

Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos

Máster Oficial en Calidad de Alimentos de Origen Animal

Estudio de la *L. monocytogenes* y su
crecimiento en presencia de
microorganismos alterantes sobre
productos cocidos listos para el
consumo

María Romina Banchero

Tutora: Dra María Manuela Hernández

Bellaterra, 3 de septiembre de 2018

Informe del director del trabajo de investigación:

María Manuela Hernandez

INFORMA

Que el trabajo titulado “Estudio de la *L. monocytogenes* y su crecimiento en presencia de microorganismos alterantes sobre productos cocidos listos para el consumo” ha sido realizado bajo mi tutela dentro del módulo Trabajo Fin de Master Oficial de Calidad e Alimentos de Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Barcelona, 3 de septiembre de 2018

Índice del trabajo

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN.....	7
MATERIALES Y METODOS	10
Descripción de las muestras	10
Preparación del inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i>	11
Preparación de las muestras	12
Inoculación	14
Análisis microbiológicos y fisicoquímicos.....	15
Predicción del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	15
Análisis estadístico	16
RESULTADOS	17
Evolución del pH	17
Evolución de los microorganismos aerobios mesófilos.....	18
Evolución de <i>Listeria monocytogenes</i>	19
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES.....	22
BIBLIOGRAFIA	23

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a SILLIKER Ibérica, S.A.U. y a los departamentos implicados en el buen desarrollo de este experimento, ya que sin la oportunidad de realizarlo y los medios invertidos, esto no hubiera sido posible.

A *Manoli*, por su paciencia y comprensión a lo largo del proyecto.

A mi familia y amigos, que han contribuido directa o indirectamente en el trabajo, ya sea por consejos, apoyo moral y aguante.

Y a Marc, por estar ahí, por no entender nada y aun así querer entender, por tirar del carro cuando ya lo había dejado tirado; por estar.

Gracias.

RESUMEN

En el reglamento CE Nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, se establecen unos criterios sobre la *Listeria monocytogenes* en los alimentos listos para el consumo (RTE) para poder catalogar el producto según pueda o no favorecer el crecimiento de la *L. monocytogenes*. Dicho reglamento establece que, las industrias responsables de la fabricación de productos RTE realizarán estudios en relación con lo dispuesto en el anexo II del ya mencionado Reglamento, con más hincapié en los que puedan permitir el desarrollo de *L. monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública. Estos estudios se denominan *Challenge Test*, ya que pone a prueba al microorganismo en el producto que se quiera evaluar su crecimiento. Concretamente en este estudio, se evaluó el crecimiento de un mix de dos cepas de *L. monocytogenes* mediante un *Challenge Test* en jamón cocido con su microbiota natural y en condiciones de competencia con microorganismos alterantes resultado de la contaminación con 15 carnes picadas de diferentes carnicerías de distintos días, siendo almacenado durante 7 días a 7°C.

Tras 7 días de estudio se obtuvieron diferencias significativas en el crecimiento de *L. monocytogenes* en las muestras contaminadas respecto al crecimiento observado en las muestras control, apuntando al posible efecto de la flora acompañante en el enlentecimiento del crecimiento, sin alteración aparente del pH a lo largo del estudio.

ABSTRACT

Regulation EC No. 2073/2005 on microbiological criteria for food products establishes criteria for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products (RTE) to enable the product to be categorized according to whether or not it may promote the growth of *L. monocytogenes*. That Regulation provides that the industries responsible for the manufacture of RTE products are to carry out studies in relation to the requirements of Annex II to the abovementioned Regulation, with particular emphasis on those which may allow the development of *L. monocytogenes* and may suppose a risk to public health. These studies are called Challenge Test, as they challenge the microorganism in the product to be evaluated its growth. Specifically, in this study, the growth of a mix of two strains of *L. monocytogenes* was evaluated by means of a Challenge Test in cooked ham with its natural microbiota and under conditions of competition with spoiling microorganisms resulting from the contamination with 15 minced meats from different butchers of different days, being stored for 7 days at 7°C.

After 7 days of study, significant differences were obtained in the growth of *L. monocytogenes* in the contaminated samples with respect to the growth observed in the control samples, pointing to the possible effect of the accompanying flora in slowing down the growth, without apparent alteration of the pH throughout the study.

INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria existen diferentes tipos de riesgo: físico (presencia de partículas o sustancias indeseadas), químico (presencia o aparición de compuestos tóxicos o nocivos para el consumidor) y microbiológicos (presencia de microorganismos que alteran el estado del producto o que generan un riesgo para el consumidor). En este trabajo final de máster el estudio se ha centrado, dentro del riesgo microbiológico, en concreto sobre uno de los microorganismos patógenos más relevantes en la industria: *Listeria monocytogenes* (Schöbitz et al., 2009), por su capacidad de sobrevivir y multiplicarse en condiciones de refrigeración, pudiendo crecer en vacío y atmósfera modificada, así como puede contaminar los alimentos después de procesado (Kerry et al., 2011).

