



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA**

Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria

**EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA  
DEL LOMO DE SALMÓN (*SALMO SALAR*) TRAS LA  
APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS DE COCCIÓN AL VACÍO  
A TEMPERATURAS MODERADAS**

**Memoria presentada para optar al grado de  
Doctor en Ciencia de los Alimentos**

Doctoranda:

Sasha Mir Rivera Sánchez

Directora:

M<sup>a</sup> Manuela Hernández Herrero, Ph.D.  
Departamento de Ciencia Animal y  
de los Alimentos

Directora:

Montserrat Vila Brugalla, Ph.D.  
Agencia de Salud Pública de  
Barcelona (ASPB)

Director:

Artur Xavier Roig Sagués, Ph.D.  
Departamento de Ciencia Animal  
de los Alimentos

Bellaterra Cerdanyola del Vallès, 7 de junio del 2021



## DEDICATORIA

*A David*  
*A la meva família*  
*Als meus amics*

---



## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis:

Manoli, por darme la oportunidad de ser su doctoranda, por todo el tiempo dedicado en esta tesis, por su sabiduría, por ser un modelo que seguir, por transmitirme su pasión en la investigación, por su ayuda en muchos trámites administrativos, por escucharme cantar viejas canciones, por darme un lugar cuando lo necesité. Por cada una de ellas e infinitas razones siempre le estaré agradecida. ¡Ha sido un honor, Jefa!

Montse, por los viajes a Cornellá y las largas horas en el laboratorio, por compartir todo tu conocimiento en microbiología predictiva, por el compendio que me diste en julio 2018, por los 5 minutos de llamada que se convertían en horas, por tu guía y apoyo durante todo este proceso y por sobre todo por tu amistad. ¡Ah, y por esa horchata que me invitaste en Valls, estaba riquísima!

Artur, por su apoyo durante mi temporada en la UAB y confiar en mí, por su orientación y tiempo dedicado en la redacción de esta tesis, y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A Jordi, por el tiempo dedicado en la elaboración del programa computarizado.

*A Dolors per la teva valiosa companya al laboratori i les llargues hores de xerrades, però sobretot per la teva amistat inigualable. Mai oblides que a Puerto Rico tens un llar. ¡Visca Catalunya!*

A Sonia y Abi, por los buenos momentos que compartimos dentro y fuera de la universidad.

A Brenda, Elsa, Annabel y Lizette por siempre ser mi norte y un modelo que seguir. Por sus sabios consejos, ánimo y amor incondicional. Por haber sido cómplices de esta gran hazaña para alcanzar mis metas.

A mis padres, Ramón y Myrna, que, aunque al momento de separarnos sé que lo hicieron con tristeza estaban confiados en que todo sería para bien. ¡Son los mejores!... ¡Papi, terminé la tesis!

A mis amigos nocturnos y diurnos, porque durante las largas horas sentada frente al ordenador no podía faltar su compañía, aunque la gran parte del tiempo lo pasaban durmiendo. *¡Als meus amics!, gràcies Wifi, La Pepa i Yayi.*

*A David. Per estar al meu costat i estimarme, per donar-me suport durant aquest llarg camí y anims per continua al davant.*

A todas las personas que de alguna forma u otra hicieron todo esto posible, simplemente, ¡GRÀCIES!



## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	i
LISTADO DE FIGURAS.....	v
LISTADO DE TABLAS .....	ix
ABREVIATURAS.....	xi
<b>Capítulo 1   Introducción, Objetivos y Plan de Trabajo.....</b>	<b>8</b>
1.1   Introducción.....	3
1.2   Objetivos .....	8
1.2.1   Objetivo general.....	8
1.2.2   Objetivos específicos .....	8
1.3   Plan de trabajo .....	8
<b>Capítulo 2   Revisión Bibliográfica .....</b>	<b>11</b>
2.1   La cocción al vacío ( <i>Sous-Vide</i> ).....	13
2.1.1   Ingredientes de calidad.....	14
2.1.2   Envasado .....	15
2.1.3   Termosellado y envasado al vacío.....	16
2.1.4   Tratamiento térmico .....	16
2.1.5   Enfriamiento.....	18
2.1.6   Regeneración.....	19
2.2   Patógenos significativos a considerar en los procesos de cocción al vacío .....	19
2.3   Microbiología predictiva.....	23
2.3.1   Modelos predictivos .....	24
2.3.2   Modelos de inactivación/supervivencia .....	25
2.3.3   Modelo de crecimiento .....	28
2.3.4   Índices estadísticos de bondad en el ajuste de los modelos.....	29
2.4   Lesión celular .....	31
<b>Capítulo 3   Materiales y Métodos .....</b>	<b>11</b>
3.1   Selección de la matriz .....	37
3.2   Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	37
3.3   Preparación de la suspensión bacteriana de ensayo.....	38
3.4   Inoculación de las muestras.....	39
3.5   Envasado y almacenamiento inicial .....	39

3.6   Cocción al vacío y registro de temperaturas .....	39
3.7   Análisis microbiológicos .....	43
3.8   Cinética de letalidad y crecimiento .....	44
3.9   Análisis estadístico .....	46
<b>Capítulo 4   Resultados y Discusión.....</b>	<b>47</b>
4.1   Control de proceso .....	49
4.1.1   Validación del proceso de inoculación .....	49
4.1.2   Validación del proceso térmico por calor .....	50
4.1.3   Consideraciones iniciales sobre la letalidad (valor F) .....	57
4.2   <i>Listeria monocytogenes</i> .....	60
4.2.1   Efecto del tratamiento térmico de cocción al vacío en lomo de salmón ( <i>Salmo salar</i> ) inoculados con <i>Listeria monocytogenes</i> .....	60
4.2.2   Modelización de la inactivación térmica en condiciones no isotermas de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	62
4.2.3   Efecto del tratamiento térmico de cocción al vacío en la supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en lomo de salmón ( <i>Salmo salar</i> ) .....	69
4.2.4   Supervivencia y recuperación de <i>Listeria monocytogenes</i> en lomo de salmón ( <i>Salmo salar</i> ) tratado a 60 °C .....	69
4.2.5   Supervivencia y recuperación de <i>Listeria monocytogenes</i> en lomo de salmón ( <i>Salmo salar</i> ) tratado a 55 °C .....	83
4.3   <i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> .....	99
4.3.1   Efecto del tratamiento térmico de cocción al vacío en lomo de salmón ( <i>Salmo salar</i> ) inoculado con serovares de <i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> .....	99
4.3.2   Modelización de la inactivación térmica en condiciones no isotermas de <i>Salmonella enterica</i> .....	101
4.3.3   Efecto del tratamiento térmico de cocción al vacío en la supervivencia de <i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> en lomo de salmón .....	109
4.3.4   Supervivencia y recuperación de <i>Salmonella enterica</i> en lomo de salmón cocinado al vacío a 60 °C .....	110
4.3.5   Supervivencia y recuperación de <i>Salmonella enterica</i> en lomo de salmón cocinado al vacío a 55 °C .....	120
4.4   Discusión General .....	132
4.4.1   Lesión y estrés bacteriano .....	132

4.4.2   Variabilidad e incertidumbre.....	139
4.4.3   Seguridad Alimentaria.....	141
<b>Capítulo 5   Conclusiones.....</b>	<b>145</b>
<b>Capítulo 6   Referencias.....</b>	<b>149</b>





## RESUMEN

El término *sous vide* es una técnica de cocción donde un alimento crudo o parcialmente cocido se cocina en condiciones de vacío bajo un control de tiempo y temperatura que permite obtener un producto de alta calidad, especialmente si se aplican tratamientos térmicos suaves durante un periodo de tiempo más o menos prolongado, que varía en función del alimento a cocinar. Sin embargo, la aplicación de tratamientos suaves y prolongados pueden favorecer que aparezcan fenómenos de aclimatación al estrés o lesiones subletales en las células bacterianas, por lo que no serían suficientemente eficaces para eliminar o reducir microorganismos patógenos significativos como son *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. Es por ello, que existe cierta preocupación sobre los riesgos asociados en los sectores que aplican esta tecnología.

El objetivo de esta tesis doctoral fue evaluar el efecto letal de la aplicación de la técnica de cocción al vacío en condiciones no isotermas en un horno de vapor-convección a temperaturas suaves (55 y 60 °C) durante 30, 60 y 90 min en muestras de lomo de salmón inoculadas de forma individual o combinada con dos cepas de *Listeria monocytogenes* (CECT 4031 y Scott A) y dos serovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (serovar Enteritidis CECT 4300 y Senftenberg CECT 4565), y la posibilidad de su recuperación y crecimiento durante su posterior conservación por 30 días a temperaturas óptimas (4 °C) y de abuso (8 °C). Mediante el programa *Bioinactivation FE* se modelizaron los datos de inactivación no isotérmica, mientras que la herramienta *DMFit* del programa *Combase* permitió hacer el ajuste de los modelos de crecimiento. Además, para incorporar la variabilidad observada en los modelos predictivos se aplicó el método Monte Carlo.

Tras el tratamiento térmico a 55 °C, las curvas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. se ajustaron a un modelo no lineal, mientras que a 60 °C debido a la mayor intensidad del tratamiento no se pudo modelizar. Durante la conservación de las muestras de lomo de salmón en refrigeración, el comportamiento de las células de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. se dividió en tres escenarios: inactivación total, crecimiento/no crecimiento y viabilidad. La inactivación total solo se observó en *S. Enteritidis* en los

tratamientos a 60 °C durante 90 min y conservadas a 4 °C, en los que tras 30 días de conservación no se detectaron células viables. El crecimiento/no crecimiento, en el que una combinación de células viables y no viables pueden estar presentes de forma simultánea, se observó en la mayoría de los tratamientos a 60 °C de ambos patógenos. Mientras que el escenario de viabilidad en la que los recuentos fueron siempre superiores al límite de cuantificación (5 UFC/g), se observó principalmente en los tratamientos térmicos a 55 °C.

La recuperación y crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. estuvo determinada por la heterogeneidad en la respuesta individual celular. Además, otros factores pudieron favorecer los fenómenos de adaptación al estrés subletal y la recuperación de la lesión celular, como una velocidad de calentamiento lenta, la aplicación de temperaturas moderadas de tratamiento, largos periodos de conservación en refrigeración, así como los asociados al diseño experimental. Los resultados que se han obtenido en esta tesis hacen difícil establecer un margen de seguridad microbiológica en el lomo de salmón cuando se aplican tratamientos térmicos suaves de cocción al vacío.

## ABSTRACT

Sous Vide is a cooking technique where a raw or partially cooked food is cooked under vacuum conditions while controlling time and temperature to obtain consistent results and a high-quality product, particularly when mild heat treatments are applied during a prolonged period that varies according to the type of food. However, the application of mild and prolonged heat treatments may favor the generation of adaptation phenomena to stress or the sublethal damage to bacterial cells which may not be sufficiently effective to eliminate or reduce significantly pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. For this reason, there is concern about the risks associated with this type of product among those that use this technique.

The objective of this doctoral dissertation was to evaluate the lethal effect of cooking under a vacuum with isothermal conditions using a vapor-convection oven in mild temperatures (55 and 60 °C) during 30, 60 and 90 minutes among inoculated, individually and in combination, samples of salmon loin with two strains of *Listeria monocytogenes* (CECT 4031 y Scott A) and two serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (serovar Enteritidis CECT 4300 and Senftenberg CECT 4565), and their possibility of recovery and growth after conservation for 30 days at optimal temperature (4 °C) and abuse temperature (8 °C). The program *Bioinactivation FE* was used for data modelling of non-isothermal inactivation while the *DMFit* feature of the program *Combase* allowed to adjust the models of growth. In addition, to incorporate the observed variability in the predictive models, the Monte Carlo simulation was used.

After thermic treatment at 55 °C, the survival curve of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. were adjusted to a non-lineal model, while at 60 °C, due to the increased intensity of the treatment, could not be modelled. During the conservation of the salmon loin samples in refrigeration, the behavior of damaged cells of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. were divided in three scenarios: total inactivation, growth/no growth, and viability. Total inactivation was observed only in *S. Enteritidis* in treatment at 60 °C for 90 minutes, conserved at 4 °C and that after 30 days there were no viable cells detected. Growth/no growth, where a combination of viable cells and non-viable cells may

be present simultaneously, was observed in most of the treatments at 60 °C for both pathogens. While the viability scenario, in which bacterial counts were over the quantification limit (5 UFC/g), was observed primarily in thermic treatments at 55 °C.

The recovery and growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. was determined by the heterogeneity of the individual cell response. In addition, other factors may have favor adaptation phenomena to sublethal stress and the recovery of cellular damage such as: low rate of heat treatment, application of mild heat treatment, long periods of conservation in refrigeration as well as those associated with the experimental design. The results obtained in this dissertation make it difficult to establish a microbiological safety margin of salmon loin when cooked under a vacuum with mild heat treatments.

