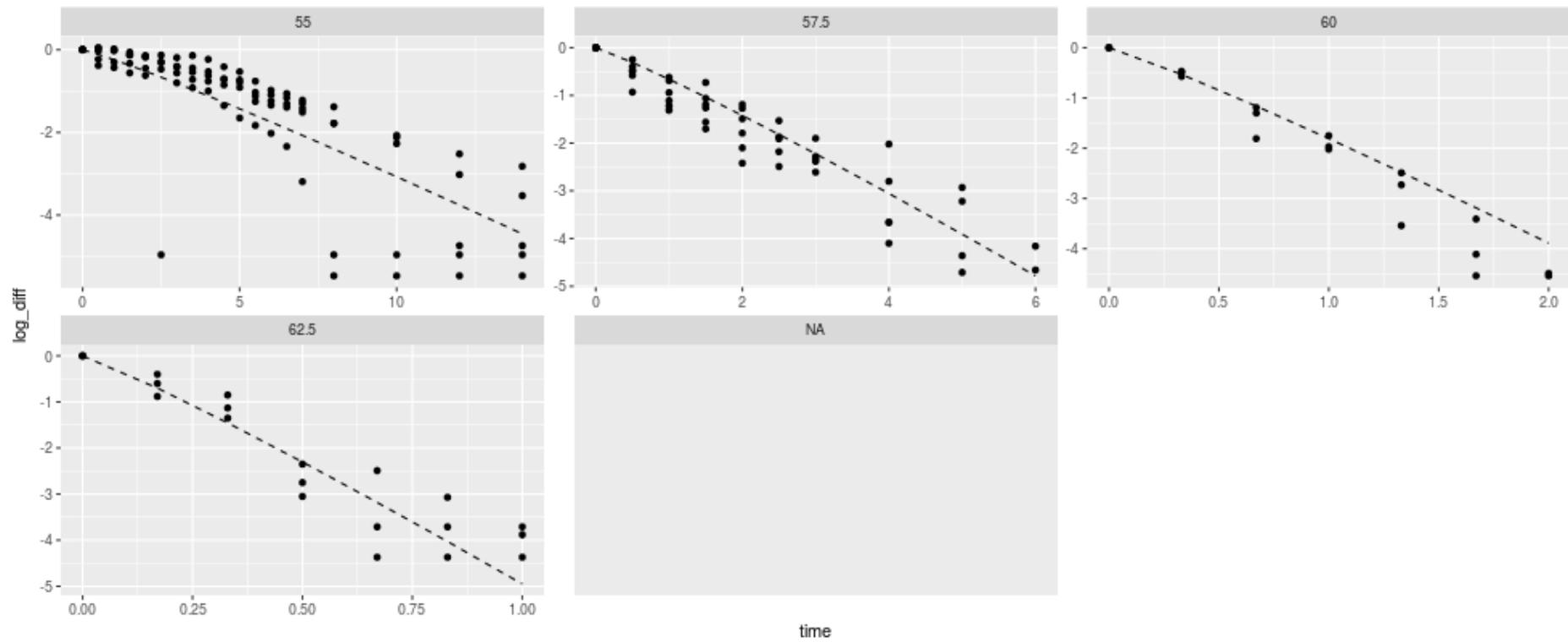
**Figura 15.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| D_R       | 0.21     | 0.01           | 0.19           | 0.23           |
| z         | 6.24     | 0.15           | 5.94           | 6.53           |

| ME   | RMSE | loglik  | AIC    | AICc   | BIC    | Af   | Bf   |
|------|------|---------|--------|--------|--------|------|------|
| 0.05 | 0.74 | -209.20 | 422.40 | 422.47 | 428.87 | 5.50 | 1.12 |

