



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería de las Industrias Agroalimentarias

Efecto de un choque ácido sobre la termorresistencia de *Salmonella*
entérica subsp. *enterica* CECT 4300 a diferentes pH's del medio de
calentamiento

Effect of acid shock on the thermoresistance of *Salmonella enterica* subsp.
enterica CECT 4300 at different pH's

Autora: Marta Clemente Carazo

Directora: Paula María Periago Bayonas

Codirector: Juan Pablo Huertas Baquero

Febrero, 2017

Índice

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	6
1. Introducción.....	7
1.1. Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA)	7
1.1.1. Factores que influyen en la aparición de las toxiinfecciones alimentarias (TIA).....	7
1.1.2. Factores que condicionan la proliferación microbiana	8
1.1.3. Tipos de enfermedades de transmisión alimentaria	8
1.1.4. Enfermedades más comunes provocadas por patógenos	9
1.1.5. Tratamiento para las enfermedades causadas por patógenos.	10
1.2. Seguridad alimentaria	10
1.2.1. Agencias de seguridad alimentaria	12
1.3. Inocuidad y calidad alimentaria	14
1.4. <i>Salmonella</i>	15
1.4.1. Productos contaminados por <i>Salmonella</i>	17
1.4.2. Métodos más usados para el control de <i>Salmonella entérica</i>	18
1.5. Tratamientos térmicos.	18
1.5.1. Termorresistómetro	21
1.6. Cinética de muerte: Valores D y Z.....	22
1.6.1. Calentamiento isotérmico	22
1.6.2. Tiempo de reducción decimal (Valor D).	24
1.6.3. Valor Z.....	24
1.6.4. Modelo y distribución de Weibull.	26
1.7. Tecnología de barreras	30
1.8. Daño subletal	31
1.9. Choque ácido	32
2. Justificación y objetivos.....	35
3. Materiales y métodos	38

3.1. Microorganismo.....	38
3.2. Preparación de medios de crecimiento a diferentes pH's.....	38
3.3. Determinación del crecimiento microbiano a diferentes pH's ácidos	38
3.4. Aplicación de un choque ácido.	40
3.5. Determinación del daño subletal.	41
3.6. Determinación de la termorresistencia de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> CECT 4300.....	42
3.7. Análisis de datos.....	43
4. Resultados y discusión	44
4.1. Termorresistencia pH 7.	44
4.2. Termorresistencia pH 4,5	49
4.3. Termorresistencia choque ácido.....	53
5. Conclusiones.....	59
6. Bibliografía.....	60
APÉNDICE DE CONTENIDO	70
ANEXO I GRÁFICAS MODELIZADAS CON WEIBULL CHOQUE ÁCIDO	77
ANEXO II GRÁFICAS MODELIZADAS CON WEIBULL MEDIO DE CALENTAMIENTO pH 4,5.....	86
ANEXO III GRÁFICAS MODELIZADAS CON WEIBULL MEDIO DE CALENTAMIENTO pH 7.....	94

Gracias a todos los que habéis estado día a día apoyándome y haber hecho posible que esto haya llegado a su fin. ¡Os debo una!

RESUMEN

Salmonella enterica es un microorganismo patógeno alimentario causante de brotes de toxiinfecciones por consumo de alimentos contaminados. Por ello, es de gran importancia, en Seguridad Alimentaria Microbiológica, el conocimiento del efecto de diversos factores, como son el pH y el NaCl del medio en el que podría estar presente este microorganismo sobre su termorresistencia. El objetivo del presente estudio es determinar el efecto de un choque ácido en *Salmonella entérica* a pH 4,5 y a pH 7 exponiéndolo posteriormente a distintas temperaturas, así como también, el efecto de la termorresistencia de este microorganismo, en un medio de calentamiento a pH 4,5 y pH 7 y determinar si se produce o no daño subletal. Para ello, se determinó la termorresistencia de *Salmonella entérica* mediante la utilización de un termorresistómetro Mastia bajo condiciones isotérmicas (52,5, 55, 57,5y 60°C) utilizando los medios de calentamiento citados anteriormente. Los resultados fueron modelizados aplicando el modelo de Weibull y mostraron que un choque ácido previo disminuye la termorresistencia de *Salmonella entérica* provocado daños en la membrana externa de la célula. En un tratamiento con medio de calentamiento a pH 4,5 y pH 7 se vió que no causaba daño subletal en la membrana externa de la célula. Se trataran de ajustar los datos obtenidos para la obtención de parámetros de esterilización y ver la posible aparición de hombros y colas para garantizar la Seguridad Alimentaria.

ABSTRACT

Salmonella enterica is a pathogenic microorganism food which causes outbreaks of poisoning by consumption of contaminated food. For this reason, it is of great importance, in microbiological food safety, knowledge of the effect of various factors, such as pH and NaCl of the medium in which this organism may be present on your thermometer. The objective of the present study is to determine the effect of acid shock in *Salmonella enterica* at pH 4.5 and pH 7 subsequently exposed to different temperatures, as well as the effect of the thermal stability of this microorganism, a means of warming at pH 7 and pH 4.5 and determine whether it occurs or damage not sublethal. For this, is determined the thermal stability of *Salmonella enteric* through the use of a termorresistómetro Mastia low conditions isothermal (52.5, 55, 57, 5y 60 ° C) using them means of warming cited previously. The results were modelled using the Weibull model and showed that a previous acid shock decreases the thermal stability of *Salmonella enterica* caused damage in the outer membrane of the cell. In a treatment by means of warming at pH 4.5 and pH 7 was that not cause sublethal damage in the outer membrane of the cell. We will try to adjust the data obtained to obtain sterilization parameters and see the possible appearance of shoulders and tails to ensure Food Safety.

1. Introducción

1.1. Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA)

Las enfermedades de transmisión alimentaria abarcan un amplio espectro de dolencias y constituyen un problema de salud pública creciente en todo el mundo. Se deben a la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas. La contaminación de los alimentos puede producirse en cualquier etapa del proceso que va de la producción al consumo de alimentos (“de la granja a la mesa”) y puede deberse a la contaminación ambiental, ya sea del agua, la tierra o el aire.

La manifestación clínica más común de una enfermedad transmitida por los alimentos consiste en la aparición de síntomas gastrointestinales, pero estas enfermedades también pueden dar lugar a síntomas neurológicos, ginecológicos, inmunológicos y de otro tipo. La ingestión de alimentos contaminados puede provocar una insuficiencia multiorgánica, incluso cáncer, por lo que representa una carga considerable de discapacidad, así como demortalidad (http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es).

Hasta la fecha se han descrito más de 250 enfermedades de transmisión alimentaria (ETA). La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de la Enterobacteria *Escherichia coli*. A largo plazo, algunas de estas enfermedades pueden conducir a otros padecimientos; por ejemplo, es posible que una infección con la cepa O157:H7 de *E. coli* provoque el síndrome hemolítico urémico (SHU) con secuelas de insuficiencia renal crónica. (González Flores, T. y Rojas Herrera, R.A., 2005).

1.1.1. Factores que influyen en la aparición de las toxiinfecciones alimentarias (TIA)

El principal factor que interviene en el origen y el desarrollo de la toxiinfección alimentaria (TIA) es la falta de higiene. La higiene alimentaria se ocupa de la manipulación adecuada de los diversos tipos de alimentos y bebidas, de los utensilios y la maquinaria utilizados en su preparación, servicio y consumo, y del cuidado y el tratamiento de los alimentos contaminados por bacterias productoras de intoxicaciones

alimentarias que proceden del animal productor del alimento.

La prevención es fundamental para evitar la aparición de la contaminación. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), hay un pequeño número de errores que es la causa principal de la aparición de un alto porcentaje de las enfermedades producidas.

1.1.2. Factores que condicionan la proliferación microbiana

- **Tipo de alimento.** Las características intrínsecas del alimento son determinantes en el desarrollo de las contaminaciones por la proliferación de bacterias. Los sustratos de alto contenido proteico, como la carne, el pescado, los huevos, la leche y derivados, son alimentos considerados de alto riesgo.

- **Temperatura.** Es uno de los factores clave, ya que es determinante en el crecimiento de los microorganismos. La multiplicación de las células bacterianas se produce en la denominada zona de peligro, entre los 5 y los 65 °C. La temperatura óptima para el crecimiento se sitúa alrededor de los 37 °C. Fuera de este intervalo establecido las posibilidades de contaminación son más bajas.

- **Actividad del agua (AW) o humedad.** A mayor humedad mayor posibilidad de desarrollo bacteriano. Por ello, cualquier tratamiento que reduzca la humedad puede evitar la proliferación microbiana, en salados y confituras.

- **Tiempo.** La existencia de un sustrato adecuado, una temperatura y humedad idónea unidos, puede hacer que en 20 minutos el número de microorganismos sea el doble, pasadas 6 horas tendríamos millones. El control de los diversos factores puede evitar la contaminación del alimento y el desarrollo de microorganismos en él. Por otra parte, la utilización de algunos de ellos, como pueden ser la temperatura y el tiempo combinados, pueden llevar a su destrucción (Rosas,R., 2007).

1.1.3. Tipos de enfermedades de transmisión alimentaria

Los tipos de enfermedades se clasifican en:

Intoxicaciones alimentarias: causadas por el consumo de alimentos que contienen sustancias tóxicas, como restos de pesticidas en vegetales o productos tóxicos formados por la descomposición del propio alimento. Algunos microorganismos también producen toxinas.

Infecciones alimentarias: derivadas de la ingestión de los alimentos contaminados. Su causa son los microorganismos presentes en el producto.

Toxiinfecciones alimentarias: originadas por la presencia en los alimentos de microorganismos patógenos que, además de reproducirse, producen toxinas (<https://tematico8.asturias.es/export/sites/default/consumo/seguridadAlimentaria/seguridad-alimentaria-documentos/basico02.pdf>).

1.1.4. Enfermedades más comunes provocadas por patógenos

Intoxicación por *Clostridium botulinum*.

Se trata de un bacilo anaeróbico que abunda en el suelo, tubo digestivo de animales, de humanos y en algunos pescados. Los alimentos causantes de la transmisión son las conservas con tratamiento incorrecto (animales o vegetales), pescados envasados al vacío, ahumados, desecados, adobados, centro de piezas de carne muy grandes, etc. La existencia de gas o hinchamiento en las conservas puede ser indicativa de la actuación de toxinas proteolíticas y, por tanto, de contaminación. La toxina botulínica es la causa de la aparición de la intoxicación. Tras un período de incubación corto (18-36 h), aparece la sintomatología que incluye cuadro intestinal (náuseas, vómitos, diarreas), síntomas neurológicos (debilidad, laxitud, mareos, vértigo), problemas en la visión, dificultad al respirar que puede llevar a muerte por insuficiencia o paro cardíaco.

Intoxicación por *Salmonella*.

Se trata de un microorganismo aeróbico que se encuentra principalmente en el intestino humano, de animales, en la superficie de huevos, piel, patas de ratones y moscas. Los alimentos contaminados más comunes son los huevos, carnes de aves y mamíferos, productos lácteos, pescados, crustáceos y moluscos. En España, según los datos del Centro Nacional de Epidemiología, entre el año 1995-2003, el 87% de los brotes producidos por microorganismos tuvo como agente causal la *Salmonella*. El período de incubación es de 12-36 h y tras él se produce una sintomatología intestinal típica que incluye dolores abdominales, náuseas, cefalea, fiebre, temblores y diarrea fétida, que pueden durar 1-7 días y luego desaparecen.

Toxiinfección por *Staphylococcus aureus*.

Este microorganismo se encuentra en piel, nariz, garganta, heridas, etc. También en alimentos muy manipulados, contaminados durante su producción, transporte o servicio (cremas, pastelería, carnes, natillas, salsas, patés). Son alimentos que se consumen sin calentar y mucho después de su preparación. La causa es la enterotoxina producida por determinadas cepas toxigénicas de *S. aureus*. Tras un período de incubación de 1-6 h, aparecen dolores abdominales, cefalea, náuseas y diarrea. El período de recuperación es de 24 h, aproximadamente. Se trata de una de las toxiinfecciones de mayor incidencia, pero en muchos casos no se tiene constancia, ya que dada su corta duración no se notifica. La mayoría de estas contaminaciones que acaban en cuadro toxiinfeccioso se podrían evitar adoptando una serie de medidas preventivas. (Rosas, R., 2007)

1.1.5. Tratamiento para las enfermedades causadas por patógenos.

En la mayor parte de las toxiinfecciones alimentarias (TIA), el cuadro clínico es básicamente el de una gastroenteritis aguda. El diagnóstico se fundamenta en la sospecha clínica y epidemiológica. Se deben establecer una serie de premisas terapéuticas básicas y el tratamiento tratará básicamente de evitar la deshidratación, aliviar la fiebre y el malestar general (Rosas, R., 2007).

1.2. Seguridad alimentaria

La seguridad alimentaria existe cuando todas las personas tienen, en todo momento, acceso físico, social y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfacen sus necesidades energéticas diarias y preferencias alimentarias para llevar una vida activa y sana (“Centro de prensa Inocuidad de los alimentos,” 2016).

- El acceso a alimentos inocuos y nutritivos en cantidad suficiente es fundamental para mantener la vida y fomentar la buena salud.
- Los alimentos insalubres que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer.
- Se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas casi 1 de cada 10 habitantes por ingerir alimentos contaminados y que 420 000

mueren por esta misma causa, con la consiguiente pérdida de 33 millones de años de vida ajustados en función de la discapacidad (AVAD).

- Los niños menores de 5 años soportan un 40% de la carga atribuible a las enfermedades de transmisión alimentaria, que provocan cada año 125 000 defunciones en este grupo de edad.
- Las infecciones diarreicas, que son las más comúnmente asociadas al consumo de alimentos contaminados, hacen enfermar cada año a unos 550 millones de personas y provocan 230 000 muertes.
- La inocuidad de los alimentos, la nutrición y la seguridad alimentaria están inextricablemente relacionadas. Los alimentos insalubres generan un círculo vicioso de enfermedad y malnutrición, que afecta especialmente a los lactantes, los niños pequeños, los ancianos y los enfermos.
- Al ejercer una presión excesiva en los sistemas de atención de la salud, las enfermedades transmitidas por los alimentos obstaculizan el desarrollo económico y social, y perjudican a las economías nacionales, al turismo y al comercio.
- En la actualidad, las cadenas de suministro de alimentos atraviesan numerosas fronteras nacionales. La buena colaboración entre los gobiernos, los productores y los consumidores contribuye a garantizar la inocuidad de los alimentos.

La definición plantea cuatro dimensiones primordiales de la seguridad alimentaria:

La DISPONIBILIDAD FÍSICA de los alimentos	La seguridad alimentaria aborda la parte correspondiente a la "oferta" dentro del tema de seguridad alimentaria y es función del nivel de producción de alimentos, los niveles de las existencias y el comercio neto.
El ACCESO económico y físico a los alimentos	Una oferta adecuada de alimentos a nivel nacional o internacional en sí no garantiza la seguridad alimentaria a nivel de los hogares. La preocupación acerca de una insuficiencia en el acceso a los alimentos ha conducido al diseño de políticas con mayor enfoque en materia de ingresos y gastos, para alcanzar los objetivos de seguridad alimentaria.
La UTILIZACIÓN de los alimentos	La utilización normalmente se entiende como la forma en la que el cuerpo aprovecha los diversos nutrientes presentes en los alimentos. El ingerir energía y nutrientes suficientes es el resultado de buenas prácticas de salud y alimentación, la correcta preparación de los alimentos, la diversidad de la dieta y la buena distribución de los alimentos dentro de los hogares. Si combinamos esos factores con el buen uso biológico de los alimentos consumidos, obtendremos la condición nutricional de los individuos.
La ESTABILIDAD en el tiempo de las tres dimensiones anteriores	Incluso en el caso de que su ingesta de alimentos sea adecuada en la actualidad, se considera que no gozan de completa seguridad alimentaria si no tienen asegurado el debido acceso a los alimentos de manera periódica, porque la falta de tal acceso representa un riesgo para la condición nutricional. Las condiciones climáticas adversas (la sequía, las inundaciones), la inestabilidad política (el descontento social), o los factores económicos (el desempleo, los aumentos de los precios de los alimentos) pueden incidir en la condición de seguridad alimentaria de las personas.

Imagen 1 Dimensiones primordiales de la seguridad alimentaria. FAO, 2011.

La Seguridad y Calidad de los alimentos es un tema fundamental y complejo en constante evolución. Esto es debido a:

Cambios en la economía, cambios demográficos, origen geográfico de los alimentos, la producción y procesado y finalmente los comportamientos del consumidor del clima y de los microorganismos.

1.2.1. Agencias de seguridad alimentaria

Para la regulación la seguridad alimentaria se ha creado entidades oficiales, son las siguientes:

Las más conocidas a nivel mundial

- Organización Mundial de la Salud (OMS).

“Nuestro objetivo es construir un futuro mejor y más saludable para las personas de todo el mundo. A través de las oficinas que la OMS tiene en más de 150 países, nuestro personal trabaja junto con los gobiernos y otros asociados para que todas las personas gocen del grado máximo de salud que se pueda lograr.”

“Juntos nos esforzamos por luchar contra las enfermedades, ya sean infecciosas, como la gripe y la infección por el VIH, o no transmisibles, como el cáncer y las cardiopatías.

Ayudamos a que las madres y los niños sobrevivan y avancen en la vida para que puedan conservar la salud hasta una edad avanzada. Velamos por la salubridad del aire que respiran las personas, de los alimentos que comen y del agua que beben, así como de los medicamentos y las vacunas que necesitan” (<http://www.who.int/about/es/>).

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).

“Nuestros tres objetivos principales son: la erradicación del hambre, la inseguridad alimentaria y la malnutrición, la eliminación de la pobreza y el impulso del progreso económico y social para todos, y la ordenación y utilización sostenible de los recursos naturales, incluida la tierra, el agua, el aire, el clima y los recursos genéticos, en beneficio de las generaciones presentes y futuras” (<http://www.fao.org/about/es/>).

Estados Unidos de América

- Food and Drug Administration (FDA). Administración de alimentos y medicamentos.

“La administración de medicamentos y alimentos es responsable de proteger la salud pública asegurando la seguridad, eficacia y seguridad de los medicamentos humanos y veterinarios, productos biológicos y dispositivos médicos; y garantizando la seguridad de suministro de alimentos, cosméticos y productos que emiten radiación de nuestra nación” (<http://www.fda.gov/AboutFDA/WhatWeDo/default.htm>).

Europa

European Food Safety Authority (EFSA). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

“La mayor parte del trabajo de la EFSA se lleva a cabo en respuesta a las peticiones de asesoramiento científico de la Comisión Europea, el Parlamento Europeo y los Estados miembros.

También realizamos trabajo científico por nuestra propia iniciativa, en particular a examinar temas emergentes y nuevos riesgos y actualizar nuestros enfoques y métodos de evaluación. Esto se conoce como "Selfasking"(<http://www.efsa.europa.eu/en/about/howwework>).

España

- Agencia española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN).

La Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición integra y desempeña en el marco competencial de la administración general del estado las funciones relacionadas con la promoción y el fomento de los derechos de los consumidores y usuarios en bienes y servicios, así como la seguridad alimentaria y la nutrición saludable.

(http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/agencia/seccion/sobre_aecosan.htm)

Es un organismo autónomo, adscrito al Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad a través de la Secretaría General de Sanidad y Consumo y es el resultado de la fusión entre el Instituto Nacional del Consumo y la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.

Objetivos fundamentales de AECOSAN

Ejercer la promoción y el fomento de los derechos de los consumidores y usuarios, tanto en materia de seguridad de los productos como de sus intereses económicos.

Promover la seguridad alimentaria, ofreciendo garantías e información objetiva a los consumidores y agentes económicos del sector agroalimentario español.

Planificar, coordinar y desarrollar estrategias y actuaciones que fomenten la información, educación y promoción de la salud en el ámbito de la nutrición, y en particular, en la prevención de la obesidad.

1.3. Inocuidad y calidad alimentaria

Los términos inocuidad de los alimentos y calidad de los alimentos pueden inducir a engaño. Cuando se habla de inocuidad de los alimentos se hace referencia a todos los riesgos, sean crónicos o agudos, que pueden hacer que los alimentos sean nocivos para la salud del consumidor. Se trata de un objetivo que no es negociable. El concepto de calidad abarca todos los demás atributos que influyen en el valor de un producto para el consumidor. Engloba, por lo tanto, atributos negativos, como estado de descomposición, contaminación con suciedad, decoloración y olores desagradables, pero también

atributos positivos, como origen, color, aroma, textura y métodos de elaboración de los alimentos (OMS y FAO, 2003).

Esta distinción entre inocuidad y calidad tiene repercusiones en las políticas públicas e influye en la naturaleza y contenido del sistema de control de los alimentos más indicado para alcanzar objetivos nacionales predeterminados.

La confianza en la inocuidad e integridad de los alimentos es un requisito importante para los consumidores. Los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en los que intervienen agentes como *Escherichia coli*, *Salmonella* y contaminantes químicos ponen de manifiesto los problemas existentes de inocuidad de los alimentos y aumentan la preocupación pública de que los modernos sistemas de producción agrícola, elaboración y comercialización no ofrezcan salvaguardias adecuadas para la salud pública. Entre los factores que contribuyen a los posibles riesgos de los alimentos se incluyen las prácticas agrícolas inadecuadas, la falta de higiene en todas las fases de la cadena alimentaria, la ausencia de controles preventivos en las operaciones de elaboración y preparación de los alimentos, la utilización inadecuada de productos químicos, la contaminación de las materias primas, los ingredientes y el agua, el almacenamiento insuficiente o inadecuado, etc.

Las preocupaciones concretas sobre los riesgos alimentarios se han centrado en general en los siguientes aspectos:

Riesgos microbiológicos, residuos de plaguicidas, utilización de los aditivos alimentarios, contaminantes químicos incluidas las toxinas biológicas y la adulteración.

Los consumidores esperan que la protección frente a los riesgos tenga lugar a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde el productor primario hasta el consumidor (un todo continuo que iría "de la granja a la mesa"). La protección sólo tendrá lugar si todos los sectores de la cadena actúan de forma integrada, y los sistemas de control de los alimentos tienen en cuenta todas las fases de dicha cadena.

1.4. *Salmonella*.

La *Salmonella* representa la causa más común y principal de intoxicación alimentaria en muchos países desde hace más de 100 años (Alakomi, H.L.y Saarela, M., 2009; Chalker, R.B. y Blaser, M.J., 1988; Coburn, B.,y col., 2007). A pesar de las

instrucciones establecidas y las medidas para prevenir la salmonelosis han aumentado significativamente la incidencia y la gravedad de la salmonelosis humana.

Los casos de salmonelosis son limitantes (aproximadamente 80%), pero se han dado grandes brotes en escuelas, hospitales y restaurantes, no muy comunes (Guiney, D.G. y col., 1995). En la actualidad, más de 2500 serotipos de *Salmonella* han sido registrados (Fierer, J. y Guiney, D.G., 2001). De éstos, los serotipos más frecuentes asociados con enfermedad humana son *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium* (*S. Typhimurium*) y *S. entérica* serovar *Enteritidis* (*S. Enteritidis*) en los Estados Unidos y países europeos.

Aproximadamente se estiman 1,4 millones de salmonelosis humanas que tienen lugar anualmente en los Estados Unidos con la certeza de sólo 2% de los casos quedan registrados en el centro para Control de Enfermedades y Prevención (CDC), dando por resultado unos 16.000 hospitalizaciones con cerca de 600 muertes (Cummings, K.J., 2010; Turner, C.W., 2010). El costo total estimado asociado con incidencias de *Salmonella* puede ser hasta varios millones de dólares anualmente (Frenzen, P., 1999; WHO, 2005). Un costo anual estimado para un programa de control de la *Salmonella* ha aumentado en algunos países (WHO, 2005). Mayores incidencias relacionadas con *Salmonella* pueden ocurrir en algunos países en desarrollo donde los datos no están disponibles.

Salmonella no se considera peligrosa para personas sanas o como agente de armas biológicas. Sin embargo, se hicieron esfuerzos para desarrollar y mejorar tecnologías de detección de este microorganismo ya que *Salmonella* puede causar intoxicación devastadora. Los métodos de detección de *Salmonella* son necesarios para tener la sensibilidad suficiente para detectar una célula en una muestra definida. Puede variar el tiempo de análisis de métodos convencionales y rápidos con pasos de enriquecimiento celular para llegar a la concentración mínima celular suficiente para detección de *Salmonella*.

