

## Inactivación de *Listeria innocua* en diferentes fases del crecimiento mediante tratamientos térmicos

**Fernando Aguado Criado<sup>1</sup>. Mauricio Herrera<sup>2</sup>.  
Rodrigo González<sup>1</sup>. Juan Aguirre Garcia<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Depto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, C.P 28040. Madrid

<sup>2</sup>Depto. de Ingeniería de Alimentos. División de Ciencias de la Vida. Campus Irapuato Salamanca. Universidad de Guanajuato. Exhacienda El Copal. Km.9. Carr. Irapuato-Silao, Apdo. Postal 311, C.P 36500, Irapuato Guanajuato, Mexico.  
[fer90@msn.com](mailto:fer90@msn.com)

**Maria Rosa Rodriguez V. Gonzalo D. Garcia de Fernando M.**

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, C.P 28040. Madrid  
[mrrodrig@vet.ucm.es](mailto:mrrodrig@vet.ucm.es)   [mingui@vet.ucm.es](mailto:mingui@vet.ucm.es)

**Resumen:** en este trabajo se ha estudiado la influencia del estado fisiológico (fase de crecimiento) de *Listeria innocua* en su termorresistencia. Los microorganismos en fase estacionaria son menos sensibles al calor que los que se encuentran en fase exponencial. Por otra parte se ha observado que la variabilidad de la inactivación es directamente proporcional a la inactivación en sí misma. Así, cuanto más intenso es un tratamiento térmico, menos microorganismos se mantienen viables, pero su número es más variable. Finalmente, la inactivación de los microorganismos en fase estacionaria es menos variable que la de los que se encuentran en fase exponencial.

**Palabras claves:** *Listeria innocua*. Fases de crecimiento. Termorresistencia. Variabilidad.

### INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* es un patógeno de transmisión alimentaria, causante de la listeriosis. Esta ubicua bacteria es Gram-positiva, anaerobia facultativa, puede multiplicarse en un amplio margen de temperaturas, desde 0 hasta 42°C, aunque lo hace óptimamente entre 30 y 37°C, y su termorresistencia es notable (<sup>6</sup>).

Las bacterias, por regla general, son más resistentes en fase estacionaria que en la exponencial (<sup>5</sup>). Por otra parte, la variabilidad de la inactivación se ha demostrado con diferentes microorganismos, *L. innocua* entre ellos, un émulo no patógeno de *L.*

*monocytogenes*, mediante acidificación (<sup>7</sup>), tratamientos térmicos (<sup>8</sup>) e irradiación con electrones acelerados (<sup>3</sup>). Por otra parte, también está demostrado que la fase de latencia de microorganismos clónicos es variable (<sup>2, 3, 4</sup>). Barajando todos estos antecedentes, se ha llegado a plantear el siguiente objetivo.

## OBJETIVO

Analizar el efecto de la fase de crecimiento en que se encuentre *Listeria innocua* en la variabilidad de su inactivación mediante tratamientos térmicos

## MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo: *Listeria innocua* (CECT 910: NCTC 11288; ATCC 33090).

Medios de Cultivo: Agar soja tripticasa (TSA) para recuentos generales y reactivación, agar Palcam, selectivo para *Listeria* spp., caldo tripticasa soja (TSB) para la revitalización y crecimiento y solución fisiológica (0.8% NaCl) para diluciones y como medio de calentamiento.

- **Cepa y preparación del inóculo:** *Listeria innocua* se mantuvo a -20°C. Para reactivar la bacteria, se sembró dos veces consecutivas en TSB a 37°C durante 24 horas. Se tomó un alícuota y se suspendió en el mismo medio. Se incubó durante diferentes tiempos, 6, 12, 24 y 72 horas, a 37°C, para obtener microorganismos en diferentes estados fisiológicos en fase exponencial y estacionaria. Para obtener microorganismos en fase de latencia, tras revitalizar la cepa en TSB a 37°C durante 24 h, se le dio un segundo pase en el mismo medio y temperatura, pero se la dejó crecer durante 48 h, momento en que se sembró en TSB a 37°C durante 1 hora. En todos los casos los microorganismos se suspendieron en solución salina estéril a temperatura ambiente y se sometieron a diversos tratamientos térmicos.
- **Condiciones experimentales de inactivación.** Se determinaron los parámetros de inactivación (valores *D*) de *Listeria innocua* mediante tratamientos térmicos en solución salina para luego poder programar unas condiciones de inactivación que produjeran efectos microbicidas controlados. Una vez determinado el valor *D* se aplicaron tratamientos microbicidas cuyo objetivo era reducir la carga microbiana de la muestra en aproximadamente 0, 1 y 3 ciclos logarítmicos. El tratamiento térmico, a 54°C, se aplicaba a 60 tubos con 4.5 ml de salina estéril, a los que se añadían 0.5 ml de la suspensión de *Listeria innocua*. Una vez transcurridos los tiempos que permitían la inactivación programada para cada experiencia, se tomaba un alícuota de 0.1 ml de cada tubo y se depositaba en

un eppendorf con 0.9 ml de solución salina estéril y fría, con el objetivo de detener el tratamiento térmico. Los viables se determinaron mediante recuento en placa en TSA a 37°C durante 48 horas.