**Tabla 15.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow.

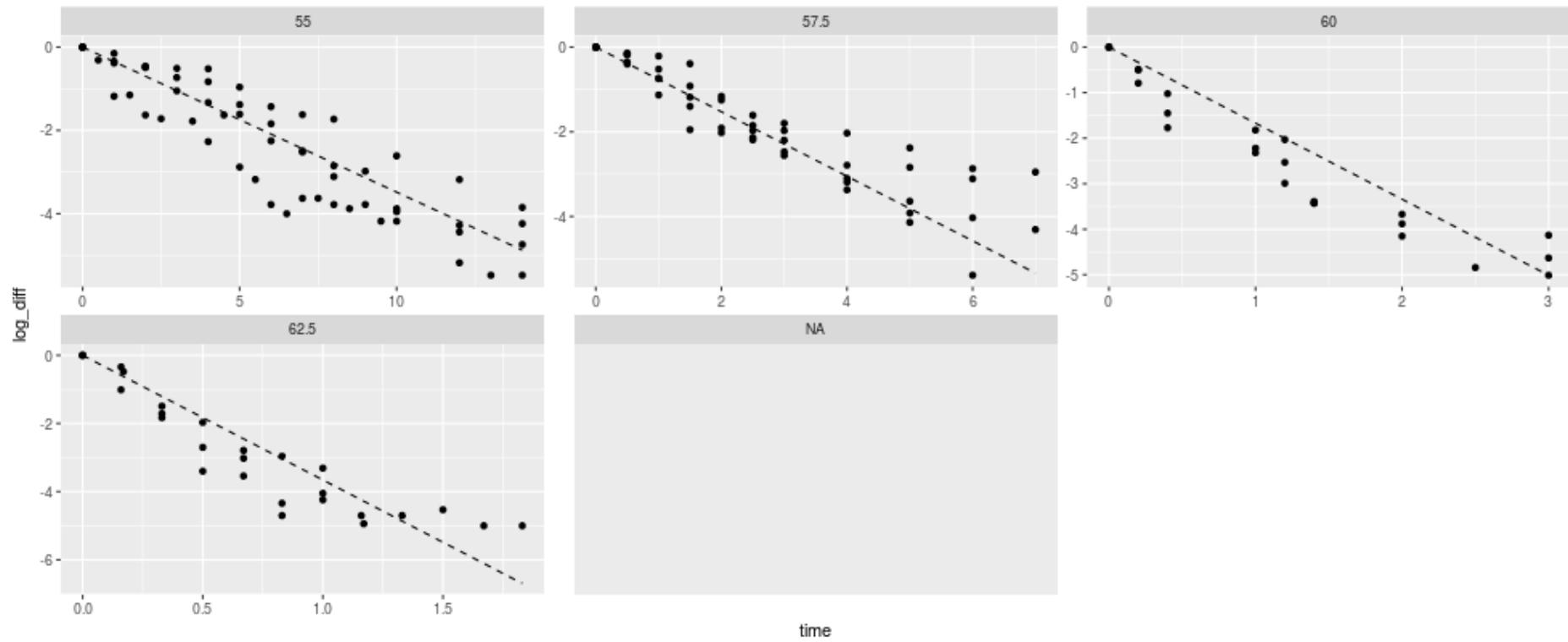


**Figura 16.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart.

| <b>Parameter</b> | <b>Estimate</b> | <b>Std. deviation</b> | <b>lower CI (95%)</b> | <b>Upper CI (95%)</b> |            |           |           |
|------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|-----------|-----------|
| delta_ref        | 0.23            | 0.02                  | 0.20                  | 0.27                  |            |           |           |
| z                | 6.32            | 0.14                  | 6.04                  | 6.59                  |            |           |           |
| p                | 1.10            | 0.07                  | 0.98                  | 1.23                  |            |           |           |
| <b>ME</b>        | <b>RMSE</b>     | <b>loglik</b>         | <b>AIC</b>            | <b>AICc</b>           | <b>BIC</b> | <b>Af</b> | <b>Bf</b> |
| 0.01             | 0.74            | -207.80               | 421.61                | 421.74                | 431.30     | 5.43      | 1.02      |

**Tabla 16.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en TSB pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart.