La vigilancia de *Salmonella* y su correspondiente seguimiento deben basarse en métodos de detección en los que se pueda confiar y sean eficientes, que a su vez deben ayudar a mejorar la inocuidad de los alimentos (Rodríguez-Lazaro, D. y col., 2007). Es fundamental que la vigilancia y control deben abarcar toda la cadena alimentaria, preferentemente a partir de investigación de alimentos y de ingredientes para la contaminación por *Salmonella* (Alakomi, H.L. y Saarela M., 2009). Normalización,

regulación y redes de vigilancia internacional también son necesarias para la efectiva prevención y control de agentes patógenos de *Salmonella*. Pruebas de estándares internacionales para la *Salmonella* como ISO 6579:2002 y el Comité Nórdico de Análisis de Alimentos (NMKL) contienen información sobre almacenamiento de la muestra, muestreo y otros pasos críticos en el análisis de *Salmonella* (Feldsine, P.T., 2003; Löfström, C., y col., 2010; NordVal, 2009; Lee, K.M., 2015).

1.4.1. Productos contaminados por *Salmonella*.

La bacteria de la *Salmonella* vive en los intestinos de las personas, animales y aves. La mayoría de personas se infectan con *Salmonella* por comer alimentos que han sido contaminados por las heces (<http://salmonelosis.net/causas/>).

- **Carne cruda, aves y mariscos.** Las heces pueden contaminar carnes y aves crudas durante el proceso de matanza. Los mariscos pueden estar contaminados si se cosecha a partir de agua contaminada.
- **Huevos crudos.** Aunque la cáscara del huevo puede parecer una barrera perfecta a la contaminación, algunas gallinas infectadas producen huevos que contienen *salmonella* antes de que se forme la cáscara. Los huevos crudos se usan en la mayonesa y la salsa holandesa. Cualquier alimento que contiene huevo presenta un riesgo de infección por salmonella. Esto es particularmente cierto si los huevos no están bien cocinados o si la yema quede líquida.
- **Frutas y verduras.** Algunos productos frescos, particularmente las variedades importadas, puede ser hidratada en el campo o lavado durante el procesamiento con agua contaminada con *salmonella*. La contaminación también puede ocurrir en la cocina, cuando los jugos de carnes y aves crudas entren en contacto con alimentos crudos, como ensaladas. Esto se conoce como contaminación cruzada.

Muchos alimentos se contaminan cuando son preparados por gente que no se ha lavado bien las manos después de ir al baño o cambiar un pañal. La infección también puede ocurrir si una persona toca algo que está contaminado, incluyendo los animales domésticos, especialmente las aves y los reptiles, a continuación, ponen los dedos en la boca.

Los manipuladores de alimentos que vuelven a trabajar antes de que la infección desaparezca por completo pueden seguir propagando la enfermedad. Algunas personas que contraen la infección por *Salmonella* se convierten en portadores crónicos, lo que significa que continuará excretando la bacteria en sus heces o, en raras ocasiones, la orina durante un año o más después de que los signos y síntomas desaparecen. Algunos portadores pueden pasar la infección por *Salmonella*, sin tener signos ni síntomas de la enfermedad.

1.4.2. Métodos más usados para el control de *Salmonella entérica*.

El procesamiento térmico de alimentos a elevadas temperaturas si bien elimina la posibilidad de daño microbiológico y reduce la actividad enzimática, afecta la calidad del producto, produciendo pérdida de componentes termolábiles y termosensibles responsables de las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos. La vitamina C, es una de las vitaminas hidrosolubles menos inestables. En especial es lábil al calentamiento en presencia de oligometales como el cobre y el hierro. Además el ácido ascórbico se oxida fácilmente en presencia de oxígeno y la rapidez de oxidación aumenta cuando se eleva la temperatura, por lo que se usa como indicador químico para evaluar el procesamiento de frutas y verduras (Mendoza, C. y col., 2015).

1.5. Tratamientos térmicos.

La aplicación de un tratamiento térmico a alimentos viene condicionado por la necesidad de:

- Reducir la flora microbiana presente en los alimentos
- Evitar las alteraciones producidas por los microorganismos no patógenos
- Aplicar el grado de calentamiento/enfriamiento adecuado a cada alimento en cuestión

Los cuatro objetivos principales que se persiguen al aplicar un tratamiento térmico a un alimento son:

- Destruir los microorganismos que puedan afectar a la salud del consumidor
- Destruir los microorganismos que puedan alterar el alimento
- Inactivación enzimática
- Optimizar la retención de factores de calidad a un costo mínimo

El tratamiento térmico de un alimento depende entre otros factores de:

- La termoresistencia de los microorganismos y enzimas presentes en el alimento
- La carga microbiana inicial que contenga el alimento antes de su procesado
- El pH del alimento
- El estado físico del alimento

Bajo el título de Tratamientos Térmicos se suelen englobar todos los procedimientos que tienen entre sus fines la destrucción de los microorganismos por el calor. Nos estamos refiriendo tanto a la Pasteurización y a la Esterilización, cuya finalidad principal es la destrucción microbiana, como al Escaldado y a la Cocción, procesos en los que también se consigue una cierta reducción de la flora microbiana, pero que sus objetivos principales son la variación de las propiedades físicas del alimento.

La **pasteurización** implica la destrucción por el calor de todos los organismos en fase vegetativa, productores de enfermedades o la destrucción o reducción del número de organismos productores de alteraciones en ciertos alimentos, como son los de acidez alta (con un pH menor de 4,6). En estos alimentos sólo se desarrollan microorganismos que alteran el alimento pero no son patógenos para el hombre.

- **HTST (High Temperatura Short Time) (Alta temperatura en un periodo corto de tiempo).**

La unidad de pasteurización (HTST) es un equipo diseñado para el tratamiento térmico de la leche y sus derivados u otros productos alimentarios como refrescos y zumos que permite eliminar los microorganismos patógenos, mediante la aplicación de alta temperatura durante un corto período de tiempo (<http://www.ioxpa.es/productos/productos/pasteurizador-htst>).

La **esterilización** significa la destrucción de todos los organismos viables que puedan ser contados por una técnica de recuento o cultivo adecuados y sus esporas, mediante la aplicación de calor a temperaturas superiores a 100 °C.

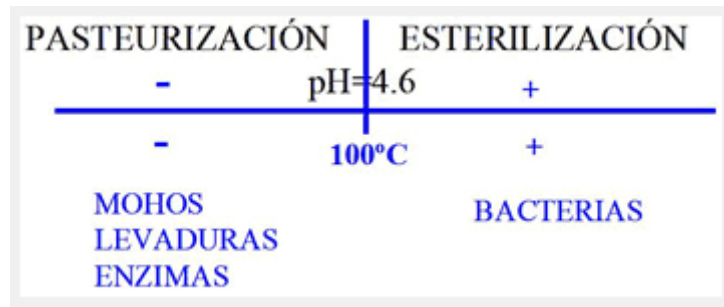


Imagen 2 Parámetros de pasteurización y esterilización.

Por ejemplo, un alimento de baja acidez ($\text{pH} > 4.6$) exige un calentamiento por encima de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, generalmente dentro del margen $[116-130]\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante un tiempo suficiente para conseguir una reducción de 12 ciclos logarítmicos en el número de esporas de *Clostridium Botulinum*. Sin embargo, los alimentos de alta acidez (zumos de frutas) no se someten a tratamientos tan intensos, puesto que el desarrollo de bacterias formadoras de esporas no tiene lugar para esos valores de pH (<http://www.hrsheatexchangers.com/es/recursos/tratamiento-termico-en-la-industria-alimentaria.aspx>).

- **UHT (Ultra High Temperature) (Tratamiento a temperaturas ultra altas)**
Se utiliza para los productos con bajo nivel de acidez (pH superior a 4,6), como la leche UHT, la leche saborizada UHT, las cremas UHT, la leche de soja y otras alternativas lácteas. El mismo proceso también se utiliza para esterilizar alimentos preparados, como sopas, salsas, postres, preparaciones a base de tomate y frutas, y alimento para bebé. Consiste en calentar el producto a más de 135°C . Destruye todos los microorganismos, lo que hace que el producto final sea apto para distribución a temperatura ambiente.

En el tratamiento a temperaturas ultra altas (Ultra High Temperature, UHT), el objetivo es maximizar la destrucción de microorganismos mientras se minimizan los cambios químicos en el producto. Esto implica encontrar la combinación ideal de temperatura y tiempo de procesado para los diferentes tipos de alimentos (<http://www.tetrapak.com/es/processing/uht-treatment>).

Escaldado

Esta técnica elimina enzimas que con el tiempo podrían provocar alteraciones en los alimentos.

El escaldado es un tratamiento térmico que se aplica sobre todo a productos vegetales. A diferencia de otros procesos, no destruye los microorganismos ni alarga la vida útil de los alimentos. Esta técnica, previa a un segundo tratamiento, como puede ser la congelación, el enlatado, la liofilización o el secado, produce un ablandamiento en el alimento que facilita el pelado, en el caso de los tomates, la limpieza y su posterior envasado.

Microorganismos, enzimas, reacciones químicas, temperatura, humedad, presencia de oxígeno, insectos, luz o el paso del tiempo son los principales motivos de alteración en los alimentos (<http://es.slideshare.net/netoabello/escaldado-de-frutas-y-hortalizas-y-encarado-2-15340580>).

Cocción

La cocción permite la modificación de los componentes físicos y bioquímicos del alimento, ya sea a través del ablandamiento, la coagulación, el hinchamiento o la disolución. El calor también permite la destrucción de los agentes causales de enfermedades que aparecen en los alimentos crudos.

Salmonella y *Escherichia coli*, por ejemplo, pueden eliminarse gracias a la cocción. Ciertos aminoácidos naturales y alcaloides que son tóxicos para el ser humano también pueden ser destruidos mediante los procesos de cocción.

Los métodos de cocción más usuales son tres: la cocción en medio acuoso, la cocción en medio graso y la cocción en medio aéreo.

La cocción en medio acuoso más usual consiste en sumergir al alimento en agua hirviendo o en baño maría. La cocción, por otra parte, puede realizarse al vapor o en una olla a presión.

En cuanto al medio graso, la cocción más habitual se realiza en aceites o grasas que se encuentran a temperaturas superiores a los 100°C (https://www.ecured.cu/Cocci%C3%B3n_de_alimentos).

1.5.1. Termorresistómetro

El termorresistómetro es un instrumento diseñado para la determinación de la resistencia de los microorganismos al calor. Permite la aplicación directa de un

tratamiento térmico preestablecido, durante un tiempo determinado en condiciones controladas, a una muestra de alimento o a un medio sintético (Palop, A., 2007).

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, A. y col. 2006).

1.6. Cinética de muerte: Valores D y Z

1.6.1. Calentamiento isotérmico

Al someter a una población bacteriana a la acción del calor, a una temperatura constante, el número de supervivientes es una función exponencial del tiempo de tratamiento: a intervalos iguales de calentamiento la población se reduce en igual proporción. La cinética de destrucción microbiana es, por tanto, una cinética de reacción de primer orden, de modo que se cumple la siguiente ecuación (Cheftel,,J. y Cheftel, H., 1980).

Ecuación 1 Cinética de destrucción microbiana.

$$N_t = N_0 e^{-kt}$$

donde:

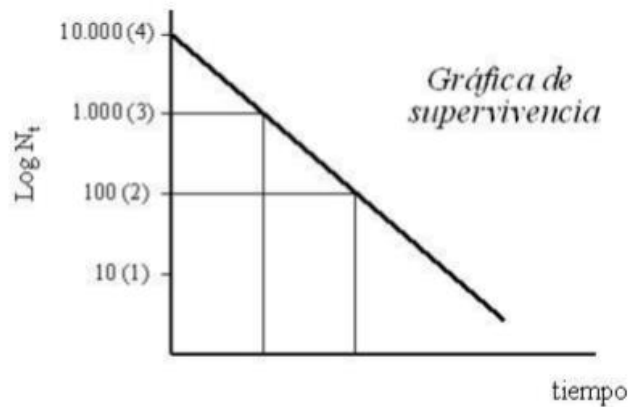
N_t : número de microorganismos tras “t” minutos de tratamiento.

N_0 : número inicial de microorganismos.

k : constante de inactivación.

t : tiempo de tratamiento.

Así pues, al representar el logaritmo del número de supervivientes a un tratamiento térmico, realizado a temperatura constante, frente al tiempo, se obtiene una línea recta. Esta representación se denomina gráfica de supervivencia (Palop, A., 2007).



Gráfica 1 Gráfica de supervivencia microbiana.

Existen una serie de principios los cuales constituyen los pilares básicos de la Termobacteriología. Estos principios se deben al hecho de que la destrucción microbiana siga una cinética de primer orden:

La intensidad de los tratamientos térmicos necesarios para conseguir un nivel determinado de destrucción microbiana se puede calcular matemáticamente.

Si se representa el número de supervivientes frente al tiempo se obtiene una curva asintótica con el eje de abscisas, es decir, el número de supervivientes nunca llega a cero, lo que demuestra al menos teóricamente, que es imposible alcanzar la esterilidad biológica mediante la aplicación de un tratamiento térmico.

Las posibilidades de supervivencia de una población microbiana sometida a la acción de calor dependerán de:

- la concentración inicial de microorganismos (N_0)
- su termorresistencia (k)
- el tiempo de calentamiento (t)

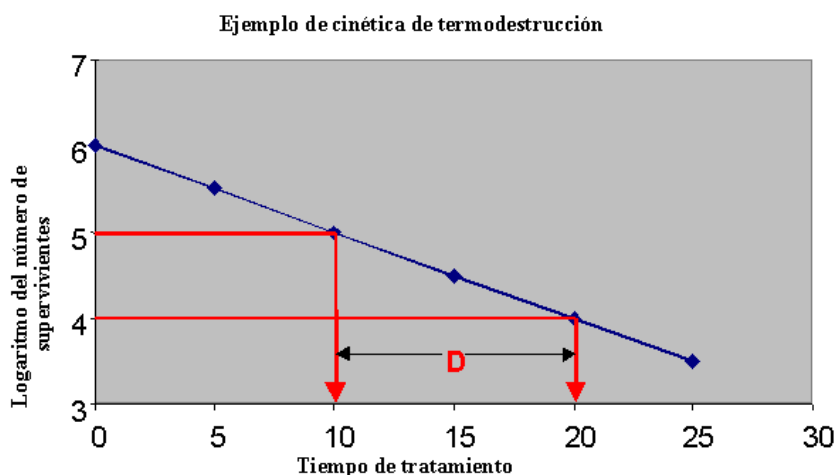
1.6.2. Tiempo de reducción decimal (Valor D).

Para definir la termorresistencia microbiana se creó un parámetro denominado “tiempo de reducción decimal o D_T ”. Se define como el tiempo necesario para que el número de supervivientes caiga al 10% del valor inicial (o, lo que es lo mismo, para que el logaritmo del número de supervivientes se reduzca en una unidad). Si consideramos N_0 como el número de células al inicio del tratamiento y N_x el número de células supervivientes después de un tratamiento de x minutos a una temperatura t , el tiempo de termodestrucción se calcula de la siguiente manera:

(<http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-5.htm>).

Ecuación 2 Tiempo de termodestrucción.

$$Dt = \frac{X}{\log(N_0/N_x)}$$



Gráfica 2 Valor D.

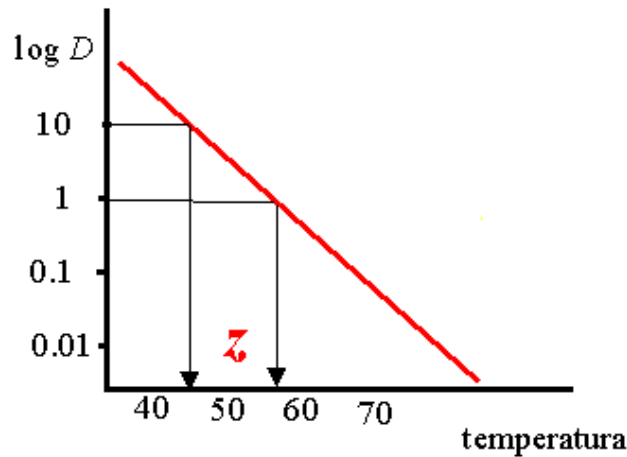
1.6.3. Valor Z.

Si aumentamos la temperatura del tratamiento, el valor D disminuye de forma logarítmica. Por tanto, representando el logaritmo de los valores D_T frente a la temperatura de tratamiento, obtendremos una línea recta denominada gráfica de termodestrucción. La gráfica de termodestrucción permite conocer la termorresistencia que presentará el microorganismo a cualquier temperatura de tratamiento y su pendiente

indica la termodependencia de las reacciones que conducen a su destrucción. A partir de la gráfica de termodestrucción se define el valor z como el número de °C que hay que aumentar a la temperatura de tratamiento para reducir el valor D_T la décima parte, es decir, para que la línea de termodestrucción atravesase un ciclo logarítmico, el valor z se calcula: (<http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-5.htm>; Palop, A.,2007).

Ecuación 3 Temperatura de termodestrucción.

$$z = \frac{\Delta T}{\log D_{T2} - \log D_{T1}}$$



Gráfica 3 Valor Z.

Los valores D y z varían para cada microorganismo y para cada condición. Las esporas, por ejemplo, tienen valores D mucho más altos que las células vegetativas de los mismos microorganismos. Los microorganismos presentes en los alimentos, por otra parte, suelen tener valores D más altos que cuando se cultivan en condiciones de laboratorio. Para poder determinar las condiciones en las que hacer un tratamiento térmico para destruir microorganismos es necesario dominar los conceptos de los valores D y z (<http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-5.htm>).

1.6.4. Modelo y distribución de Weibull.

El método convencional para calcular la eficiencia de la inactivación térmica de los microorganismos en seguridad alimentaria, se basa en el método clásico de los valores D y z, desarrollado por Bigelow, Ball y Stumbo (Stumbo, C.R., 1973). Se basa en la hipótesis de que las curvas de supervivencia microbiana y de esporas bacterianas siguen una cinética de primer orden, apoyándose en el postulado de la teoría mecanística en la cual la muerte celular es causada por la inactivación de enzimas vitales o de complejos enzimáticos.

En muchos casos, en la curvas de supervivencia obtenidas a partir de tratamientos térmicos no se observa una relación lineal y, por tanto, no obedece una cinética de primer orden, siendo observado los fenómenos de hombros (concavidades hacia abajo) y colas (concavidades hacia arriba).

Se han desarrollado y propuesto gran variedad de modelos para la descripción de las curvas de supervivencia no lineales, algunos de tendencia mecanística o pseudomecanística o simplemente empíricos. La teoría mecanística postula que todos los microorganismos de una misma población tienen la misma probabilidad y por tanto existe una homogeneidad en la población. En contraposición a esta teoría, está la teoría probabilística, la cual asume que “en una población aunque esta sea pura existe una variación biológica, en otras palabras, una heterogeneidad entre las células microbianas” (van Boekel, M.A.J.S., 2002). Por tanto, la muerte celular por la inactivación térmica no está, en muchos casos gobernada por modelos cinéticos de primer orden, hallándose más relacionada con una distribución exponencial.

Existen gran variedad de modelos para sustentar esta teoría; entre estos el modelo de Weibull es el que gana en popularidad debido a su simplicidad y flexibilidad (Mafart y col; Van Boekel, M.A.J.S., 2002). Su uso se debe a la aplicación del principio de la parsimonia, el cual postula que, para un problema existen dos o más respuestas y entonces la más simple será la correcta, argumentándose lo anterior en la teoría de la navaja de Ockham la cual se fundamenta en dos premisas muy simples: “*en igualdad de condiciones la solución más sencilla es probablemente la correcta*” y “*No ha de presumirse la existencia de más cosas que las absolutamente necesarias*”, indicado lo anterior las explicaciones nunca deben multiplicar las causas sin necesidad. Lo anterior

en pocas palabras indica que el modelo presenta mayor flexibilidad, robustez y simpleza entre los demás modelos (Mafart, P. y col., 2002; van Boekel, M.A.J.S., 2002).

El modelo proviene de ingeniería donde se usa para describir el tiempo de fallo en sistemas mecánicos y electrónicos y es igualmente útil para el análisis de datos de supervivencia en microbiología, como por ejemplo, el tiempo de muerte luego de la aplicación de un estrés.

La forma acumulativa de la distribución de Weibull para el análisis de curvas de supervivencia no lineales (Eq.4) fue empleada (Ruíz, P.y col., 2002):

Ecuación 4 Distribución de Weibull.

$$\text{Ln} \left(\frac{N}{N_0} \right) = - \left(\frac{t}{\alpha} \right)^\beta$$

La cual fue modificada por Mafart, P.y col., 2002 (Eq.5) y esta última es la que se aplicará en la investigación para la modelización:

Ecuación 5 Distribución de Weibull mejorada por Mafart, P. y col., 2002.

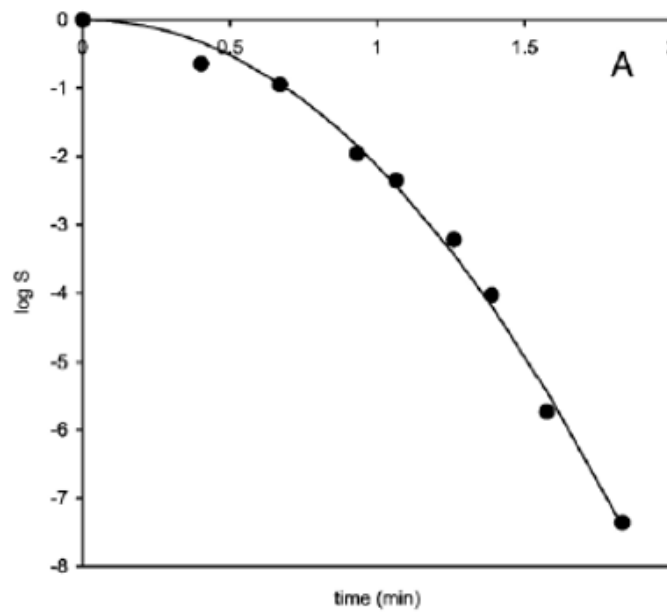
$$\text{Log} \left(\frac{N}{N_0} \right) = - \left(\frac{t}{\delta} \right)^p$$

Donde N_0 es el número inicial de microorganismos (UFC/mL), N el número de supervivientes luego de un tiempo de exposición en un tratamiento térmico t (UFC/mL), t tiempo del tratamiento (min), δ tiempo de la primera reducción decimal o factor de escala, p factor de forma (Mafart, P. y col., 2002).

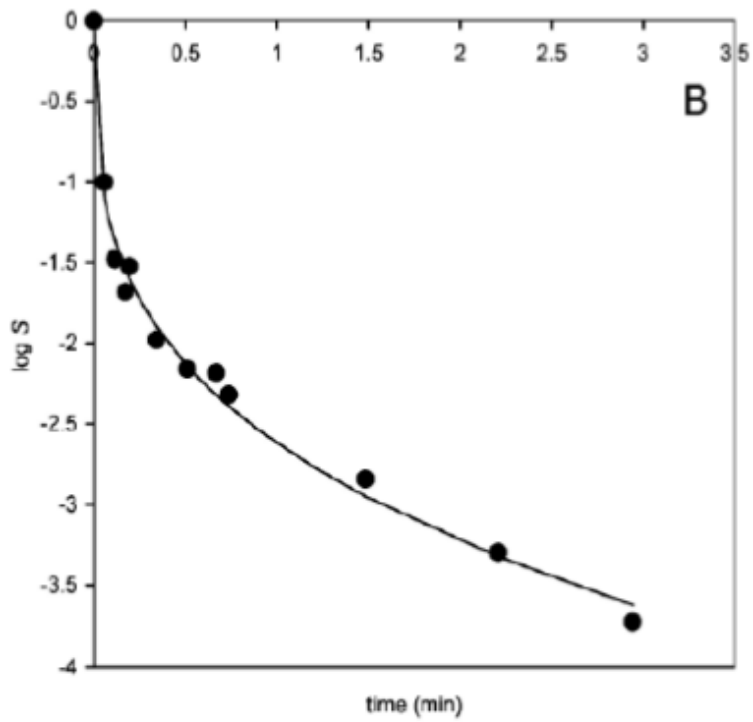
La distribución de Weibull puede ser:

- Cóncava hacia arriba si $p < 1$ (Gráfica 5), lo que indicaría que las células supervivientes tienen menos probabilidad de morir, indicando que éstas son las más resistentes tal vez por adaptación al tratamiento.
- Cóncava hacia abajo si $p > 1$ (Gráfica 4), que indicaría que las células supervivientes se volverían más termosensibles, en otras palabras; el daño acumulado provocado haría más difícil que las células sobrevivan.