La *Listeria monocytogenes* es un microorganismo patógeno responsable de la listeriosis en humanos, enfermedad transmitida por alimentos. Esta especie de Listeria es la única patógena para el ser humano (Low et al., 1997). Se trata de un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, flagelado, catalasa positiva y, aunque su temperatura óptima de crecimiento sea entre 30 – 37 °C, está estudiado su crecimiento en temperaturas de hasta 3°C (Low et al., 1997). Este último aspecto es el que hace a la *L. monocytogenes* un patógeno de alta relevancia en la industria alimentaria, ya que la temperatura de refrigeración no inhibe su crecimiento.

En el año 2000 fue cuando se instauraron por primera vez recomendaciones de límites microbiológicos en los alimentos respecto a la *L. monocytogenes* siendo respaldada por el Comité Científico de Alimentación Humana (SCF) en su dictamen del 22 de junio de ese año (European Comission, 2000). Posteriormente, en el Reglamento (CE) nº 2073/2005 en el que se recogen los criterios microbiológicos establecidos para los productos alimenticios, en el Artículo 3 apartado 2 se cita lo siguiente con relación a los productos listos para el consumo y el desarrollo de la *L. monocytogenes*: “*Cuando sea necesario, los explotadores de las empresas alimentarias responsables de la fabricación del producto realizaran estudios conforme a lo dispuesto en el anexo II para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil. Esto es aplicable especialmente a los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de Listeria monocytogenes y puedan suponer un riesgo para la salud publica en relación con dicha bacteria.*” (Reglamento CE 2073/2005, 2005).

En relación con estos estudios, se menciona que “*Las empresas alimentarias podrán colaborar en la realización de dichos estudios.*” y “*En las guías de prácticas correctas contempladas en el artículo 7 del Reglamento (CE) no. 852/2004 podrán incluirse directrices para el desarrollo de dichos estudios.*”

En relación con los estudios que hace referencia este apartado, la Comisión Europea redactó un documento guía, únicamente a título informativo, destinado a los operadores de la industria alimentaria ampliando lo indicado en el artículo 3.2. Asimismo, este documento guía a los fabricantes para saber cómo clasificar los alimentos, según lo indicado en el ANEXO I del Reglamento 2073/2005, donde se recogen los criterios microbiológicos en función del tipo de producto:

[...]

1.1 *Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales*

1.2 *Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales*

1.3 *Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales.*

[...]

Los aspectos técnicos de los estudios a realizar vienen detallados en la guía técnica elaborada por el Laboratorio de Referencia Comunitario (CRL) para la elaboración de estudios de vida útil sobre la *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (RTE). En esta guía se detallan dos tipos de estudios, introduciendo el término de *Challenge test*. Este tipo de estudios consisten en la inoculación de un microorganismo en un alimento con una concentración conocida y evaluar su comportamiento durante la vida útil del producto. Esta guía es la que se ha seguido en este trabajo para la elaboración de dos *Challenge tests*.

Aunque ya haya sido ampliamente estudiado el hecho de que las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen capacidad inhibidora de la *L. monocytogenes* en productos RTE (Nilsson et al. 1998, Campanini et al. 1993, Amézquita et al. 2001), en SILLIKER Ibérica S.A.U

(primer laboratorio de Europa en acreditarse en la realización de *Challenge test* de *L. monocytogenes*) se ha observado en los estudios realizados durante más de 10 años, que un elevado recuento de microorganismos aerobios ($>10^6$ ufc/g) al final de la vida útil del producto suelen ir acompañado de recuentos bajos de *L. monocytogenes*. Asimismo, autores citan el “Efecto Jameson” (Mellefont et al., 2008) como “*supresión del crecimiento microbiano entre especies como una competencia no específica por nutrientes*”.

El planteamiento del estudio consiste en evaluar el crecimiento de un mix de dos cepas de *L. monocytogenes* mediante un *Challenge Test* en una matriz (jamón cocido) con su microbiota natural y en condiciones de competencia con microorganismos alterantes resultado de la contaminación con 15 carnes picadas de diferentes carnicerías de distintos días.

MATERIALES Y METODOS

Descripción de las muestras

Para la realización de este estudio se utilizó una pieza de jamón cocido extra Bonnatur de Argal, lote 18.05.16 y fecha de consumo preferente 20.08.18 cerrado e íntegro adquirido en un supermercado (Figura 1 y 2).



Figura 1: Aspecto del jamón cocido utilizado como matriz en este estudio.



Figura 2: Lote, peso y fecha de consumo preferente del jamón cocido.

Asimismo, para la contaminación de las muestras de jamón se utilizó carne picada proveniente de 15 carnicerías diferentes, o en su defecto, de una misma carnicería, pero de días distintos o de tipos de carne distintos (Tabla 1). Se hará referencia a cada una de las carnes como lotes diferentes.