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>   Esquema del diseño experimental: Letalidad, recuperación y crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enterica</i> inoculadas en lomo de salmón, tras el tratamiento de cocción al vacío a 55 y 60 °C y conservadas a 4 y 8 °C. ....	<b>10</b>
<b>Figura 2</b>   Diagrama de proceso de la cocción al vacío .....	<b>14</b>
<b>Figura 3</b>   Bandeja de lomo de salmón. ....	<b>37</b>
<b>Figura 4</b>   Muestras de lomo de salmón. ....	<b>37</b>
<b>Figura 5</b>   Instrumento para inocular las muestras.....	<b>39</b>
<b>Figura 6</b>   Muestra de cubo de salmón envasado al vacío .....	<b>39</b>
<b>Figura 7</b>   Cámara del horno y sonda para el registro de temperatura interna. ....	<b>40</b>
<b>Figura 8</b>   Ejemplo de un registro de lote que muestra el perfil de temperatura del programa de cocción y un perfil detallado en formato de tabla. ....	<b>42</b>
<b>Figura 9</b>   Recuento en placa, 9A) colonias de <i>Listeria monocytogenes</i> en ALOA, 9B) colonias de <i>Salmonella</i> spp. en SM2. ....	<b>44</b>
<b>Figura 10</b>   Registros de las pruebas de distribución de temperatura de los hornos de 0.5 m <sup>3</sup> y 2 m <sup>3</sup> . ....	<b>52</b>
<b>Figura 11</b>   Curvas de penetración térmica para los tratamientos térmicos a 55 y 60 °C de cocción durante 30, 60 y 90 minutos. ....	<b>54</b>
<b>Figura 12</b>   Fase de calentamiento de las curvas de penetración térmica para los tratamientos térmicos a 55 °C de las muestras inoculadas con <i>Listeria monocytogenes</i> y Serovares de <i>Salmonella</i> . ....	<b>56</b>
<b>Figura 13</b>   Curva de supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031 a 55 °C generada por <i>Bioinactivation FE</i> (línea azul) ajustada al modelo <b>Geeraerd</b> . ....	<b>64</b>
<b>Figura 14</b>   Curva de supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A a 55 °C generada por <i>Bioinactivation FE</i> (línea azul) ajustada al modelo <b>Bigelow</b> . ....	<b>66</b>
<b>Figura 15</b>   Curva de supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A a 55 °C generada por <i>Bioinactivation FE</i> (línea azul) ajustada al modelo <b>Mafart</b> . ...	<b>66</b>
<b>Figura 16</b>   Recuento total de <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031 en las muestras tratadas a 60 °C y almacenadas a 4 y 8 °C.. ....	<b>71</b>

<b>Figura 17</b>   Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031 y tratadas a 60 °C con recuento superior del límite de cuantificación (>LC) (en rojo), recuento inferior al (<LC) (en amarillo) y muestras en las que la inactivación fue completa (ND) (en verde) durante el almacenamiento a 4 y 8 °C. ....	<b>73</b>
<b>Figura 18</b>   Recuento total de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A en las muestras tratadas a 60 °C y almacenadas a 4 y 8 °C.....	<b>75</b>
<b>Figura 19</b>   Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A y tratadas a 60 °C con recuento superior del límite de cuantificación (>LC) (en rojo), recuento inferior al (<LC) (en naranja) y muestras en las que la inactivación fue completa (ND) (en verde) durante el almacenamiento a 4 y 8 °C .....	<b>77</b>
<b>Figura 20</b>   Recuento total del <b>Combinado de cepas</b> de <i>Listeria monocytogenes</i> en las muestras tratadas a 60 °C y almacenadas a 4 y 8 °C ...	<b>79</b>
<b>Figura 21</b>   Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con el <b>Combinado de cepas</b> de <i>Listeria monocytogenes</i> y tratadas a 60 °C con recuento superior del límite de cuantificación (>LC) (en rojo), recuento inferior al (<LC) (en amarillo) y muestras en las que la inactivación fue completa (ND) (en verde) durante el almacenamiento a 4 y 8 °C. ....	<b>81</b>
<b>Figura 22</b>   Evolución del recuento total (puntos rojos) de <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031 en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 4 °C .....	<b>86</b>
<b>Figura 23</b>   Evolución del recuento total (puntos rojos) de <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031 en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 8 °C .....	<b>87</b>
<b>Figura 24</b>   Evolución del recuento total (puntos rojos) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 4 °C.....	<b>90</b>
<b>Figura 25</b>   Evolución del recuento total (puntos rojos) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 8 °C.....	<b>91</b>
<b>Figura 26</b>   Evolución del recuento total (puntos rojos) del <b>Combinado de cepas</b> de <i>Listeria monocytogenes</i> en las muestras tratadas a 55 °C durante 30 y 60 minutos refrigeradas a 4 °C.....	<b>95</b>
<b>Figura 27</b>   Evolución del recuento total (puntos rojos) del <b>Combinado de cepas</b> de <i>Listeria monocytogenes</i> en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 8 °C .....	<b>96</b>
<b>Figura 28</b>   Curva de supervivencia de <i>Salmonella</i> Enteritidis a 55 °C generada por <i>Bioinactivation</i> FE (línea azul) ajustada al modelo <b>Geeraerd</b> .....	<b>103</b>

<b>Figura 29</b>   Curva de supervivencia de <b>Salmonella Senftenberg</b> a <b>55 °C</b> generada por <i>Bioinactivation FE</i> (línea azul) ajustada al modelo <b>Bigelow</b> ....	<b>104</b>
<b>Figura 30</b>   Curva de supervivencia del <b>Combinado de serovares de Salmonella</b> a <b>55 °C</b> generada por <i>Bioinactivation FE</i> (línea azul) ajustada al modelo <b>Mafart</b> .....	<b>105</b>
<b>Figura 31</b>   Curva de supervivencia del <b>Combinado de serovares de Salmonella</b> a <b>55 °C</b> generada por <i>Bioinactivation FE</i> (línea azul) ajustada al modelo <b>Geeraerd</b> .....	<b>105</b>
<b>Figura 32</b>   Recuento total de <b>Salmonella Enteritidis</b> en las muestras tratadas a <b>60 °C</b> y almacenadas a <b>4 y 8 °C</b> .....	<b>110</b>
<b>Figura 33</b>   Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con <b>Salmonella Enteritidis</b> y tratadas a <b>60 °C</b> , con recuento superior del límite de cuantificación (>LC) (en rojo), recuento inferior al (<LC) (en amarillo) y muestras en las que la inactivación fue completa (ND) (en verde) durante el almacenamiento a <b>4 y 8 °C</b> . ....	<b>112</b>
<b>Figura 34</b>   Recuento total de <b>Salmonella Senftenberg</b> en las muestras tratadas a <b>60 °C</b> y almacenadas a <b>4 y 8 °C</b> .....	<b>114</b>
<b>Figura 35</b>   Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con <b>Salmonella Senftenberg</b> y tratadas a <b>60 °C</b> con recuento superior del límite de cuantificación (>LC), recuento inferior al límite de cuantificación (<LC) durante el almacenamiento a <b>4 y 8 °C</b> . ....	<b>114</b>
<b>Figura 36</b>   Evolución del recuento total (puntos rojos) de <b>Salmonella Senftenberg</b> en las muestras tratadas a <b>60 °C</b> durante <b>30 minutos</b> refrigeradas a <b>8 °C</b> . ....	<b>115</b>
<b>Figura 37</b>   Recuento total de <b>Combinado de serovares de Salmonella</b> en las muestras tratadas a <b>60 °C</b> y almacenadas a <b>4 °C</b> .....	<b>116</b>
<b>Figura 38</b>   Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con el <b>Combinado de serovares de Salmonella</b> tratadas a <b>60 °C</b> , con recuento superior del límite de cuantificación (>LC), recuento inferior al límite de cuantificación (<LC) durante el almacenamiento a <b>4 °C</b> .....	<b>117</b>
<b>Figura 39</b>   Evolución del recuento total (puntos rojos) del <b>Combinado de serovares de Salmonella</b> en las muestras tratadas a <b>60 °C</b> durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a <b>8 °C</b> .....	<b>119</b>
<b>Figura 40</b>   Recuento de <b>Salmonella Enteritidis</b> en las muestras tratadas a <b>55 °C</b> almacenadas a <b>4 °C</b> . ....	<b>121</b>
<b>Figura 41</b>   Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con <b>Salmonella Enteritidis</b> y tratadas a <b>55 °C</b> con recuento superior del límite de	

cuantificación (>LC) (en rojo) y recuento inferior al (<LC) (en amarillo) durante su conservación a 4 °C. .... 122

**Figura 42** | Evolución del recuento total (puntos rojos) de **Salmonella Enteritidis** en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 8 °C ..... 124

**Figura 43** | Recuento total de **Salmonella Senftenberg** en las muestras tratadas a 55 °C y almacenadas a 4 °C..... 126

**Figura 44** | Evolución del recuento total (puntos rojos) de **Salmonella Senftenberg** en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos y refrigeradas a 8 °C ..... 128

**Figura 45** | Recuento total de **Combinado de serovares de Salmonella** en las muestras tratadas a 55 °C y almacenadas a 4 °C. El límite de cuantificación (5 UFC / g) se muestra con una línea gris. .... 130

**Figura 46** | Evolución del recuento total (puntos rojos) de **Combinado de serovares de Salmonella** en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 8 °C..... 131

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>   Aplicaciones para móviles y tabletas que ofrecen combinaciones de tiempo y temperaturas para recetas a base de salmón.....	<b>6</b>
<b>Tabla 2</b>   Algunos tratamientos térmicos de cocción al vacío recomendados o sugeridos para los productos cocidos .....	<b>17</b>
<b>Tabla 3</b>   Recuento inicial medio (log UFC/g $\pm$ desviación estándar) de los microorganismos inoculados en las muestras de lomo de salmón ( <i>Salmo salar</i> ) tratadas a 55 y 60 °C de cocción.....	<b>50</b>
<b>Tabla 4</b>   Temperatura media (°C) durante la fase de mantenimiento y el valor F (min) estimado del lomo de salmón sometido a tratamientos de cocción al vacío a 55 y 60 °C.....	<b>59</b>
<b>Tabla 5</b>   Efecto del tratamiento térmico sobre <i>Listeria monocytogenes</i> spp. en función del tiempo y tratamiento de cocción aplicado. ....	<b>61</b>
<b>Tabla 6</b>   Parámetros del modelo (media $\pm$ desviación estándar e intervalos de confianza del 95%) de inactivación <i>Bioinactivation FE</i> de <i>Listeria monocytogenes</i> a 55 °C. ....	<b>68</b>
<b>Tabla 7</b>   Porcentaje de supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en las muestras tratadas a <b>60 °C</b> durante 30, 60, y 90 minutos y refrigeradas a <b>4 y 8 °C</b> . ....	<b>83</b>
<b>Tabla 8</b>   Valores de los parámetros cinéticos estimados de la evolución de <i>Listeria monocytogenes</i> <b>CECT 4031</b> generados por el análisis de Monte Carlo y DMFit en las muestras tratadas a <b>55 °C</b> y almacenamiento a <b>4 y 8 °C</b> . ....	<b>89</b>
<b>Tabla 9</b>   Valores de los parámetros cinéticos estimados de la evolución de <i>Listeria monocytogenes</i> <b>Scott A</b> generados por el análisis de Monte Carlo y DMFit en las muestras tratadas a <b>55 °C</b> y almacenamiento a <b>4 y 8 °C</b> . ....	<b>93</b>
<b>Tabla 10</b>   Valores de los parámetros estimados de la evolución del <b>Combinado de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i></b> generados por el análisis de Monte Carlo y DMFit en las muestras tratadas a <b>55 °C</b> y almacenamiento a <b>4 y 8 °C</b> . ....	<b>98</b>
<b>Tabla 11</b>   Efecto del tratamiento térmico sobre <i>Salmonella</i> spp. en función del tiempo y tratamiento de cocción aplicado.....	<b>100</b>
<b>Tabla 12</b>   Parámetros del modelo (media $\pm$ desviación estándar e intervalos de confianza del 95%) de inactivación <i>Bioinactivation FE</i> de <i>Salmonella enterica</i> subsp <i>enterica</i> a 55 °C. ....	<b>108</b>

**Tabla 13** | Valores de los parámetros cinéticos estimados de la evolución del **Combinado de serovares de *Salmonella*** generados por el análisis de Monte Carlo y DMFit en las muestras tratadas a **60 °C** y almacenamiento a **8 °C**.... **120**

**Tabla 14** | Valores de los parámetros cinéticos estimados de la evolución de ***Salmonella* Enteritidis** generados por el análisis de Monte Carlo y DMFit en las muestras tratadas a **55 °C** y almacenamiento a **8 °C**..... **125**

**Tabla 15** | Valores de los parámetros cinéticos estimados de la evolución de ***Salmonella* Senftenberg** generados por el análisis de Monte Carlo y DMFit en las muestras tratadas a **55 °C** y almacenamiento a **8 °C**. .... **129**

**Tabla 16** | Valores de los parámetros cinéticos estimados del crecimiento del **Combinado de serovares de *Salmonella*** generados por el análisis de Monte Carlo y DMFit en las muestras tratadas a **55 °C** y almacenamiento a **8 °C**.... **132**

**Tabla 17** | Comportamiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. posterior al tratamiento térmico en la cocción al vacío y durante su conservación en refrigeración ..... **134**

## ABREVIATURAS

$B_f$	<i>Bias factor</i> (Factor Sesgo)
Cc	parámetro que determina la fase de hombro en un modelo Weibull
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades)
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
EE. UU.	Estados Unidos de América
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Alimentos y Medicamentos)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i>
g	gramos
IC	Intervalo de confianza
LC	Límite de cuantificación
Lm CECT 4031	<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031
Lm Scott A	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A
Lm Combinado	<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031 y Scott A
min	minutos
log	Logaritmo
$N_f$	Número de células final (UFC/g)
$N_0$	Número de células inicial (UFC/g)
$N_{res}$	Densidad de la población residual
$p$	parámetro que determina la forma en el Modelo Mafart
RMSE	<i>Root Mean Square Error</i> (Raíz del error cuadrático medio)
SE	<i>Standard error of fit</i> (error estándar)

S. Enteritidis	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis CECT 4300
S. Senftenberg	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Senftenberg CECT 4565
S. Combinado	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar
Grmax	tasa máxima de crecimiento
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos)
valor D	tiempo de reducción decimal a una temperatura determinada
valor $\delta$	tiempo necesario para la primera reducción decimal a una temperatura determinada
valor F	tiempo de muerte térmica o tiempo requerido para causar una reducción declarada en una población de microorganismos o esporas a una temperatura particular
valor z	incremento en la temperatura necesaria para que el valor D se reduzca en un ciclo logarítmico



---

## Capítulo 1 | Introducción, Objetivos y Plan de Trabajo





# Capítulo 1

## 1.1 | Introducción

En la actualidad una de las técnicas que está adquiriendo interés en las cocinas de restaurantes y hogares es la cocción al vacío, tanto es así que el sector gastronómico la ha convertido en una herramienta esencial para los chefs (Baldwin, 2012; Rinaldi *et al.*, 2014). Esta técnica conocida desde los años 70, ha surgido nuevamente como un método de cocción que supera a otros métodos de uso convencional, ya que permite conservar el alimento por un periodo de tiempo más prolongado evitando, además, la pérdida de color y aromas del propio alimento. El proceso conlleva cocinar materias primas alimentarias dentro de bolsas termorresistentes bajo un tiempo y una temperatura controlada, seguido de un enfriamiento rápido y un almacenamiento a bajas temperaturas ( Schellekens y Martens, 1993; Armstrong, 2000; Sebastiá *et al.*, 2010).