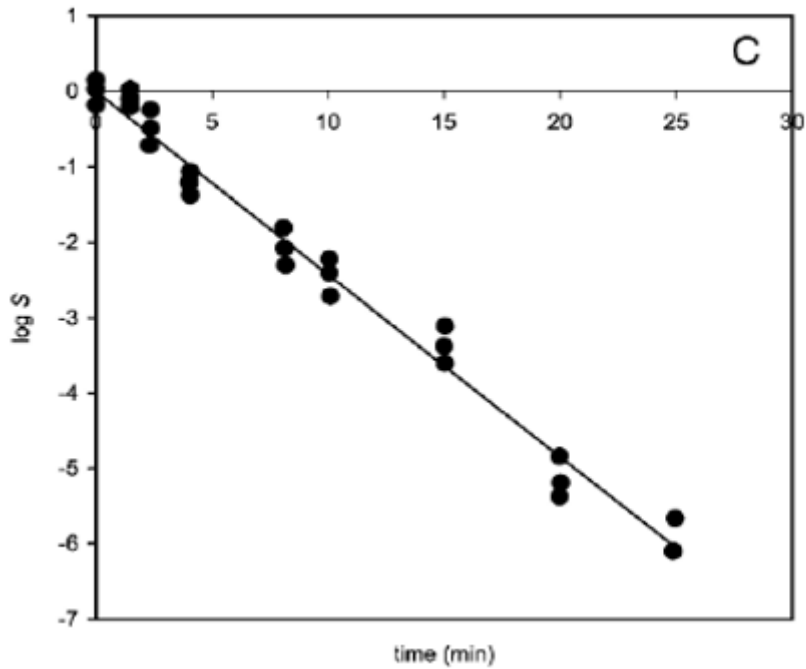
- Seguiría una distribución exponencial si $p=1$ (Gráfica 6), lo que indica que la probabilidad de muerte de las células no depende del tiempo, en otras palabras, cada célula es igualmente susceptible no importando cuanto dure el tratamiento.



Gráfica 4 Formación de hombro $p > 1$



Gráfica 5 Formación de cola $p < 1$



Gráfica 6 Cinética de primer orden $p=1$

1.7. Tecnología de barreras

La estabilidad y seguridad microbiana de la mayoría de alimentos se basa en la combinación de varios factores (obstáculos), que no deberían ser vencidos por los microorganismos. Esto es ilustrado por el llamado “efecto barrera”, que es de fundamental importancia para la preservación de alimentos dado que las barreras en un producto estable controlan los procesos de deterioro, intoxicación y fermentación no deseados. Además, el concepto de barrera ilustra el hecho de que las complejas interacciones entre temperatura, actividad de agua, pH, potencial redox, etc., son significativas para la estabilidad microbiana de los alimentos. La tecnología de barreras (o tecnología de obstáculos o métodos combinados), permite mejoras en la seguridad y calidad, así como en las propiedades económicas (esto, es cuánta agua en un producto es compatible con su estabilidad) de los alimentos, mediante una combinación inteligente de obstáculos que aseguran la estabilidad y seguridad microbiana, así como propiedades nutritivas y económicas satisfactorias (Santo, P.H.S. y Silva, M.A., 2008; Murno, Hernán, 2006).

Las barreras más importantes comúnmente usadas en la conservación de alimentos, ya sean aplicadas como barreras de proceso o como aditivos, son:

- Altas temperaturas (valor F)
- Bajas temperaturas (valor t)
- Actividad de agua
- Acidez
- Potencial redox
- Microorganismos competitivos(por ejemplo, bacterias ácido lácticas)
- Conservantes (nitrito, sorbato, sulfito).

De todos modos, han sido identificadas más de 40 barreras de uso potencial para alimentos de origen animal o vegetal, que mejoran la estabilidad y/o calidad de dichos productos, incluyendo:

- Alta o baja tensión de oxígeno
- Atmósfera modificada (CO₂, N₂,O₂)
- Alta o baja presión
- Radiación (UV, microondas, irradiación)
- Calentamiento Óhmico
- Pulsaciones de campos eléctricos
- Ultrasonido
- Nuevos envases
- Micro estructura de los alimentos (fermentación en estado sólido, emulsiones)
- Varios conservantes

1.8. Daño subletal

El estrés ambiental y los métodos de preservación de alimentos (p. ej., calefacción, refrigeración, acidez y alcalinidad) deben conocerse para inducir las respuestas de adaptación dentro de la célula bacteriana. Los microorganismos que sobreviven a una tensión determinada a menudo ganan resistencia a que el estrés u otras tensiones mediante protección cruzada. El estado fisiológico de una bacteria es una consideración importante cuando se está estudiando su respuesta a técnicas de preservación de alimentos.

Los daños bacterianos pueden definirse simplemente como el efecto del tratamiento subletal de uno o más de microorganismos (Hurst, A. 1984).

Los daños subletales son consecuencia de la exposición a un proceso químico o físico que daña pero no mata a un microorganismo (Hurst, A. 1977) (Rowe, M. T., y R. B. Kirk. 2000). Yousef y Courtney (Yousef, A. E., y P. D. Courtney. 2003) incluyen daños a los componentes celulares en su descripción de la lesión, y Gilbert (Gilbert, P. 1984) escribió, " daños subletales de microorganismos implican daños a las estructuras dentro de las células, esto da lugar a cierta pérdida de la función celular que puede ser transitorio o permanente ".

Las Estrategias de intervención más utilizadas para el control de patógenos y microorganismos de deterioro frecuente producen una serie continua de efectos subletales y una proporción considerable de los microorganismos en los alimentos que de cierto modo pueda dar lugar a un grado de daños subletales durante el procesamiento de alimentos (Institute of Food Technologists, 2002) (Mossel, D. A. A., y P. van Netten. 1984; Zhao, T., y M. P. Doyle. 2001; Wesche, A.M., y col., 2009).

1.9. Choque ácido

Los microorganismos poseen capacidad de desarrollar respuestas de carácter adaptativo cuando han sido sometidos a condiciones subletales, activando mecanismos generales de defensa capaces de provocar un aumento en su resistencia inicial. Pero, no sólo presentan la capacidad de desarrollar un incremento contra esa situación letal, sino también frente a otros agentes estresantes, entre los que se encontrarían los diferentes métodos de conservación de alimentos. Se ha observado que la inducción de la tolerancia a un determinado tipo de estrés, conlleva la tolerancia a otros tipos de estrés, aunque éstos sean letales en ausencia de una inducción previa (resistencia cruzada) (Hill, C. y col., 2002). Por esa razón, es necesario investigar en las respuestas adaptativas a diferentes condiciones de conservación individualmente y en conjunto para poder determinar la aplicación adecuada de los factores de conservación. Todo esto con el ánimo de evitar que los microorganismos sean más sensibles en vez de más resistentes en cada barrera o factor de conservación que se aplique al producto, consiguiendo de esta manera evitar el desarrollo selectivo de flora bacteriana más peligrosa (Abee, T. y Wouters, J.A., 1999).

Todas las respuestas de adaptación, ya sea a cambio de alimentos o a otros tipos de estrés diferentes, implican una serie de interruptores genéticos que controlan los cambios metabólicos que tienen lugar. Un mecanismo de regulación común implica la modificación del factor sigma cuya función principal es enlazar un núcleo de ARN polimerasa que confieren especificidad de promotor (Haldenwang, W.G., 1995).

La subunidad σ^s de la ARN polimerasa (RpoS) es el principal regulador de la respuesta de estrés general en *E. coli* y otras bacterias entéricas, incluyendo *Shigella flexneri* y *Salmonella typhimurium* (Small, P. y col., 1994; Hengge-Aronis, R., 1996b).

La exposición gradual o repentina a estrés ácido ocurre en una gran diversidad de nichos ecológicos de varios agentes patógenos en alimentos. La adificación del medio para la conservación de alimentos se lleva haciendo desde mucho tiempo, se utiliza como barrera a consecuencia de patógenos y bacterias como: *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *Shigella flexneri* y *L. monocytogenes* son neutrófilos; crecen mejores en pH neutro (Abee, T. y Wouters, J.A., 1999).

Estrés ácido se puede describir como el efecto biológico de ausencia combinada de pH bajos y débiles ácidos (orgánicos), como acetato, propionato y lactato presentan en el entorno de perturbación (comida) como resultado de la fermentación, o alternativa, cuando se añade como conservante (Zhao, T. y col., 1993; Garland Miller, L. y Kaspar C.W., 1994; Bearso, S. y col., 1997).

Los microorganismos han desarrollado o adquirido mecanismos para que regular su pH intracelular (pHin) para garantizar su supervivencia cuando se producen disminuciones del pH extracelular (pHex). Lo hacen mediante procedimientos homeostáticos complejos, pero son totalmente diferentes los mecanismos empleados por microorganismos Gram positivos y Gram negativos. En los microorganismos Gram positivos, tiene lugar una disminución gradual del pH intracelular (pHex – pHin) conforme desciende el pH extracelular, de forma que conserva un gradiente de pH (pHex, pHin) constante (Foster, J.W., 2000).

Los microorganismos han desarrollado sistemas de transducción de señal, en respuesta a un estrés ambiental, se debe al control de la expresión coordinada de genes que están implicados en mecanismos de defensa celular (Huisman, G.W. y Kolter, R., 1994; Rees, C.E.D. y col., 1995; Salmond, G.P.C. y col., radiation, hydrogenperoxide, heat and high

salt1995; Hengge-Aronis,R., 1996a; Kennelly, P.J.y Potts, M., 1996; Kleerebezem, M.y col., 1997).

La eficiencia de los métodos de inactivación y conservación deben evaluarse, especialmente en relación con el gran potencial de patógenos en alimentos, que tienen estos para adaptarse a una amplia variedad de condiciones de estrés. Se describen mecanismos adaptativos celulares a hambre, frío choque, choque térmico, ácidos (débiles), elevada osmolaridad y alta presión hidrostática y discute su importancia en la conservación de alimentos y seguridad (Abee & Wouters, 1999).

2. Justificación y objetivos

Justificación

Las industrias alimentarias han evolucionado a lo largo de los años, la sinergia entre seguridad y calidad alimentaria cada vez se ha ido poniendo más en marcha.

Fácil no ha sido, ya que conservar los atributos de seguridad y calidad alimentaria ha llevado a su vez a cambios importantes en las industrias a nivel económico, que han hecho que no fuera tan fácil la puesta en marcha de equipos sofisticados, que hacen posible y fundamental la estabilidad microbiológica de los alimentos.

La población humana ha cambiado sus gustos, hábitos de vida y esto ha llevado a una “revolución” a la hora del “diseño” de nuevos alimentos que hagan posible y más cómoda la vida y llegar a la satisfacción sana y equilibrada que la población demanda.

La demanda de alimentos naturales y frescos listos para el consumo, los denominados en inglés “Ready to eat” o “Ready to cook”, ha crecido, por lo que la industria alimentaria ha tenido que hacer frente a este punto de la mejor manera innovando y compitiendo con otros mercados e industrias mejorando su producto y haciendo este accesible al consumidor. La mayoría de alimentos son pereceros, por lo que lleva a un rápido deterioro de estos por el ataque de diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos), a distintos niveles de contaminación debido a la gran variedad de productos, cada vez más, consumidores y procedentes de cualquier parte del mundo. Esto implica un enorme estudio y por tanto control, ya que una de las mayores preocupaciones que causa una fuerte presión acerca de los alimentos es la accesibilidad. Se trata de que los consumidores de todos los puntos del mundo puedan acceder a todo tipo de alimentos y que estos a su vez cumplan los requisitos de seguros, abundantes y finalmente y no menos importante accesibles en costo.

Salmonella es uno de los principales patógenos de interés en la industria alimentaria, causante de la llamada Salmonelosis. Los alimentos contaminados por *Salmonella* son la vía primaria de transmisión de esta enfermedad. Los animales también pueden estar infectados y transmitir la infección al estar en contacto con ellos como en el caso de las mascotas o también, un ejemplo muy común, la gallina portadora de la infección transmitirla al producto, en este caso el huevo. La posible presencia en gran variedad de alimentos, junto con la capacidad de crecimiento y supervivencia a distintos

tratamientos y condiciones hacen que *Salmonella* sea un microorganismo importante a tener en cuenta.

La industria alimentaria está continuamente en desarrollo e implementando nuevos métodos de procesado de alimentos. Por ello se requiere un estudio exhaustivo del efecto de cada técnica sobre los diferentes microorganismos que ponen en riesgo la seguridad del alimento procesado.

Uno de los métodos más utilizados para la conservación de alimentos son los tratamientos térmicos. Los tratamientos térmicos no siempre afectan de manera positiva al alimento, ya que ciertas temperaturas son capaces de degradar la calidad organoléptica y nutritiva de este. De igual modo el tratamiento térmico sigue siendo el método de esterilización más utilizado ya que permite conseguir la seguridad alimentaria y por tanto estabilidad microbiológica de los alimentos procesados.

El tratamiento térmico no sólo reduce e inactiva la flora microbiana y evita alteraciones producidas por patógenos, sino que también, interviene en la inactivación enzimática y a optimizar factores de calidad en los alimentos a un coste mínimo.

Los aplicación de tratamientos térmicos se dan a través de intercambiadores de calor y autoclaves, para ello se conoce y se dispone de la resistencia térmica de numerosos microorganismos. No obstante, es necesario seguir estudiando el comportamiento de los microorganismos en diferentes condiciones.

Objetivos

El objetivo del presente trabajo fin de grado es el siguiente: estudiar la inactivación de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* CECT 4300 en condiciones isotérmicas.

Para poder cumplir estos objetivos, se abordaron los siguientes objetivos por separado:

1. Determinar la termorresistencia de un choque ácido y el efecto del pH del medio de calentamiento, de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* CECT 4300 mediante tratamientos isotérmicos a 52.5°C, 55°C, 57.5°C y 60°C.
2. Aplicar el modelo necesario para obtener la letalidad.

3. Materiales y métodos

3.1. Microorganismo

El microorganismo con el que se llevó a cabo el estudio fue *Salmonella enterica* subsp.*enterica* CECT 4300.

Fue proporcionada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España).

Esta cepa fue almacenada a - 80°C (20% glicerol) hasta su uso. Para los experimentos de crecimiento y supervivencia, se prepararon cultivos frescos en caldo tripticasa de soja (TSB) (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España) (37°C x 24h) hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionaria ($\approx 10^9$ UFC/mL).

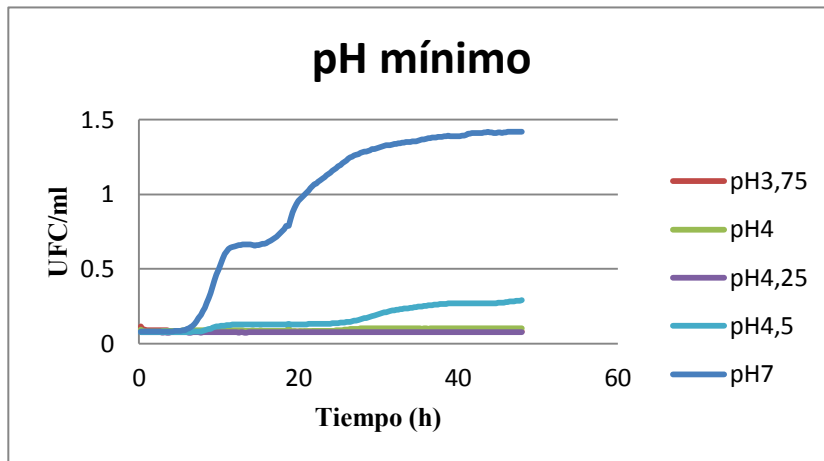
3.2. Preparación de medios de crecimiento a diferentes pH's

La preparación de TSB a diferentes pH's ácidos se realizó mediante la adición de ácido cítrico (Panreac, Barcelona, España) 1M. Se prepararon 5 medios a diferente pH: 3.75, 4,4.25, 4.5 y 7. El valor de pH 7 fue considerado como control. Posteriormente se usaron en la Bioscreen C.

3.3. Determinación del crecimiento microbiano a diferentes pH's ácidos

El crecimiento de *Salmonella enterica* a diferentes pH's se determinó mediante mediciones de absorbancia en un Bioscreen C a una longitud de onda de 600 nm. (LabSystems Helsinki, Finland). Las diluciones en serie de los cultivos frescos se realizaron en TSB a los diferentes pH's. Se usaron 25 pocillos/valor de pH, de los cuales 5 se dejaron sin inocular (para comprobar que el medio no estuviese contaminado).

Estos resultados muestran que el pH mínimo de crecimiento para esta cepa es de 4.5, a valores por debajo de este pH no se observa crecimiento de este microorganismo.



Gráfica 7 Curva de crecimiento a pH mínimo.

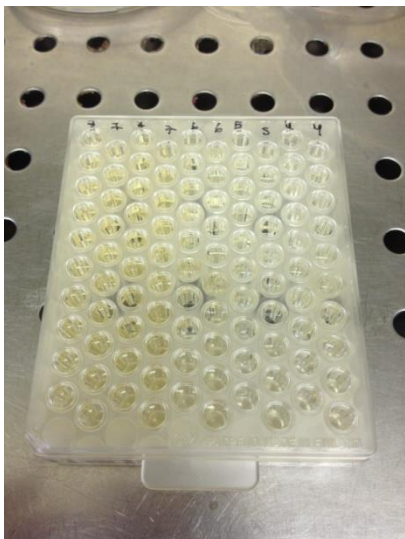


Imagen 3 Pocillos para Bioscreen C.

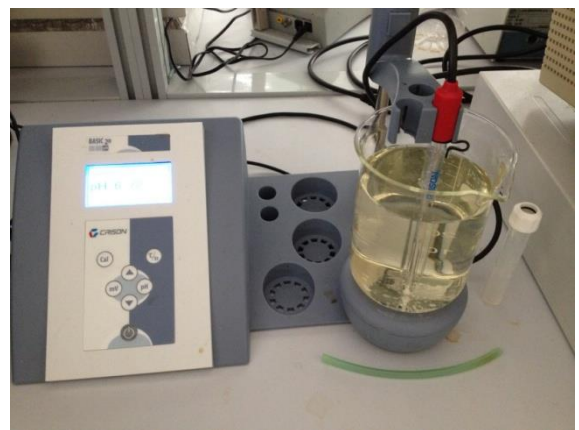


Imagen 4 pH metro.

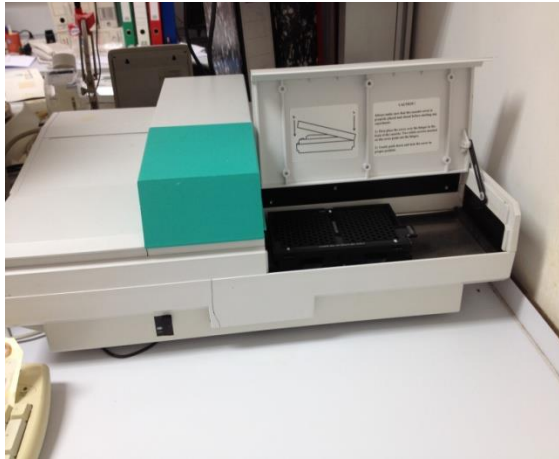


Imagen 5 Bioscreen C.

3.4. Aplicación de un choque ácido.

Se añadió 1 mL de cultivo de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* CECT 4300, previamente incubado 24 horas a 37°C.

Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Una vez centrifugado, se observó que en la parte superior quedaba el sobrenadante y en la parte inferior el pellet, por lo que el sobrenadante se descartó y se quedó en la parte inferior de los tubos eppendorf el pellet al que se le añadió TSB estéril a pH 7.1

Se homogenizó la solución en un agitador tipo vórtex y se volvió a centrifugar de nuevo a 10000 rpm durante 10 min a 4°C.

Tras la nueva centrifugación se siguió el protocolo descrito anteriormente:

Descartar sobrenadante quedando el pellet en la parte inferior de los tubos eppendorf y añadir de nuevo TSB estéril a pH 7.1 volviendo a homogenizar con el agitador tipo vórtex y a continuación se vuelve a repetir el proceso anterior.

Finalmente tras la última centrifugación se volvió a descartar el sobrenadante, pero esta vez se añadió TSB estéril a pH 4.5, se volvió a homogenizar con el pellet y se dejó incubar durante 30 min a 37°C. El TSB se acidificó antes de su esterilización mediante la adición de una solución 1M de ácido cítrico (Panreac, Barcelona, España). Se comprobó que el valor de pH de los diferentes medios no variaba tras el tratamiento de esterilización.

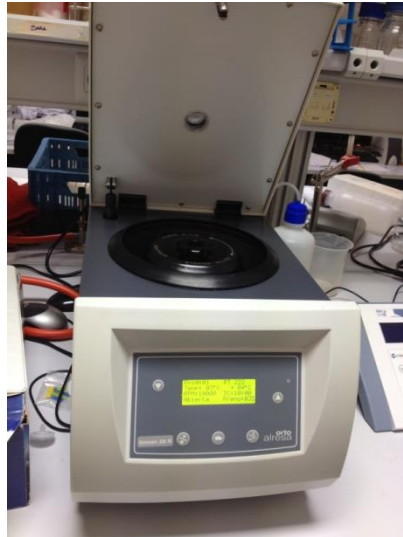


Imagen 3 Centrífuga.



Imagen 4 Vórtex.

3.5. Determinación del daño subletal.

El daño subletal por cloruro de sodio en *Salmonella entérica*, se determinó mediante la preparación medios de TSA, en una disolución de sal con porcentajes en un rango de 1 a 5%, en placas petri. Una posterior incubación en estufas a 37°C durante 48 horas. Finalmente se determinó que el porcentaje para el daño subletal en *Salmonella entérica* era del 1%.



Imagen 5 Medios TSB a distintos porcentajes de sal.

3.6. Determinación de la termorresistencia de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT 4300.

La determinación de la termorresistencia del microorganismo se llevó a cabo en un termorresistómetro Mastia (Conesa et al., 2009). El medio de calentamiento fue agua de peptona (10 g/L. de peptona de caseína (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España) y 5 g/L. de cloruro de sodio (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España)). Para los tratamientos en medio ácido el agua de peptona se acidificó previo a su esterilización con ácido cítrico 1M. El vaso del termorresistómetro se llenó con 500 ml de medio de calentamiento y se esterilizó en el termorresistómetro antes de cada tratamiento y se enfrió hasta la temperatura de tratamiento (52.5, 55, 57.5 y 60°C).

Una vez que la temperatura del tratamiento se alcanzó y permaneció estable, se inoculó el medio con 0.2 ml de suspensión microbiana (con choque o sin choque ácido). Las muestras se recogieron en tubos de ensayo estériles a intervalos de tiempo preestablecidos y se sembraron en TSA (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España) y fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Se realizaron un mínimo de 3 experimentos separados por condición.



Imagen 6 Termorresistómetro Mastia.

3.7. Análisis de datos.

Para modelizar las curvas de supervivencia de *Salmonella enterica* se empleó el modelo dinámico propuesto por weibull basado en el modelo clásico del valor δ , p y z , permitiendo describir gráficas de supervivencia no lineales de distintas formas, incluyendo la presencia de hombros y colas.

Para modelizar las curvas de supervivencia, se utilizó el software GLFIT, que emplea la siguiente ecuación:

Ecuación 8 Distribución de Weibull.

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

Donde N_0 es el número inicial de microorganismos (UFC/mL), N el número de supervivientes luego de un tiempo de exposición en un tratamiento térmico t (UFC/mL), t tiempo del tratamiento (min), δ tiempo de la primera reducción decimal o factor de escala, p factor de forma (Mafart, P.y col., 2002).