Las carnes picadas para el estudio se detallan a continuación:

Tabla 1.- Relación de muestras compradas para el estudio: numeración, fecha y lugar de compra

Numeración	Fecha de compra	Lugar de compra
1	13-jun	Mercat del ninot - P41
2	13-jun	Mercat del ninot - P61
3	13-jun	Keisy supermercats
4	13-jun	Escofet Oliver
5	13-jun	El Corte Inglés
6	13-jun	El Corte Inglés
7	13-jun	Consum
8	13-jun	Xarcuteria Hernando
9	15-jun	Carrefour
10	16-jun	Consum
11	16-jun	Consum
12	16-jun	Bobinum
13	16-jun	El corte ingles
14	16-jun	Carrefour
15	16-jun	Caprabo

Preparación del inóculo de *Listeria monocytogenes*

Según lo dispuesto en la Guía del *Challenge test* (EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT, 2014) se eligieron 2 cepas de *Listeria monocytogenes* en función de la matriz a inocular, condiciones de actividad de agua de la matriz, pH y temperatura de almacenamiento. En este estudio se seleccionó dos de las 4 cepas propuestas para realizar estudios de Challenge en productos cárnicos a baja temperatura. el genoserotipo II (serotipo 1/2c) 12LMOB045LM y el genoserotipo IV 12LMOB089LM

Para la preparación del inóculo, se tomó una criobola de la cepa de *L. monocytogenes* elegida, se introdujo una en un tubo con 9 ml de Brain Heart Caldo (BHI) y se incubó a 37 ± 1 °C durante 15-18 h. Pasado este tiempo, la concentración alcanzada fue de aproximadamente, 109 ufc/ml, estando en fase estacionaria temprana. De este tubo, se transfirió 0,1 a otro tubo con 9mL medio BHI y se incubó a 7°C por 7 días, con el objetivo de adaptar a los microorganismos a las bajas temperaturas.

Las dos cepas se mezclaron manera equitativa, 2 ml de cada uno de los caldos, y se realizaron diluciones sucesivas hasta conseguir la concentración deseada de inóculo final. Esta cantidad viene determinada por el volumen de inóculo que se debe inocular en el producto final (máximo 1% del peso de la muestra para conseguir inocular 100 ufc/g).

Como comprobación que el inóculo contenía *L. monocytogenes* viables, juntamente con las muestras de estudio se dejaron 2 tubos, uno con caldo sin inóculo de *L. monocytogenes* y otro con inóculo. En el momento de la realización del primer control se debe evaluar la turbidez visualmente de ambos tubos, y el resultado que permite continuar con el estudio es que el tubo con presencia de *L. monocytogenes* esté turbio.

Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon a partir de cortes asépticos en cubos de 1 cm x 1 cm (imagen 3) e individualmente se transfirieron a bolsas Stomacher®. Se pesaron bolsas de 30 g para la inoculación de *L. monocytogenes* y bolsas de 10 g para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos y pH. En total se prepararon 45 bolsas de dados con la microbiota natural del jamón cocido de 30 g cada una y 60 bolsas con 10 g (Figura 3).

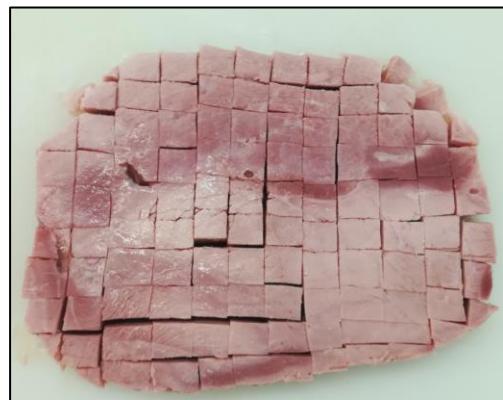
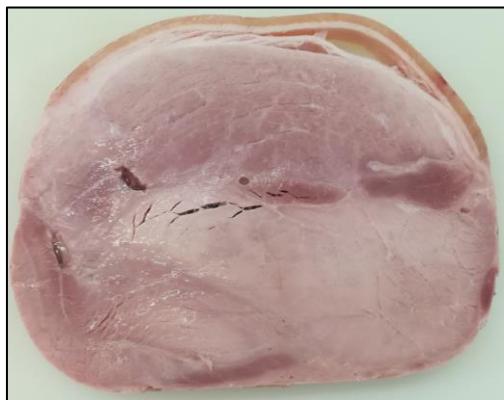


Figura 3: Aspecto de una loncha de 1cm aproximadamente de jamón antes y después del corte.

Para la preparación de las muestras contaminadas, se utilizaron recipientes metálicos en los que se introdujo la carne picada. Se frotó toda la superficie con ella, se extrajo la carne y se introdujeron los dados de jamón a contaminar, y con el mismo guante utilizado con la carne se frotaron por la superficie contaminada previamente. Luego se pesaron bolsas

de 30 g y 10 g al igual que en las muestras con la microbiota natural, para cada uno de los 15 lotes de carne picada (Figura 4).

En la secuencia de fotos siguiente se detallan los pasos para la contaminación de las muestras de jamón:



Paso 1: se introduce la carne picada en un bol metálico, previamente lavado.



Paso 2: se frota toda la superficie del bol con la carne picada, procurando que toda la superficie quede bien cubierta.



Paso 3: se retiran todos los restos de carne picada del bol.



Paso 4: se introducen los dados de jamón cortados en el bol previamente contaminado.



Paso 5: se frotan los dados por toda la superficie del bol para conseguir la mayor transferencia entre el bol y los dados.

Figura 4. pasos de la contaminación de las muestras de jamón cocido contaminadas.

Inoculación

En total se inocularon, para cada tratamiento, 45 bolsas de 30 g con el inóculo del mix de cepas de *L. monocytogenes*. En el caso de las bolsas de 10 g, destinadas a analizar pH y microorganismos aerobios, para mantener las mismas condiciones de humedad y Aw del producto se introdujo la misma cantidad de agua destilada que de inóculo. En total se inocularon con agua 60 bolsas de 10 g por cada tratamiento.