- **Análisis de los datos.** Una vez enumerados los supervivientes, las distribuciones resultantes se analizaron estadísticamente con ayuda del programa VariFit, donado por sus programadores, del Computational Microbiology Group of the Institute of Food Research (Norwich, United Kingdom).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la curva de crecimiento de *L. innocua* en TSB a 37°C y los momentos en que se tomaron muestras para analizar la termorresistencia de los microorganismos. La tasa específica de crecimiento máxima fue de 0.508 h<sup>-1</sup>, lo que nos da un tiempo de duplicación de 44 minutos. Las bacterias recolectadas se suspendieron en solución salina y se calentaron a 54°C para reducir su número en 0, 1 y 3 ciclos logarítmicos [valor  $D_{54°C} = 6.61$  minutos (<sup>1</sup>)].

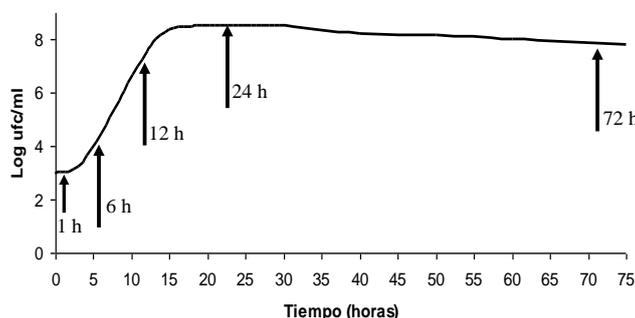


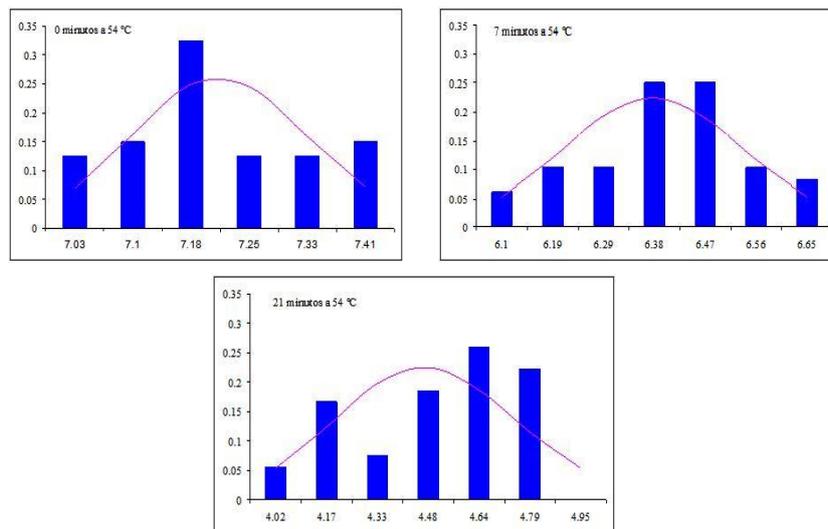
Figura 1. Curva de crecimiento de *Listeria innocua* a 37°C en TSB.

Tiempo crecimiento (h)	Valor <i>D</i> (min)	Error típico
1	7.53	1.94E-03
6	6.17	3.83E-02
12	7.12	2.53E-02
24	7.55	3.65E-02
72	8.40	1.35E-05

Tabla 1. Termorresistencia de *L. innocua* a 54°C en solución salina. Se muestra el error típico del ajuste del valor *D*.

La Tabla 1 muestra los valores *D* obtenidos en las diferentes fases de crecimiento de *L. innocua*. Estos resultados confirman que los microorganismos son más termorresistentes en fase estacionaria que en la exponencial, cuando su estado fisiológico está exacerbado, lo que le permite una multiplicación constante. Para

analizar la variabilidad de la inactivación, a 180 muestras idénticas de cada lote (cada tiempo de crecimiento) se las sometió a un calentamiento a 54 °C durante 7 y 21 minutos y a un tercer grupo se le mantuvo en refrigeración. Esto se hizo por triplicado. Los recuentos de los supervivientes se aproximan a distribuciones normales tras haber crecido en TSB a 37°C durante 24 horas. Las distribuciones obtenidas tras 6, 12, 24 y 72 horas de incubación no se muestran por ser similares a las de la figura 2.