4. Resultados y discusión

4.1. Termorresistencia pH 7.

En la figura 1 se presentan las curvas de termodestrucción de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* CECT 4300 en un medio de preparación pH 7, con adición del 1% de NaCl y sin adición de NaCl en el medio de recuperación, para poder ver si se ha producido o no daño subletal en la membrana extena de la célula bacteriana. El objetivo en el experimento de Arroyo, C. y col., (2010) fue evaluar el daño en el exterior de la membrana de *Enterobacter sakazakii* debido al efecto de la combinación de pulsos eléctricos y citral. Además los autores en esta investigación demostraron la ocurrencia de daños subletales dentro de la supervivencia de la población celular, no solo en la membrana citoplasmática, sino también en la membrana externa.

En este caso, todas las curvas, presentan únicamente fenómeno de cola ya que su valor p es inferior a 1 (tabla 2).

En este caso el parámetro z para el tratamiento sin adición de NaCl al medio de recuperación con los valores de p fijados (tabla 1) la temperatura para disminuir una unidad logarítmica, es considerablemente más alta respecto de la de la temperatura de los valores de p sin fijar (tabla 2), ya que la z de la tabla 1 ha sido calculada a partir de dos únicas temperaturas a comparar. Por lo que tener una mejor predicción y exactitud en la predicción del tratamiento, se decidió coger la tabla de los valores p sin fijar (tabla 2).

Si se observan los valores de δ (Tabla 2) la termorresistencia del microorganismo al tratamiento va disminuyendo, conforme aumentan las temperaturas, por lo que se observa que a una temperatura de 60°C el tiempo para disminuir una unidad logarítmica es menor también. Estos valores de δ nos indican que no existen diferencias significativas entre un medio de recuperación con la adición del 1% NaCl que sin la adición de NaCl para la determinación del daño subletal, así como también la figura 1 no muestra que el número final de microorganismos es el mismo o muy parecido para ambos medios. Por lo que se puede deducir que la membrana externa de la célula no ha sufrido daño subletal.

Según los datos obtenidos no importa el tratamiento que se le aplique, ya que algunas células se adaptan al tratamiento, incrementando su resistencia y siendo muy difícil eliminarlas.

Si se observa también la R^2 ajustada, se puede afirmar que el modelo utilizado se ajusta de manera aceptable a los datos del experimento, ya que estos son próximos al 100%.

Shrestha y Nummer (2016) investigaron la supervivencia de *Salmonella spp.* en baja actividad de agua con pasta de base de pollo y polvo fueron formulados a diferentes niveles de sal. El propósito de este estudio fue determinar la supervivencia de un cóctel de cinco cepas de *Salmonella* en pasta base pollo ($a_w 0.709 \pm 0.029$) y base de polvo de pollo ($a_w 0,282 \pm 0.020$), ambos formulados nivel regular de sal, 45% reducido en sal y 90% reducido en sal. Se vió que la pasta de base de pollo y el polvo formulado en tres niveles de sal, específicamente, regular sal, sal reducido de 45% y 90% de sal reducido, tenían un estimado cloruro de sodio (NaCl) contenido de $33,5 \pm 0.5$, $18,4 \pm 0.2$ y $3.3 \pm 0.2\%$ w/w respectivamente. Todos los otros ingredientes utilizados en la pasta fueron en forma seca (baja humedad y baja a_w). Depende del porcentaje de sal en las formulaciones de pasta y carne, las humedades en las formulaciones de pasta estuvieron entre el 21,6 y 30.0%, con actividad de agua de 0.686-0.751. Los contenidos de la formulación de la carne en polvo para la humedad no varían tan ampliamente. Estuvieron entre 6.1 y 8.6% y los niveles de a_w eran 0.254 a 0.301.

La supervivencia y la inactivación de *Salmonella* es afectada por la actividad de agua de alimentos secos (Beuchat, L.R. y Scouten, A.J. 2002; Jung, Y.S. y Beuchat, L.R., 1999). Diferentes niveles de sal ($33,5 \pm 0.5$, $18,4 \pm 0.2$ y $3.3 \pm 0.2\%$ w/w) resultaron diferencias significativas en el contenido de humedad de las formulaciones en el presente estudio, su influencia en la actividad de agua no fue lo suficientemente significativo como para afectar a la supervivencia de *Salmonella* en tratamientos ya sea en pasta o en polvo formulado en los tres niveles de la sal añadida. En muchos productos alimenticios, el contenido de sal no está diseñado para preservar o un obstaculizar el crecimiento microbiano, sino por las características sensoriales. En los últimos años ha habido un creciente interés en la reducción de sodio (sal) en la dieta humana, particularmente en los Estados Unidos y Europa. Por lo tanto, los resultados del presente estudio destacan para los procesadores de alimentos que buscan reducir el contenido de sal en los alimentos actividad de agua baja. Por lo tanto, los resultados del

presente estudio destacan para los procesadores de alimentos que buscan reducir el contenido de sal en los alimentos actividad de agua baja. El nivel de sal no tiene ningún efecto significativo sobre la supervivencia de Salmonella en alimentos de agua baja y muy baja actividad. Las poblaciones de Salmonella reduce gradualmente en moderadamente productos de la actividad de agua baja (a_w 0.69-0.75) durante el almacenamiento. Sin embargo, la supervivencia es mayor en productos de actividad muy baja de agua (a_w 0.30).

Tabla 1 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia en un medio de calentamiento neutro con valores de p fijos.

	Adición 1% NaCl				Sin adición de NaCl			
	52,5	55	57,5	60	52,5	55	57,5	60
Temperatura (°C)	52,5	55	57,5	60	52,5	55	57,5	60
δ (min)	6,73±2,68	2,56±0,90	*	*	6,23±1,87	3,64±1,36	*	*
LOG10(N0) (UFC/ml)	5,03±0,21	5,07±0,20	*	*	5,26±0,17	5,01±0,21	*	*
p		0,62	*	*		0,64	*	*
z (°C)		5,98	*	*		10,75	*	*
RMSE	0,3658	0,3416	*	*	0,2922	0,3612	*	*
R²	0,8981	0,8920	*	*	0,9435	0,8346	*	*

*No funcionaba el programa con los datos a temperaturas de 60°C

Tabla 2 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia en un medio de calentamiento neutro con valores de p sin fijar.

	Adición 1% NaCl				Sin adición de NaCl			
	52,5	55	57,5	60	52,5	55	57,5	60
Temperatura (°C)	52,5	55	57,5	60	52,5	55	57,5	60
δ (min)	3,96±1,92	2,20±0,84	0,16±0,05	0,07±0,04	5,57±1,75	2,96±1,25	0,16±0,04	0,06±0,03
LOG10(N0) (UFC/ml)	5,18±0,20	5,12±0,19	5,80±0,13	5,52±0,46	5,29±0,17	5,08±0,20	5,95±0,16	5,61±0,36
p	0,49±0,09	0,57±0,10	0,55±0,08	0,87±0,36	0,61±0,09	0,56±0,13	0,62±0,07	0,78±0,25
z (°C)		3,92				3,49		
RMSE	0,3466	0,3394	0,2322	0,8182	0,2907	0,3574	0,2799	0,6292
R²	0,9084	0,8934	0,9496	0,6340	0,9441	0,8380	0,9572	0,7453

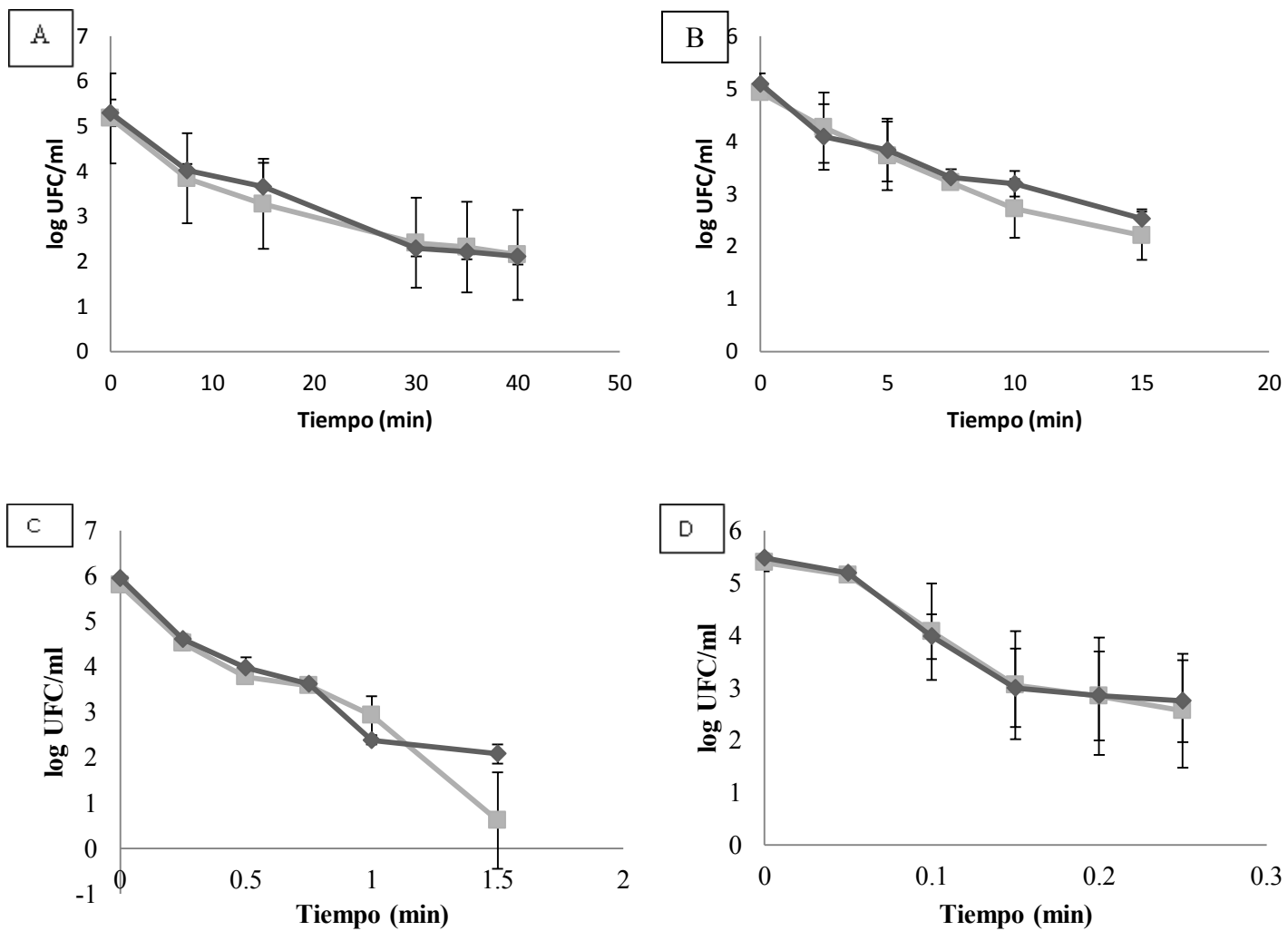


Figura 1 Curvas de termodestrucción de *Salmonella enterica* en medio de calentamiento pH 7 con y sin sal. A: 52,5°C, B: 55°C, C: 57,5°C, D: 60°C (Gris oscuro sin sal, gris claro con sal).

4.2. Termorresistencia pH 4,5

En la Figura 2 se presentan curvas de termodestrucción de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* CECT 4300 en un medio de calentamiento a pH 4,5, con adición del 1% de NaCl y sin adición de NaCl al medio de recuperación. . La adición de NaCl al medio de recuperación se realiza para determinar el daño subletal de los tratamientos aplicados.

En este caso, todas las curvas, presentan únicamente fenómeno de cola ya que su valor de p es inferior a 1, aunque algunas están cerca de la linealidad, 52,5 y 60°C, cuyos valores son 0,92 y 0,84 respectivamente (Tabla 4). Se podrían fijar todas, aunque la temperatura de 52,5°C perdería bondad de ajuste pero para la predicción de tratamiento más complejos (tratamientos no isotérmicos). Tampoco sería bueno coger los datos de la tabla 3, ya que como se puede observar hay dos temperaturas que no han podido ser fijadas (debido a problemas del software), por lo que luego a la hora de calcular otros parámetros del modelo no sería óptimo con solo dos temperaturas.

Por otro lado, se observa, que conforme aumenta la temperatura, la termorresistencia en un medio de recuperación con adición al 1% de NaCl, los valores de p se mantienen constantes con valores menores de 1 y el tiempo para disminuir una unidad logarítmica al que se somete al microorganismo es menor.

Los valores de δ , son parecido o iguales para todas la temperaturas (tabla 4). Así como también si observamos la figura 2 se puede observar que no existen diferencias significativas entre los distintos medios con adición del 1% de NaCl y sin adición de NaCl, ya que como se muestra en las gráficas el número de microorganismos al final del tratamiento el mismo en ambos medios. Con esto se puede intuir que la aplicación de un tratamiento térmico con un medio de calentamiento a pH 4,5 no afecta a la membrana externa (daño subletal con adición de 1% NaCl al medio de recuperación) con lo cual el mecanismo de inactivación con este tratamiento no está relacionado con un daño en la membrana externa de la célula, quizás la muerte de las células bacterianas este dada por la desnaturalización de proteínas o de otros componentes celulares.

Si se observa también la R^2 ajustada, se puede afirmar que el modelo utilizado se ajusta de manera aceptable a los datos del experimento, ya que estos son próximos al 100%.

En el experimento realizado por Cristina, R., y col., (2014) se utilizó ácido láctico y ácido acético, con *Salmonella spp.* para estudiar la expresión de los genes a la tolerancia ácida. Tres genes fueron investigados en este estudio (*rpoS*, *nlpD* y *clpP*), ya que estos genes producen proteínas que regulan o protegen a las bacterias contra el daño celular causado por el estrés (Foster, J.W., 2001; Hengge-Aronis, R., 2002; Lange, R. y col., 1995; Lues, J.F. y Theron, M.M., 2011; Paesold, G. y Krause, M., 1999). La mejor eficacia de ácido acético en el control y reducción de los microorganismos puede explicarse por su capacidad de disociación menor en comparación con ácido láctico. En el presente estudio, esta eficacia, demuestra la disminución de las poblaciones de *Salmonella* en los tratamientos con ácido acético a pH 5.0 y pH 4.0. Las respuestas adaptativas de *Salmonella* a los ácidos orgánicos se han descrito para diferentes serotipos (Álvarez Ordóñez, A. y col., 2011), y el presente estudio demostró un comportamiento ácido tolerancia por las tres cepas probadas. Estos resultados muestran que *Salmonella* puede adaptarse a ácidos orgánicos, especialmente a pH 6,0 o pH 5.0. Sin embargo, cuando el pH es inferior (pH 4.0), la supervivencia no es viable después de 6 a 24 h. Bajo estas condiciones se pueden observar en la práctica comercial, como los cadáveres de animales son rociados con ácidos orgánicos pueden presentar niveles de pH entre 3.3 y 5.8, dependiendo del ácido específico, tiempo de pulverización, concentración y otros factores (Ordóñez Álvarez, A. y col., 2009). Sin embargo, dependiendo del valor de pH necesario para promover la reducción bacteriana adecuada, la calidad sensorial de la carne puede ser riesgo (Smulders, F.J. y Greer, G.G., 1998).

Tabla 3 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia en un medio de calentamiento ácido con valores de p fijos.

	Adición 1% NaCl				Sin adición de NaCl			
	52,5	55	57,5	60	52,5	55	57,5	60
Temperatura (°C)	52,5	55	57,5	60	52,5	55	57,5	60
δ (min)	3,05±1,01	1,67±0,95	0,15±0,05	*	2,77±0,69	1,78±0,91	*	*
LOG10(N0) (UFC/ml)	5,66±0,26	5,36±0,44	5,41±0,26	*	5,66±0,20	5,34±0,34	*	*
p		0,8		*		0,74	*	*
z (°C)		3,83		*		13,15	*	*
RMSE	0,4612	0,7747	0,4506	*	0,3463	0,6127	*	*
R²	0,9193	0,7744	0,8999	*	0,9580	0,7999	*	*

*No funcionaba el programa con los datos a temperaturas de 60°C

Tabla 3 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia en un medio de calentamiento ácido con valores de p sin fijar.

	Adición 1% NaCl				Sin adición de NaCl			
	52,5	55	57,5	60	52,5	55	57,5	60
Temperatura (°C)	52,5	55	57,5	60	52,5	55	57,5	60
δ (min)	3,92±1,11	1,46±0,89	0,12±0,04	0,04±0,02	2,24±0,60	1,76±0,91	0,15±0,04	0,05±0,02
LOG10(N0) (UFC/ml)	5,52±0,25	5,42±0,44	5,53±0,25	4,99±0,39	5,77±0,19	5,34±0,35	5,68±0,20	4,97±0,40
p	0,92±0,15	0,75±0,22	0,70±0,13	0,84±0,28	0,68±0,07	0,74±0,20	0,76±0,12	0,79±0,31
z (°C)		3,54				4,17		
RMSE	0,4520	0,7734	0,4415	0,6890	0,3399	0,6127	0,3567	0,7028
R²	0,9225	0,7752	0,9039	0,7634	0,9596	0,7999	0,9287	0,7022

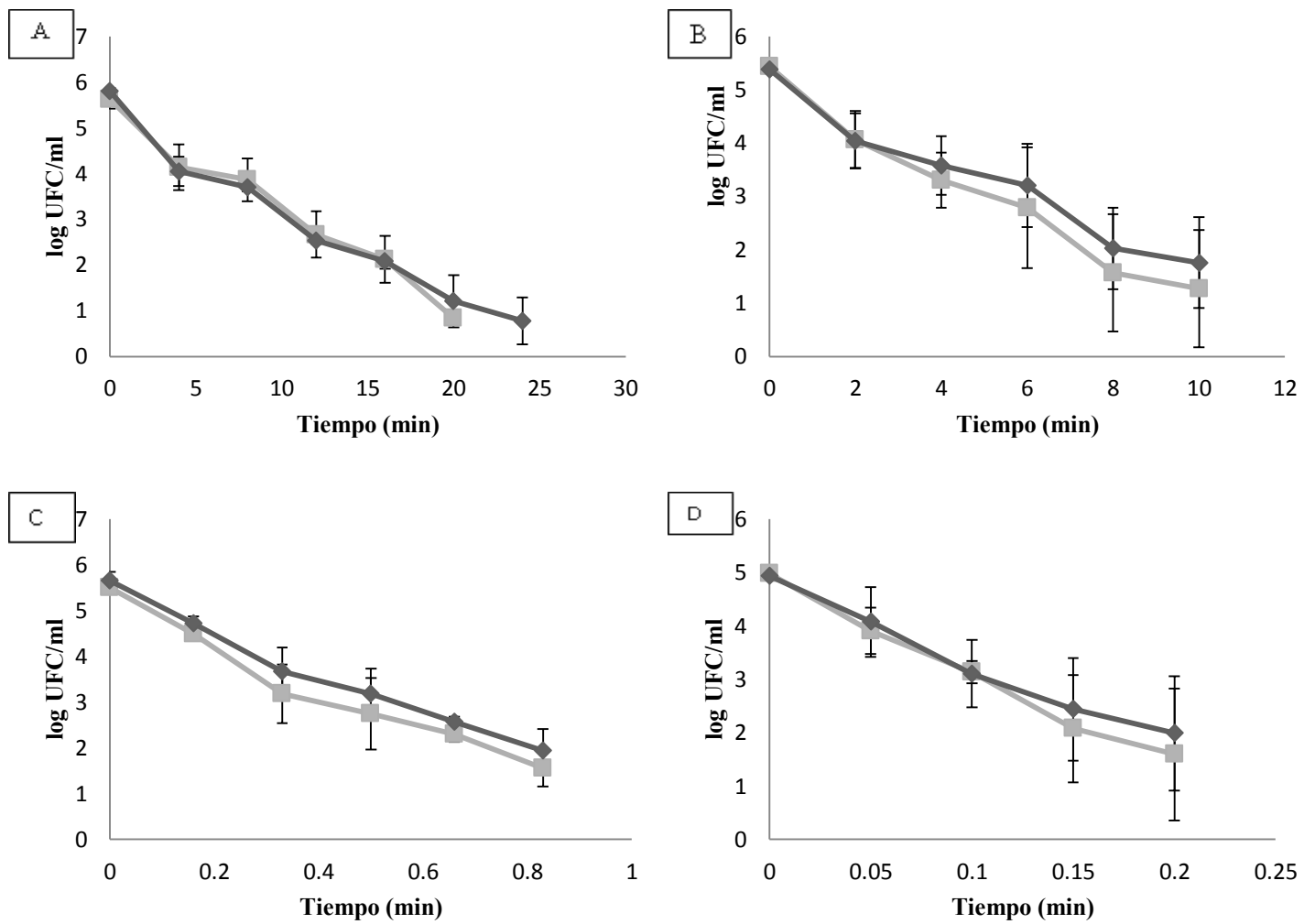


Figura 2 Curvas de termodestrucción de *Salmonella enterica* en medio de calentamiento pH 4,5 con y sin sal. A: 52,5°C, B: 55°C, C: 57,5°C, D: 60°C (Gris oscuro sin sal, gris claro con sal).

4.3. Termorresistencia choque ácido.

En la figura 3 se presentan las curvas de termodestrucción de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* CECT 4300 a diferentes temperaturas de tratamiento, en medio de calentamiento neutro (pH 7) y ácido (pH 4,5), con un choque ácido previo. En la tabla 5 y 6 se presentan los valores estimados de p , z y δ al analizar los datos con el modelo de Weibull utilizando el software GinaFit (Mafart, P. y col., 2002). En la tabla 5, se fijó un único valor p . El fijar el valor p tiene la finalidad minimizar la variabilidad de las predicciones, perdiendo bondad de ajuste pero ganando precisión para las predicciones en condiciones no testadas, sobre todo en condiciones de tratamientos no isoterms. En el experimento realizado por Esteban, M.D. y col., (2012), utilizó un único valor de p para ajustar todas las curvas de supervivencia realizadas en el mismo medio de calentamiento con el modelo de Weibull, se vió que este experimento empeoró ligeramente la bondad de ajuste (Couvert, O. y col., 2005). En cambio en modelo de Geeraerd se aplicó individualmente a cada curva de supervivencia, dando una mejor bondad de ajuste bajo condiciones isotérmicas.

En la tabla 6 se analizaron los resultados de cada tratamiento de forma individual, estimando los valores p y δ para cada tratamiento.

Al comparar los valores p de la tabla 5 con los diferentes valores p de la tabla 6 se observa que los fijados son muy distintos de los valores estimados de forma individual. Para los tratamientos a pH 4,5 el valor estimado de p indica que la cinética de termodestrucción es lineal ($p \approx 1$) mientras a pH 7 se observa el fenómeno de hombro ($p > 1$). De forma individual se observa que dependiendo de la temperatura de tratamiento el comportamiento del microorganismo es diferente, a pH 7 se observan cinéticas de termodestrucción lineales y fenómenos de hombro, mientras a pH 4,5 se observan cinéticas lineales y fenómenos de hombro y cola. Estos resultados permiten deducir que la respuesta del microorganismo a los tratamientos térmicos es diversa y dependerá de las condiciones previas al tratamiento, la temperatura y el pH del medio de calentamiento.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el fijar el valor p no es lo más adecuado porque las predicciones con los valores de la tabla 5 serán erróneos.

Estadísticamente si comparamos el coeficiente de regresión lineal de las tablas 5 y 6 se puede observar que ambos ajustes son buenos al igual que el error de la raíz media cuadrada que también es bueno, pero si habláramos de seguridad alimentaria no estaríamos garantizando un buen tratamiento, ya que por ejemplo para la temperatura de 52,5°C su valor de p es 0,67, pero cuando se fija es 1,02, esta diferencia conllevaría a aplicar un tratamiento insuficiente lo cual resultaría en un riesgo muy alto para asegurar la estabilidad y seguridad microbiológica del producto.

Si analizamos los valores de las curvas de supervivencia de *Salmonella entérica* a pH 4,5 (tabla 5), observamos que a una temperatura de tratamiento de 52,5 se obtiene un $p < 1$ lo cual indica que la población microbiana se inactiva inicialmente de forma lineal, pero algunas células bacterianas incrementan su resistencia al tratamiento, quedando una población remanente que aunque el tratamiento se prolongue no se eliminarán o en otras palabras se adaptan y persistirán de forma infinita. Para las temperaturas de 55°C y 57,5°C el valor de p indica que todas las células tienen la misma probabilidad de inactivarse. Al comparar los valores δ se observa que a mayor temperatura menos tiempo para inactivar la población en un ciclo logarítmico.