El nivel de inóculo real utilizado en la inoculación (Imagen 4) fue de $4,8 \times 10^9$ ufc/ml, que posteriormente se diluyó hasta llegar a $4,8 \times 10^4$ ufc/ml. Teniendo en cuenta que las bolsas inoculadas eran de 30 g y que el máximo que se puede utilizar de inóculo es del 1%, se añadió superficialmente 0,3 ml de inóculo, siendo el recuento teórico inoculado de 480 ufc/g de producto ($2,7 \log$ ufc/g) (Figura 5).

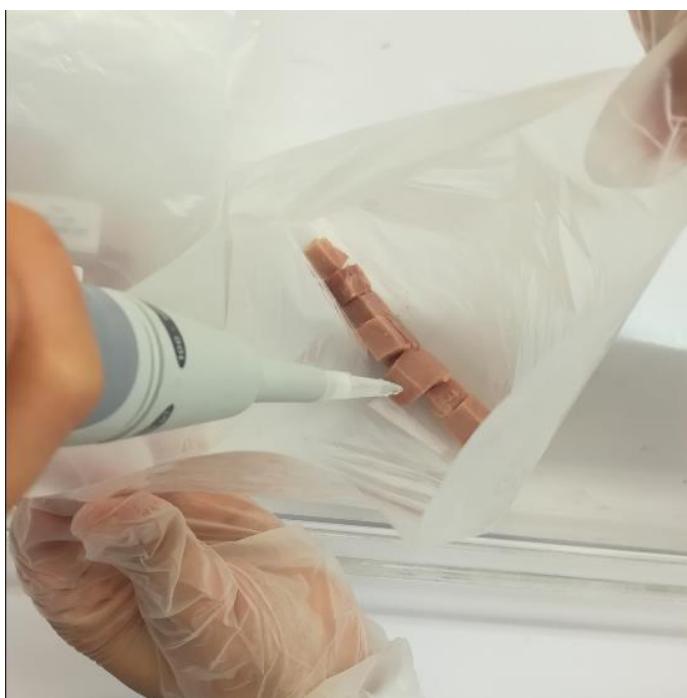


Figura 5: Fotografía del momento de la inoculación.

Análisis microbiológicos y fisicoquímicos

- Microbiológicos

En las muestras inoculadas se realizó a fecha 0, 3 días y 7 días el análisis de *Listeria monocytogenes* (recuento) por el método ISO 11290-2:2017 en la totalidad de la muestra. Para ello se realizó la dilución 10^{-1} de la muestra en agua de peptona tamponada (Biomerieux, Marcy l’Etoile, Francia), luego se sembró en superficie las correspondientes diluciones (en el caso de este estudio, hasta la -5) en medio selectivo agar Ottaviani et Agosti (OAA) (Biomerieux). Se incubaron las muestras a 37 ± 1 °C y se realizó una evaluación visual a las 24 ± 3 horas, y si fue necesario, a las a las 24 ± 3 horas más, para detectar la presencia de colonias características presumibles de ser *L. monocytogenes* o *Listeria spp.* En este estudio, al inocular cepas conocidas de *L. monocytogenes*, a la hora de hacer el recuento todas las colonias verdes-azules presentes en la placa ALOA se consideran *L. monocytogenes*.

Asimismo, en las muestras inoculadas con agua se realizó el análisis de Microorganismos aerobios mesófilos (recuento) por el método ISO 4833-1:2013 en la totalidad de la muestra, realizando una siembra en profundidad de las diluciones hasta la -8 en placas de Petri con 12-15 ml de agar de recuento en placa (PCA) (BIOKAR BK144) fundido y enfriado a unos 45°C. Se dejaron solidificar, se invirtieron las placas y se incubaron en estufa a 30 ± 1 °C durante 72 ± 3 horas.

- Fisicoquímicos

En muestras inoculadas con agua se realizó el análisis de pH (solución al 10%) a 25 °C. (FisherBrad Accumet™ AB150, FisherScientific, Madrid, España)

Predicción del crecimiento de *Listeria monocytogenes*

En este estudio, se estudió previamente el comportamiento de la *L. monocytogenes* en diferentes condiciones de temperatura utilizando la herramienta online ComBase (University of Tasmania y USDA Agricultural Research Service (USDA-ARS), www.combase.cc), basándonos en el pH, A_w , posibles temperaturas de almacenamiento

del producto a estudiar y teniendo en cuenta la vida útil real que se le puede dar a un producto de estas características envasado sin atmósfera protectora y sin vacío. Este planteamiento simula el seguido por Awaiwanont et al. (2015).

Las condiciones establecidas fueron las siguientes: nivel inicial 2.5 ufc log/g (nivel teórico del inóculo), pH de 6,5 y A_w de 0,997, el estado fisiológico se dejó por defecto el que determina ComBase de inicio, ya que, aunque las cepas estuvieran adaptadas previamente en la preparación del inóculo, suponer un estado fisiológico menor al 1 da cierto margen en cuanto a la previsión de adaptación del microorganismo en el medio inoculado. Se hicieron pruebas a diferentes temperaturas, seleccionándose finalmente una temperatura de 7 °C, a la que, calculando la vida útil, se correspondería a 168 h (7 días) como período de estudio.