Desde su desarrollo, la técnica de cocción al vacío ha tenido diferentes aplicaciones en el sector de la restauración colectiva, *catering* y la industria alimentaria en especial en productos cárnicos ( Armstrong 2000; Carlin, 2014). Otros procesos similares como el *cook-chill* y *cook-freeze* habían adquirido gran interés en la industria de la restauración, pero la cocción al vacío proporcionaba una mejor calidad sensorial y nutricional en los alimentos (Creed, 1998), así como un aumento en la vida útil de sobre 40 días (González-Fandos *et al.*, 2005; Peck y Stringer, 2005; Sebastiá *et al.*, 2010). A partir de los años 90 esta tecnología se desarrolla con un enfoque de fabricación, producto de la necesidad de la restauración colectiva de ser más eficiente y poder satisfacer las demandas de los clientes que exigían una alta calidad en el servicio. Factores como el estilo de vida, el uso de horno microondas y un aumento en el número de mujeres que trabajan fuera del hogar ( Schellekens & Martens, 1993; Espinosa *et al.*, 2016) contribuyeron a la creciente demanda de alimentos que requerían un menor

tiempo de preparación, una alta calidad en el producto, un sabor fresco y un bajo contenido de conservantes (Armstrong, 2000).

Sin embargo, a fin de conseguir una mejora notable de la calidad organoléptica del producto, la investigación gastronómica se centra cada vez más en reducir considerablemente la temperatura y aumentar el tiempo de cocción ( Agència de Salut Pública de Catalunya, 2012). Cuando se aplica un tratamiento térmico relativamente moderado (55-65 °C), surge una gran controversia con relación a la seguridad microbiológica de estos productos. Según Peck y Stringer (2005), los productos elaborados mediante esta tecnología suelen presentar valores elevados de actividad de agua y pH, en parte asociado a que en su formulación, en muchas ocasiones, se reduce o se elimina el contenido de aditivos. Estas condiciones en combinación con la baja presión parcial de oxígeno y la ausencia de microorganismos competidores pueden facilitar el desarrollo de microorganismos patógenos vegetativos y esporulados, anaerobios estrictos o facultativos.

Las enfermedades de transmisión alimentaria tienen una importante repercusión a nivel mundial, debido a la alta incidencia y el elevado costo que suponen a la sociedad (Bhaskar, 2016). Cada año en los Estados Unidos (EE. UU.), se estima que 9 millones de personas enferman a causa de una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA), de las cuales 56,000 son hospitalizadas y 1,300 mueren (IFSAC, 2020). En el 2018, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) reportó un total de 125 retiros (*recall*) del mercado de los cuales el 28% (n=35) fueron alimentos listos para el consumo. El 80% de los alimentos se clasificaron bajo la categoría Clase I que implica una situación de peligro para la salud, en la que existe una probabilidad razonable de que consumir el alimento cause problemas de salud o muerte. Del total de los retiros por *Listeria monocytogenes* (n=21), el 76% (n=16) fueron alimentos listos para el consumo y un 52% (n=11) también estaban contaminados con *Salmonella* spp. (FSIS, 2018). Además, hay una amplia variedad de patógenos no esporulados de transmisión alimentaria y de importancia para la salud pública que pueden estar presentes en los alimentos listos para el consumo tratados bajo la cocción al vacío, como *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* patogénicos,

*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas* spp., *Listeria monocytogenes* y especies de *Yersinia*. Particularmente, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* son capaces de multiplicarse a temperaturas de refrigeración (<5°C) durante un periodo de tiempo prolongado (7-21 días), así como diversas especies de *Salmonella* o de *Staphylococcus aureus*, bajo condiciones de abuso de temperaturas (5 a 12°C) (Schellekens y Martens, 1993).

Por otra parte, los grandes avances tecnológicos que se han experimentado en el siglo XXI dan paso a sistemas inteligentes de cocción en donde algunos de ellos se ven reflejados en la cocción al vacío. Se han desarrollado numerosas aplicaciones para móviles y tabletas que presentan combinaciones de tiempo y temperatura o para garantizar la calidad organoléptica de un producto, o para poder determinar el grado de seguridad microbiológico alcanzado al aplicar un tratamiento térmico moderado en presencia de posibles patógenos.

En la Tabla 1 se presenta algunas de las aplicaciones disponibles para la cocción al vacío en salmón, materia prima de interés de esta tesis doctoral. En estas aplicaciones, se observó que existe una gran variedad de combinaciones de tiempo y temperatura en platos elaborados a base de salmón y otros alimentos en donde la temperatura promedio es de 51.5 °C y un tiempo de 39.3 min. De hecho y de forma generalizada, el tiempo y la temperatura que se aplica en los productos a base de pescado es mucho más reducido que en los elaborados con carnes u hortalizas. Dicho par de tiempo y temperatura es suficiente, ya que la temperatura a la cual el colágeno se convierte en gelatina en el pescado y los mariscos es alrededor de 46-49 °C. Sin embargo, estas temperaturas resultan demasiado bajas para destruir cualquier patógeno en los alimentos (Baldwin, 2012). A pesar de ello, muchos *chefs* aplican temperaturas de 42 °C al salmón y a la trucha alpina, así como otros pescados, y crustáceos a 49 °C durante 15-20 min.

**Tabla 1** / Aplicaciones para móviles y tabletas que ofrecen combinaciones de tiempo y temperaturas para recetas a base de salmón.

<b>Aplicación *</b>	<b>Funciones</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<i>Joule: Sous Vide by ChefSteps</i>	Determina el tiempo de cocción a base del grosor del pescado (1.3, 2.5 y 3.8 cm), y si es fresco o congelado.	30 a 90	40.0 a 55.0
<i>Anova Culinary</i>	Ofrece una guía básica de combinaciones de tiempo y temperatura para una variedad de alimentos.	45	46.0
	Variedad de recetas a base de salmón	8 a 90	30 a 76.7
<i>Cook Pro</i>	Recetas limitadas. Grosor del salmón 3.2 cm.	30	40.0
<i>SousVide Pro Vac-Star</i>	Guía para diferentes pescados medio hecho, medio: grosor de 2- 3 cm	15-25	49.0 a 55.0
<i>Gourmia Sous Vide</i>	Ofrece una guía para una variedad de pesados y otros alimentos. La combinación de tiempo y temperatura dependerá del producto final de la materia prima.	10 a 30	40.0 a 60.0
<i>Sansaire</i>	La combinación de tiempo/temperatura dependerá	30 a 60	45.0 a 55.0
<i>Tender Sous Vide récipe</i>	Variedad de recetas a base de salmón.	8 a 80	43.0 a 87.0

\*La cocción se realiza mediante un dispositivo que registra el tiempo y temperatura. Elaboración propia.

La cocción al vacío a temperaturas relativamente bajas y tiempos de cocción prolongados ha surgido como una tecnología popular durante las últimas dos décadas (Sanchez Del Pulgar *et al.*, 2013). Según Baldwin (2012), la cocción al vacío es una herramienta poderosa en la cocina moderna ya que el control preciso de la temperatura da reproducibilidad superior, un mejor control de la cocción, una reducción de patógenos a niveles seguros a temperaturas más bajas (entre 42 °C a 70 °C) y más elección de la textura que los métodos tradicionales. El objetivo principal de esta tecnología es asegurar la inocuidad y extender la vida útil de los alimentos, a la vez de preservar las propiedades nutricionales y realzar los atributos sensoriales (Díaz Molins, 2009). Por ello, surge la necesidad de estudiar el comportamiento de los microorganismos patógenos en dos aspectos (Stringer *et al.*, 2012): 1) con relación a cuál es el

grado de seguridad alcanzado al aplicar condiciones de cocción moderados y 2) cuál sería la fecha de caducidad del producto conservado en refrigeración en función del tratamiento de cocción aplicado, basado en la posibilidad de crecimiento de microorganismos patógenos significativos, como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., ambos patógenos de frecuente implicación en brotes de toxiinfecciones alimentarias. Por lo tanto, es fundamental establecer la relación temperatura/tiempo óptima con el fin de alcanzar un equilibrio entre la seguridad microbiológica y la calidad organoléptica de los platos cocidos (Roldán, 2014).

El uso de la microbiología predictiva nos permite predecir el comportamiento de microorganismos patógenos y alterantes mediante modelos matemáticos que ofrecen curvas microbianas de cómo las bacterias responden a determinados factores (temperatura, pH,  $a_w$ , NaCl). A pesar de que hay datos sobre el comportamiento cinético de patógenos entre el rango de temperatura de 40 a 60 °C, no son suficientes, debido a: 1) que hay una menor cantidad de datos en la región de crecimiento/no crecimiento por su variabilidad e incertidumbre, 2) los tiempos de cocción utilizados en experimentos de inactivación son más cortos que los tiempos de cocción recomendados para productos *sous-vide*, y 3) el efecto de vacío, puede ser un factor significativo pero ha sido poco estudiado. Por lo tanto, la carencia de modelos predictivos en el rango de temperatura de 40 - 60 °C hace que sea difícil evaluar la seguridad de estos nuevos métodos de cocción, ya que en la actualidad la temperatura máxima en los modelos de crecimiento para patógenos vegetativos es de alrededor de 40 °C, mientras que los modelos de muerte térmica abarcan temperaturas mayores entre 55 °C - 60 °C (Stringer *et al.*, 2012). Para propósito de esta tesis se utilizó el programa *Combase Web Edition*, *Bioinactivation FE* y un modelo *ad hoc* de análisis de Monte Carlo, que serán discutidos en el capítulo 2.

Finalmente, desde un punto de vista de seguridad alimentaria, es fundamental validar la tecnología de cocción al vacío aplicando diferentes tratamientos de tiempo y temperatura con el objetivo de reducir los patógenos de mayor

relevancia para la salud pública hasta niveles que no supongan un riesgo en condiciones normales de almacenamiento y distribución (NACMCF, 2005).

## 1.2 | Objetivos

### 1.2.1 | Objetivo general

El objetivo general de esta tesis doctoral fue evaluar el efecto de la aplicación de la técnica de cocción al vacío a temperaturas moderadas (55 y 60 °C) en lomo de salmón para establecer su inocuidad, determinando el efecto letal del tratamiento térmico en condiciones no isotermas sobre los peligros significativos (*Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* subsp. *enterica*) y la posibilidad de su recuperación y crecimiento durante su posterior conservación a temperaturas óptimas (4 °C) y de abuso (8 °C).

### 1.2.2 | Objetivos específicos

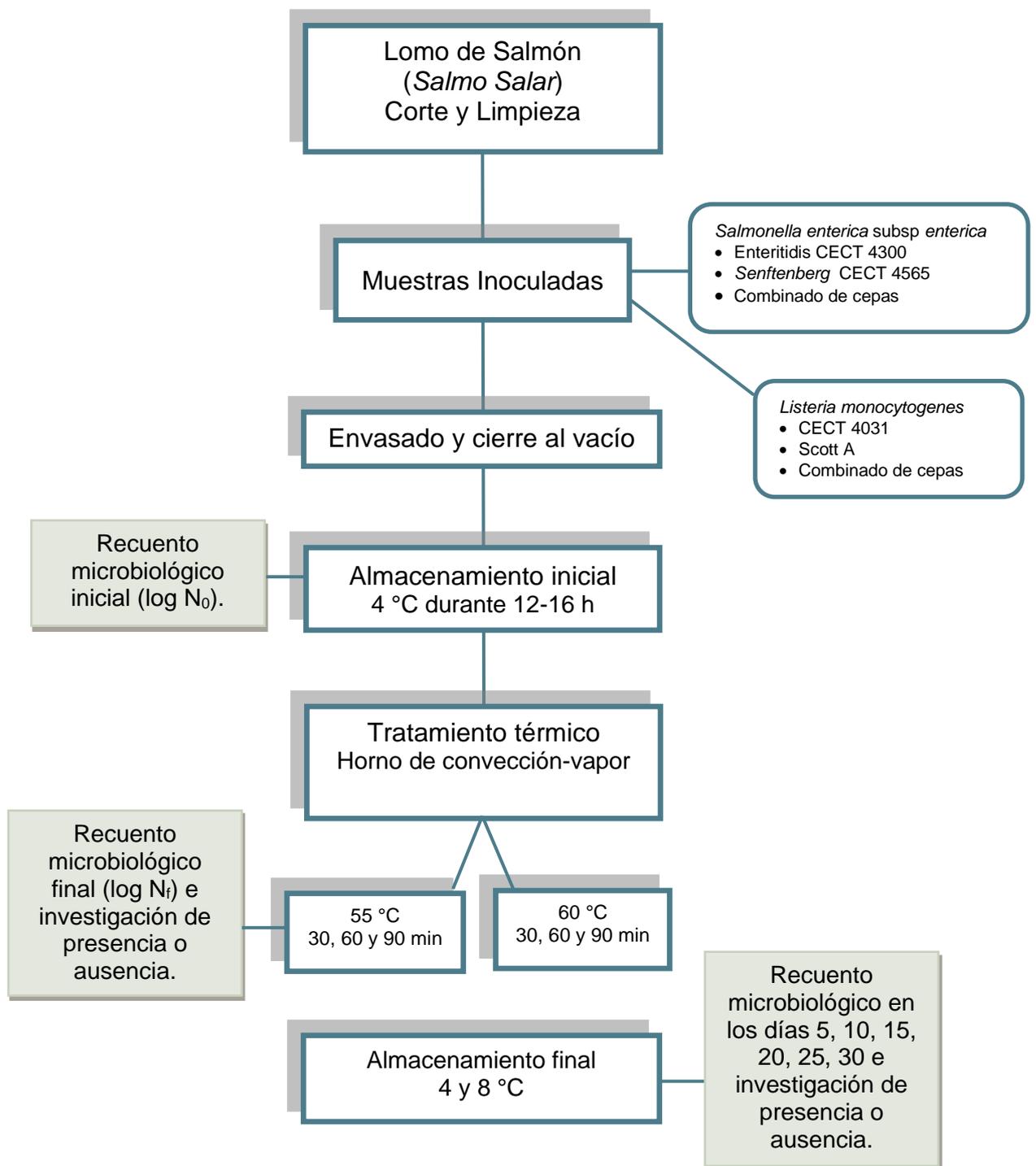
- Determinar el grado de letalidad alcanzado y modelizar la inactivación en condiciones no isotermas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* inoculadas en muestras de lomo de salmón cocidas al vacío a 55 y 60 °C, durante 30, 60 y 90 minutos.
- Evaluar la posibilidad de recuperación o crecimiento y aplicar modelos matemáticos para *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* inoculadas en lomo de salmón, durante su posterior conservación en condiciones óptimas (4 °C) y de abuso (8 °C).
- Evaluar la seguridad microbiológica de los tratamientos de cocción al vacío no isotérmicos aplicados a 55 y 60 °C durante 30, 60 y 90 minutos al lomo de salmón, en relación con *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*.