Si comparamos ambos tratamientos debido a la disparidad de los valores p se debe elegir aquel que evite el incremento de termorresistencia, es decir, aquel que tenga valores de p cercanos a 1 y el valor de δ más bajo.

Al choque ácido también se le aplicó la determinación de daño subletal con la adición del 1% de NaCl al medio de recuperación, pero no se observó crecimiento del microorganismo. Por lo que se decidió repetir el experimento pero con porcentajes inferiores a 1: 0,2-0,3-0,4-0,5%, pero tampoco se pudo observar crecimiento de *Salmonella entérica*, por lo que como a un intervalo no significativo inferior a 0,2 no había apariencia de crecimiento de este, se pudo determinar que la membrana había quedado muy sensible debido al efecto del choque ácido, que la había debilitado mucho y no pudo recuperarse (no existen datos).

Si tuviéramos que elegir un tratamiento en mi opinión elegiría un tratamiento con un choque ácido previo y un pH de 4,5 en el medio de calentamiento a 57,5°C, ya que este tiene un valor de p de 1,01 es decir, una cinética de primer orden y no encontraremos fenómenos de cola al final de tratamiento que no le interesan a la industria agroalimentaria.

La presencia de colas en curvas de inactivación se puede asumir como una situación en la que el microorganismo se ha adaptado a las condiciones estresantes y su población no disminuye, es decir, se mantiene constante. Por lo tanto, resulta ser una circunstancia desagradable en el ámbito de la industria agroalimentaria. Por otro lado, la presencia del fenómeno denominado hombro hace referencia a una población que, nada más encontrarse en una situación estresante (en este caso, calor o acidez) intenta resistir hasta un punto en el que la mayoría de sus células, finalmente, mueren.

Los mecanismos implicados en la respuesta microbiana a un estrés ácido son, en parte, desconocidos, a pesar de las numerosas investigaciones al respecto (Foster, J.W., 2000). Sin embargo, es conocido que los microorganismos perfeccionan distintos mecanismos que les ayudan a adaptarse a condiciones ácidas. Tales mecanismos serían, por un lado, la homeostasis del pH intracelular, así como la síntesis de proteínas del choque ácido (Acid Shock Proteins – APSPs) (Lim ,B.y col., 2013).

Tabla 5 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia para un choque ácido con valor de p fijos.

	pH 4,5				pH 7			
	52,5	55	57,5	60	52,5	55	57,5	60
Temperatura (°C)								
δ (min)	9,09±2,20	0,94±0,20	0,37±0,06	*	13,54±1,16	3,24±0,48	0,36±0,05	*
LOG10(N0) (UFC/ml)	5,53±0,28	5,39±0,19	5,93±0,14	*	5,83±0,09	5,23±0,18	5,97±0,14	*
p		1,02		*		1,33		*
z (°C)		3,59		*		3,17		*
RMSE	0,4903	0,3458	0,2654	*	0,2438	0,3355	0,2686	*
R²	0,9078	0,9110	0,9654	*	0,9456	0,9578	0,9422	*

*No funcionaba el programa con los datos a temperaturas de 60°C

Tabla 6 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia para un choque ácido con valor de p individuales.

	pH 4,5				pH 7			
	52,5	55	57,5	60	52,5	55	57,5	60
Temperatura (°C)								
δ (min)	4,20±1,54	0,88±0,20	0,37±0,06	0,11±0,01	18,91±0,60	1,99±0,26	0,34±0,05	0,09±0,02
LOG10(N0) (UFC/ml)	5,91±0,23	5,43±0,19	5,93±0,14	5,37±0,09	5,50±0,05	5,61±0,12	6,07±0,14	5,79±0,19
p	0,67±0,11	0,97±0,16	1,01±0,10	1,42±0,13	2,15±0,12	0,95±0,07	1,24±0,18	0,97±0,19
z (°C)		4,90				3,23		
RMSE	0,3987	0,3450	0,2654	0,1670	0,1774	0,2207	0,2664	0,3326
R²	0,9391	0,9114	0,9654	0,9768	0,9722	0,9817	0,9431	0,8880

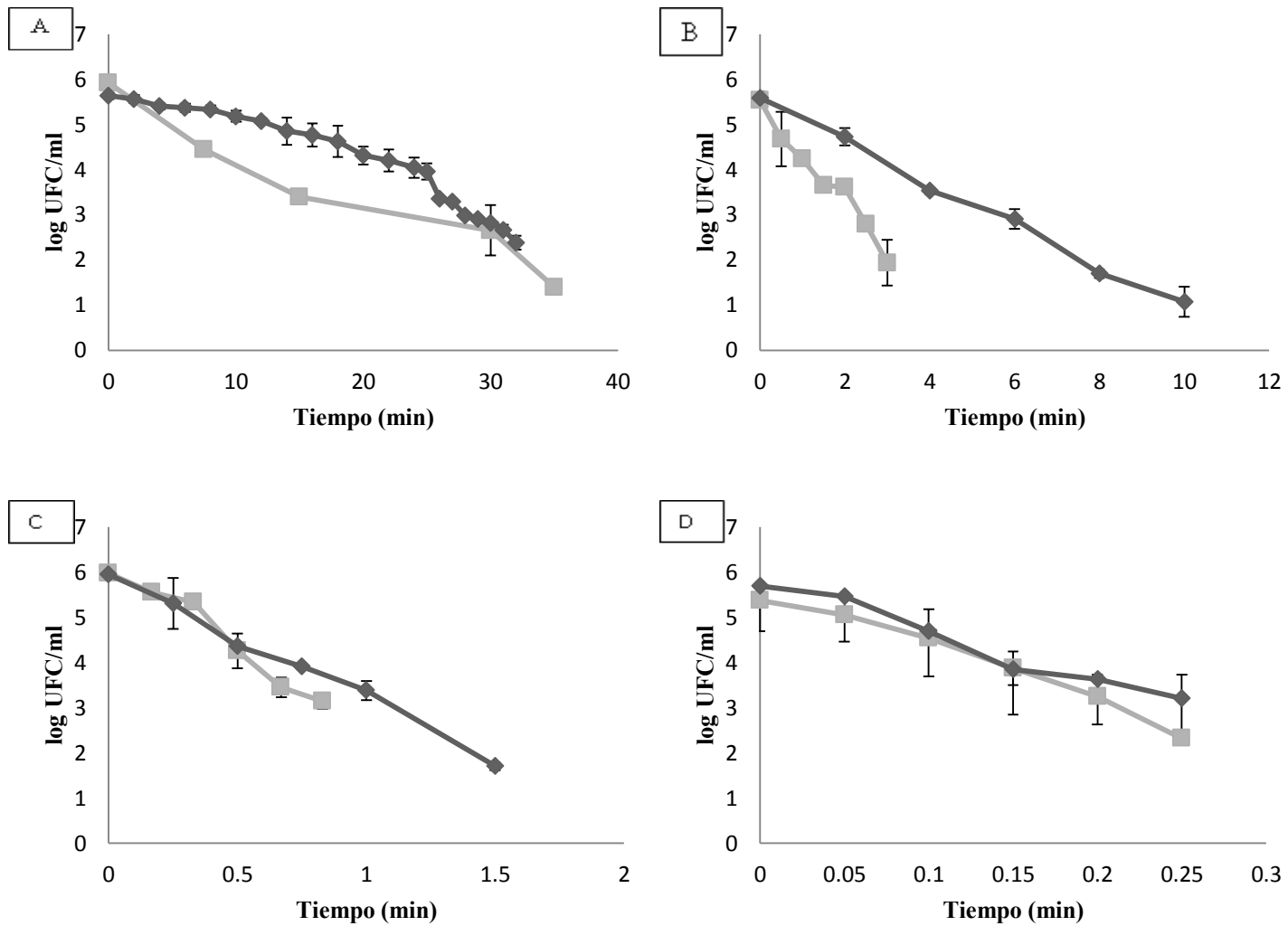


Figura 3 Curvas de termodestrucción de Salmonella enterica con choque ácido. A: 52, 5°C, B: 55°C, C: 57,5°C, D: 60°C (Gris oscuro pH 7, gris claro pH 4,5).

De acuerdo a la revisión bibliográfica, se observa que el comportamiento de *Salmonella entérica* ante un tratamiento térmico varía, encontrándose comportamientos mayoritariamente no lineales y algún lineal. Asimismo, en aquellas curvas de supervivencia no lineales se han utilizado diferentes modelos. Por lo tanto, resulta difícil comparar o determinar la termorresistencia de este patógeno alimentario debido a los diferentes comportamiento y modelos utilizados para determinar la termorresistencia de este microorganismo, asumiéndose que esto puede deberse, en su gran mayoría, a la variabilidad de las condiciones de experimentación.

En este estudio se decidió utilizar el modelo de Weibull porque, con los parámetros que se obtienen, permite describir curvas de supervivencia no lineales, incluyendo la presencia de hombros y colas (fenómenos que aparecen en la mayoría de las curvas que se han obtenido) de una forma más fácil.

Mafart, P., y col., (2002) verifican con éxito revisar el modelo de weibull para esporas de *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium botulinum* y células de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella thyphimurium*. Fernández et al., (1999) habían aplicado con éxito el mismo modelo para la destrucción de calor de *B. cereus*. Este modelo presenta la ventaja principal de ser muy simple y ser lo suficientemente robusto para describir tanto las curvas de supervivencia hacia abajo cóncavo ($p > 1$) y hacia arriba cóncava de las curvas ($p < 1$). El modelo incluye el caso tradicional donde la curva de supervivencia, de primer, es lineal ($p = 1$).

5. Conclusiones

- Los resultados obtenidos a partir del daño subletal, apuntan que aparentemente la membrana externa de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* CECT 4300 no se ve afectada por los tratatamiento a pH 4,5 ni a pH 7 de los medios de calentamiento, pero si que es afectada cuando se aplica un choque ácido previo.
- Un choque ácido previo a pH 4,5 disminuye la termorresistencia de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* CECT 4300 a la temperatura de 57,5°C en un medio de calentamiento a pH 4,5.
- Un choque ácido a pH 4,5 aumenta la termorresistencia de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* CECT 4300 en un medio de calentamiento a pH 7 a temperaturas bajas (52,5°C).
- Un medio de calentamiento a pH 7 y pH 4,5 no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos.
- El fenómeno de cola está presente en todas las curvas de supervivencia de *Salmonella enterica* subsp.*enterica* CECT 4300 en medio de calentamiento a pH 7 y pH 4,5.
- El modelo de Weibull resultó acertado para modelizar los resultados obtenidos y poder comparar las curvas de supervivencia de *Salmonellaenterica* subsp.*enterica* CECT 4300, con los fenómenos de hombro y cola que han sido obtenidos.

6. Bibliografía

Abee, T. y Wouters, J. A. Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*. 1999. 50: 65 – 91.

Acevedo, B., Montiel, M., Avanza, J. Efecto del tratamiento térmico en la capacidad antioxidante total de jugos de pomelo, naranja y mandarina. [En línea] <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2002/08-Exactas/E-013.pdf>. 1:1-3 (2002). Acceso: agosto (2014).

Alakomi, H. L., y Saarela, M. (2009). Salmonella importance and current status of detection and surveillance methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1,142-152.

Alimentos, C. Y. M. H. D. L. (2014). Unidad 2 Enfermedades de Transmisión Alimentaria, 31–48.

Álvarez-Ordóñez, A., Fernandez, A., Bernardo, A., y Lopez, M. (2009). Comparison of acids on the induction of an acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*, consequences for food safety. *Meat Science*, 81(1), 65–70.

Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Bernardo, A., Hill, C., y López, M. (2011). The acid tolerance response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International*, 45(2), 482–492.

Bearso, S., Bearson, B., Foster, J.W., 1997. Acid stress in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 173–180.

Beuchat, L. R., y Scouten, A. J. (2002). Combined effect of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *The Journal of Applied Microbiology*, 92, 382e395.

Calderón-miranda, M. L., Fernanda, M., Martín, S., Barbosa-cánovas, G. V, y Swanson, B. G. (1998). Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. *Brazilian Journal of Food and Technology*, 1, 3–11. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962005001000013>

Centro de prensa Inocuidad de los alimentos. (2016), 1–7.

Chalker, R. B., y Blaser, M. J. (1988). A review of human salmonellosis: III. Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. *Review of Infectious Diseases*, 10, 111-124.

Cheftel, J. y Cheftel, H. (1980). “Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos”. Vol.I. Editorial Acribia S.A., Zaragoza.

Cristina, R., Burin, K., Jr, A. S., & Nero, L. A. (2014). Influence of lactic acid and acetic acid on *Salmonella* spp. growth and expression of acid tolerance-related genes. *FRIN*, 64, 726–732. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.019>

Condon, S. (2010). Pulsed electric fields cause sublethal injuries in the outer membrane of *Enterobacter sakazakii* facilitating the antimicrobial activity of citral, 525–531. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02931.x>

Couvert, O., Gaillarda, S., Savyb, N., Mafart, P., Leguerinel, I., 2005. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *International Journal of Food Microbiology*. 101, 73e81

Coburn, B., Grassl, G. A., y Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85, 112-118.

Cruz, R. M. S., Vieira, M. C., Silva, C. L. M. Effect of heat and thermosonication treatments on watercress (*Nasturtium officinale*) vitamin C degradation kinetics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9:483-488 (2008).

Cummings, K. J., Warnick, L. D., Elton, M., Gröohn, Y. T., Patrick, L. M., & Siler, J. D. (2010). The effect of clinical outbreaks of *Salmonellosis* on the prevalence of fecal *Salmonella* shedding among dairy cattle in New York. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 815-823.

Esteban, M., Huertas, J., Fernández, P. S., y Palop, A. (2013). Effect of the medium characteristics and the heating and cooling rates on the nonisothermal heat resistance of *Bacillus sporothermodurans*. *Food Microbiology*, 34(1), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.020>

FAO. (2011). Una introducción a los conceptos básicos de la seguridad alimentaria. *La Seguridad Alimentaria: Información Para La Toma de Decisiones*, 1–4.

Feldsine, P. T., Lienau, A. H., Leung, S. C., Mui, L. A., Humbert, F., Bohnert, M., y col. (2003). Detection of Salmonella in fresh cheese, poultry products, and dried egg products by the ISO 6579 Salmonella culture procedure and the AOAC official method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 86,275-295.

Fernandez, A., Salmeron, C., Fernandez, P.S., Martinez, A., 1999. Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 158–162.

Fernández, A., López, M., Bernardo, A., Condón, S., Raso, J. 2006. Modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *Food Microbiology* 24, 372–379.

Fierer, J., y Guiney, D. G. (2001). Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection. *Journal of Clinical Investigation*, 107, 775-780

Foster, J. W. 2000. Microbial responses to acid stress. In: Storz, G. & Hengge – Aronis, R. (Eds.). *Bacterial Stress Responses*. ASM Press. Washington DC. 99 – 115.

Foster, J.W. (2001). Acid stress responses of Salmonella and E. coli: Survival mechanisms, regulation, and implications for pathogenesis. *The Journal of Microbiology*, 39(2),89–94.

Frenzen, P., Riggs, T., Buzby, J., Breuer, T., Roberts, T., Voetsch, D., y col., ,FoodNet Working Group. (1999). Salmonella cost estimate update using FoodNet data. *Food Review*, 22,10-15.

Garlant Miller, L., Kaspar, C.W., 1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *J. Food Prot.* 57,460-464.

Garza-Velasco, R., Silva-Monzuazo, T., Hernández-Gómez, L. La listeriosis humana y el ciclo infeccioso asociado a su agente etiológico. Online <<http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Listeria.pdf>> visto 10/08/2007.

Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case - 2007 - 959 páginas

Gilbert, P. 1984. The revival of microorganisms sublethally injured by chemical inhibitors, p. 175–197. In M. H. E. Andrew and A. D. Russell (ed.), *The revival of injured microbes*. Academic Press, London.

González Flores, T., & Rojas Herrera, R. A. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: Prevención y diagnóstico. *Salud Publica de Mexico*, 47(5), 388–390. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342005000500010>

Gould, G.W., 1998. New approaches to the microbial stability and safety of foods. European research towards safer and better food. In: Gaukel, V., Spiess, W.E.L. (Eds.), *Proceedings (part 1) 3rd Karlsruhe Nutrition Symposium (18–20 October 1998)*, pp. 12–20.

Guiney, D. G., Fang, F. C., Krause, M., Libby, S., Buchmeier, N. A., y Fierer, J. (1995). Biology and clinical significance of virulence plasmids in *Salmonella* serovars. *Clinical Infectious Diseases*, 21, 146–151

Haldenwang, W.G., 1995. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 59, 1–30.

Helmuth, R., y col. (2007). Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 306–319.

Hengge-Aronis, R., (1996a). Regulation of gene expression during entry into stationary phase. In: Neidhardt, F.C. et al. (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella*, ASM Press, Washington, pp. 1497–1512.

Hengge-Aronis, R., (1996b). Back to log phase: σ^s as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21, 887–893.

Hengge-Aronis, R. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (σ^s) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 373–395.

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*. 12: 273 – 283

Huertas, J. P., Ros, M., Esteban, M., Palop, A., y Hill, C. (2014). Determination of genes involved in heat resistance response of *Cronobacter sakazakii*, (1), 22–25.

Huisman, G.W., Kolter, R., (1994). Sensing starvation: a homoserine lactone-dependent signalling pathway in *Escherichia coli*. *Science* 265, 537–539.

Hurst, A. 1977. Bacterial injury: a review. *Can. J. Microbiol.* 23: 935–944.

Hurst, A. 1984. Revival of vegetative bacteria after sublethal heat- ing, p. 77–103. In M. H. E. Andrew and A. D. Russell (ed.), *The revival of injured microbes*. Academic Press, London.

Institute of Food Technologists. (2002). Expert report on emerging microbiological food safety issues. Implications for control in the 21st century. Institute of Food Technologists, International Food Safety and Quality Conference and Exposition, Atlanta, 20 Febru- ary(2002).

International Journal of Food Microbiology, 44(3), 149–169.

International Journal of Food Microbiology, 49, 1e8.

Jung, Y. S., yBeuchat, L. R. (1999). Survival of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in egg powders as affected by water activity and temperature.

Kennelly, P.J., Potts, M., (1996). Fancy meeting you here! afreshlook at prokaryotic protein phosphorylation. *J. Bacteriol.* 178, 4759–4764.

Kleerebezem, M., Quadri, L.E.N., Kuipers, O.P., De Vos, W.M., (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24, 895–904.

Lange, R., Fischer, D., yHengge-Aronis, R. (1995). Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177(16), 4676–4680.

Lee, K. M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., y Hsieh, J. (2015). Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264–276.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>

Lim, B., Miyazaki, R., Neher, S., Siegele, D. A., Ito, K., Walter, P., Akiyama, Y., Yura, T. y Gross, C. A. 2013. Heat Shock Transcription Factor σ^{32} Co-opts the Signal Recognition Particle to Regulate Protein Homeostasis in *E. coli*. *Biology*.

Löfström, C., Hansen, F., yHoorfar, J. (2010). Validation of a 20-h real-time PCR method for screening of Salmonella in poultry faecal samples. *Veterinary Microbiology*, 144,511-514.

Lues, J. F., y Theron, M. M. (2011). Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne *Listeria monocytogenes* strains in vitro.

Foodborne Pathogens and Disease, 9(12), 1126–1129.

Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard, and I. Leguerinel. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 107– 113.

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., y col. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607-625

Mendoza, C., Hernández, E. J., y Ruiz, L. E. (2015). Efecto del Escaldado sobre el Color y Cinética de Degradación Térmica de la Vitamina C de la Pulpa de Mango de Hilacha (*Mangifera indica* var magdalena river). *Información Tecnológica*, 26(3), 09–16. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000300003>

Microbiology, A. (2009). Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia, (October 2016). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04236.x>

Mossel, D. A. A., y P. van Netten. (1984). Harmful effects of selective media on stressed micro-organisms: nature and remedies, p. 329–369. In M. H. E. Andrew and A. D. Russell (ed.), *The revival of injured microbes*. Academic Press, London.

Murno, Hernán, Revista: Revisiones de la ciencia, tecnología e ingeniería de los alimentos, (2006).

Nordic Validation Organ (NordVal). (2009). Protocol for the validation of alternative microbiological methods. Accessed June 2012 <http://www.nmkl.org/dokumenter/nordval/NordValProtocol.pdf>

OMS y FAO. (2003). Calidad De Los Alimentos : *Garantía de La Inocuidad Y Calidad de Los Alimentos: Directrices Para El Fortalecimiento de Los Sistemas Nacionales de Control de Los Alimentos*, 1–94.

Paesold, G., y Krause, M. (1999). Analysis of rpoS mRNA in Salmonella Dublin: Identification of multiple transcripts with growth-phase-dependent variation in transcript stability. *Journal of Bacteriology*, 181(4), 1264–1268.

Palou, E., y Barbosa-ca, G. V. (1999). Polyphenoloxidase activity and color changes during storage of high hydrostatic pressure treated avocado puree, *31*(8).

Palop, A. 2007. Cuaderno de prácticas ingeniería de la esterilización, asepsia e higiene. Ed. Alfredo Palop. Universidad politécnica de Cartagena-etsia Cartagena. Cartagena, España.

Ramos, A., García, L., Pinedo, M. y Souza, R. Evaluación de factores de procesamiento y conservación de pulpa de MyrciariaDubia H.B.K. (Camu-Camu) que reducen el contenido de vitamina C (Ácido Ascórbico). *Revista Amazónica de investigación*, 2(2):89-99 (2002).

Rees, C.E.D., Dodd, C.E.R., Gibson, P.T., Booth, I.R., Stewart, G.S.A.B., (1995). The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 263–275.

Rodríguez-Lázaro, D., Lombardc, B., Smith, H., Rzezutka, A., D'Agostino, M.

Rosas, R. (2007). Contaminaciones alimentarias. *Offarm*, 26(6), 95–100.

Rowe, M. T., and R. B. Kirk. (2000). Effect of nutrient starvation on the resistance of Escherichia coli O157:H7 to subsequent heat stress. *J. Food Prot.* 63:1745–1748.

- Ruiz, P., Ocio, M.J., Cardona, F., Fernández, A., Rodrigo, M., Martínez, A. (2002). Nature of the inactivation Curves of *Bacillus pumilus* spores heated using non isothermal and isothermal treatments. *Journal of food science*, Vol.s7, Nr.2.
- Salmond, G.P.C., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., (1995). The bacterial ‘enigma’: cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.* 16, 615–624.
- Santos, P. H. S., Silva, M. A. Retention of vitamin C in drying processes of fruits and vegetables. *Drying Technology*, 26:1421-1437 (2008).
- Sleator, R.D., Gahan, G.M., Abee, T., Hill, C., (1999). Identification and disruption of betL, a secondary glycine betaine transport system important in the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2078–2083
- Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E., Slonczewski, J.L., (1994). Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J. Bacteriol.* 176,1729–1737.
- Smulders, F. J., y Greer, G. G. (1998). Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: Prospects and controversies.
- Stumbo, C.R. (1973). “Thermobacteriology in food processing” 2ª edición. Ed. Academic press. New York and London, p. 130-133.
- Turner, C. W. (2010). Microbiology of ready-to-eat poultry products. In I. Guerrero-Legarreta, y Y. H. Hui (Eds.), *Handbook of poultry science and technology*, volume 2: Secondary processing (pp. 507-515). Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- VanBoekel, M.A.J.S., (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 139–159
- Wesche, A. M., Gurtler, J. B., Marks, B. P., & Ryser, E. T. (2009). Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 72(5), 1121–1138.
- World Health Organization (WHO). (2005). Drug-resistant Salmonella Accessed March 2013 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>

Yousef, A. E., and P. D. Courtney. (2003). Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods, p. 1–30. In A. E. Yousef and V. J. Juneja (ed.), Microbial stress adaptation and food safety. CRC Press, Boca Raton, FL.

Zhao, T., Doyle, M.P., Besser, R.E., (1993). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2526–2530.

Zhao, T., and M. P. Doyle. (2001). Evaluation of universal preen- richment broth for growth of heat-injured pathogens. J. Food Prot. 64:1751–1755.