Análisis estadístico

El experimento se realizó en 15 unidades estériles y en 15 unidades contaminadas. Los valores en tablas y figuras son resultado de 15 análisis. Se analizaron los datos con un test ANOVA de diferencias, con un Test Tukey para discriminar entre medias utilizando el programa R Deducer. La significancia estadística se estableció con un p-value = 0,05.

RESULTADOS

Evolución del pH

Se determinó el pH en cada uno de los tratamientos y para cada control, aunque no se pudieron realizar los correspondientes al día 0 en las muestras no inoculadas (control), por lo que únicamente se muestran los resultados del día 3 y 7 (Figura 6).

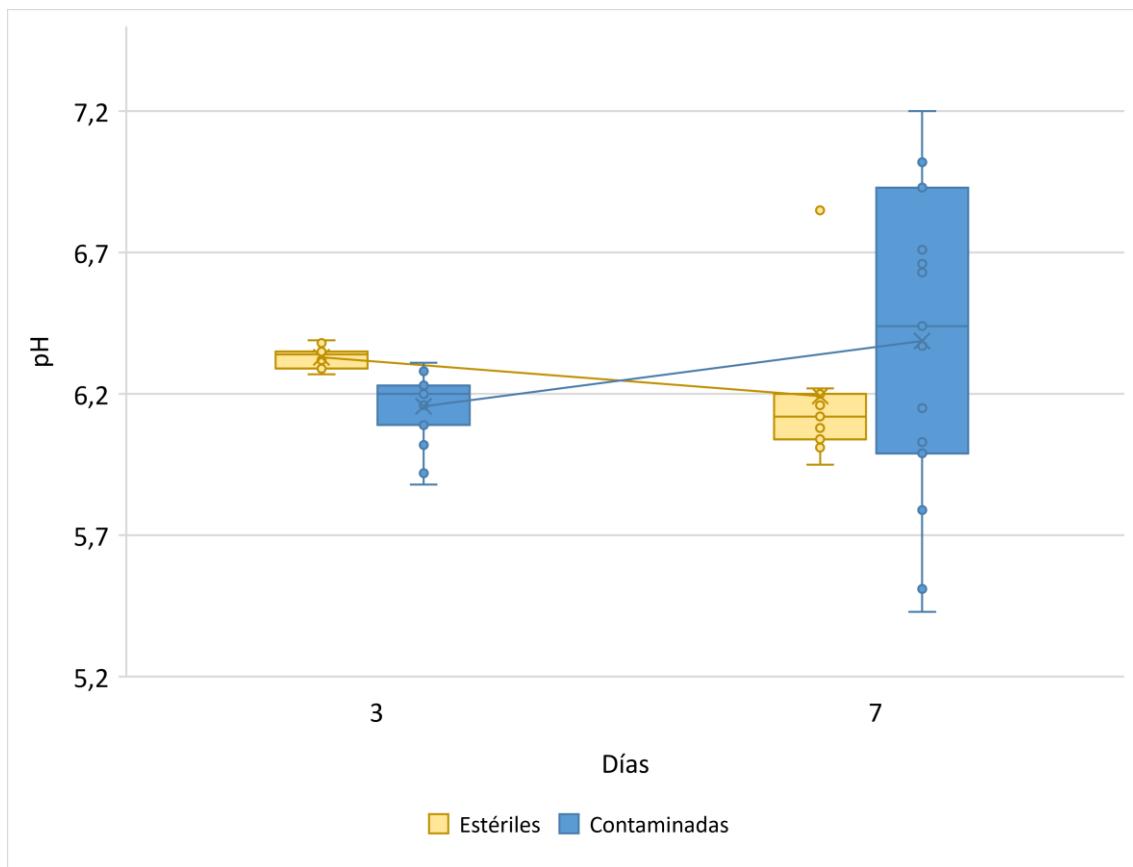


Figura 6: Diagrama de cajas de la evolución del pH durante el almacenamiento de las muestras 7 días a 7 °C.

A falta de los resultados del control a día 0, se observa una amplia dispersión en el caso de las muestras contaminadas en el control 7 días, mientras que en las muestras control los resultados fueron menos dispersos, posiblemente debido que en las muestras contaminadas la microbiota es muy variable, lo que condiciona el tipo de metabolitos producidos durante su crecimiento que afectan a los cambios de pH. En la Tabla 2 se detallan los valores medios y desviación estándar de los pH analizados para cada tratamiento.

Tabla 2. Media y desviación estándar de los valores de pH de las muestras control y contaminadas durante su conservación a 7 °C durante 7 días.

TIEMPO	CONTROL	CONTAMINADAS
Día 3	$6,33 \pm 0,04^{\text{aA}}$	$6,19 \pm 0,13^{\text{aA}}$
Día 7	$6,19 \pm 0,28^{\text{aB}}$	$6,39 \pm 0,55^{\text{aB}}$

a-b Las letras minúsculas en la misma fila representan diferencias significativas ($p\text{-value} < 0,05$) entre las muestras control y contaminadas

A-B Las letras mayúsculas en la misma columna representan diferencias significativas ($p\text{-value} < 0,05$) durante el tiempo

Evolución de los microorganismos aerobios mesófilos

Con el objetivo de evaluar el efecto competitivo de la microbiota aerobia a diferentes concentraciones, se estableció como premisa que el recuento de las muestras contaminadas estuviera 2 logaritmos por encima del control. En la Figura 7 se muestra la evolución de estos recuentos a lo largo de los días de estudio.