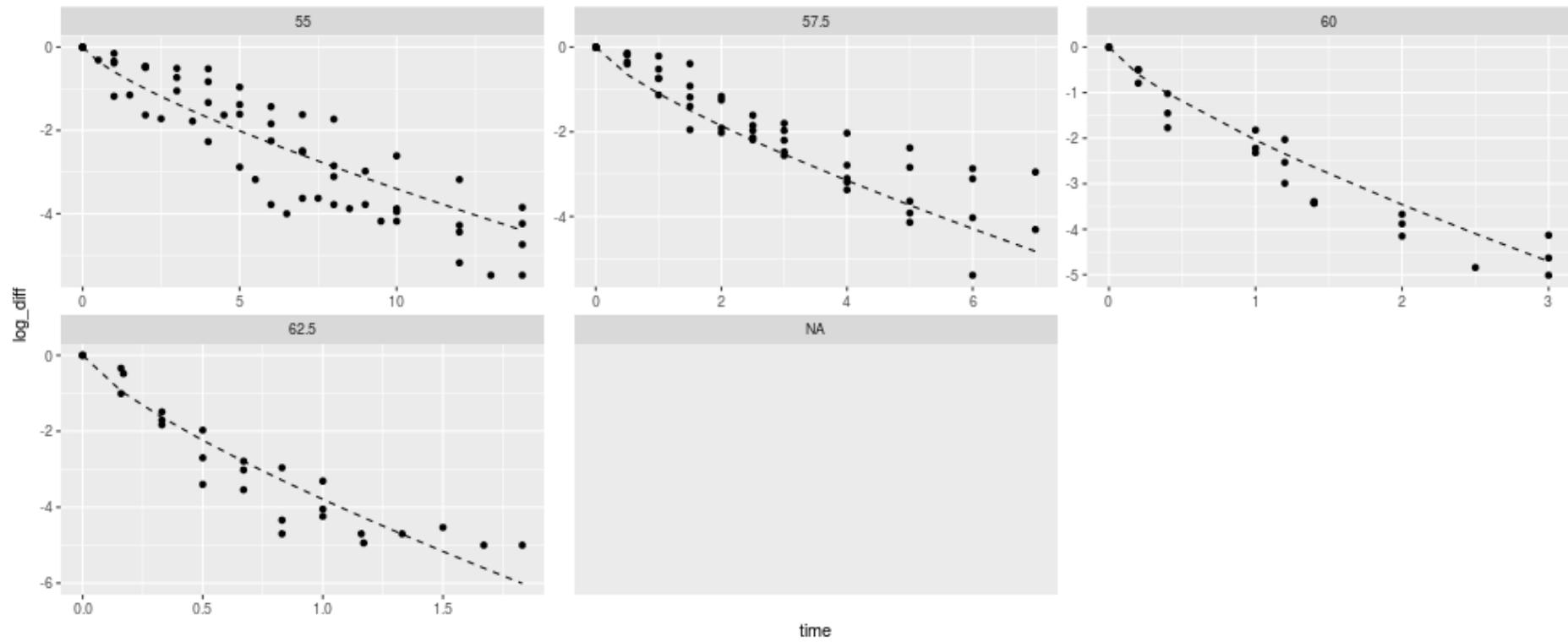
Crema de verduras comercial pH 4,2. Gráficas y parámetros obtenidos tras la modelización por el Software *Bioinactivation*.



**Figura 17.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |        |      |      |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|--------|------|------|
| D_R       | 2.87     | 0.09           | 2.70           | 3.04           |        |      |      |
| z         | 7.35     | 0.16           | 7.02           | 7.67           |        |      |      |
| ME        | RMSE     | loglik         | AIC            | AICc           | BIC    | Af   | Bf   |
| -0.11     | 0.69     | -169.09        | 342.17         | 342.25         | 348.35 | 4.87 | 0.78 |