Páginas web consultadas

http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/agencia/seccion/sobre_aecosan.htm
Última visita 13/11/2016

<http://www.avantium.es/index.php/seguridad-alimentaria-iso-22000-ifs-brc-appcc>
Última visita 13/11/2016

http://datateca.unad.edu.co/contenidos/301219/exe_calor/calor_3_2010/leccin_20_microndas.html Última visita 19/11/2016

<http://www.fao.org/about/es/> Última visita 13/11/2016

<http://www.fda.gov/AboutFDA/WhatWeDo/default.htm> Última visita 13/11/2016

https://www.ecured.cu/Cocci%C3%B3n_de_alimentos Última visita 19/11/2016

<http://www.efsa.europa.eu/en/about/howwework> Última visita 13/11/2016

<http://es.slideshare.net/netoabello/escaldado-de-frutas-y-hortalizas-y-encarado-2-15340580> Última visita 19/11/2016.

<http://www.hrs-heatexchangers.com/es/recursos/tratamiento-termico-en-la-industria-alimentaria.aspx> Última visita 29/10/2016

<http://www.inoxpa.es/productos/producto/pasteurizador-htst> Última visita 31/10/2016

<http://salmonelosis.net/causas/> Última visita 17/10/2016

<https://tematico8.asturias.es/export/sites/default/consumo/seguridadAlimentaria/seguridad-alimentaria-documentos/basico02.pdf> Última visita 31/10/2016

<http://www.tetrapak.com/es/processing/uht-treatment> Última visita 29/10/2016

<http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-5.htm>

<https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/htst-milk-flow-overview> Última visita 31/10/2016

<http://www.who.int/about/es/> Última visita 13/11/2016

http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/ Última visita 31/10/2016

APÉNDICE DE CONTENIDO

Índice de abreviaturas

AECOSAN: Agencia española de Consumo, Seguridad alimentaria y Nutrición

AENOR: Asociación Española de Normalización y Certificación

AVAD: Años de Vida Ajustados por Discapacidad

AW: Actividad de Agua

CDC: Control de enfermedades y protección

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

ETA: Enfermedades de Transmisión Alimentaria

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: U.S. Food and Drugs Administration

HHP: Alta Presión Hidrostática

HTST: High-Temperature-Short-Time

JEMBRA: Evaluación de Riesgos Microbiológicos

M: Molar

NaCl: Cloruro sódico

NMKL: Comité Nórdico de Análisis de Alimentos

OMS: Organización Mundial de la Salud

S.A.: Sociedad Anónima

SHU: Síndrome Hemolítico Urémico

SICURA: La Red Española de Seguridad Alimentaria

TIA: Toxiinfecciones Alimentarias

TSA: Tryptic Soy Agar

TSB: Tryptic Soy Broth

UE: Unión Europea

UPCT: Universidad Politécnica de Cartagena

US: Unit Station

WHO: World Health Organization

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Índice de tablas

Tabla 1 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia para un choque ácido con valor de p fijos.....	56
Tabla 2 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia para un choque ácido con valor de p individuales.....	56
Tabla 3 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia en un medio de calentamiento ácido con valores de p fijos.....	51
Tabla 4 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia en un medio de calentamiento ácido con valores de p sin fijar.....	51
Tabla 5 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia en un medio de calentamiento neutro con valores de p fijos.....	47
Tabla 6 Parámetros del modelo de Weibull para las curvas de supervivencia en un medio de calentamiento neutro con valores de p sin fijar.....	47

Índice de gráficas

Gráfica 1 Gráfica de supervivencia microbiana.	23
Gráfica 2 Valor D.	24
Gráfica 3 Valor Z.	25
Gráfica 4 Formación de hombro $p > 1$	29
Gráfica 5 Formación de cola $p < 1$	29
Gráfica 6 Cinética de primer orden $p = 1$	30
Gráfica 7 Curva de crecimiento a pH mínimo	39

Índice de imágenes

Imagen 1 Dimensiones primordiales de la seguridad alimentaria. FAO, 2011.....	12
Imagen 2 Parámetros de pasteurización y esterilización.....	20
Imagen 3 Centrífuga.....	41
Imagen 4 Vórtex.	41
Imagen 5 Medios TSB a distintos porcentajes de sal.	42
Imagen 6 Termorresistómetro Mastia.	43

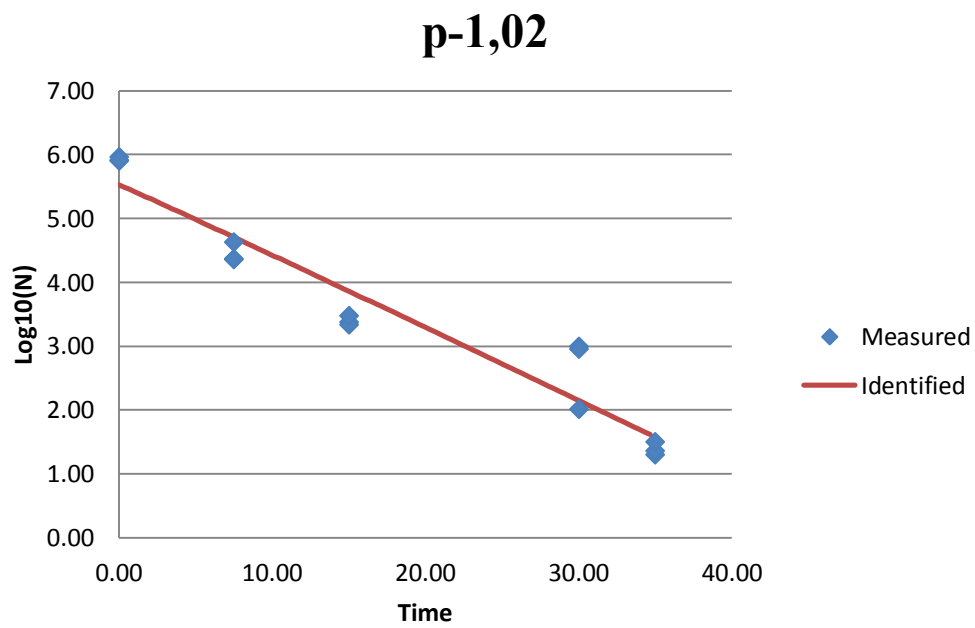
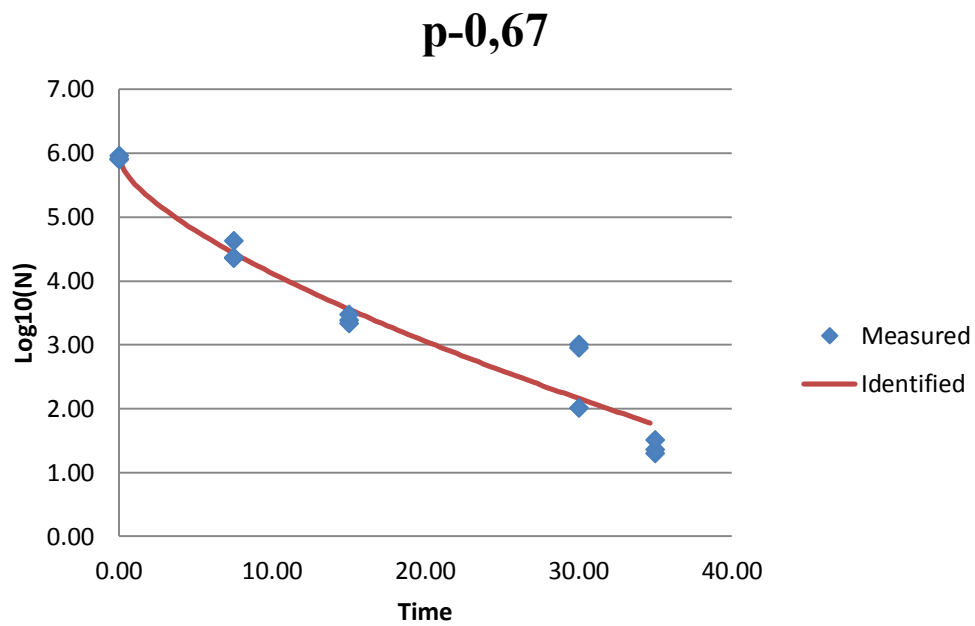
Índice de figuras

Figura 1 Curvas de termodestrucción de <i>Salmonella enterica</i> en medio de calentamiento neutro con y sin sal. A: 52,5°C, B: 55°C, C: 57,5°C, D: 60°C (Gris oscuro sin sal, gris claro con sal).	48
Figura 2 Curvas de termodestrucción de <i>Salmonella enterica</i> en medio de calentamiento ácido con y sin sal. A: 52,5°C, B: 55°C, C: 57,5°C, D: 60°C (Gris oscuro sin sal, gris claro con sal).	52
Figura 3 Curvas de termodestrucción de <i>Salmonella enterica</i> con choque ácido. A: 52,5°C, B: 55°C, C: 57,5°C, D: 60°C (Gris oscuro pH 7, gris claro pH 4,5).	57

ANEXO I GRÁFICAS MODELIZADAS CON WEIBUL CHOQUE ÁCIDO

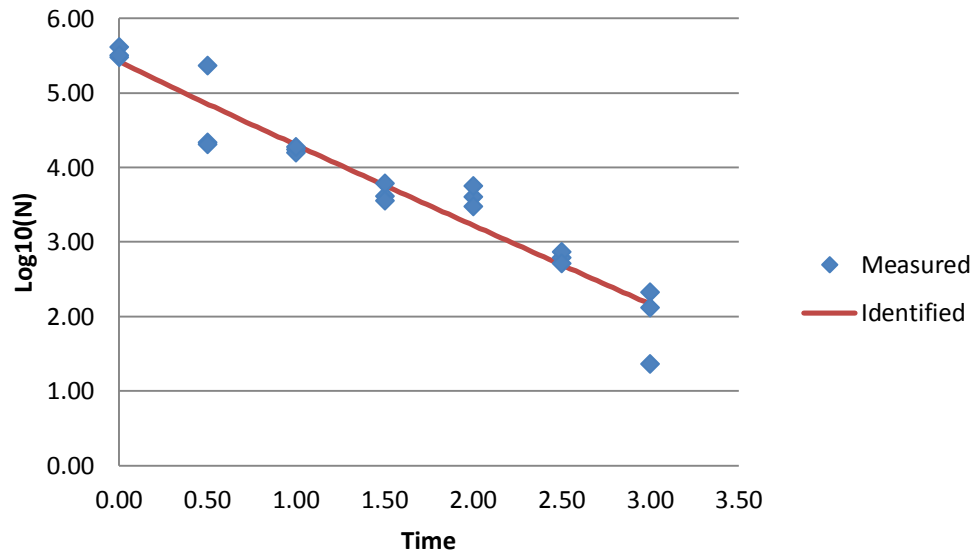
Tratamiento en medio de calentamiento pH 4,5

Temperatura 52,5°C

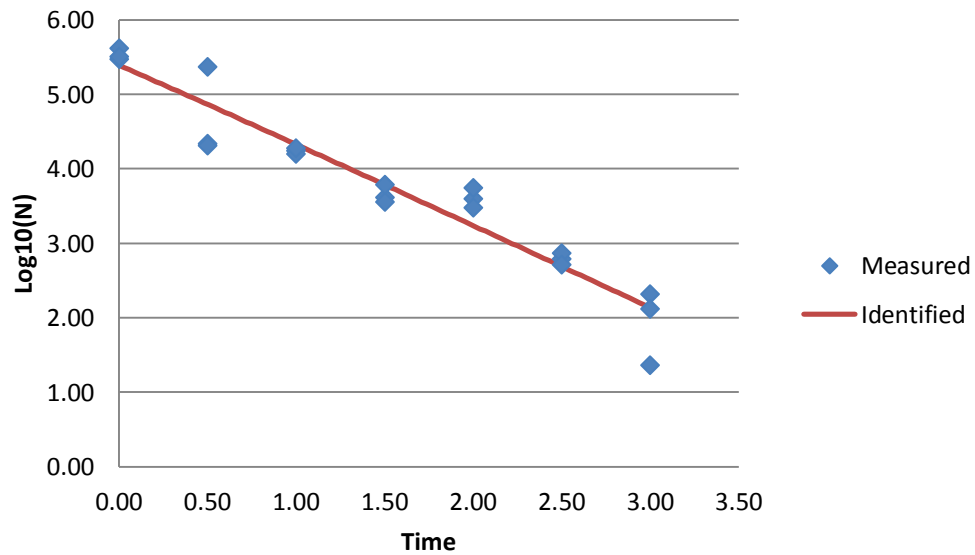


Temperatura 55°C

p-0,97

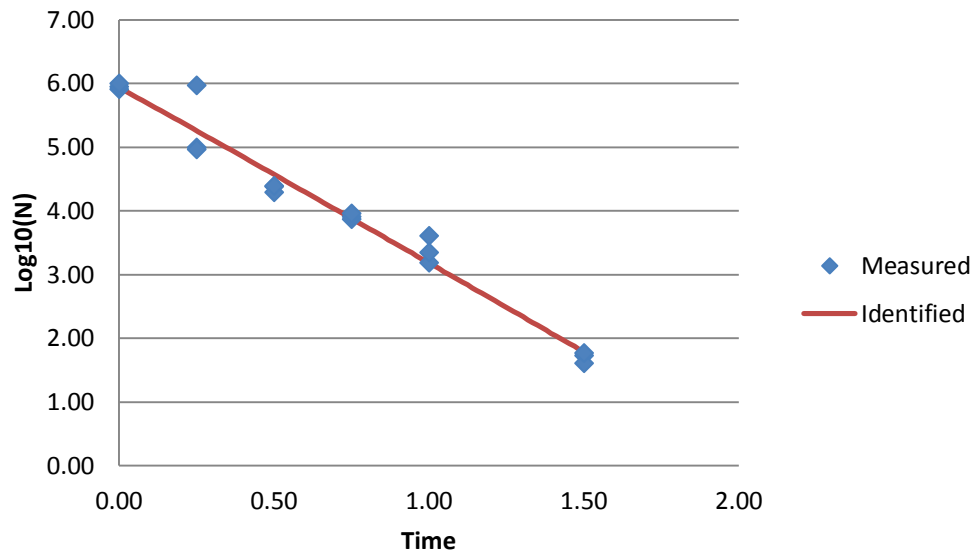


p-1,02

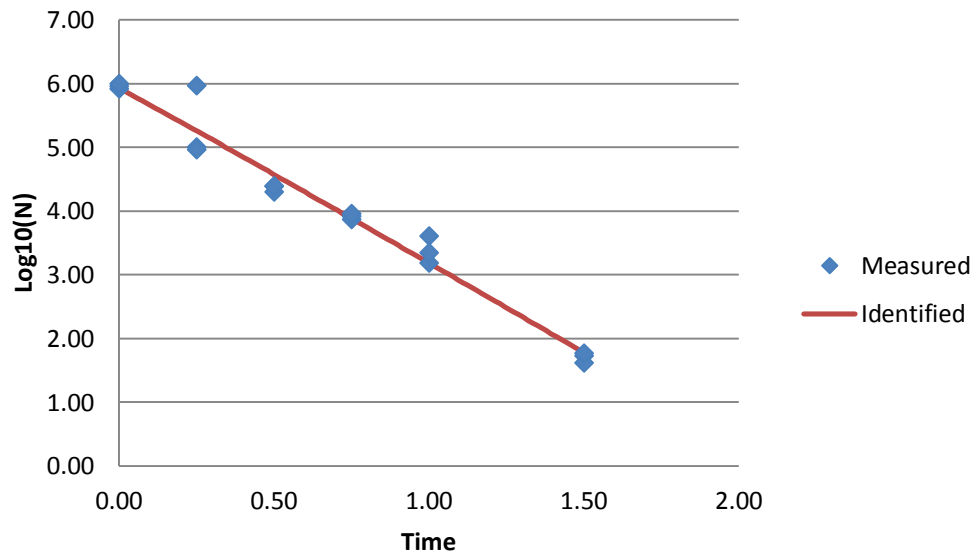


Temperatura 57,5°C

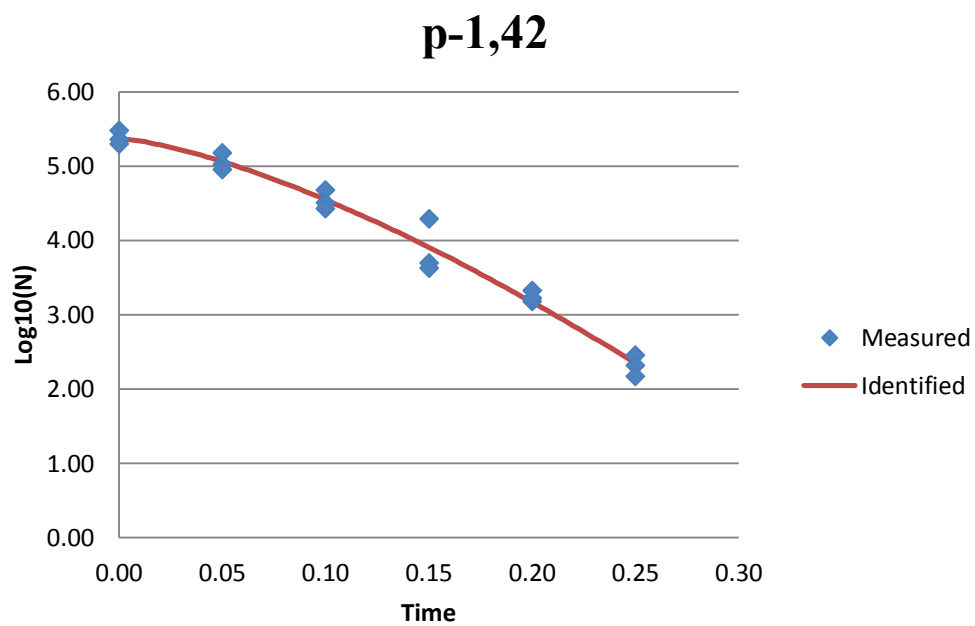
p-1,01



p-1,02



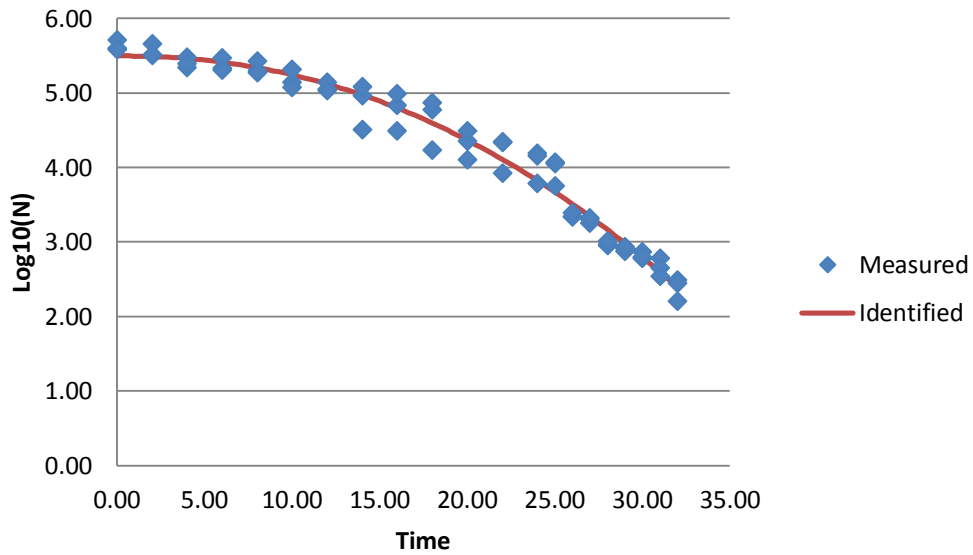
Temperatura 60°C



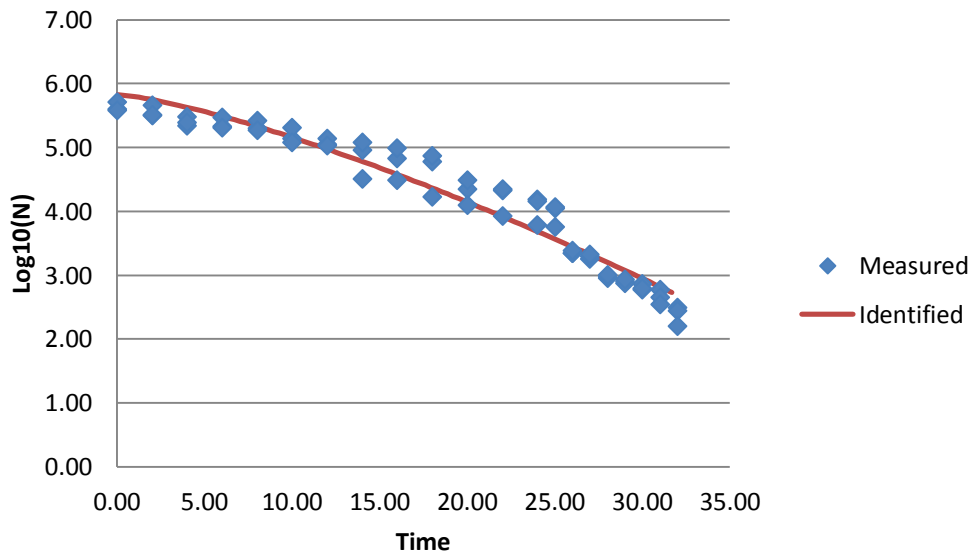
Tratamiento en medio de calentamiento pH neutro