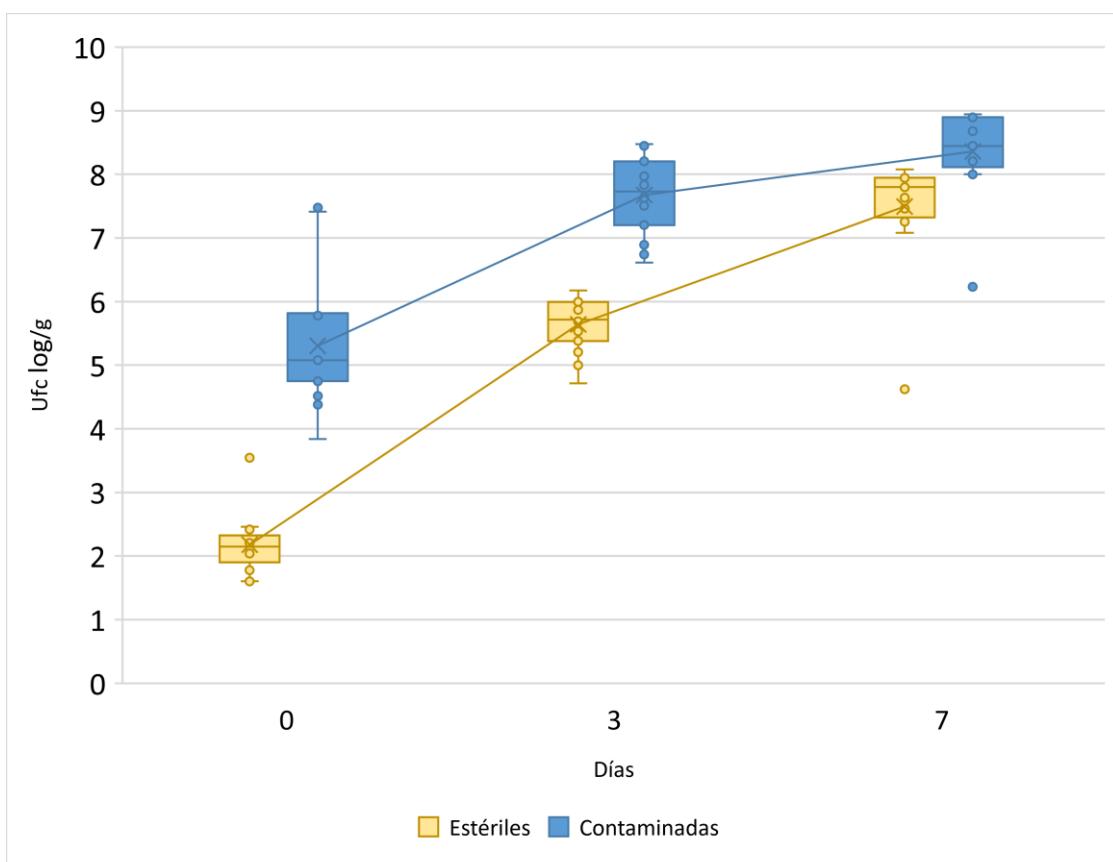


Figura 7: Diagrama de cajas de la evolución de los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos ($\log \text{UFC/g}$) después de almacenar las muestras 7 días a 7 °C.

Se observa que en ambos tratamientos la microbiota aerobia muestra un crecimiento continuo durante el tiempo. En el caso de las muestras control el recuento inicial fue inferior al de las muestras contaminadas (2,2 ufc log/g), llegando al final del periodo de conservación a 7,5 ufc log ufc/g. En el caso de las contaminadas el recuento inicial, aunque con cierta variabilidad, es notablemente superior (5,3 ufc log/g), aunque al final del estudio los recuentos fueron de alrededor de 8 log ufc/g. Parece ser, en ambos casos, que la fase exponencial de crecimiento microbiano tenga lugar entre los 0 y los 7 días, y que la tendencia a partir del último análisis sea el punto en el cual los microorganismos llegan a la fase estacionaria. En la Tabla 3 se presentan los resultados medios, desviación estándar y p-value para cada pareja de datos según tratamiento y para cada control de microorganismos aerobios mesófilos.

Tabla 3: Media y desviación estándar de los recuentos de microorganismos aerobios de las muestras control y contaminadas durante su conservación a 7 °C durante 7 días.

TIEMPO	CONTROL	CONTAMINADAS
Día 0	2,18 ± 0,46 ^{aA}	5,31 ± 1,03 ^{bA}
Día 3	5,64 ± 0,42 ^{aB}	7,68 ± 0,63 ^{bB}
Día 7	7,49 ± 0,85 ^{aC}	8,36 ± 0,68 ^{aB}

a-b Las letras minúsculas en la misma fila representan diferencias significativas (p-value < 0,05) entre las muestras control y contaminadas

A-B Las letras mayúsculas en la misma columna representan diferencias significativas (p-value < 0,05) durante el tiempo

Evolución de *Listeria monocytogenes*

En la Figura 8 se muestra la evolución de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en las muestras control y contaminadas a lo largo de los días de estudio.