**Tabla 17.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Bigelow.



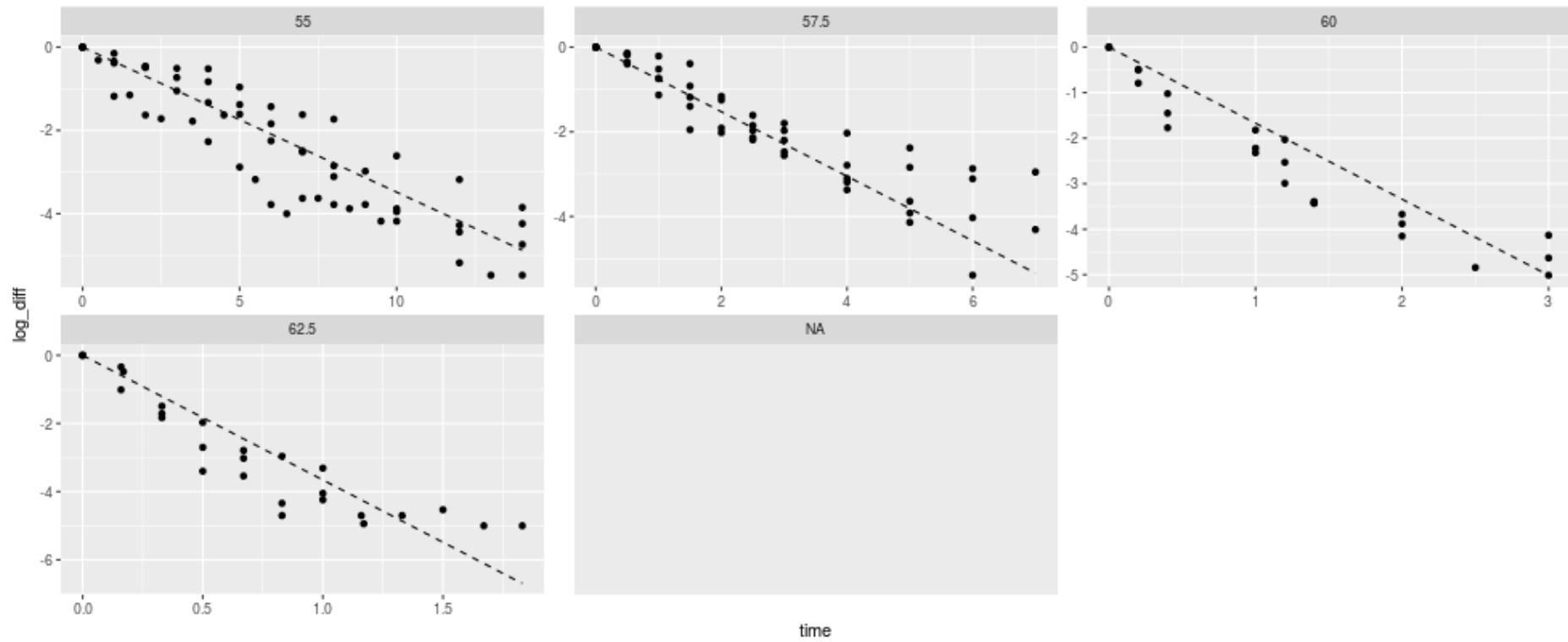
**Figura 18.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| delta_ref | 2.00     | 0.17           | 1.66           | 2.34           |
| z         | 7.07     | 0.19           | 6.69           | 7.44           |
| p         | 0.76     | 0.04           | 0.68           | 0.84           |

| ME   | RMSE | loglik  | AIC    | AICc   | BIC    | Af   | Bf   |
|------|------|---------|--------|--------|--------|------|------|
| 0.02 | 0.62 | -153.70 | 313.41 | 313.56 | 322.67 | 4.22 | 1.05 |

**Tabla 18.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 55°C. Modeladas por Mafart.



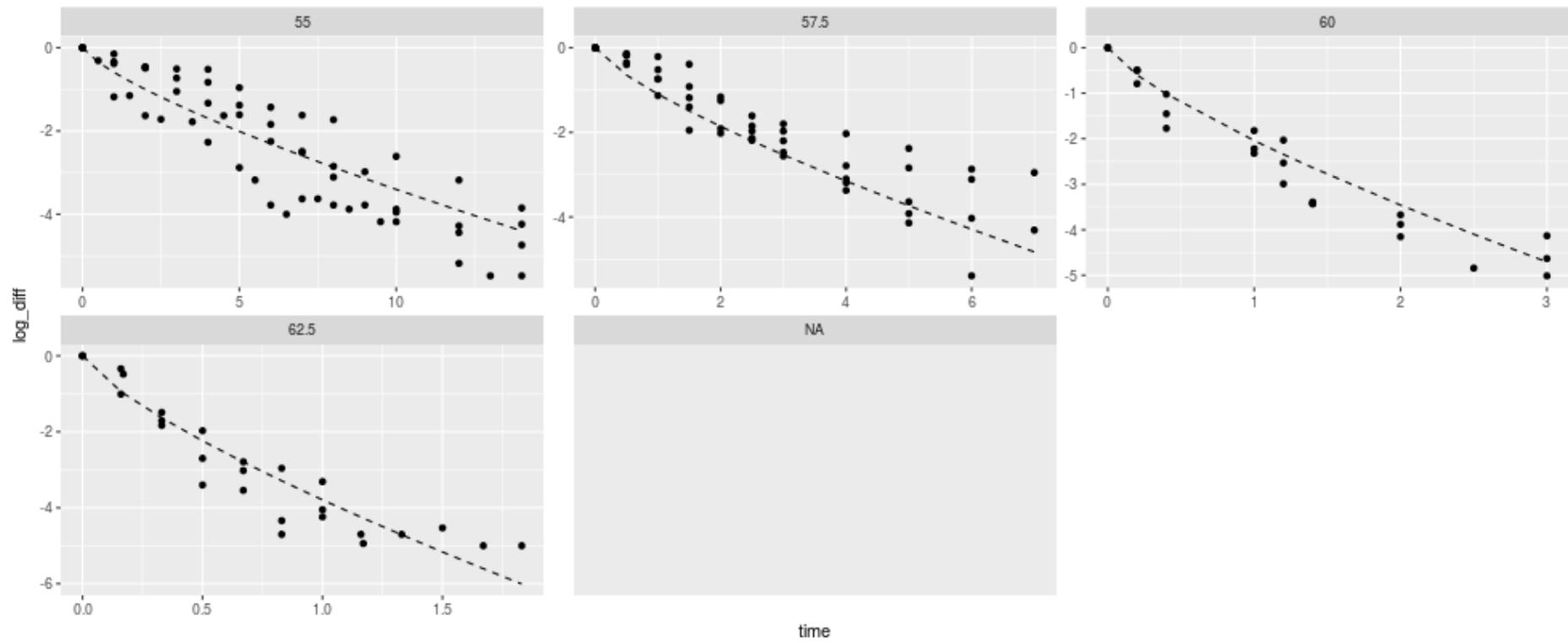
**Figura 19.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| D_R       | 1.31     | 0.03           | 1.26           | 1.37           |
| z         | 7.35     | 0.16           | 7.02           | 7.67           |