## 1.3 | Plan de trabajo

Esta tesis doctoral se realizó en el Centro Especial de Investigación - Planta de Tecnología de los Alimentos (CERPTA, Bellaterra, España), en el Laboratorio de Bioseguridad (NSB3) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma

de Barcelona (UAB) y en las instalaciones de *RATIONAL Ibérica Cooking Systems S.L.* en Cornellà de Llobregat, Barcelona.

De acuerdo con los objetivos, en la Figura 1 se presenta el diseño experimental que consistió en un diseño bifactorial en función de la temperatura y el tiempo de cocción, realizándose los experimentos por triplicado, con un total de 240 muestras por cepa bacteriana. Primero, se evaluó el efecto de los diferentes tratamientos de cocción al vacío aplicados para determinar el grado de letalidad. Para ello, las muestras de lomo de salmón inoculadas se trataron combinando diferentes temperaturas con el objetivo de realizar cocciones a 55 y 60 °C durante 30, 60 y 90 min. Posterior a ello, se determinó la capacidad de recuperación de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* en las muestras tratadas por la tecnología de cocción al vacío y conservadas a temperaturas óptimas de 4 °C y de abuso 8 °C, durante un periodo de 30 días de almacenamiento. Finalmente, se realizó el ajuste de modelos matemáticos junto al análisis estadístico de los resultados obtenidos.



**Figura 1** / Esquema del diseño experimental: Letalidad, recuperación y crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* inoculadas en lomo de salmón, tras el tratamiento de cocción al vacío a 55 y 60 °C y conservadas a 4 y 8 °C.

---

## Capítulo 2 | Revisión Bibliográfica







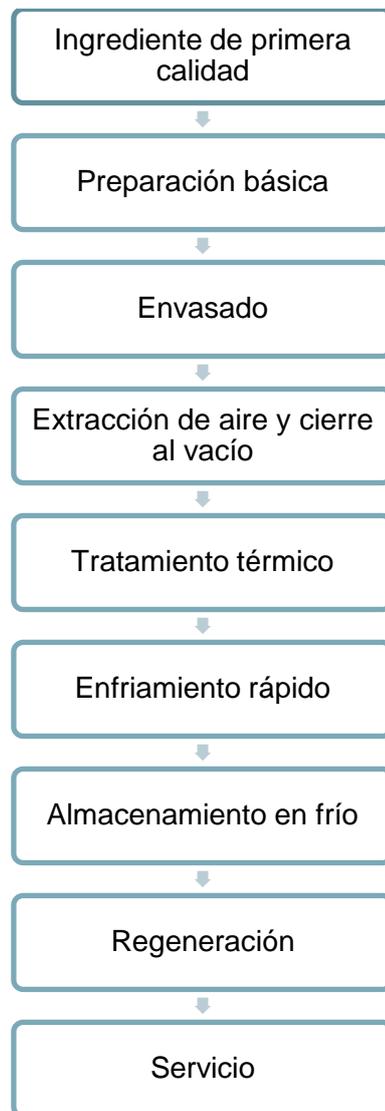
## Capítulo 2

### 2.1 | La cocción al vacío (*Sous-Vide*)

El término francés *sous-vide* se traduce como vacío y se utiliza para describir el proceso de envasar alimentos al vacío antes de aplicar un tratamiento térmico, seguido de un almacenamiento bajo condiciones de refrigeración ( Vaudagna *et al.*, 2002; García-Linares *et al.*, 2004). Esta tecnología descrita por primera vez por Sir Benjamin Thompson en 1799, fue redescubierta para su aplicación gastronómica por Georges Pralus a mediados de los años 70 del pasado siglo en el Restaurante *Troisgros* de Francia. Posteriormente, con el desarrollo del plástico de uso alimentario resistente a altas temperatura, Pralus experimentó con el vacío y la cocción lenta como una manera de extender la vida útil de un producto. Fue entonces que aplicó la cocción al vacío en una pieza de *foie gras* envasado en una bolsa de plástico, sellada al vacío y sumergida en un baño de agua caliente con temperaturas controladas, observando que además de reducirse la pérdida de peso, mejoraban significativamente las propiedades sensoriales.

Si bien es cierto que en los años 90 fue considerada como una técnica revolucionaria, originalmente deriva de la técnica tradicional *Cuisson en papillote*, que significa comida cocinada en bolsas de papel aceitado (Armstrong, 2000). Aunque ya existían otros sistemas de uso industrial con elementos de la cocción al vacío como el *Nacka*, el *AGS* y *CapKold* (Schellekens y Martens, 1993; Creed, 1998; Creed y Reeve, 1998), ésta ofrecía otros beneficios, como un aumento sustancial de la vida útil de hasta 45 días (Sebastiá *et al.*, 2010) y mejoras en la calidad sensorial y nutricional del producto. El *Sous Vide Advisory Committee* define la cocción al vacío como un sistema de restauración ininterrumpida en el que los alimentos crudos o parcialmente cocidos son envasados al vacío en un contenedor o una bolsa de plástico laminado, para

luego aplicar un tratamiento térmico controlado, seguido de un enfriado rápido, y al que después de un periodo de almacenamiento en refrigeración, se recalienta para su servicio (Creed, 1998). El proceso de la cocción al vacío se divide en diferentes etapas que se muestran en la Figura 2 (Baerdemaeker y Nicolaï, 1995), y que fueron utilizados parcialmente en esta tesis doctoral.



**Figura 2** | Diagrama de proceso de la cocción al vacío

### 2.1.1 | Ingredientes de calidad

La materia prima debe ser de alta calidad ya que durante el proceso de cocción los estándares de calidad no mejoran. Luego de comprar ingredientes de calidad, se debe tener el cuidado adecuado para garantizar que el valor de los

materiales no se deteriore durante el almacenamiento. Tras la preparación, es importante seguir los principios básicos de seguridad alimentaria y garantizar que se cumplan los niveles adecuados de temperatura y humedad para cada alimento en particular (Ghazala, 2004). Si se aplica un tratamiento inadecuado o se utilizan prácticas incorrectas de fabricación, como utilizar materias primas de baja calidad, o se producen fugas en el sellado y envasado (Nyati, 2000), los microorganismos patógenos pueden sobrevivir y contaminar el producto final tras el tratamiento térmico.

### **2.1.2 | Envasado**

En la elaboración, conservación y distribución de alimentos el material que más se utiliza es el plástico ya que ofrece diferentes posibilidades de presentación, dureza, flexibilidad y termorresistencia. Otras características que debe presentar el material de envasado son: propiedades barrera o protección al paso de los gases, humedad y olores, resistencia a altas temperaturas, baja permeabilidad de gases ( $O_2$ , vapor), resistencia mecánica a las presiones ocasionadas por el vacío y ser químicamente inerte (Schellekens, 1996; Villarino Rodriguez, 2009). Las bolsas de cocción deben tener una gran resistencia térmica soportando temperaturas de  $-40$  a  $120$  °C, lo que permitirá pasteurizar o realizar la cocción al vacío. Además, el almacenamiento en bolsas al vacío con baja permeabilidad al oxígeno evita el contacto del producto con el aire y, por consiguiente, los alimentos conservarán su textura, sabor, color y calidad microbiológica mucho más que un alimento del mismo tipo que no esté envasado al vacío (Schafheitle, 1990; Petersen, 1993). Según Rodgers (2007), la etapa de envasado es crucial en la cocción al vacío por su importancia en la inhibición del deterioro químico y microbiológico durante el procesado y almacenamiento, aumentando de esta forma la vida útil del producto.

En la Unión Europea, la normativa establece que los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos deben cumplir con el Reglamento (UE) N°10/2011 de la Comisión. La fabricación debe ser conforme con las Buenas Prácticas de Fabricación recogidas en el Reglamento (CE) 2023/2006, de 22 de diciembre de 2006 de la Comisión de manera tal que, *el material no debe transferir sus componentes al alimento en cantidades que*

*puedan presentar un peligro para la salud humana, provocar una modificación inaceptable de la composición de los alimentos, o provocar una alteración de las características organolépticas.* En la legislación de los Estado Unidos, el título 21 del *Code of Federal Regulation* (CFR, 2020) recoge de forma similar esta política.

### **2.1.3 | Termosellado y envasado al vacío**

Dentro de la tecnología de envasado en atmosfera protectora, el envasado al vacío es uno de los tres principales tipos de envasado. Su fin es prevenir el deterioro de los alimentos de factores ambientales (Restuccia *et al.*, 2010), químicos y microbiológicos, y mantener la calidad del alimento durante el tiempo de almacenamiento hasta su uso final (Kelsey, 1985). En el envasado al vacío se reduce la cantidad de oxígeno que hay dentro del envase y se sella herméticamente para que se mantenga en su interior el vacío (FDA, 2017). Es un sistema muy sencillo que conlleva la extracción de aire que hay en el contenido del envase. Si el proceso se realiza de forma correcta la cantidad de oxígeno residual es inferior al 1%. El envasado al vacío antes del tratamiento térmico evita la pérdida de nutrientes y compuestos volátiles durante la cocción, aportando al producto cocido mejores cualidades nutricionales y sensoriales (Church y Parsons, 2000).

### **2.1.4 | Tratamiento térmico**

Al aplicar un tratamiento térmico en un alimento, el objetivo principal es reducir o eliminar los microorganismos patógenos y a los causantes de deterioro para garantizar la calidad e inocuidad del producto. Baldwin (2012) señala que, dependiendo del tipo de alimento, el tiempo requerido en la cocción al vacío puede ser de unos minutos a varias horas. En la Tabla 2 se presentan normativas que han sido desarrolladas por diversas autoridades reguladoras con relación al tratamiento térmico que deben recibir estos productos frente a un determinado microorganismo. Actualmente, el proceso de pasteurización estándar en la industria alimentaria es 70 °C durante 2 minutos, lo que ha demostrado que proporciona una reducción de 6 unidades logarítmicas en *Listeria monocytogenes*, la más resistente al calor de los patógenos vegetativos no esporulados (Gaze *et al.*, 1989).

**Tabla 2** | Algunos tratamientos térmicos de cocción al vacío recomendados o sugeridos para los productos cocidos

Tratamiento	Vida útil(días)	Fuente	Microorganismo
70°C- 40 minutos	6	<i>Ministère de l'Agriculture</i> (1974, French Regulations (1988))	<i>Enterococcus faecalis</i>
70°C - 100 minutos	21		
70°C - 1000 minutos	42		
70°C - 2 minutos	5	DOH (1989)	<i>Listeria monocytogenes</i>
80°C- 26 minutos 90°C-4.5	hasta 8	SVAC (1991)	<i>Clostridium botulinum</i> tipo E
90°C- 10 minutos	>10	ACMSF (1992)	<i>Clostridium botulinum</i>
70°C- 2 minutos	Vida útil corta y temperatura de almacenamiento fiable	<i>Gould</i> (1996) (ECFF <i>Botulinum Working Party</i> )	<i>Listeria monocytogenes</i>
90°C- 10 minutos	Mayor vida útil		<i>Clostridium botulinum</i>

(Creed, 1998)

En la cocción al vacío, el ambiente anaeróbico generado puede potenciar el crecimiento de patógenos importantes. Al mismo tiempo, la inhibición de las bacterias alterantes es significativa, por lo que sin estos organismos competidores los cambios organolépticos relacionados con el color y sabor del productos se producen lentamente, tomando especial relevancia el desarrollo de los microorganismos patógenos (Ghazala, 2004). Los peligros microbiológicos de mayor significancia asociados a la cocción al vacío se caracterizan por tener cierta termorresistencia, capacidad de crecimiento a bajas temperaturas y tener naturaleza anaerobia facultativa o estricta (Schellekens y Martens, 1993). De tal forma que en su conservación en refrigeración junto a una vida útil prolongada son más vulnerables al abuso de temperatura (7-12 °C), facilitando el crecimiento de otros microorganismos patógenos (Moir y Szabo, 1998).

Las bacterias más preocupantes en la cocción al vacío son aquellas que forman esporas y pueden multiplicarse en ausencia de oxígeno a medida que el producto se calienta a la temperatura de procesamiento. Por ejemplo, se incluyen *Clostridium botulinum*, que crece a temperaturas entre 3.3 °C y 45 °C y *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*, que crecen entre 4 °C y 52.3 °C. Las bacterias

que no forman esporas y pueden tolerar condiciones bajas de oxígeno (anaerobios facultativos) también son motivo de preocupación e incluyen *Salmonella* spp., cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y, en alimentos marinos, *Vibrio* spp. Es por ello, que la temperatura mínima de cocción al vacío aceptable es de 55 °C, siendo recomendable que se produzca una reducción de 6.5 log en el caso de los productos a base de carne de animales de abasto. En los elaborados a base de carne de aves de corral se recomienda temperaturas de 60 °C, con una reducción de 7 unidades logarítmicas de *Salmonella* spp. (Fellows, 2017).