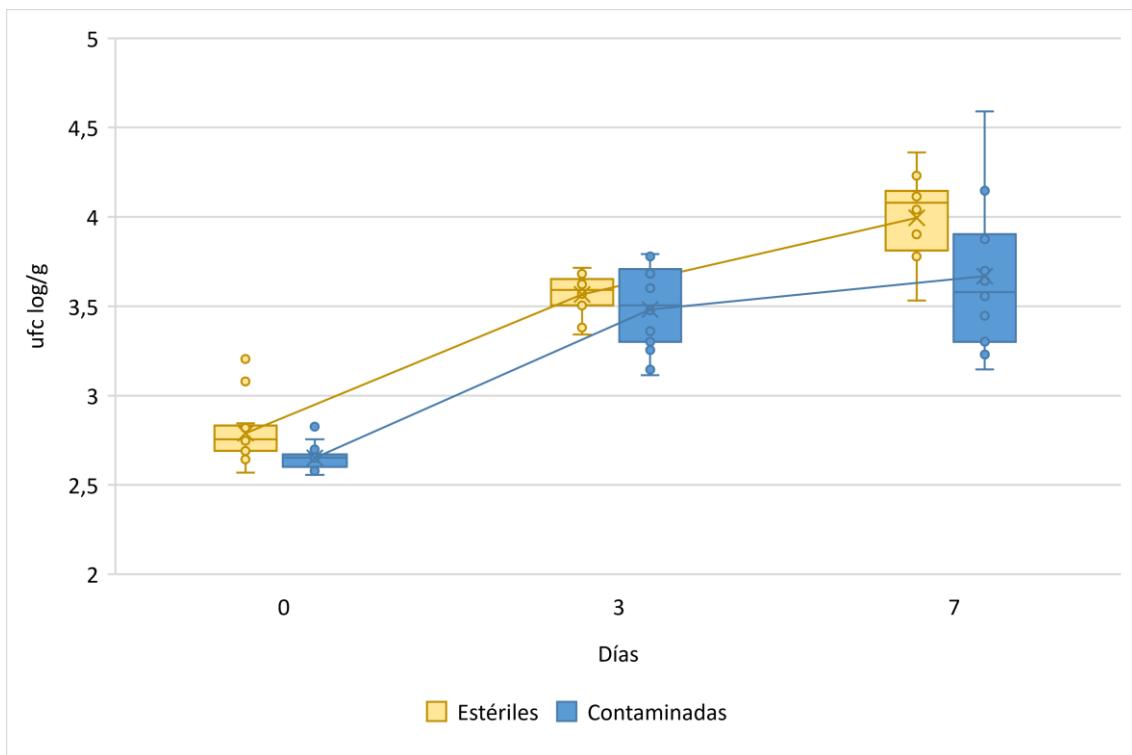


Figura 8: Diagrama de cajas de la evolución de los recuentos de *Listeria monocytogenes* (log ufc/g) después de almacenar las muestras 7 días a 7 °C.

En la evolución de *L. monocytogenes*, no se observaron diferencias estadísticas en los días 0 y 3, sin embargo, sí se apreciaron en el día 7, con valores inferiores en las muestras contaminadas. La tendencia en el crecimiento en ambas muestras entre los días 0 y 3 es muy similar, sin embargo, en las muestras contaminadas este crecimiento se ve ligeramente inhibido. En la Tabla 4 se detallan los valores medios, desviación estándar y p-value para cada pareja de datos por día de estudio.

Tabla 4: Media y desviación estándar de los recuentos de *L. monocytogenes* de las muestras control y contaminadas durante su conservación a 7 °C durante 7 días.

TIEMPO	CONTROL	CONTAMINADAS
Día 0	$2,79 \pm 0,16^{\text{aA}}$	$2,65 \pm 0,07^{\text{aA}}$
Día 3	$3,57 \pm 0,11^{\text{aAB}}$	$3,48 \pm 0,23^{\text{aB}}$
Día 7	$3,99 \pm 0,23^{\text{aC}}$	$3,67 \pm 0,41^{\text{bB}}$

a-b Las letras minúsculas en la misma fila representan diferencias significativas ($p\text{-value} < 0,05$) entre las muestras control y contaminadas

A-B Las letras mayúsculas en la misma columna representan diferencias significativas ($p\text{-value} < 0,05$) durante el tiempo

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos se observa que los microorganismos aerobios mesófilos incrementan notablemente en ambas muestras, no siendo del todo relevante el recuento inicial, pues en ambos casos se llega a recuentos de alrededor de 8 log ufc/g, coincidiendo con el inicio de la fase estacionaria de crecimiento microbiano. Este comportamiento responde a lo que Egli et al., (2001) comentan en su artículo de la “ley del mínimo” (o Ley de Liebig), en la que se condiciona la cantidad máxima de microorganismos que puede haber en un cultivo en función de la disponibilidad de nutrientes que haya. En este caso, la matriz alimentaria es el nutriente que es limitante para el crecimiento.