| ME    | RMSE | loglik  | AIC    | AICc   | BIC    | Af   | Bf   |
|-------|------|---------|--------|--------|--------|------|------|
| -0.11 | 0.69 | -169.09 | 342.17 | 342.25 | 348.35 | 4.87 | 0.78 |

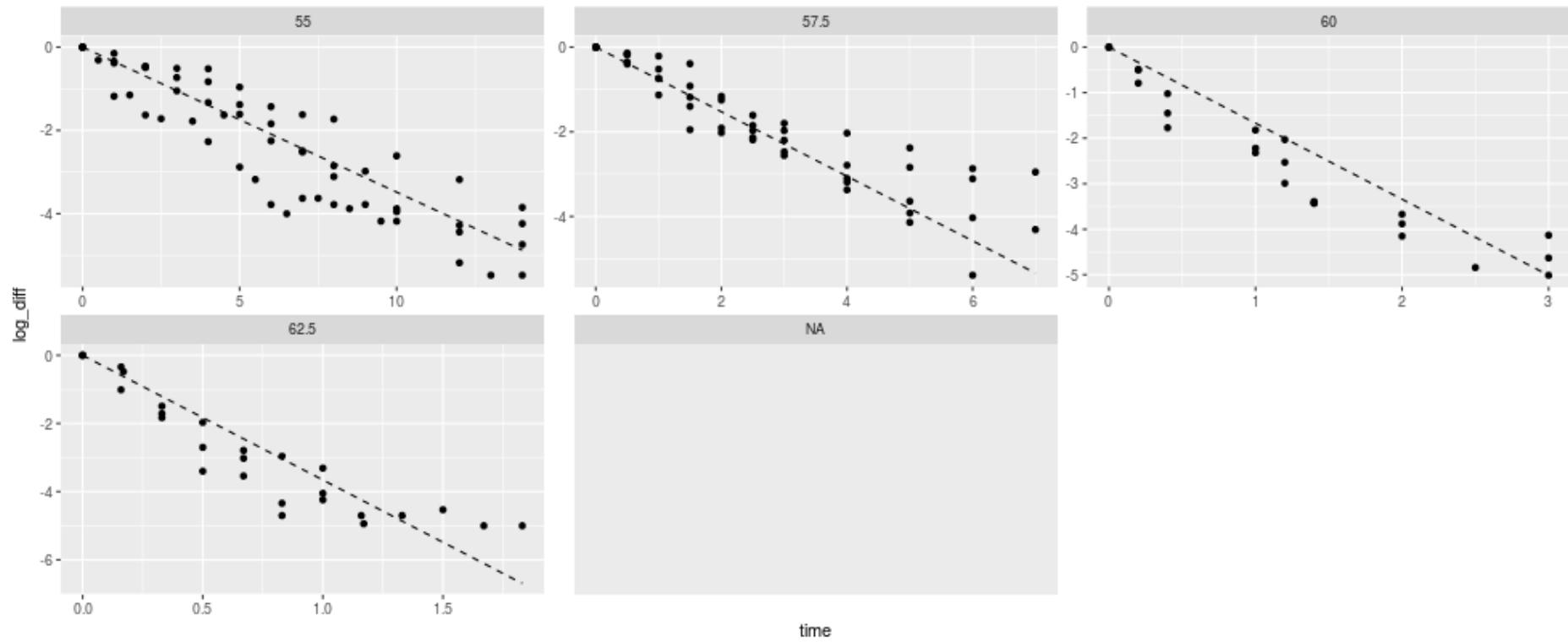
**Tabla 19.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Bigelow.