### **2.1.5 | Enfriamiento**

En el rango de temperatura entre 63 y 5 °C, los microorganismos patógenos sobrevivientes pueden multiplicarse fácilmente. Es por ello que el descenso de la temperatura debe ser lo más rápido posible para minimizar el crecimiento después de la cocción, durante las etapas de enfriamiento, regeneración, exposición y servicio (FSAI, 2006). La velocidad de enfriamiento puede variar dependiendo del tamaño del envase y del método de refrigeración, siendo esencial que se realice el enfriamiento rápido para el control del crecimiento de *C. perfringens*, *C. botulinum* y *B. cereus* y para maximizar la vida útil del producto (Armstrong, 2000).

El enfriamiento debe realizarse inmediatamente tras la finalización del tratamiento térmico, en un tiempo no superior a 30 minutos (Schellekens y Martens, 1993) con el fin de alcanzar una temperatura interna de 0-3 °C dentro de 90 minutos siguientes. Este parámetro tiene por objetivo prevenir cambios negativos en la calidad y la germinación y crecimiento de esporas supervivientes (Fellows, 2017). Sin embargo, en la práctica se han reportado dificultades con el enfriamiento (dentro de los 90 minutos siguientes) de envases de gran tamaño diseñados para el servicio de alimentos, tales como piezas grandes de carne. Para resolver dichos inconvenientes en ocasiones se aplica agua helada o nitrógeno líquido en lugar de utilizar un equipo de abatimiento. En el caso que no se alcanzara la velocidad de enfriamiento recomendada, se aconseja que al menos se reduzca la temperatura desde los 50 a 10 °C en 4 h, ya que es poco

probable que aumente el riesgo asociado al desarrollo de los microorganismos esporulados patógenos.

### **2.1.6 | Regeneración**

La regeneración de un producto cocido implica un recalentamiento y mantenimiento del producto a una temperatura de al menos 70 °C en el centro del producto (Ghazala, 2004) durante 2 minutos (Armstrong, 2000). Sin embargo, si el alimento va a ser consumido inmediatamente después de la regeneración, entonces es suficiente alcanzar una temperatura superior o igual a 63 °C (Díaz Molins, 2009). La regeneración de los alimentos tratados mediante cocción al vacío previamente a su servicio puede realizarse: a) recalentando dentro de la misma bolsa en un baño termostático o en un horno de vapor; b) recalentando dentro de la misma bolsa y aplicando posteriormente una doble cocción en una plancha, horno o freidora; c) recalentando fuera de la bolsa con un sistema tradicional mediante horno, sartén o microondas y d) perforando la bolsa y recalentando en un horno de microondas. No obstante, esta última práctica no se recomienda, ya que el calor generado en el horno de microondas no se distribuye de manera uniforme en el alimento. En caso de haber un mantenimiento posterior en caliente, como en las cocinas centrales de distribución, cocinas hospitalarias o servicio de banquetes, entre otros, se debe recalentar en el mínimo tiempo posible para alcanzar una temperatura igual o superior a 65°C en el centro del producto y garantizar esta temperatura durante el período de mantenimiento en caliente. En cualquier caso, el emplatado se debería realizarse con la mínima antelación posible (Agència de Salut Pública de Catalunya, 2012).

## **2.2 | Patógenos significativos a considerar en los procesos de cocción al vacío**

Producir alimentos saludables, nutritivos y seguros, requiere de estrategias eficientes para controlar los microorganismos patógenos que causan las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) (Abee *et al.*, 2016). Según la Organización Mundial de la Salud (2019), se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas por ingerir alimentos contaminados, causando 420,000 muertes. La causa de las ETA se asocia al consumo de

alimentos contaminados con bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas. A nivel mundial, este problema de salud pública ha ido en aumento, causando un considerable impacto socioeconómico y contribuyendo significativamente a la mortalidad y morbilidad poblacional.

En el año 2017, EE. UU. reportó un total de 841 brotes causados por ETA, ocasionando 14,481 enfermedades, 827 hospitalizaciones, 20 muertes y 14 retiros (*recalls*) de alimentos. Del total de las enfermedades reportadas, *Salmonella* spp. fue la segunda causa más común, lo que supone un 29 % de los brotes y un 34 % de las enfermedades. El porcentaje más alto de personas enfermas y hospitalizadas fue a causa de los brotes de *Listeria monocytogenes*, con un 97%, seguido de *Clostridium botulinum* (94%) (CDC, 2019). Del mismo modo, la *European Food Safety Authority* (EFSA) reportó a *Salmonella* como la segunda causa más común de ETA con una tendencia estable en los últimos cinco años, mientras que los casos confirmados de listeriosis aumentaron durante el periodo 2014-2018 (EFSA, 2019).

Por décadas, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* han sido dos de los principales patógenos causantes de ETA. Concretamente en la producción de alimentos cocidos-refrigerados, *Listeria monocytogenes* es uno de los principales patógenos a considerar, ya que tiene la capacidad de crecer a bajas temperaturas, tiene una amplia presencia en la naturaleza, y también por la gravedad de las enfermedades que causa (Díaz Molins, 2009; Sergelidis y Abraham, 2009), como meningitis, encefalitis, gastroenteritis, abortos en mujeres embarazadas e infecciones en los recién nacidos (Anónimo, 1992; Khelef *et al.*, 2006). Es una bacteria Gram-positiva, no formadora de esporas, que tiene una alta resistencia térmica en comparación a otros patógenos ( Schellekens y Martens, 1993; Murphy *et al.*, 2004a). El género *Listeria* incluye otras especies, aunque *L. monocytogenes* es el principal agente causal de la listeriosis en humanos (Magalhaes *et al.*, 2014). Su amplia distribución en el medio ambiente y su capacidad para crecer en la mayoría de los alimentos no ácidos, ofrecen a *Listeria monocytogenes* la oportunidad de contaminar los alimentos en diferentes puntos de la cadena alimentaria y multiplicarse (Adams y Moss, 2007). Además, la capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración hace que los alimentos

refrigerados con una vida útil comercial prolongada constituyan un riesgo al consumidor. Es uno de los patógenos más resistentes a la congelación (Ryser y Buchanan, 2013), pudiendo crecer a temperaturas tan bajas como  $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Lawley *et al.*, 2012), siendo la temperatura óptima de crecimiento de  $30\text{ a }37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el límite superior de  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Si bien *Listeria monocytogenes* no es particularmente resistente al calor, es más resistente que otros agentes patógenos en su forma vegetativa, como *Salmonella* y *E. coli* O157: H7 (Lawley *et al.*, 2012).

Los grupos de población que presentan un mayor riesgo son los recién nacidos, niños, personas de edad avanzada, mujeres embarazadas, y personas inmunocomprometidas. Aproximadamente el 95% de los aislamientos en humanos pertenecen a los serovares 4b, 1/2 a, y 1/2b (Khelef *et al.*, 2006). De entre las cepas de *Listeria monocytogenes*, el serotipo 4b es responsable del 33 al 50% de los casos humanos esporádicos, y el principal causante en todo el mundo de brotes de listeriosis de origen alimentario, tanto en Europa como en Estados Unidos (Ryser y Buchanan, 2013). De hecho, para garantizar la seguridad alimentaria en los alimentos listos para el consumo, el Reglamento (CE) N° 2073/2005, del 15 de noviembre de 2005 de la Comisión de la Unión Europea relativo a los *criterios microbiológicos aplicables a los alimentos* establece requisitos de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes*, y en función del tipo de alimento también para *Salmonella*. En EE. UU., desde la década de los 80, el Departamento de Agricultura adoptó una política de tolerancia cero para *Listeria monocytogenes* en los alimentos listos para el consumo (FSIS, 2003).

La mayoría de las especies de *Salmonella* son patógenas, aunque difieren en las características y la gravedad de la enfermedad que causan. Son bacilos Gram-negativo, no formadores de esporas, anaerobio facultativos y pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Adams y Moss, 2007). Se encuentra principalmente en el tracto intestinal de una amplia variedad de animales domésticos y salvajes, por lo que, una gran diversidad de productos alimenticios puede contaminarse de forma directa o indirecta por este patógeno. El género *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella enterica* con seis subespecies conformadas de diversos serotipos con más de 2,600 serotipos

identificados y *Salmonella bongori* (EFSA, 2014). Entre los serotipos que componen la especie de *Salmonella enterica*, los dos principales de preocupación actual en Europa y los EE. UU. son S. Enteritidis y S. Typhimurium. Su importancia se debe a la frecuencia de su aislamiento en los brotes de intoxicación alimentaria, y su elevada incidencia en carnes de animal de abasto, aves de corral y huevos (Wareing *et al.*, 2010).

*Salmonella* se ha establecido como el segundo agente causante de ETA. Según la EFSA, en el año 2018 se confirmaron un total de 91,857 casos (20.1 casos por 100.000 habitantes) tendencia que se ha mantenido durante los últimos 5 años. Los dos serotipos de *Salmonella* más comunes fueron S. Enteritidis y S. Typhimurium, representando un 49.9% y 13.0%, respectivamente, de todos los serotipos reportados en los casos confirmados producidos en humanos (N = 79,698) (EFSA, 2019). En 2015 la red *FoodNet* en los EE. UU., notificó un total de 7,719 casos de infección por *Salmonella* con una incidencia de 15.74 casos por cada 100.000 habitantes. De entre los 7,220 (93.5%) serotipos aislados, y al igual que en Europa, los serotipos más comunes aislados fueron S. Enteritidis con 1,388 (19.2%) y S. Typhimurium con 755 (10.4%).

La mayoría de especies de *Salmonella* crecen en un intervalo de temperatura de 7 a 48 °C, siendo el óptimo de 35 a 37 °C (Wareing *et al.*, 2010). Sin embargo, algunas presentan propiedades psicrótroficas, siendo capaces de crecer a temperaturas de refrigeración de entre 2 y 4 °C (Montville y Matthews, 2008). Así mismo, el pre-acondicionamiento de las células a bajas temperaturas, puede aumentar en gran medida el crecimiento y la supervivencia de *Salmonella* en productos refrigerados (Montville y Matthews, 2008).

Diversos países han establecido códigos de buenas prácticas para la producción de diversos productos alimenticios que incluyen medidas para controlar la *Salmonella*. En la UE el Reglamento 2073/2005 se estable un límite de no detectado en 25 g en diferentes categorías de alimentos, entre los que no se incluyen los alimentos listos para el consumo que no están destinados a ser calentados antes de ser consumidos, y que sí están regulado en la normativa de Estados Unidos. Además, hay establecidos requisitos específicos para el

etiquetado de los huevos no tratados para inactivar el patógeno y para el control de *Salmonella* en los alimentos preparados para poblaciones vulnerables (FDA,2000).

### **2.3 | Microbiología predictiva**

Conocida también como la “ecología microbiana cuantitativa”, la microbiología predictiva tiene como objetivo el uso de ecuaciones matemáticas para explicar el comportamiento de las poblaciones bacterianas expuestas a determinadas condiciones ambientales (Garre *et al.*, 2017). Los parámetros cinéticos estimados a partir de ecuaciones matemáticas se han utilizado para describir el crecimiento, la inactivación, la supervivencia o la probabilidad de crecimiento de patógenos y microorganismos causantes de deterioro en diversos alimentos (González *et al.*, 2019). Por lo que, predecir el comportamiento de una especie bacteriana en un alimento para un conjunto de condiciones intrínsecas y extrínsecas puede ofrecer ventajas y beneficios al profesional de la industria alimentaria, principalmente por la capacidad de determinar la vida útil de un alimento utilizando modelos matemáticos (O’Mahony y Seman, 2016).

Por décadas, se ha estudiado la capacidad que tienen los alimentos frente a diversos factores para favorecer el crecimiento y la supervivencia de microorganismos alterantes y patógenos inoculados. Esta metodología, tradicionalmente denominada como pruebas de desafío o *Challenge test*, se utiliza en el campo de la microbiología predictiva para obtener información sobre la estabilidad microbiana en una formulación de producto o para evaluar el comportamiento de un microorganismo específico. Si bien los métodos microbiológicos de laboratorio tradicional, como el método de recuento en placa, son el enfoque estándar para cuantificar los microorganismos en los alimentos, la microbiología predictiva se ha desarrollado como una alternativa complementaria efectiva y rápida para estimar recuentos microbianos (Huang, 2017). Actualmente, la microbiología predictiva forma parte de la gestión de la seguridad alimentaria en diversos productos de alimentos, y que se tiene en consideración en el Reglamento (CE) 2073/2005 sobre los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios establecido en el anexo II.

El primer modelo predictivo de inactivación térmica de esporas de *Clostridium botulinum* se desarrolló por Esty y Meyer (1922) (McMeekin y Ross, 2002; Arroyo-López *et al.*, 2014). Posteriormente, Scott (1937) tras realizar diferentes estudios, describió el potencial de utilizar los datos cinéticos de las respuestas de crecimiento microbiano para predecir la vida útil y la seguridad de los alimentos (McMeekin *et al.*, 2002). A partir de los años 1960 como consecuencia del número de brotes de toxiinfecciones alimentarias, se volvieron a considerar los estudios relacionados con la microbiología predictiva, presentando su auge en la década de 1980, ante la necesidad de proveer alimentos seguros y saludables. En ese período, Roberts y Jarvis (1983) cuestionaron el uso de los métodos microbiológicos tradicionales para determinar la calidad y seguridad de los alimentos, asentando, junto con el mayor desarrollo de la informática, las bases de la microbiología predictiva actual.