Asimismo, en los recuentos de *L. monocytogenes*, aunque no se observaron diferencias significativas en los días 0 y 3, éstas si se apreciaron en el séptimo día, en el que las muestras control 7 días presentaron un mayor recuento, lo que indica que se produjo un cierto enlentecimiento del crecimiento por parte del microorganismo patógeno en las condiciones de estudio de las muestras contaminadas, que puede ser debido a la competencia establecida con los microorganismos presentes en las muestras contaminadas. Esta observación, se explicaría en base a lo que se denomina efecto Jameson que puede describirse como “*una carrera entre especies para usar los recursos del medio ambiente para maximizar su crecimiento y el número de su población. Cuando esos recursos se agotan, la carrera termina y el crecimiento de cada especie en la población se detiene*” (Cornu et al., 2007).

En cuanto a los pH analizados, la dispersión de los resultados de las muestras contaminadas en el control final, es el reflejo de la diversidad microbiana presente en la contaminación forzada, ya que si esta fuera básicamente compuesta por BAL el pH habría tenido una tendencia negativa en todo momento, pero la media de resultados se mantiene estable, por lo que no se puede atribuir que toda la microbiota aerobia presente, o ni siquiera una parte elevada de la misma, sean BAL, de las cuales ya ha sido estudiado que tienen capacidad inhibitoria del crecimiento de la *L. monocytogenes* en productos RTE (Amézquita et al., 2001).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- La elevada carga microbiana de las muestras contaminadas no tuvo relevancia en la variación de pH de las muestras, mostrando una gran dispersión en el día 7 asociado, posiblemente, a una gran diversidad en la microbiota presente.
- Independientemente del recuento inicial, la tendencia en las muestras control y contaminadas fue similar, alcanzando la fase de crecimiento estacionario en el séptimo día con recuento finales de aproximadamente 8 log ufc/g, que podría explicarse por la Ley de Liebig.
- Se observan diferencias significativas en el control de *L.monocytogenes* al séptimo día, lo cual indica un enfriamiento de este microorganismo frente a las condiciones del producto. Todo parece indicar que la presencia de recuentos superiores a 8 ufc log/g de microorganismos aerobios hacen que esto ocurra.
- Este estudio aporta importancia a los análisis de flora acompañante recomendados por la Guía técnica de *Challenge test* ya que no deja de ser un principio de prudencia ante un falso negativo en las conclusiones del estudio, teniendo en cuenta el riesgo que ello conlleva.
- Como futuras líneas de trabajo que quedan abiertas a partir de este estudio, sería aconsejable estudiar qué pasaría si el estudio se prolongase hasta 6 días más. Según las tendencias observadas en este estudio, los microorganismos aerobios están cerca de llegar a su fase estacionaria, mientras que los recuentos de *L.monocytogenes* apuntan a que aún está en fase exponencial y sería de interés ver en qué momento, para cada condición, llega a la fase estacionaria.

BIBLIOGRAFIA

AMÉZQUITA, Alejandro; BRASHEARS, M. M. Competitive inhibition of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products by lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 2002, vol. 65, no 2, p. 316-325. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.2.316>

AWAIWANONT, Nattakarn; SMULDERS, Frans JM; PAULSEN, Peter. Growth potential of *Listeria monocytogenes* in traditional Austrian cooked-cured meat products. *Food Control*, 2015, vol. 50, p. 150-156. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.043>

CAMPANINI, Mirella; PEDRAZZONI, Ilaria; BARBUTI, Silvana; BALDINI, P. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 1993, vol. 20, no 3, p. 169-175. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90109-T](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90109-T)

CORNU, M.; BILLOIR, E.; BERGIS, H.; BEAUFORT, A.; ZULIANI, V. Modelling microbial competition in food: Application to the behaviour of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. *Food microbiology*, 2011, vol. 28, no 4, p. 639-647. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.007>

EGLI, Thomas; ZINN, Manfred. The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. *Biotechnology advances*, 2003, vol. 22, no 1-2, p. 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.006>

European Commission (EC) (2014). EUR Lm technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Disponible on-line:

[http://www.fsai.ie/uploadedFiles/EURL%20Lm_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelf-life%20studies_V3_2014-06-06%20\(2\).pdf](http://www.fsai.ie/uploadedFiles/EURL%20Lm_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelf-life%20studies_V3_2014-06-06%20(2).pdf)

European Comission (EC) (2000) Opinion of the Scientific Committee on Food in respect of *Listeria monocytogenes*. Disponible on-line:

https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out63_en.pdf

KERRY, Joseph P.; KERRY, John F. (ed.). *Processed meats: improving safety, nutrition and quality*. Elsevier, 2011. ISB 978-0-85709-294-6 (on-line)

LOW, J. C.; DONACHIE, William. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal*, 1997, vol. 153, no 1, p. 9-29.
[https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(97\)80005-6](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(97)80005-6)

MELLEFONT, L. A.; MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International journal of food microbiology*, 2008, vol. 121, no 2, p. 157-168.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.010>

NILSSON, Lilian; GRAM, Lone; HUSS, Hans Henrik. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *Journal of Food Protection*, 1999, vol. 62, no 4, p. 336-342.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.4.336>

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

Disponible on-line: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=ES>

SCHOBITZ, Renate; CIAMPI, Luigi; NAHUELQUIN, Yanina. *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro sur*, 2009, vol. 37, no 1, p. 1-8.
Disponible on-line: <http://mingaonline.uach.cl/pdf/agrosur/v37n1/art01.pdf>