Temperatura 52,5°C

p-2,15

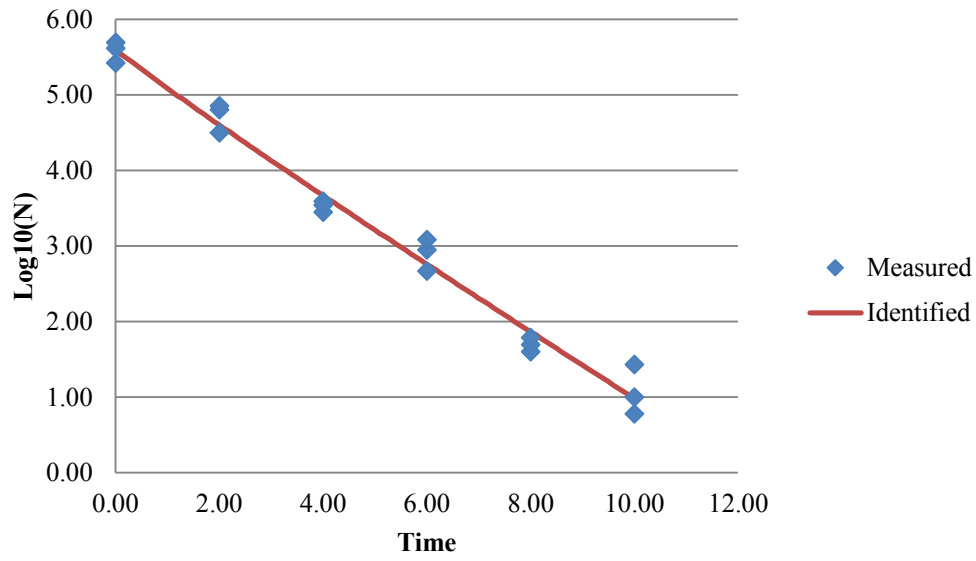


p-1,33

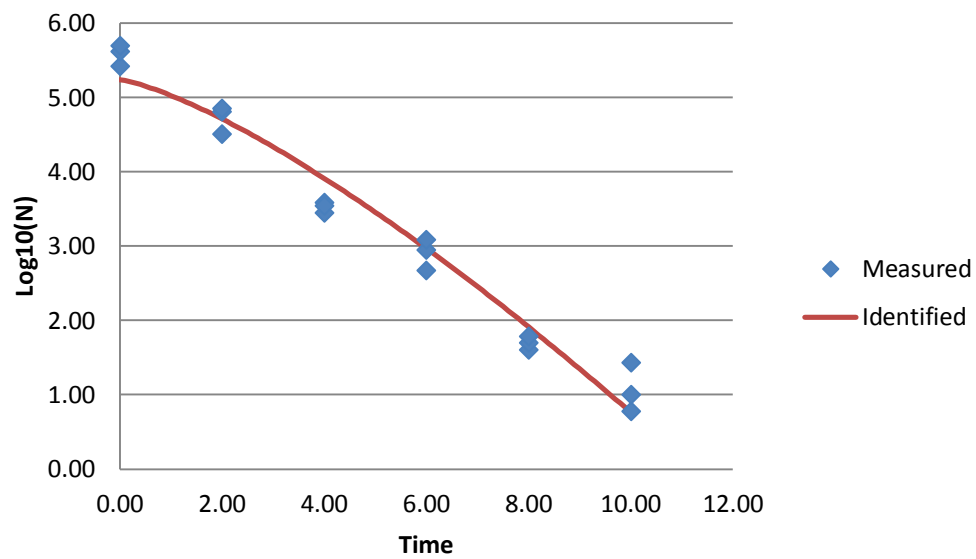


Temperatura 55°C

p-0,95

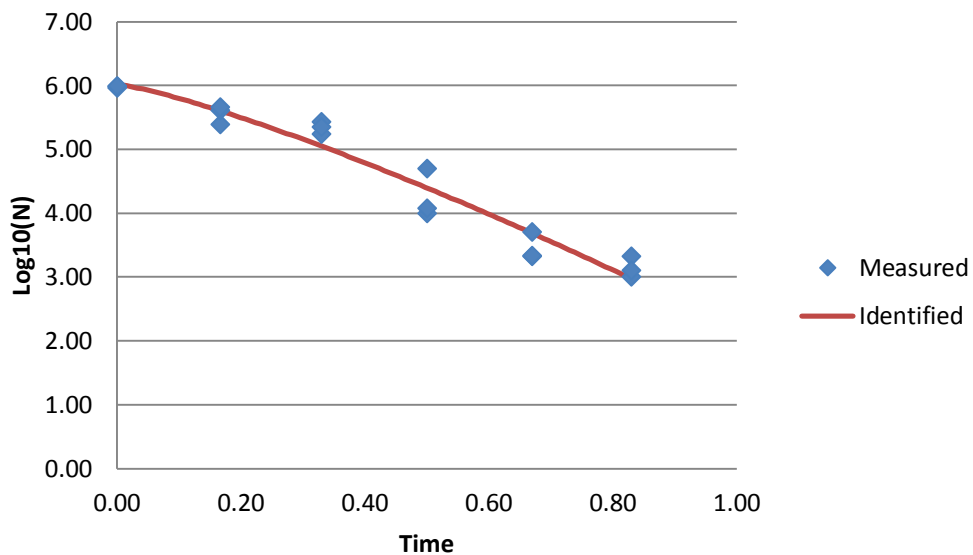


p-1,33

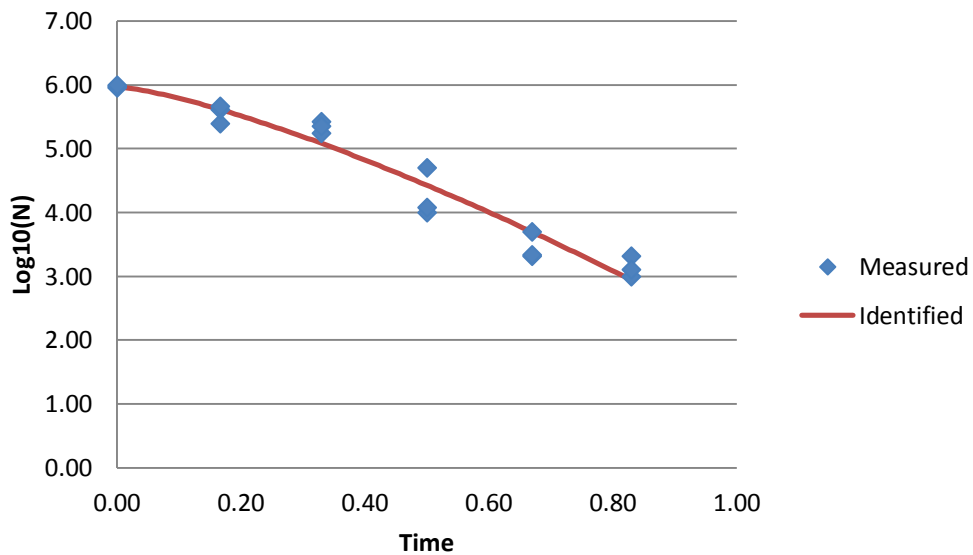


Temperatura 57,5°C

p-1,24

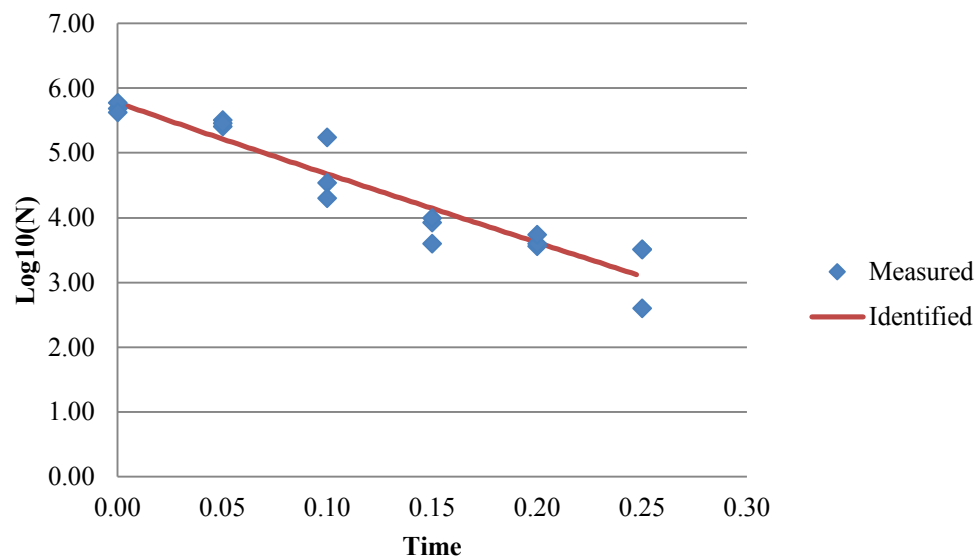


p-1,33



Temperatura 60°C

p-0,97

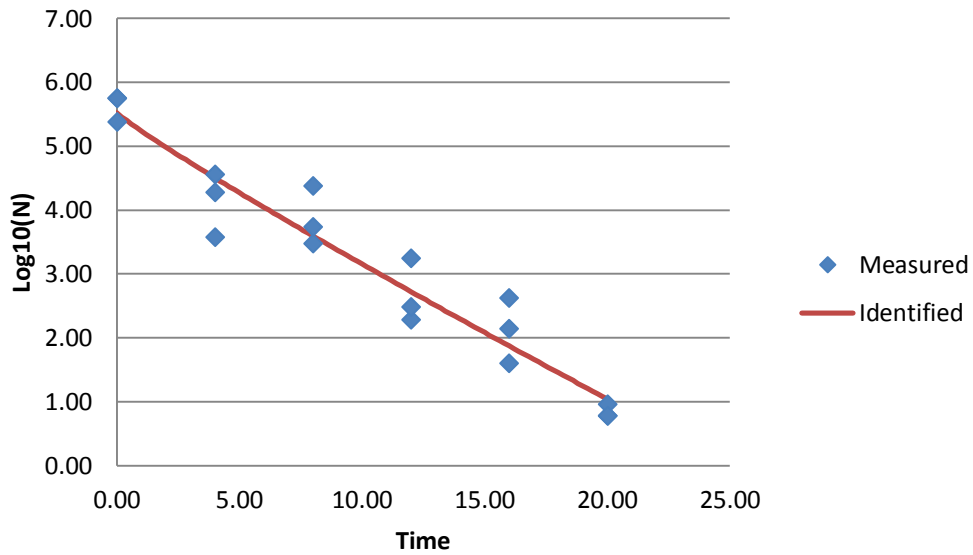


**ANEXO II GRÁFICAS
MODELIZADAS CON WEIBULL
MEDIO DE CALENTAMIENTO pH
4,5**

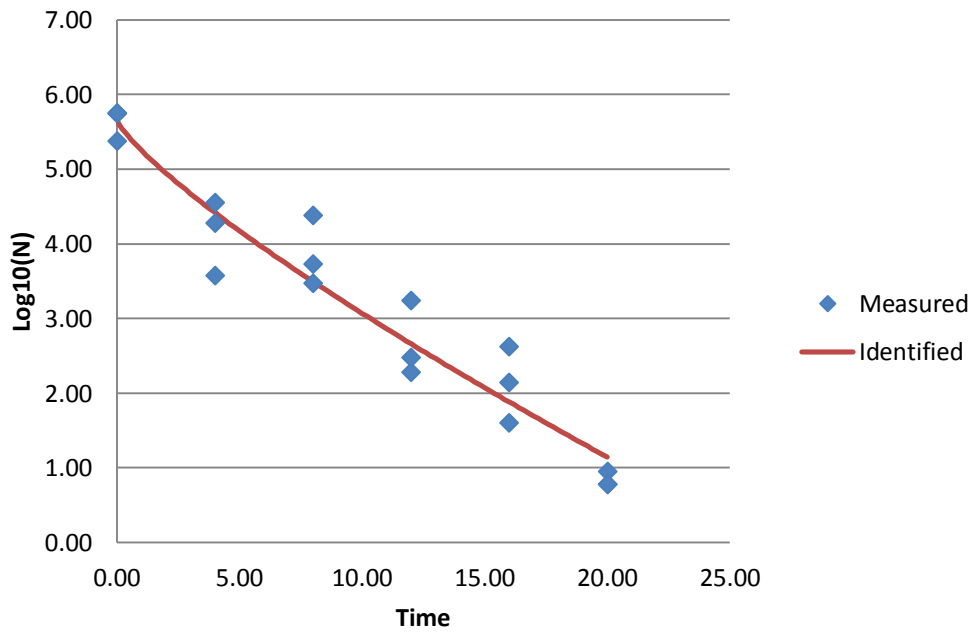
Tratamiento en medio de cultivo con 1%NaCl

Temperatura 52,5°C

p-0,92

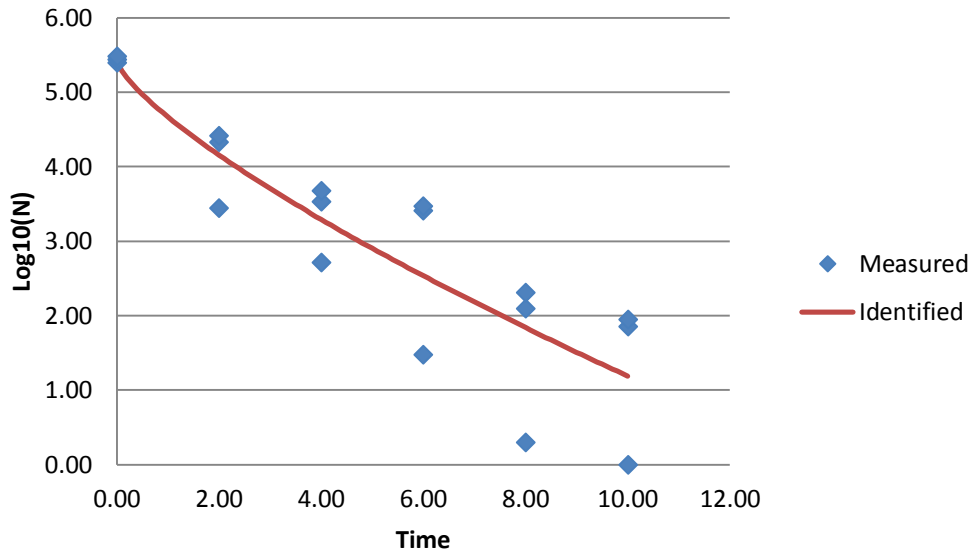


p-0,8

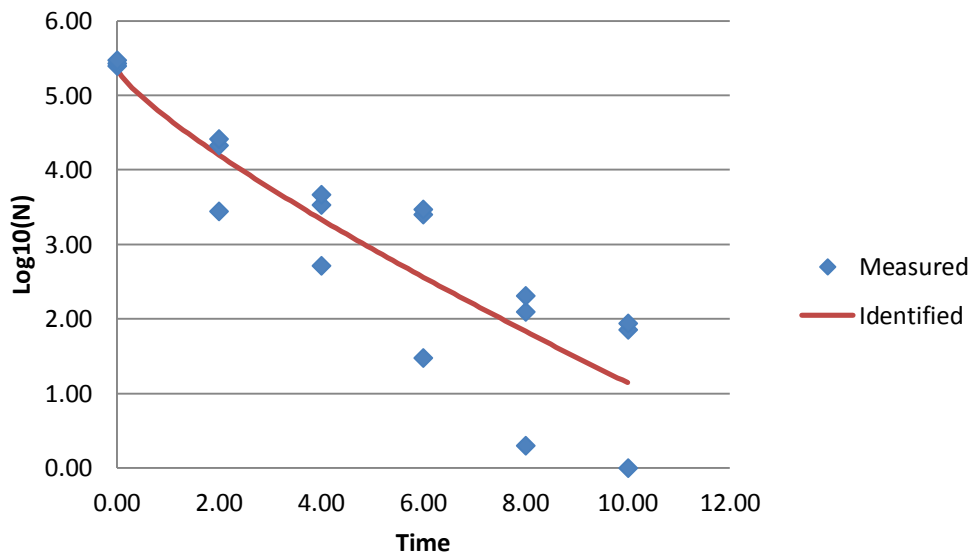


Temperatura 55°C

p-0,75

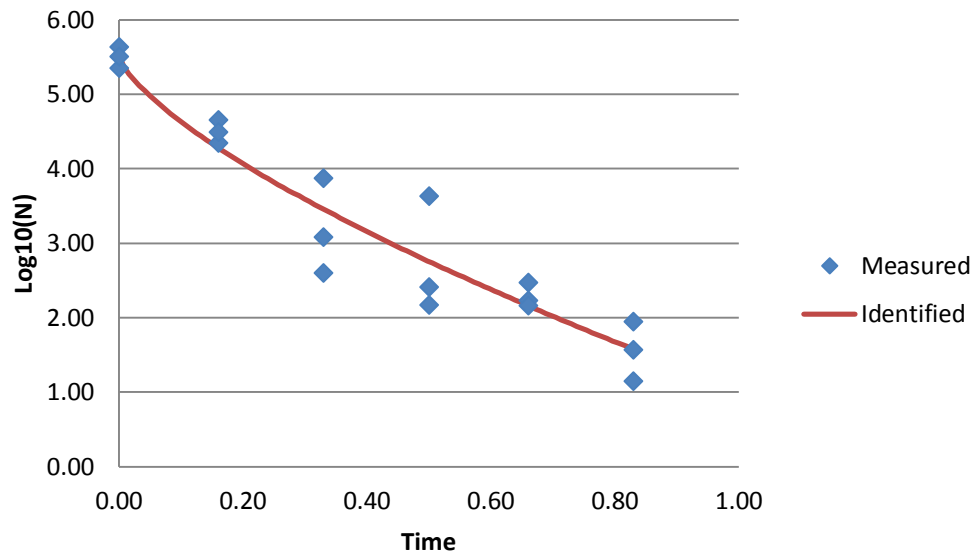


p-0,8

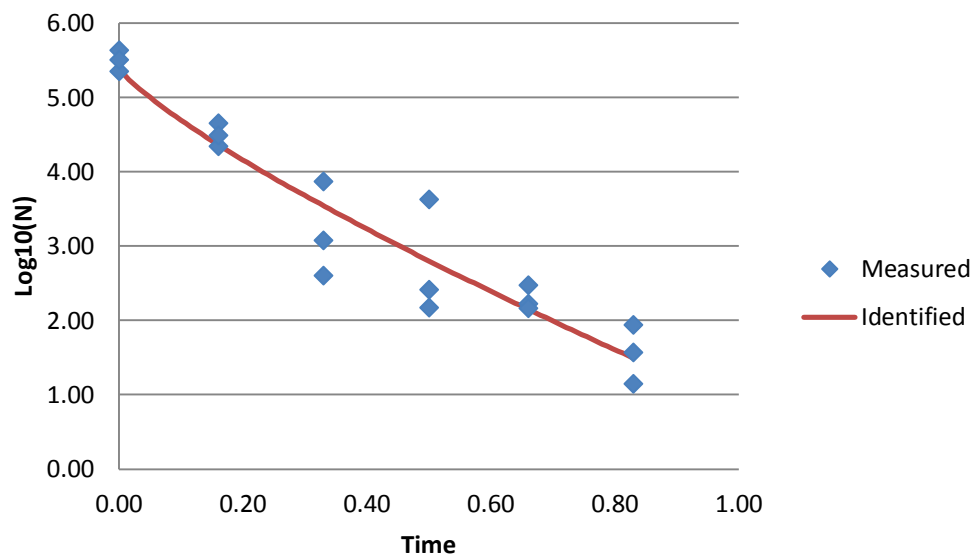


Temperatura 57,5°C

p-0,70

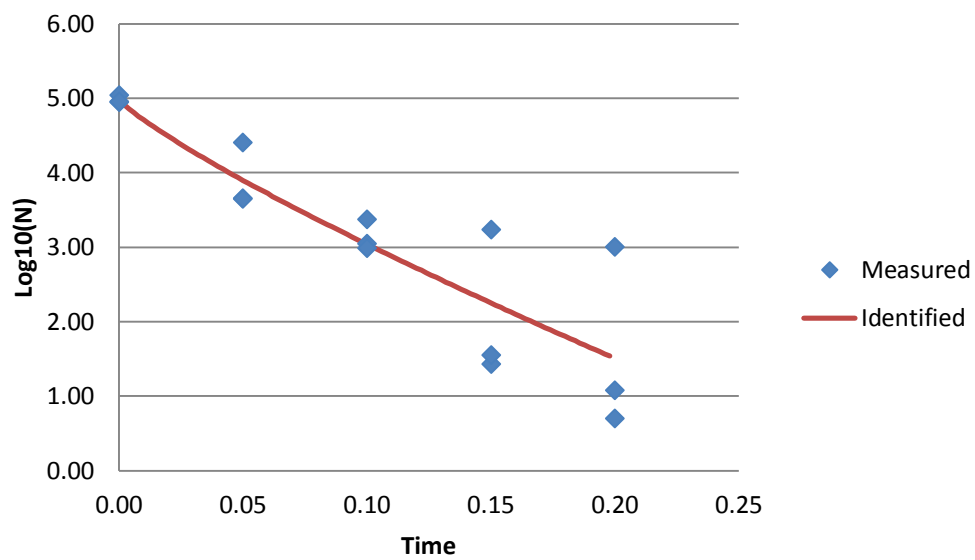


p-0,8



Temperatura 60°C

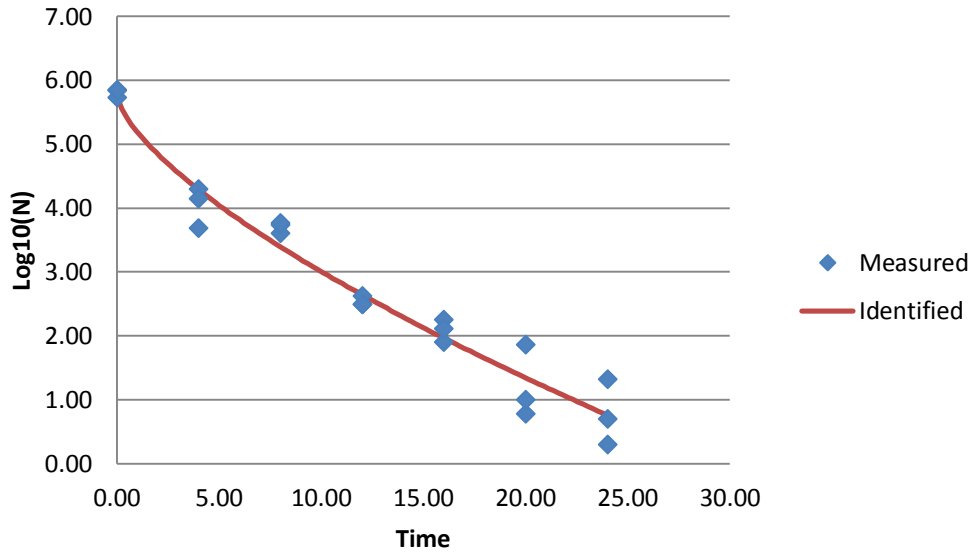
p-0,84



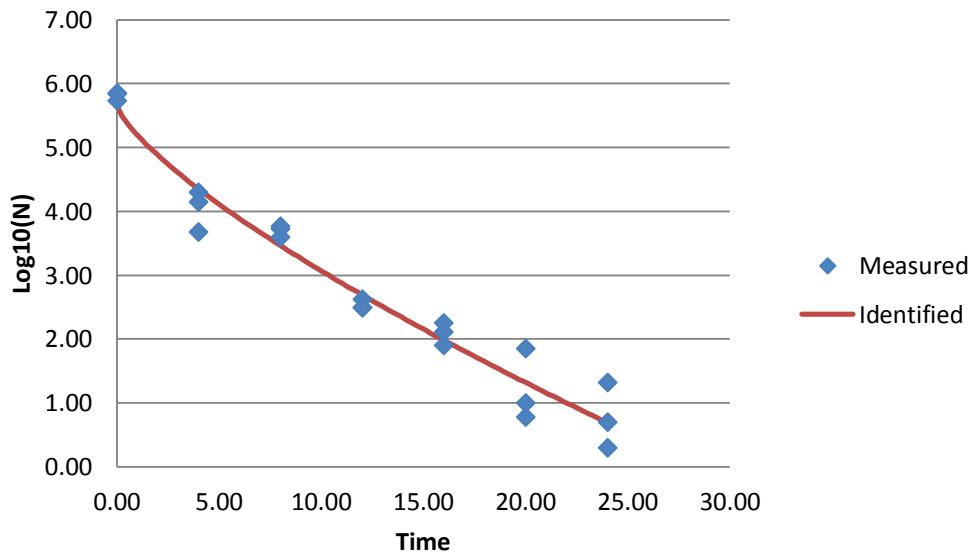
Tratamiento en medio de cultivo sin NaCl