**Figura 20.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |        |      |      |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|--------|------|------|
| delta_ref | 0.89     | 0.08           | 0.73           | 1.04           |        |      |      |
| z         | 7.07     | 0.19           | 6.69           | 7.44           |        |      |      |
| p         | 0.76     | 0.04           | 0.68           | 0.84           |        |      |      |
| ME        | RMSE     | loglik         | AIC            | AICc           | BIC    | Af   | Bf   |
| 0.02      | 0.62     | -153.70        | 313.41         | 313.56         | 322.67 | 4.22 | 1.05 |

**Tabla 20.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 57,5°C. Modeladas por Mafart.



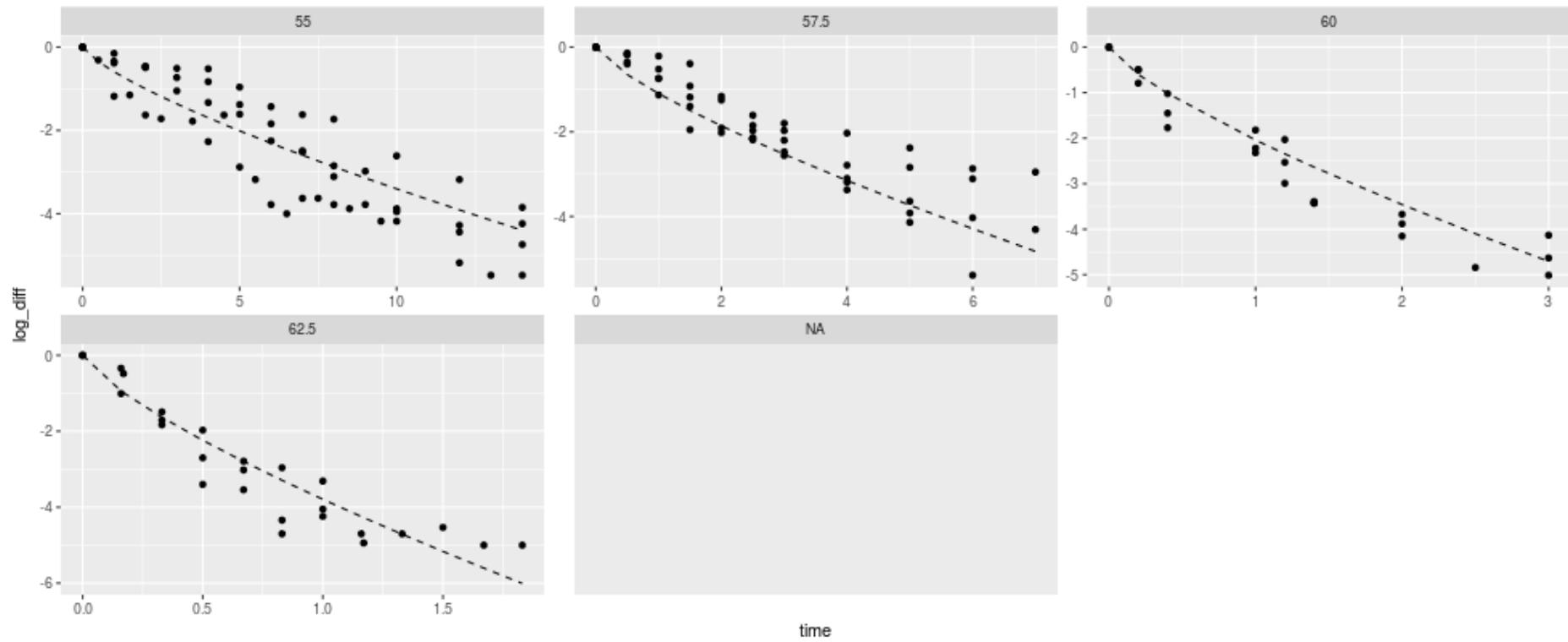
**Figura 21.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| D_R       | 0.60     | 0.01           | 0.57           | 0.63           |
| z         | 7.35     | 0.16           | 7.02           | 7.67           |

| ME    | RMSE | loglik  | AIC    | AICc   | BIC    | Af   | Bf   |
|-------|------|---------|--------|--------|--------|------|------|
| -0.11 | 0.69 | -169.09 | 342.17 | 342.25 | 348.35 | 4.87 | 0.78 |