### **2.3.1 | Modelos predictivos**

La microbiología predictiva de los alimentos es un campo amplio que incluye diferentes conceptos y aplicaciones. Dentro de los modelos predictivos, una clasificación muy utilizada es la sugerida por Whiting y Buchanan (1993), que agrupa los modelos en “primarios”, “secundarios” y “terciarios”. Los modelos primarios son aquellos que reflejan el cambio de carga microbiana con respecto al tiempo (Valdramidis, 2016). El objetivo es obtener los parámetros de crecimiento/inhibición de la población microbiana en función de los tratamientos que inicialmente se establecen en un diseño experimental. Cuando es un modelo de crecimiento se dispone de diversos conjuntos de ecuaciones para ajustar los datos experimentales y obtener así los parámetros de crecimiento de los microorganismos (fase de latencia, tasa máxima de crecimiento específico y nivel máximo de población) mediante un procedimiento de regresión no lineal (Arroyo-López *et al.*, 2014).

Los modelos secundarios relacionan los parámetros cinéticos de los modelos primarios con factores ambientales, como el pH, la temperatura y la  $a_w$ . Se utilizan para caracterizar cuantitativamente el efecto de estos parámetros en función de los tratamientos que inicialmente se establecen en un diseño experimental. Un ejemplo de un modelo secundario son los modelos

probabilísticos que se utilizan para determinar los límites de crecimiento/no crecimiento de los microorganismos en función de variables ambientales (Arroyo-López *et al.*, 2014).

Los modelos terciarios, no son modelos en sí mismos, sino que integran los modelos primarios y secundarios en herramientas de *software* para proporcionar estimaciones del comportamiento microbiano en condiciones específicas definidas por los usuarios (Pérez-Rodríguez, 2014). En función de las condiciones ambientales se generan las predicciones automatizadas para diversos patógenos en alimentos específicos (Arroyo-López *et al.*, 2014). Los *softwares* pueden ser de acceso libre o de pago, entre los que podemos mencionar a “*Combase*”, “*Pathogen Modelling Program*”, o “*MicroHibro*”. Los modelos que se describen a continuación fueron los utilizados en el desarrollo de esta tesis.

### **2.3.2 | Modelos de inactivación/supervivencia**

En los modelos de predicción del efecto de la temperatura en la inactivación/supervivencia, presentan incertidumbres en su determinación. Si se considera que el rango de temperatura de crecimiento de un microorganismo patógeno es de aproximadamente 0–45 °C y la región máxima análoga para los modelos de inactivación térmica es de aproximadamente 45–100 °C, ¿Cómo se puede predecir la respuesta microbiana en función de perfiles de temperatura arbitrarios, es decir, mientras se cambia de la región de crecimiento a la región de inactivación, y luego, posiblemente, nuevamente a la región de crecimiento? (Pin *et al.*, 2013).

La evaluación del riesgo de los alimentos mínimamente procesados es un buen ejemplo que demuestra la necesidad de predecir las respuestas microbianas durante el cambio dinámico de los perfiles de temperatura. La cuantificación adecuada del estado fisiológico de las células jugará un papel crucial en el desarrollo de métodos apropiados para tal modelado dinámico (Pin *et al.*, 2013).

La forma convencional de calcular la eficacia de los tratamientos térmicos se basa en el supuesto de que las curvas de supervivencia de las células

vegetativas y las esporas bacterianas se rigen por una cinética de primer orden. En consecuencia, se utiliza una relación lineal entre el logaritmo decimal del número de microorganismos supervivientes y el tiempo de tratamiento a una temperatura dada para estimar el valor D (tiempo de reducción decimal). Sin embargo, en muchos casos, la curva de supervivencia de los microorganismos no es lineal y presenta una concavidad hacia abajo (presencia de un hombro) o una concavidad hacia arriba (presencia de una cola) (Mafart *et al.*, 2002). Los modelos de inactivación Bigelow, Mafart y Geeraerd se detallan a continuación, ya que fueron los modelos que presentaron el mejor ajuste a los datos experimentales de esta tesis.

El modelo de Bigelow (1921) se fundamenta en la premisa de que a una temperatura constante la densidad microbiana sigue una relación logarítmica lineal con el tiempo, como se presenta en la ecuación (1). De acuerdo con el modelo, N es el recuento microbiano que disminuye exponencialmente con el tiempo (t) requerido para obtener una reducción logarítmica bajo una temperatura constante, T, que se define por el valor  $D_T$ . Es decir, el tiempo necesario para reducir la población microbiana en un 90% con un tratamiento térmico a una temperatura T. Bigelow considera que el logaritmo del valor D varía linealmente con la temperatura, como se muestra en la ecuación (2) (Bigelow, 1921). La sensibilidad del valor D a los cambios de temperatura se cuantifica a través del valor z, que se podría definir como el incremento de temperatura necesario para una reducción de diez veces el valor D.  $T_{ref}$  es una temperatura de referencia definida por el usuario según el microorganismo objetivo para cada tipo de alimento (Garre *et al.*, 2018c; Peñalver-Soto *et al.*, 2019).

$$\frac{d\log_{10}N(t)}{dt} = -\frac{1}{D_T} \quad (1)$$

$$\log_{10}D_T = \log_{10}D_{T_{ref}} - \frac{T-T_{ref}}{z} \quad (2)$$

Como se ha mencionado, el modelo convencional de primer orden asume que las poblaciones microbianas son homogéneas desde el punto de vista de su resistencia al calor. Pero algunos investigadores (Fernández *et al.*, 1999; Peleg y Cole, 1998) asumen que, a una temperatura dada, el tiempo de exposición al calor, que causa la muerte de una célula o espora bacteriana es variable de un individuo a otro, y que la dispersión de la resistencia al calor individual se rige por una distribución Weibull. De forma que los modelos de inactivación Weibullianos se basan en la hipótesis de que la inactivación microbiana puede describirse como un fenómeno de falla, con curvas de supervivencia lineal, convexas o hacia arriba o cóncava o hacia abajo. El comportamiento no lineal de las poblaciones microbianas al aplicar un tratamiento térmico, observando fenómenos de “hombro” (*shoulder*) y “cola” (*tail*) conlleva al desarrollo de modelos predictivos que explican y modelan este tipo de comportamiento (McMeekin *et al.*, 2002; Huertas Baquero, 2008).

El modelo de Mafart se define bajo 4 parámetros ( $\delta$ ,  $p$ ,  $z$  y  $T_{ref}$ ) y se muestra en las ecuaciones 3 y 4 (Mafart *et al.*, 2002).

$$\frac{d\log_{10}N(t)}{dt} = -p \left(\frac{1}{\delta_T}\right)^p t^{p-1} \quad (3)$$

donde  $\delta_T$  se interpreta como el tiempo requerido para la primera reducción logarítmica para un tratamiento a una temperatura  $T$ ,  $p$  como es el factor que define la forma de la curva de supervivencia, que es equivalente al parámetro  $\beta$  en una distribución Weibull. Si  $p$  es igual a 1, la forma de la curva de supervivencia isotérmica es log-lineal y los resultados son equivalentes a los obtenidos utilizando el modelo de Bigelow, sin embargo, si  $p$  es  $<1$  describe una forma cóncava y si  $p > 1$  describe una forma convexa. El modelo de Mafart, al igual que el modelo de Bigelow, plantea la hipótesis de que la tasa de inactivación sigue una relación exponencial con la temperatura, utilizando un modelo secundario. El valor  $z$ , y la temperatura de referencia  $T_{ref}$ , tienen la misma interpretación que en el modelo de Bigelow. El parámetro  $\delta_{ref}$  representa el valor de  $\delta_T$  estimado a la temperatura de referencia (Peñalver-Soto *et al.*, 2019).

$$\log_{10} \delta_T = \log_{10} \delta_{T_{ref}} - \frac{T - T_{ref}}{z} \quad (4)$$

El modelo de Geeraerd (2000) también considera que la inactivación microbiana bajo estrés constante es log-lineal (ecuación 1). Sin embargo, incluye parámetros adicionales para tener en cuenta los efectos del “hombro” y la “cola” (ecuación 5). Para predecir el efecto del comportamiento microbiano no log-lineal, el modelo de Geeraerd (2000) tiene 4 parámetros ( $k_{maxT}$ ,  $T_{ref}$ ,  $z$  and  $N_{res}$ ) y 2 variables ( $N$  and  $C_c$ ). La descripción del efecto hombro se modela bajo el supuesto de que existe una sustancia teórica  $C_c$  que inhibe la inactivación microbiana y que decae con la velocidad  $k_{maxT}$ . El fenómeno de cola está definido por la existencia de una subpoblación residual a través del parámetro  $N_{res}$ . Esta población se considera más resistente al tratamiento térmico. La relación entre  $k_{max}$  y la temperatura se describe mediante una ecuación similar a la utilizada en el modelo de Bigelow (ecuación 6).

$$\frac{dC_c}{dt} = -k_{maxT} \cdot C_c \quad (5)$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + C_c}$$

$$\gamma = 1 - \frac{N_{res}}{N}$$

$$k_{maxT} = k_{max} 10^{-(T - T_{ref})/z} \quad (6)$$

### 2.3.3 | Modelo de crecimiento

Los modelos de crecimiento describen las cuatro fases de una población microbiana presente en un alimento: latencia, exponencial, estacionaria y muerte. En la primera fase ocurre un período de adaptación, donde las células bacterianas se transforman y se benefician del nuevo entorno. Luego, los microorganismos crecen exponencialmente hasta que alcanzan el nivel máximo de la población. Cuando la concentración de nutrientes o el estado fisiológico de

las células disminuye, la población microbiana comienza a descender (Pérez-Rodríguez, F. y Valero, 2013).

En este sentido, Baranyi y Roberts (1994) establecieron el modelo primario más utilizado para describir los datos de crecimiento microbiano. Mediante la herramienta *DMFit Web Edition* del programa computarizado *Combase*, se puede obtener el modelo, que describe una curva bacteriana sigmoidea con una interfaz más lineal, a diferencia de las curvas sigmoideas clásicas, que tienen una curvatura más pronunciada. El modelo de Baranyi y Roberts tiene 4 parámetros principales (valor inicial, fase de latencia,  $\mu_{max}$  y valor final) y 2 parámetros de curvatura:  $mCurv$  y  $nCurv$ , que se describen al principio y al final de la fase de crecimiento y dependen del modelo seleccionado por el usuario. Las ecuaciones (7) y (8) describen el modelo Baranyi y Roberts (1994),

$$\frac{dx}{dt} = \frac{q(t)}{q(t) + 1} \cdot \mu_{max} \cdot \left( 1 - \left( \frac{x(t)}{x_{max}} \right)^m \right) x(t) \quad (7)$$

$$h_0 = \ln \left( 1 + \frac{1}{q_0} \right) = \mu_{max} \lambda \quad (8)$$

donde  $x$  es el número de células en el tiempo  $t$ ,  $x_{max}$  la densidad máxima de células y  $q(t)$  es la concentración de un sustrato limitante, que cambia con el tiempo. El parámetro  $m$  caracteriza la curvatura antes de la fase estacionaria. El valor inicial de  $q$  ( $q_0$ ) es una medida del estado fisiológico inicial de las células y  $h_0$  ( $\lambda$ ) es el tiempo que las células necesitan para adaptarse al nuevo entorno antes de comenzar su crecimiento (Pérez-Rodríguez, F. y Valero, 2013).

#### 2.3.4 | Índices estadísticos de bondad en el ajuste de los modelos

Existen diferentes índices estadísticos sobre la bondad de ajuste que pueden ser utilizados para evaluar si una función matemática se ajusta a los datos experimentales (Pérez-Rodríguez y Valero, 2013). Uno de ellos es el coeficiente de determinación  $R^2$ , parámetro comúnmente utilizado para evaluar si un modelo lineal propuesto se ajusta o no a los datos experimentales, mediante un valor,

entre cero y uno, de forma que cuanto mayor sea, mejor será el ajuste de los datos al modelo (Sutherland y Bayliss, 1994). Otro parámetro muy similar, es el  $R^2$ ajustado ( $R^2_{adj}$ ), se utiliza en la regresión múltiple para ver el grado de intensidad o efectividad que tienen las variables independientes en explicar la variable dependiente, de forma que intenta penalizar la inclusión de una variable irrelevante, en caso de que sea un parámetro redundante (Geeraerd *et al.*, 2005). No obstante, el uso de ambas medidas es inapropiado para la regresión no lineal, ya que generalmente conduce a una visión muy optimista del éxito del proceso de modelización (Ratkowsky, 2004; Geeraerd *et al.*, 2005).

La raíz del error cuadrático medio o *root mean square error* (*RMSE*, por sus siglas en inglés) es un índice válido tanto para funciones matemáticas lineales como no lineales (Ratkowsky, 2004), ya que permite diferenciar entre un valor predicho por un modelo y un valor observado (Aguirre, 2012) como puede verse en la Ecuación 9.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n}} \quad (9)$$

donde  $Y_i$  corresponde al valor observado,  $\hat{Y}_i$  al valor predicho y  $n$  al número de puntos de datos u observaciones.

Ross (1996), propuso unas medidas para evaluar la capacidad de desempeño de los modelos matemáticos utilizados en microbiología predictiva y de esta manera ayudar en la toma de decisiones de seguridad y calidad de los alimentos. Es así que proporcionó una medida simple y cuantitativa sobre la confiabilidad del modelo. Uno de estos índices se denomina “factor sesgo” o *Bias factor* ( $B_f$ ), que es una medida que ofrece una estimación de la fiabilidad del modelo cuando se compara con observaciones que no se han utilizado para generarlo (Rodríguez, 2016).

Sin embargo, según McMeekin *et al.*, (1993), antes de evaluar los índices de bondad de ajuste, primero se deben analizar los residuos estandarizados, que son la distancia observada entre el punto de datos y el modelo ajustado, que reflejan la diferencia entre el modelo y los datos reales (van Boekel y Zwietering,

2007) . La suposición de normalidad para el término de error se puede determinar probando la normalidad en los residuos asociados a base de gráficas de probabilidad normal. Además, los supuestos de linealidad y homocedasticidad también se pueden evaluar observando los residuos estandarizados con el uso de gráficos de dispersión. Si ambos supuestos son ciertos, los residuos deben variar aleatoriamente alrededor de cero y la dispersión de los residuos debe ser aproximadamente la misma en toda la gráfica. Pero una debilidad notable del método de regresión es su sensibilidad a los valores atípicos, que también se pueden detectar al observar los residuos.