Temperatura 52,5°C

p-0,68

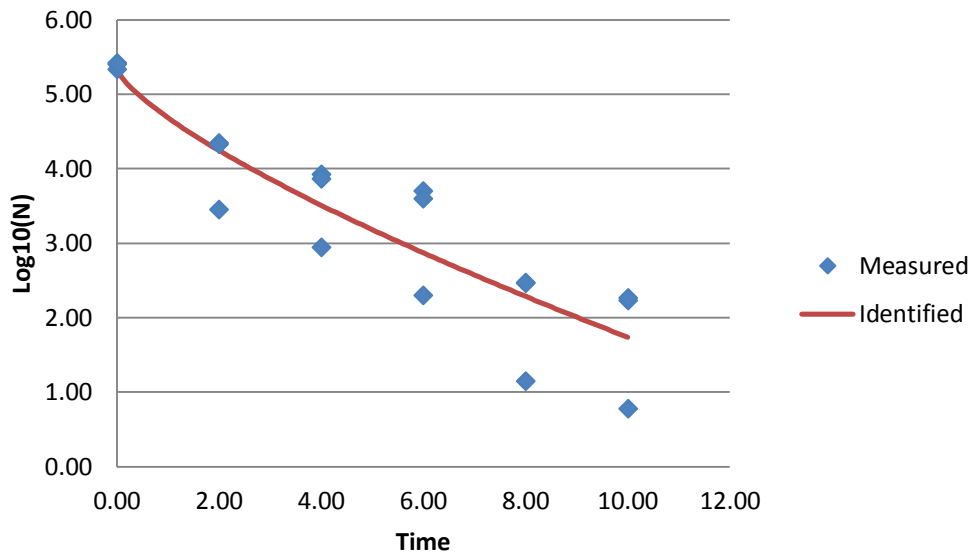


p-0,74

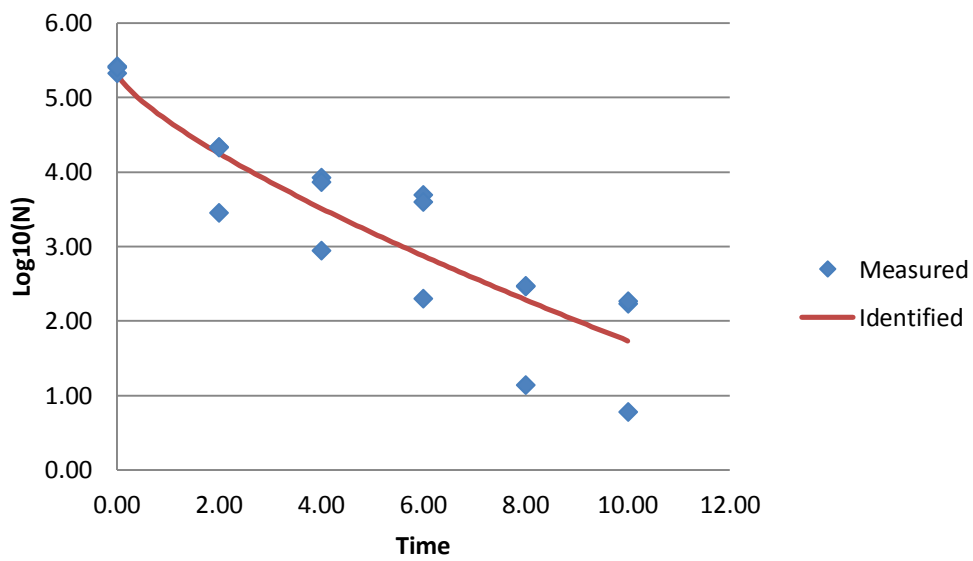


Temperatura 55°C

p-0,74

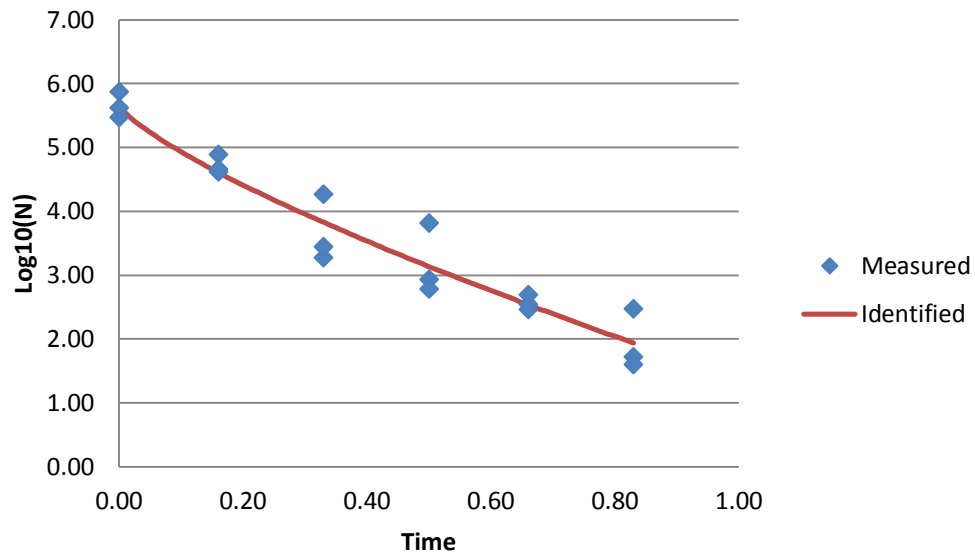


p-0,74



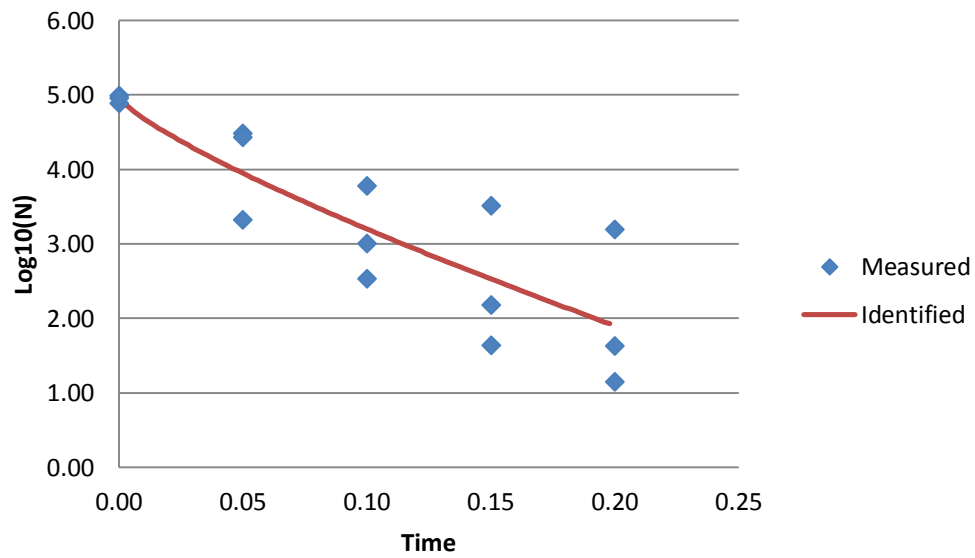
Temperatura 57,5°C

p-0,76



Temperatura 60°C

p-0,79

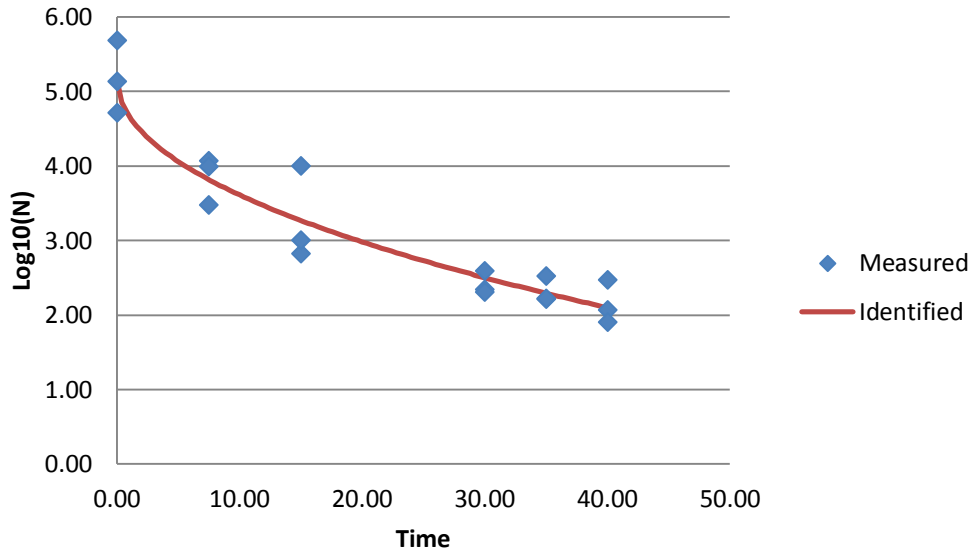


**ANEXO III GRÁFICAS
MODELIZADAS CON WEIBULL
MEDIO DE CALENTAMIENTO pH 7**

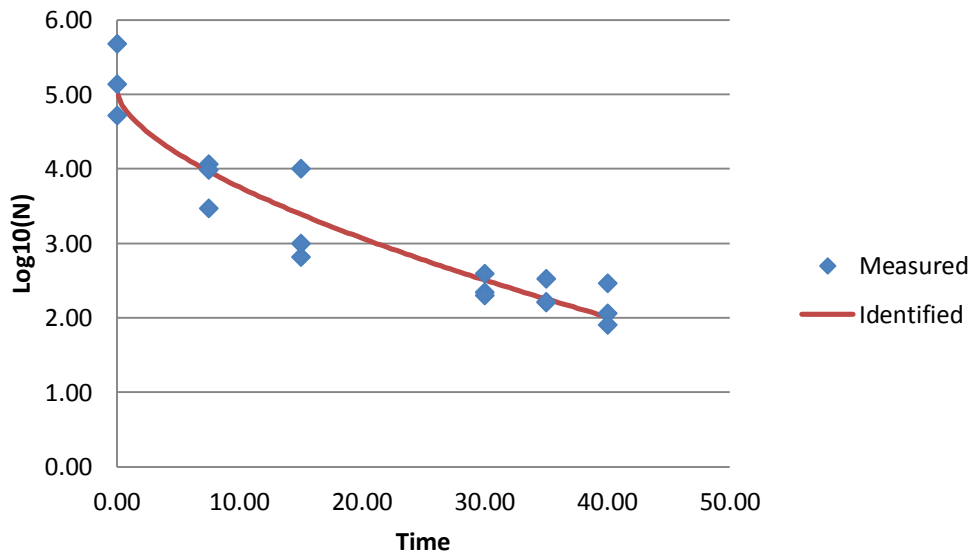
Tratamiento en medio de cultivo con 1%NaCl

Temperatura 52,5°C

p-0,49

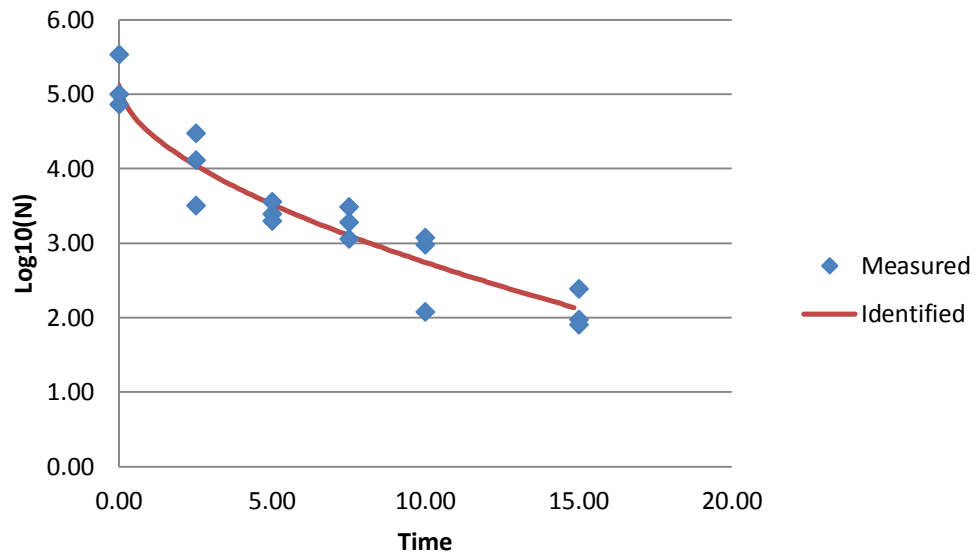


p-0,62

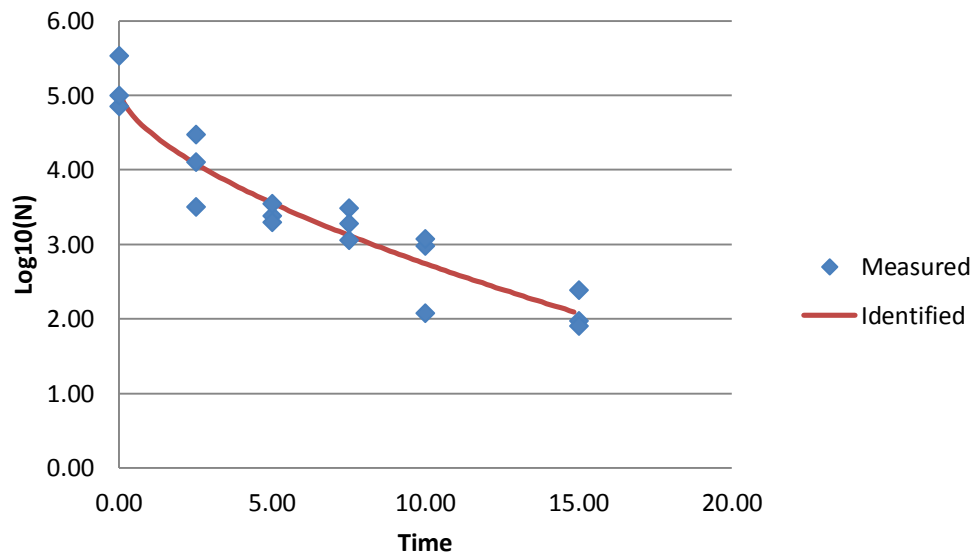


Temperatura 55°C

p-0,57

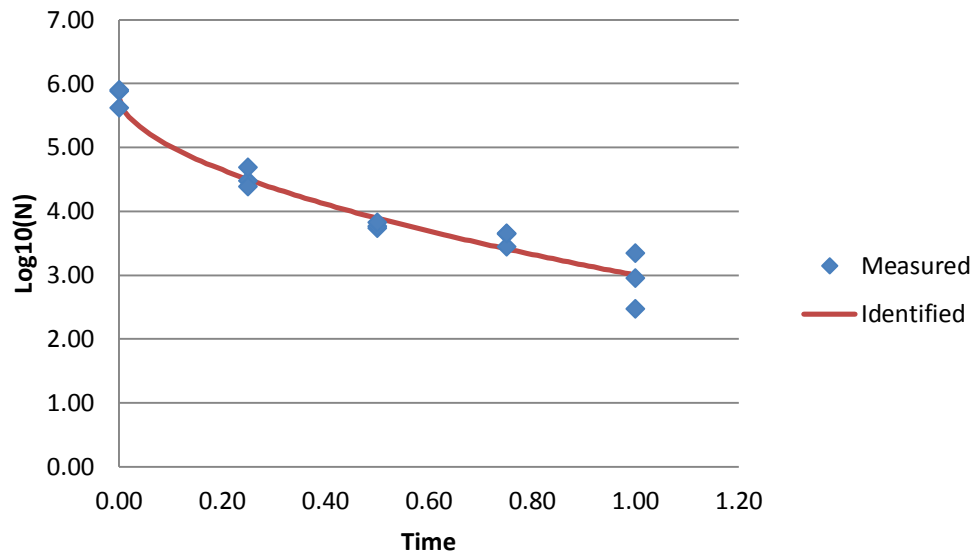


p-0,62



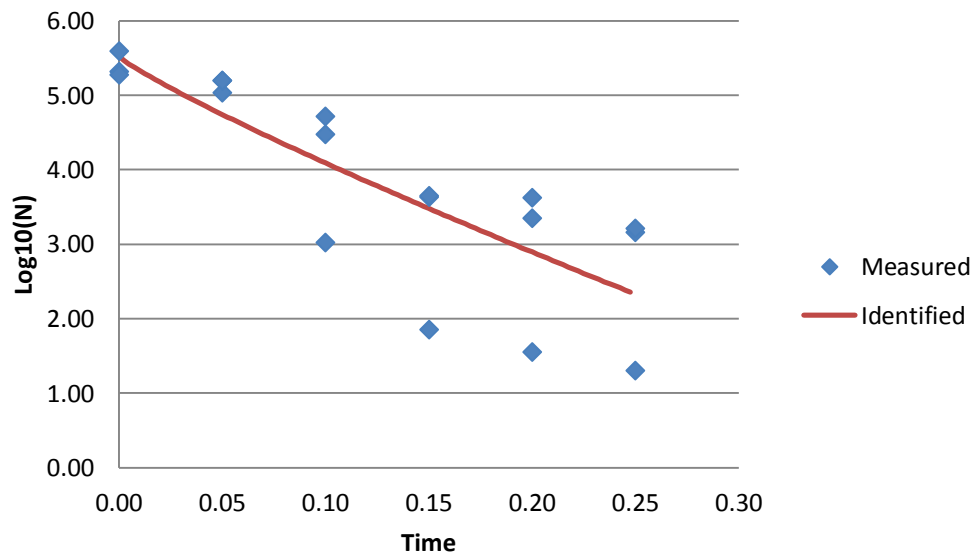
Temperatura 57,5°C

p-0,55



Temperatura 60°C

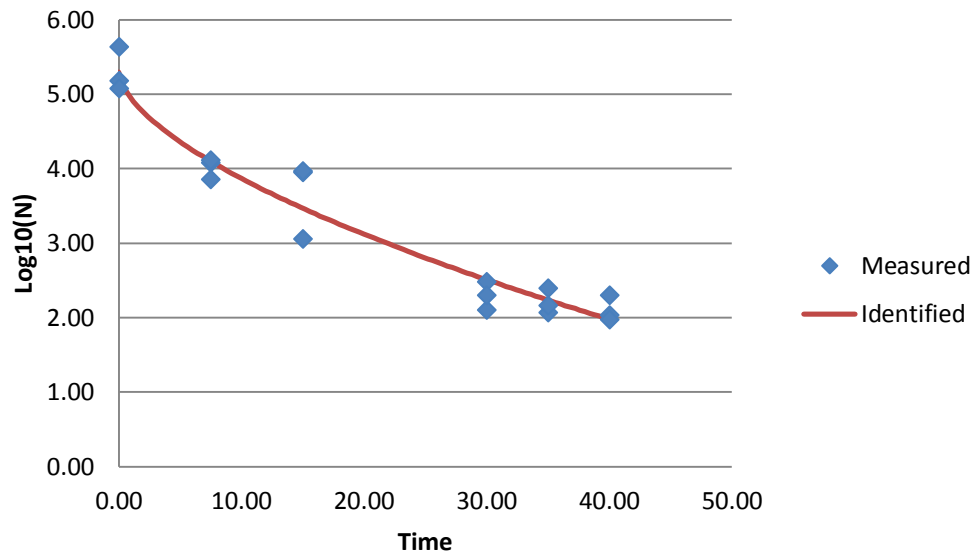
p-0,87



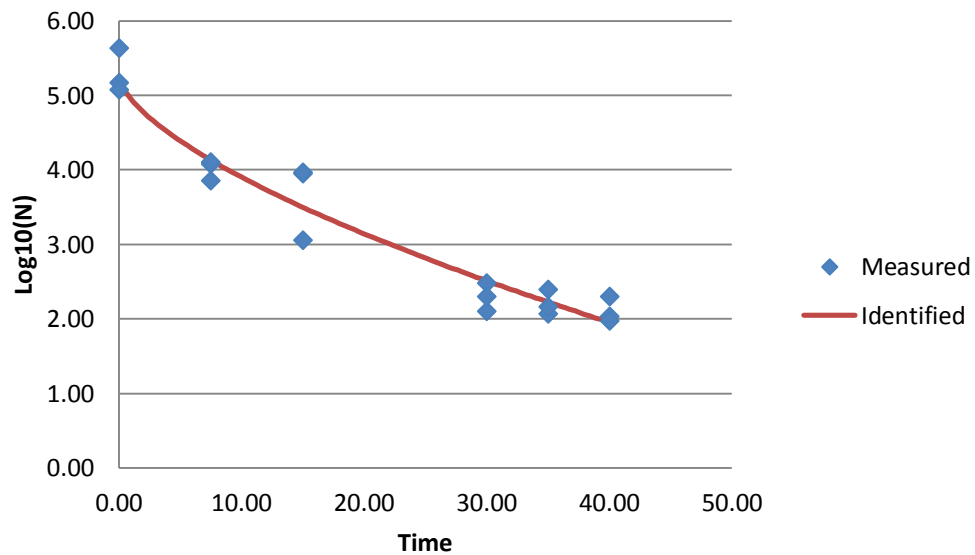
Tratamiento en medio de cultivo sin NaCl

Temperatura 52,5°C

p-0,61

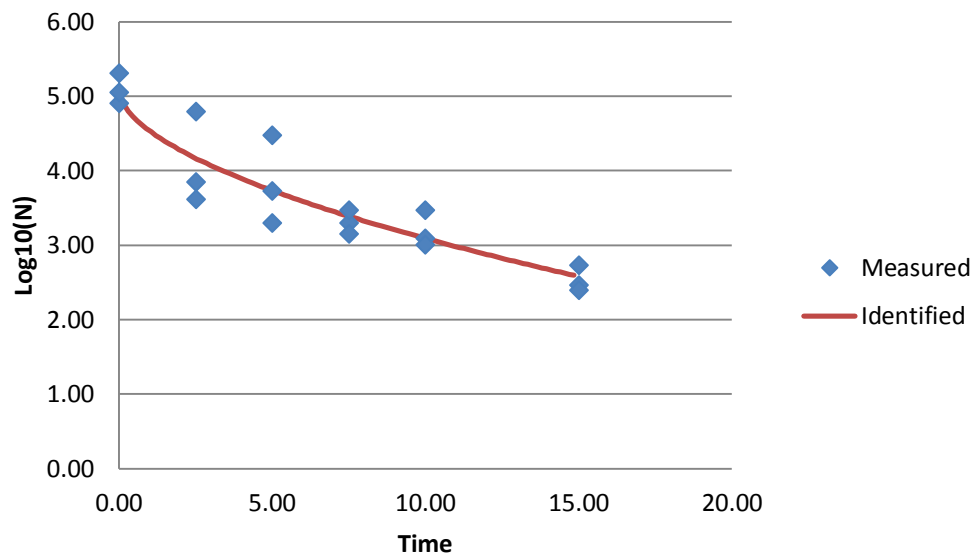


p-0,64

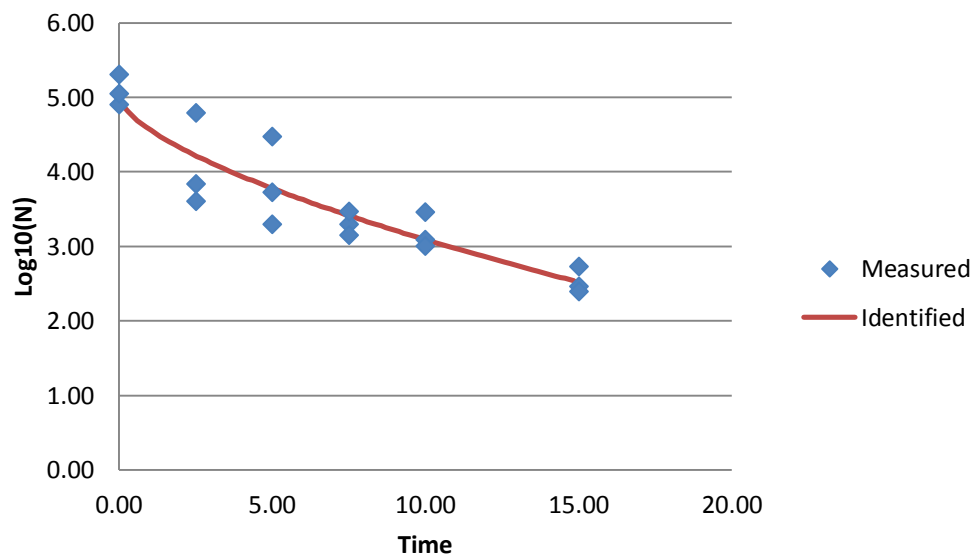


Temperatura 55°C

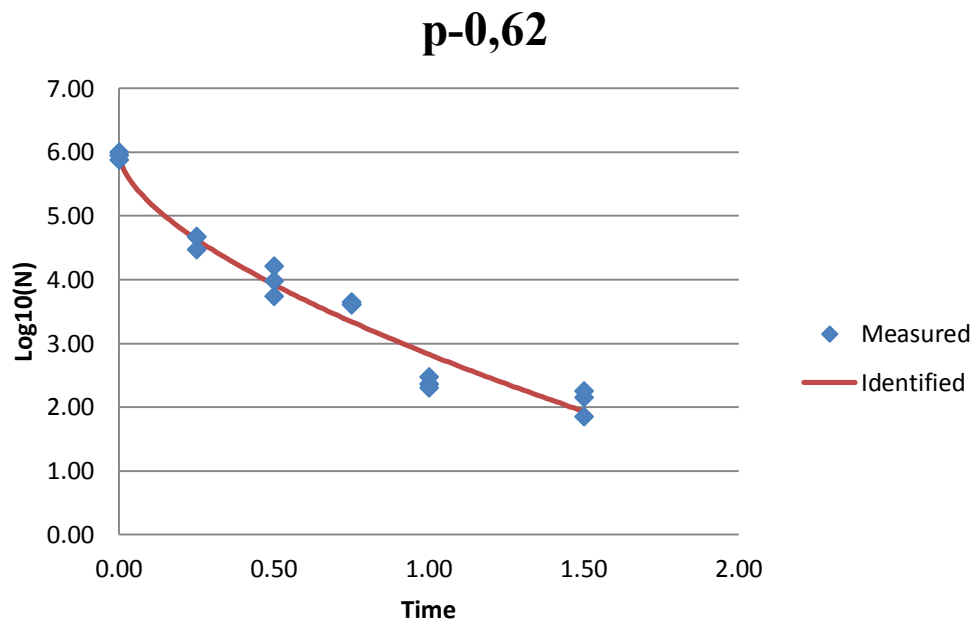
p-0,56



p-0,64



Temperatura 57,5°C



Temperatura 60°C