**Tabla 21.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Bigelow.



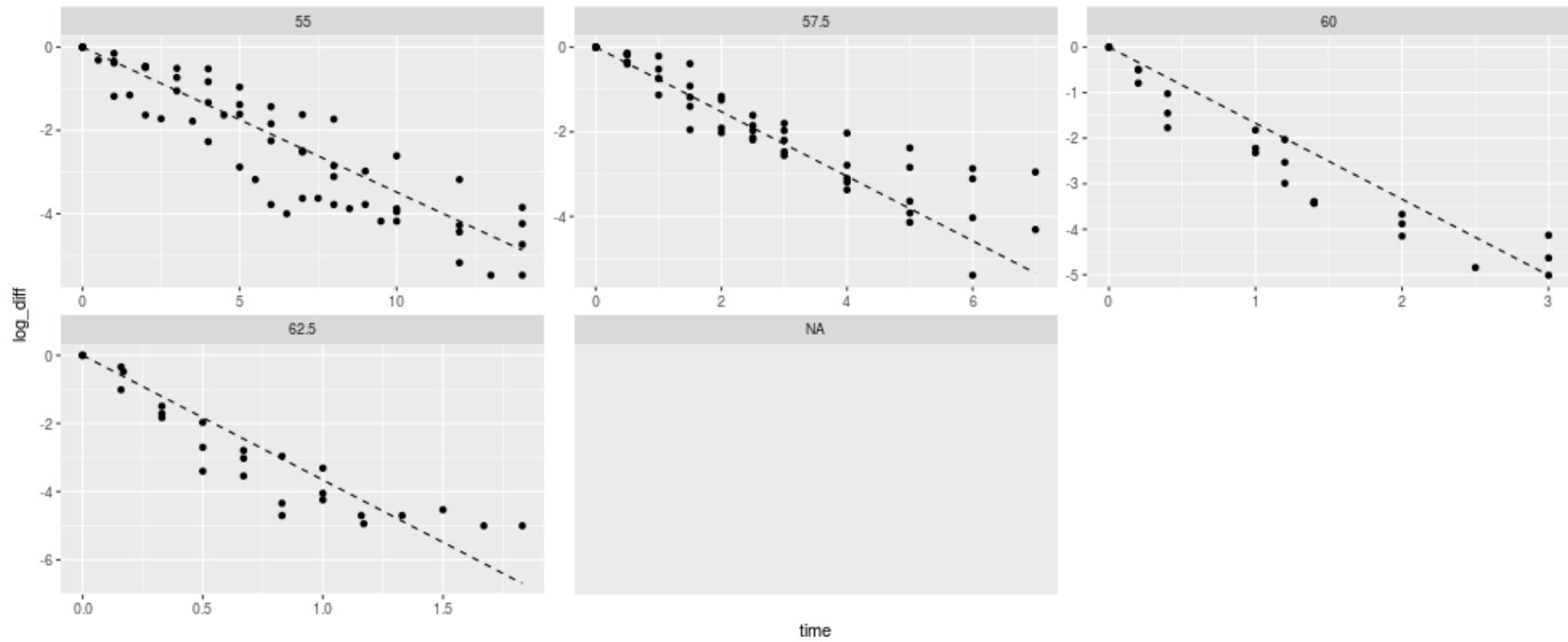
**Figura 22.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Mafart.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| delta_ref | 0.39     | 0.04           | 0.32           | 0.46           |
| z         | 7.07     | 0.19           | 6.69           | 7.44           |
| p         | 0.76     | 0.04           | 0.68           | 0.84           |

| ME   | RMSE | loglik  | AIC    | AICc   | BIC    | Af   | Bf   |
|------|------|---------|--------|--------|--------|------|------|
| 0.02 | 0.62 | -153.70 | 313.41 | 313.56 | 322.67 | 4.22 | 1.05 |