## 2.4 | Lesión celular

El procesamiento térmico es el método más confiable y el más utilizado en la industria alimentaria para la inactivación de microorganismos en la elaboración de productos alimenticios ya que proporciona alimentos seguros y estables bajo condiciones de almacenamiento (Verheyen *et al.*,2021). El proceso de pasteurización puede destruir o inactivar microorganismos patógenos mediante daño en la pared celular, la desnaturalización de proteínas y / o afectando reacciones en la función celular (Clemente-Carazo *et al.*,2020). Sin embargo, un número cada vez mayor de alimentos tratados mediante la cocción al vacío se cocinan a temperaturas suaves. Por lo tanto, son tratamientos en los que no existe una combinación equivalente de tiempo / temperatura que permita obtener una reducción de 6 log de *Listeria monocytogenes* (Vila,2019). Como consecuencia las células microbianas son capaces de desarrollar una respuesta fisiológica a temperaturas superiores a la temperatura máxima de crecimiento lo que podría incrementar su resistencia a tratamientos posteriores (Clemente-Carazo *et al.*,2020). La respuesta dinámica de los microorganismos a las condiciones ambientales (cambiantes) depende del comportamiento de las células individuales dentro de la población, lo que pudiera afectar la eficiencia de los procedimientos convencionales de inactivación por calor y la de los procesos no térmicos (Abee *et al.*, 2016).

Los microorganismos que sobreviven a procesos térmicos mínimamente procesados pueden adaptarse a su nuevo entorno y así comprometer la

seguridad del producto. Cuando los microorganismos detectan cambios desfavorables, pueden responder alterando la expresión genética de manera que aumenta su tolerancia al estrés percibido. Este fenómeno de adaptación al estrés tiene mayores implicaciones que simplemente mejorar la capacidad de supervivencia del microorganismo. La adaptación al estrés podría alterar las características de virulencia de los microorganismos patógenos y mejorar su capacidad para infectar a un huésped. Es posible que la adaptación se produzca más fácilmente cuando los microorganismos experimentan lesiones subletales (Yousef y Abdelhamid, 2019).

La resistencia de los microorganismos a los tratamientos térmicos varía ampliamente entre especies e incluso dentro de la misma especie. Las razones detrás de este comportamiento no siempre se conocen, y es cierto que los eventos finales que conducen a la inactivación de las células bacterianas por el calor no están completamente claros. El calor afecta a diversas estructuras y funciones celulares en diferente grado, y esas estructuras están interrelacionadas. Esta complejidad conduce a la presencia de células subletalmente dañadas con una variedad de lesiones, que solo podrán recuperarse y reanudar el crecimiento en condiciones ambientales adecuadas. Además, la supervivencia o inactivación de las bacterias vegetativas expuestas a tratamientos térmicos está influenciada por muchos factores, como las condiciones de crecimiento (temperatura, tiempo, composición del medio de crecimiento), exposición previa a lesiones, características fisicoquímicas del medio de tratamiento y condiciones ambientales después del tratamiento (Cebrián *et al.*, 2017).

Las bacterias han evolucionado en redes adaptadas para hacer frente a los desafíos de los entornos cambiantes y para sobrevivir en condiciones de estrés. Cuando las células bacterianas, que crecen a una temperatura óptima, se tratan a una temperatura más elevada, se desarrolla una respuesta de choque térmico y se induce la resistencia al calor y la síntesis de un conjunto de proteínas de choque térmico. La termorresistencia de las bacterias se ve afectada por una amplia variedad de factores genéticos, fisiológicos y ambientales. Cuando los

microorganismos desarrollan resistencia a los métodos de conservación de uso común, la calidad y la seguridad de los alimentos pueden verse afectadas y, por lo tanto, la comprensión de los mecanismos de adaptación al estrés juega un papel clave en el diseño de condiciones seguras de procesamiento de alimentos (Guevara *et al.*,2015)







---

## Capítulo 3 | Materiales y Métodos







# Capítulo 3

## 3.1 | Selección de la matriz

Los lomos de salmón (*Salmo salar*), procedentes de acuicultura y envasados en atmósfera modificada en bandejas de plástico (Figura 3), con un peso aproximado de entre 300-500 g, se adquirieron en un hipermercado localizado en Sant Cugat del Vallès (Barcelona, España). Tras su almacenamiento a 4 °C entre 12 a 16 horas y con el fin de garantizar la homogeneidad en el tamaño de las muestras, se procedió a eliminar las espinas, la piel y las partes más delgadas del lomo, obteniendo 9 unidades de muestra con un peso de entre 25-30 g y un grosor de 2.5 cm (Figura 4).



Figura 3 | Bandeja de lomo de salmón.



Figura 4 | Muestras de lomo de salmón.

## 3.2 | Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Enteritidis CECT 4300, *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Senftenberg CECT 4565 y *Listeria monocytogenes* CECT 4031 (serotipo 1/2a) se obtuvieron de la

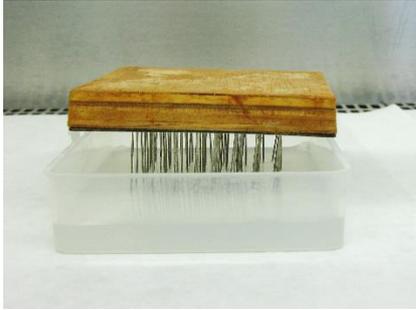
Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Universidad de Valencia, Valencia, España). La cepa de *Listeria monocytogenes* Scott A (serotipo 4b) se obtuvo del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA; Madrid, España). Las cepas, originalmente liofilizadas, se recuperaron adicionando a los viales 1 mL de caldo de Tripticasa Soja (TSB, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido), dejando la mezcla en reposo durante 30 min. Luego, ésta se transfirió a un tubo con 10 mL del mismo caldo TSB, que se incubó por 24 h a 37 °C. Posteriormente, una muestra del caldo se sembró en placas de Petri con agar Tripticasa Soja Agar (TSA, Oxoid), y se incubaron a 37 °C durante 24 h para comprobar la identidad y pureza del cultivo. A partir de este cultivo se sembraron tubos con TSA inclinado que se incubaron a 37 °C durante 24 h, y que posteriormente se conservaron a 4 °C. Estos fueron los cultivos de trabajo para los ensayos realizados, siendo su caducidad máxima de 9 semanas.

### **3.3 | Preparación de la suspensión bacteriana de ensayo**

A partir del cultivo de trabajo se realizaron dos subcultivos adicionales en placas de TSA incubadas a 37 °C durante 24 h para obtener los microorganismos en fase estacionaria. A partir del segundo subcultivo se preparó una suspensión del inóculo, en un tubo con 10 mL de una solución al 0.85% de cloruro de sodio (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España). Para obtener una concentración aproximada de  $10^8$  UFC/mL de cada cepa, se midió la turbidez de cada suspensión bacteriana de ensayo con un densitómetro (DENSIMAT, bioMérieux Marcy-l'Étoile, Francia), hasta la obtención de un valor de 1.0 unidades McFarland (UMcF) para las cepas de *Listeria monocytogenes* y 1.5 UMcF para los serovares de *Salmonella enterica*. A partir de ella, se realizó una dilución 1/10 en 100 mL de solución salina (solución de trabajo), a partir del cual se realizó la inoculación de los cubos de salmón.

### 3.4 | Inoculación de las muestras

La inoculación de las cepas se realizó en una cabina de seguridad tipo Bio-II-A (Telstar, Terrasa, España) ubicada en el Laboratorio de Bioseguridad de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Las muestras se inocularon utilizando un instrumento adaptado, el cual consiste en una base



**Figura 5 |** Instrumento para inocular las muestras

cuadrada de madera de 10 x 10 cm de lado, en la que se insertaron 64 agujas de 3 cm de largo y 0.70 mm de diámetro en forma de una matriz de 8 x 8 (Figura 5). Las agujas se sumergieron en la solución de trabajo y se introdujeron en las piezas de lomo de salmón unas 20 veces por cada lado, con el objetivo de conseguir un recuento aproximado de  $10^5$ - $10^6$  UFC/g.

### 3.5 | Envasado y almacenamiento inicial

Una vez realizada la inoculación, las muestras se envasaron individualmente en bolsas de poliamida y polietileno de 90  $\mu$ m de grosor en una medida de 20 x 15 cm, con un rango de resistencia térmica a temperaturas de -40 °C / +120 °C (VAC BCN, S.L, Barcelona, España), apropiadas para la cocción al vacío. El termosellado al vacío se realizó utilizando un equipo manual modelo EVT-7-VT (Tecnotrip, Terrasa, España). Una vez envasadas, las muestras se almacenaron a 4 °C durante 12 h antes de ser procesadas (Figura 6).



**Figura 6 |** Muestra de cubo de salmón envasado al vacío

### 3.6 | Cocción al vacío y registro de temperaturas

Para los tratamientos térmicos realizados en el 2013 y 2013 se utilizó un horno de convección a vapor (*SelfCookingCenter® 5 Senses, Rational Aktiengesellschaft, Landsberg am Lech, Alemania*) de 0.5 m<sup>3</sup> de capacidad, y en el 2014 uno de 2 m<sup>3</sup> de capacidad. La homogeneidad en la distribución del calor en toda la cámara de cocción de los hornos se verificó utilizando tres sensores (dispositivo TELID®251, Microsensys iID, Swizertland) colocados dentro del

horno durante un ciclo de cocción, en diferentes estantes y lo más lejos posible el uno del otro. También, se consideró la temperatura del aire obtenida con sensores de termopar conectados directamente a la electrónica del horno. Se calculó la desviación estándar de todos estos registros durante la fase de mantenimiento de un ciclo de cocción.

En los hornos se realizó su programación para aplicar tratamientos térmicos a 55 y 60 °C en centro del producto durante un periodo de 30, 60 y 90 min. Para establecer el tiempo de cocción de los tratamientos térmicos se utilizó como referencia el valor medio de D según van Asselt y Zwietering (2006), que implica que a una temperatura de 55 °C aplicada durante 30, 60 y 90 min la reducción logarítmica esperada para *Listeria monocytogenes* fuera de 2, 4 y 6 logaritmos, respectivamente. También, se tomó en consideración la mejora notable de la calidad organoléptica al utilizar temperaturas suaves y tiempos largos de cocción, propuesta por diferentes profesionales del sector gastronómico.

La temperatura interna se registró mediante una sonda térmica específica para productos *sous-vide* incorporada en el horno, realizando la punción a centro de producto, sin perder el vacío, a través de una junta autoadhesiva para uso alimentario. La sonda se introdujo en una muestra no inoculada localizada en la zona más fría del horno (Figura 7).



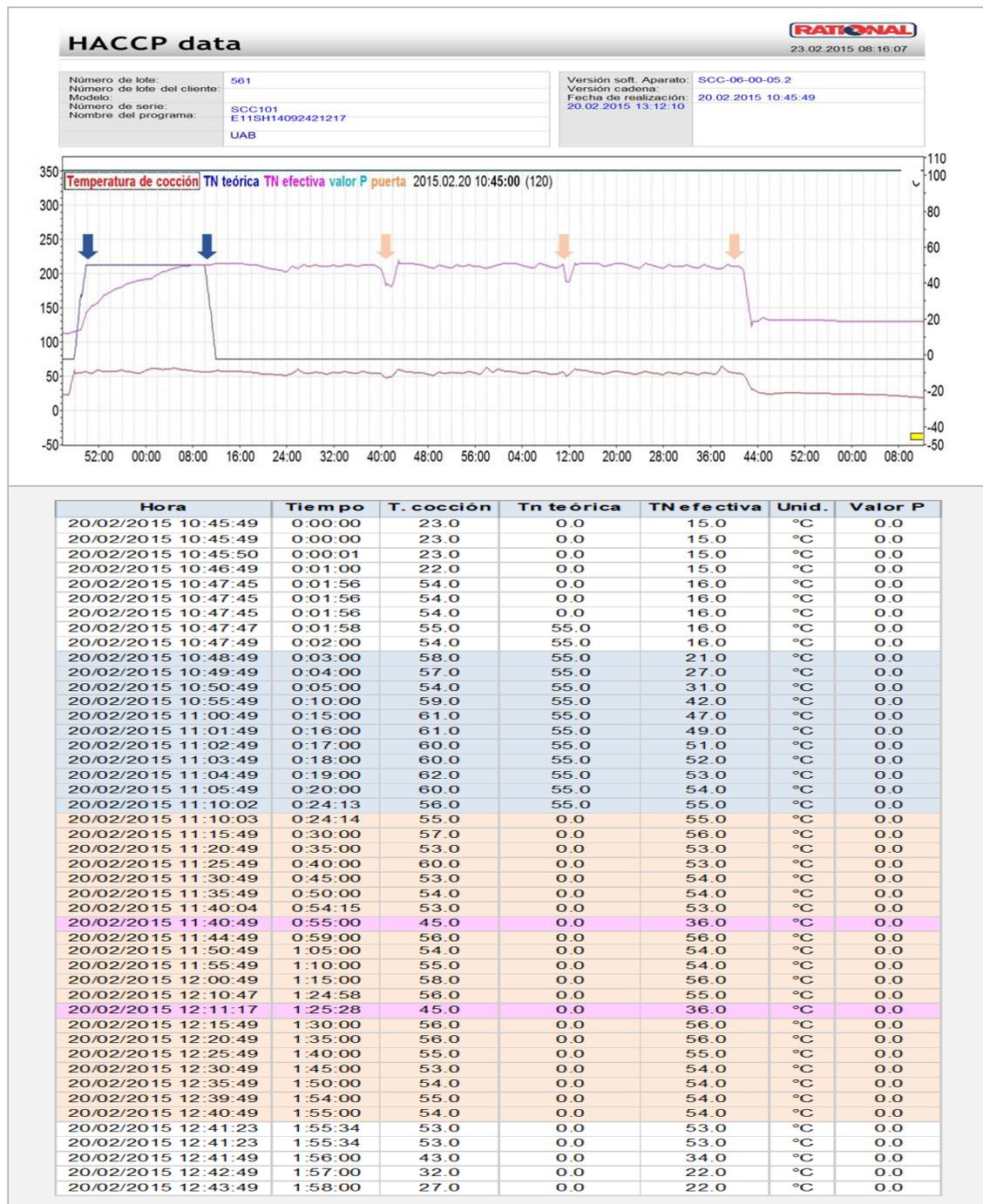
**Figura 7 |** Cámara del horno y sonda para el registro de temperatura interna.