**Figura 2. Distribuciones de frecuencia del número de *L. innocua* supervivientes a 54°C en solución salina. Corresponden a los microorganismos en fase de latencia (1 h de incubación a 37°C).**

Cuanto más intenso es el tratamiento inactivante, más variable es su número como puede observarse en la Figura 3, en la que se muestran los coeficientes de variación (CV) del número de supervivientes en función del grado de inactivación alcanzado. Los datos revelan que los resultados más variables se han obtenido con las células en fase de latencia, mientras que en fase exponencial y estacionaria no se sigue un patrón claro, estando un tanto imbricadas unas muestras con otras, a pesar de que la termorresistencia era bastante distinta. Recuérdese que las células en fase estacionaria son más termorresistentes que en la fase exponencial (Tabla 1).

En conclusión, se confirma que las células en fase exponencial son menos termorresistentes que las que se encuentran en fase estacionaria. Por otra parte, la inactivación resultó ser más variable en fase de latencia que en las otras, pero no se sigue una tendencia clara, por lo que solo puede concluirse que la variabilidad de la inactivación puede estar influida por la fase de crecimiento, pero deben existir más factores que la controlan.

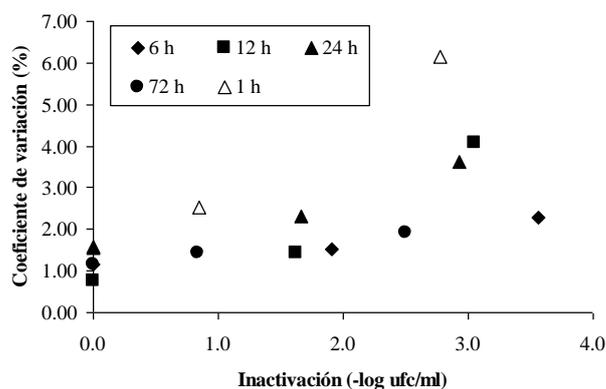


Figura 3. Variabilidad de la inactivación de *L. innocua* a 54°C en solución salina en función del tiempo de incubación a 37°C antes de aplicar el tratamiento térmico.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre, J.S., Pin C., Rodriguez, M.R. y Garcia de Fernando G.D. 2009. Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Appl. Environ. Microbiol*, 75, (22): 6992-6997.
2. Aguirre, J.S., Rodriguez M. R. y García Fernando G.D. 2011a. Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a tratamientos conservantes de los alimentos, En: J.A Ordoñez, J.J. Córdoba, J. Ventanas (eds.). *Productos Cárnicos para el Siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables*. Universidad de Extremadura, Cáceres, p. 215 - 219.
3. Aguirre, J.S., Rodriguez M. R. y García Fernando G.D. 2011b. Effects of electron beam irradiation on variability of the number of survivors and on duration of lag phase of four food-borne organisms. *Int. J. Food Microbiol* 149: 236-246.
4. Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.C., 2005. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2940–2948.
5. Mackey BM. 2000. Injured bacteria. En: Lund BM, Baird-Parker A, Gould GW (eds.). *The microbiological safety and quality of food*. Aspen Pub. Gaithersburg, MA. pp: 315-341.
6. Ruiz-Bolivar, Z., Poutou-Piñales, A., Carrascal-Camacho, A. K. Resistencia antimicrobiana a desinfectantes de *Listeria spp*. *Publicación científica en ciencias biomédicas-ISSN: 1794-2470*. Vol. 6 Nº 10 de Julio- Diciembre, 2008, p. 201-218/236.

7. Rodríguez, J.J. (2005). Nuevas tecnologías en la conservación de alimentos. [www.consumoseguridad.com/cienciaytecnología.2005/07/06](http://www.consumoseguridad.com/cienciaytecnología.2005/07/06).
8. Rodríguez, M.R., Aguirre, J.S., García de Fernando, G.D. (2008). Variabilidad de la inactivación de *Salmonella Enteritidis* mediante la acidificación. XIII CYTALIA, Madrid, 9-11 de Abril.

#### BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

Pin, C. y Baranyi, J. Single-cell and population lag times as a function of cell age. Appl. Environ. Microbiol, 2008, 74: 2534-2536.

Recibido: 16 marzo 2012.

Aceptado: 16 diciembre 2013.