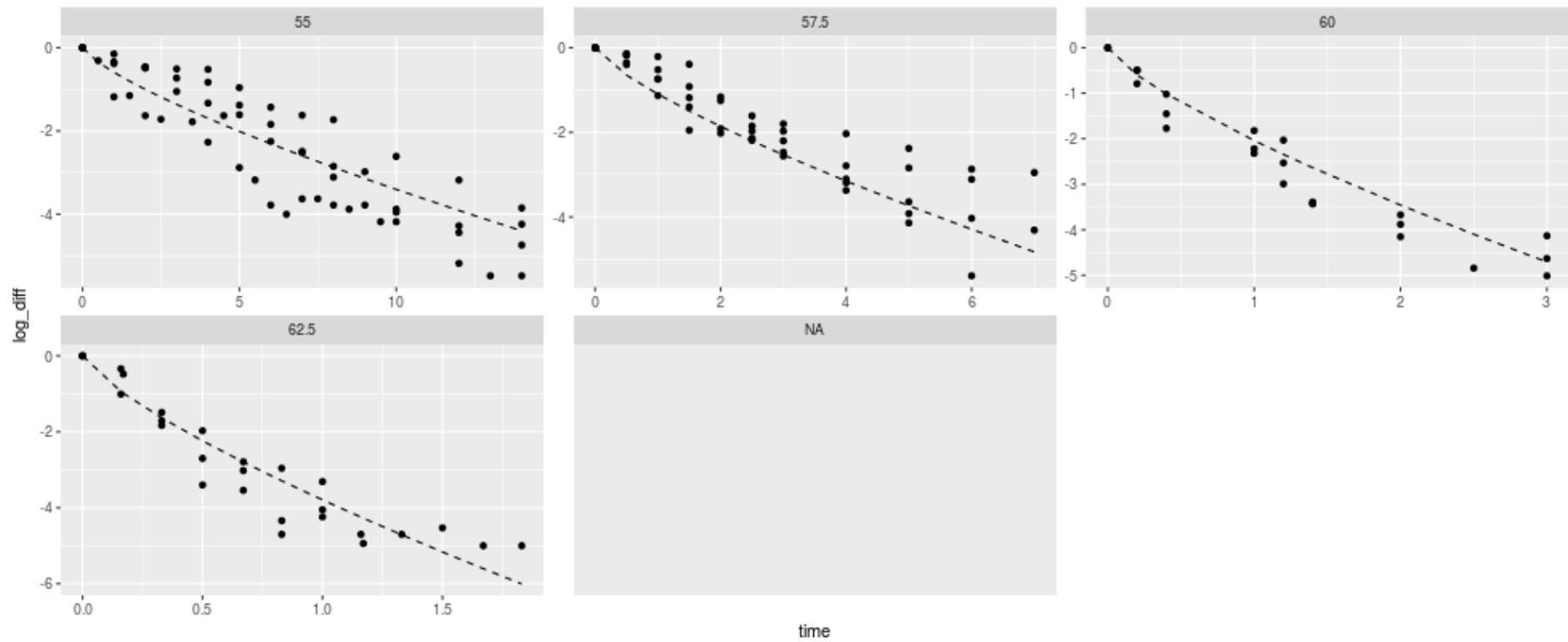
**Tabla 22.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 60°C. Modeladas por Mafart.



**Figura 23.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |        |      |      |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|--------|------|------|
| D_R       | 0.27     | 0.01           | 0.25           | 0.29           |        |      |      |
| z         | 7.35     | 0.16           | 7.02           | 7.67           |        |      |      |
| ME        | RMSE     | loglik         | AIC            | AICc           | BIC    | Af   | Bf   |
| -0.11     | 0.69     | -169.09        | 342.17         | 342.25         | 348.35 | 4.87 | 0.78 |

**Tabla 23.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Bigelow.



**Figura 24.** Curvas de supervivencia obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart.

| Parameter | Estimate | Std. deviation | lower CI (95%) | Upper CI (95%) |
|-----------|----------|----------------|----------------|----------------|
| delta_ref | 0.17     | 0.02           | 0.14           | 0.21           |
| z         | 7.07     | 0.19           | 6.69           | 7.44           |
| p         | 0.76     | 0.04           | 0.68           | 0.84           |

| ME   | RMSE | loglik  | AIC    | AICc   | BIC    | Af   | Bf   |
|------|------|---------|--------|--------|--------|------|------|
| 0.02 | 0.62 | -153.70 | 313.41 | 313.56 | 322.67 | 4.22 | 1.05 |

**Tabla 24.** Parámetros obtenidos por el software *Bioinactivation* de *L.monocytogenes* en una crema comercial de verduras a pH 4,2 a una temperatura de referencia de 62,5°C. Modeladas por Mafart.