El proceso de cocción se llevó a cabo en tres fases: precalentamiento, calentamiento y mantenimiento o cocción. Tras la fase de precalentamiento, se colocaron las muestras en el horno hasta que se alcanzó la temperatura deseada (55 o 60 °C). La duración de la fase de calentamiento varió entre 9 y 79 minutos, con un valor medio de 28.21 minutos, dependiendo de la cinética de calentamiento

programada. Tras la cocción, se procedió a enfriar rápidamente las muestras en un baño de hielo y agua, registrando la disminución de la temperatura mediante una sonda introducida en la muestra control (Tinytag, Gemini Data Loggers,

Reino Unido), hasta alcanzar una temperatura de entre 4 a 6 °C en unos 30 minutos. Posteriormente, las muestras se conservaron en refrigeración a 4 °C, considerando que es la temperatura máxima permitida en el Real Decreto 3484/2000, de 29 de diciembre, por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas (Anónimo, 2000). Para las muestras que fueron almacenadas a 8 °C se consideró las recomendaciones de la *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments* (AFSSA), de realizar evaluaciones a temperaturas de abuso en los estudios de pruebas de desafío (*Challenge test*), o de durabilidad (AFSSA, 2014).

En cada cocción se obtuvo el registro del tratamiento realizado y que se procesó mediante el *Software SelfCookingCenter®* (Versión 07-00-07.1). El registro se obtuvo en forma de gráfico y tabla, en el que se incluye la temperatura de la cámara del horno, la temperatura teórica programada, la temperatura a corazón del producto y el valor P (valor de pasteurización). Sin embargo, aunque el *software* calcula el valor P, el valor z específico para *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* no se parametrizaron en el *software*. Este valor se calculó en una hoja de cálculo basada en los registros de tiempo/temperatura obtenidos en el centro del producto. Los datos se comentarán con más detalle en la sección de Resultados y Discusión. En la Figura 8 se muestra un ejemplo de registro *HACCP data* de un lote. Después de la fase de precalentamiento, se inició la fase de calentamiento midiendo la temperatura interna. Esta fase terminó cuando el producto alcanzó la temperatura de cocción establecida, en el caso de la Figura 8 de 55 °C en el minuto 24. Posteriormente, durante la fase de cocción a 55 °C, las muestras se sacaron del horno en los minutos 30, 60 y 90 (ver picos descendentes en la temperatura ambiente y del producto en el gráfico de la Figura 8).



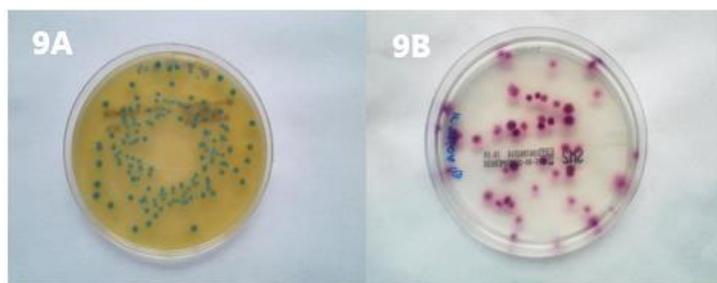
**Figura 8** / Ejemplo de un registro de lote que muestra el perfil de temperatura del programa de cocción y un perfil detallado en formato de tabla: a) temperatura del horno en rojo, b) temperatura real en centro del producto en rosa, c) temperatura programada en azul. Las flechas azules y de las celdas en la tabla indican el punto de tiempo inicial y final de la fase de calentamiento. Las flechas y celdas naranjas indican los minutos 30, 60 y 90 de la fase de mantenimiento/cocción.

### 3.7 | Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos se realizaron a los 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días de conservación *post*-tratamiento. Las muestras envasadas se abrieron de forma aséptica. Todo el contenido de la muestra se depositó en una bolsa estéril con filtro (Interscience, Saint-Nom-la-Bretêche, Francia), y se realizó una dilución (1:5) en agua de peptona tamponada (Oxoid) mediante un equipo gravimétrico automático (Delta Dilutor, IUL Instruments, GmbH, Königswinter, Alemania). A continuación, se procedió a homogeneizar las muestras en un homogeneizador de palas (BagMixer® 400 W Lab Blender, Interscience, Franca) durante 1.5 min. Las diluciones decimales seriadas se realizaron en tubos con agua de peptona tamponada (Oxoid), y se procedió a su siembra en medios de cultivo selectivos mediante un equipo automático de siembra en espiral (*Eddy Jet*, IUL Instruments, Barcelona). De acuerdo a la norma europea UNE-EN ISO 7218 (AENOR, 2008), para detectar recuentos microbianos bajos, se dispensó 1.0 mL de la dilución menor sobre la superficie de tres placas de 90 mm de diámetro con el medio de cultivo selectivo.

Para facilitar la recuperación y el recuento de *L. monocytogenes*, las muestras se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente. Para el recuento se utilizó el medio cromogénico selectivo *Listeria* de Ottaviani y Agosti (ALOA, BioMérieux). Las placas se incubaron a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 24-48 h según se indica en la UNE-EN ISO 11290-2 (AENOR, 2005).

El medio cromogénico utilizado para el recuento de *Salmonella* spp. fue el SM2 (BioMérieux), que se incubó a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 24 h. La Figura 9 muestra una imagen del aspecto de las colonias de *L. monocytogenes* (A) y *Salmonella* spp. (B) en los correspondientes medios selectivos cromogénicos.



**Figura 9** | Recuento en placa, 9A) colonias de *Listeria monocytogenes* en ALOA, 9B) colonias de *Salmonella* spp. en SM2.

El recuento de las placas se hizo de forma manual cuando la densidad de las colonias era baja, y mediante un contador de colonias automático (IUL Flash & Go; IUL micro, Barcelona, España)

cuando era elevada. Para determinar la presencia de bacterias por debajo del límite de detección o determinar la presencia de microorganismos con lesiones subletales, se procedió a la incubación de la dilución inicial de la muestra a 37 °C durante 24-48 h, procediendo posteriormente a detectar la presencia de células viables de los microorganismos en los medios de cultivo anteriormente descritos. La letalidad se calculó como la diferencia entre el logaritmo del recuento inicial  $N_0$  (correspondientes a las muestras crudas) y del recuento final  $N_f$  (correspondientes a las muestras después del tratamiento térmico).

### 3.8 | Cinética de letalidad y crecimiento

Los datos experimentales se introdujeron en una hoja de cálculo en Excel para transformar los resultados en unidades logarítmicas. Para modelizar el comportamiento de los datos obtenidos en la fase experimental se utilizaron los siguientes programas: para la letalidad *Bioinactivation FE* (<https://foodlab-upct.shinyapps.io/bioinactivationFE/>) y para el crecimiento *Combase DMFit Online* ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)).

#### 3.8.1 | *Bioinactivation FE*

*Bioinactivation FE* (Garre *et al.*, 2018a) es un programa que implementa funciones de modelización de inactivación microbiana no isotérmica y genera intervalos de confianza e intervalo de predicción para una curva de supervivencia. Para generar estos datos, una vez introducido el perfil de temperatura del tratamiento térmico aplicado y el recuento microbiano obtenido en la fase experimental, se seleccionaron diferentes modelos de inactivación (Bigelow, Mafart, Geeraerd y Peleg). Luego, se ajustaron los parámetros del modelo y las configuraciones del algoritmo. Con estos datos se generó un gráfico

con los datos experimentales y la predicción de la curva de supervivencia. De acuerdo con el modelo, se definieron varios parámetros de ajuste para obtener estimaciones de los valores, desviación estándar, intervalos de confianza del 95%, índice de bondad y convergencia. El factor sesgo ( $B_f$ ) y la raíz del error cuadrático medio ( $RMSE$ ) se utilizaron como medidas de bondad de ajuste de los modelos. Una segunda entrada del perfil de temperatura y recuento microbiano, tras realizar 10,000 iteraciones aplicando el método de Monte Carlo, permitió obtener los intervalos de predicción utilizando la varianza de los parámetros del modelo y una representación gráfica del modelo.

### 3.8.2 | **Combase**

El programa *Combase DMFit Online* ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)) se utilizó para modelizar el crecimiento/supervivencia bacteriana de los microorganismos patógenos. El modelo primario de Baranyi y Roberts (1994) se ajustó para las poblaciones bacterianas estimando el periodo de latencia en días (*lag/shoulder*), la velocidad máxima de crecimiento o *maximum rate* ( $G_{max}$  (log UFC/g/día), el número inicial y final de células (log UFC/g) y error estándar (*SE of Fit*). Luego de introducir el tiempo (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 días) y los valores de los recuentos expresados en unidades logarítmicas de las tres réplicas, se generó una representación gráfica de los datos con la curva y los puntos de crecimiento / supervivencia microbiológica, el modelo y el ajuste de los parámetros.

Tras obtener el ajuste de los parámetros reportados en el programa *Combase DMFit Online*, los datos se introdujeron en un programa creado *ad hoc* para aplicar el método de Monte Carlo (Poschet *et al.*, 2003; Posada-Izquierdo *et al.*, 2013) con el objetivo de calcular los intervalos de confianza de los parámetros cinéticos estimados ( $G_{max}$  y *lag*) y los valores de predicción. Se realizaron 10,000 iteraciones obteniendo un conjunto de nuevas curvas de crecimiento/supervivencia y de diferentes estimaciones en los parámetros cinéticos. Tanto las bandas de confianza como el intervalo de confianza del 95% fueron estimados a base de los percentiles 2.5 y 97.5 de la concentración predicha en cada momento por los modelos de crecimiento definidos por los 10,000 parámetros cinéticos simulados.

### **3.9 | Análisis estadístico**

Para proceder al análisis estadístico de los datos, los recuentos obtenidos de las tres réplicas se expresaron como log UFC/g. Se utilizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) para comparar la letalidad obtenida después de aplicar los diferentes tratamientos térmicos. Se utilizó la prueba de Tukey para obtener comparaciones pareadas entre medias muestrales. Los recuentos bacterianos obtenidos durante el tiempo de almacenamiento que no se pudieron modelar se transformaron en tres variables categóricas: no detección, detección por debajo del límite de cuantificación (LC) y detección por encima del LC. Se aplicó la prueba de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y el análisis de tablas de contingencia para estudiar la dependencia entre variables discretas. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 23 (IBM SPSS Statistics; IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.). En todos los análisis, los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos.

---

## Capítulo 4 | Resultados y Discusión



# Capítulo 4

## 4.1 | Control de proceso

### 4.1.1 | Validación del proceso de inoculación

Previamente al inicio de los ensayos, se validó el procedimiento de inoculación en lomos de salmón fresco, en cuanto a número de veces que se debía realizar la punción en cada uno de los lados (superior e inferior) del lomo, para conseguir un recuento entre 5-6 log UFC/g, siguiendo el procedimiento descrito por Vila (2019). La validación se efectuó con la cepa de *Listeria monocytogenes* Scott A realizando unas 20 punciones en profundidad por lado, obteniendo un recuento medio de  $5.52 \pm 0.18$  log UFC/g. En diferentes estudios en los que también se evaluó el efecto letal causado por los procesos tecnológicos se obtuvieron valores similares (Posada-Izquierdo *et al.*, 2013; Mataragas *et al.*, 2015; Vila, 2019), por lo que se consideró que el método de inoculación era el adecuado para realizar los experimentos diseñados en esta tesis doctoral.

En la Tabla 3 se presentan los recuentos iniciales obtenidos de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, tras su inoculación en lomos de salmón. Como media, el recuento inicial de *Listeria monocytogenes* fue de  $5.89 \pm 0.46$  log UFC/g y el de los serovares de *Salmonella* de  $5.51 \pm 0.68$  log UFC/g, variando en función del experimento entre 4.5 y 6.5 log UFC/g. La desviación estándar fue entre 0.02 y 0.47 log UFC/g en cada uno de los experimentos realizados, por lo que, si bien hubo ciertas diferencias entre experimentos, la variabilidad intra-experimental fue muy reducida. En los estudios de supervivencia realizados a 4 y a 8 °C de las muestras de salmón inoculadas con el combinado de cepas de *Salmonella*, el recuento inicial se presenta de forma independiente, debido a que durante la ejecución del ensayo se produjeron problemas técnicos en la nevera de conservación.

**Tabla 3** | Recuento inicial medio (log UFC/g  $\pm$  desviación estándar) de los microorganismos inoculados en las muestras de lomo de salmón (*Salmo salar*) tratadas a 55 y 60 °C de cocción.

Microorganismo	Cepa	Recuento Inicial	
		Tratamiento térmico	
		55 °C	60 °C
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 4031	6.23 $\pm$ 0.04	5.35 $\pm$ 0.07
	Scott A	6.22 $\pm$ 0.05	5.43 $\pm$ 0.47
	Combinado <sup>a</sup>	5.55 $\pm$ 0.10	6.54 $\pm$ 0.40
Serovares de <i>Salmonella enterica</i>	S. Enteritidis	6.56 $\pm$ 0.06	4.96 $\pm$ 0.13
	S. Senftenberg	6.03 $\pm$ 0.29	5.71 $\pm$ 0.33
	Combinado <sup>b</sup>	5.87 $\pm$ 0.08	5.03 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup> 4.44 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Combinado de las cepas de *L. monocytogenes* Scott A y CECET 4031

<sup>b</sup> Combinado de los dos serovares de *Salmonella enterica* (Enteritidis y Senftenberg)

<sup>c</sup> muestras conservadas a 4 °C

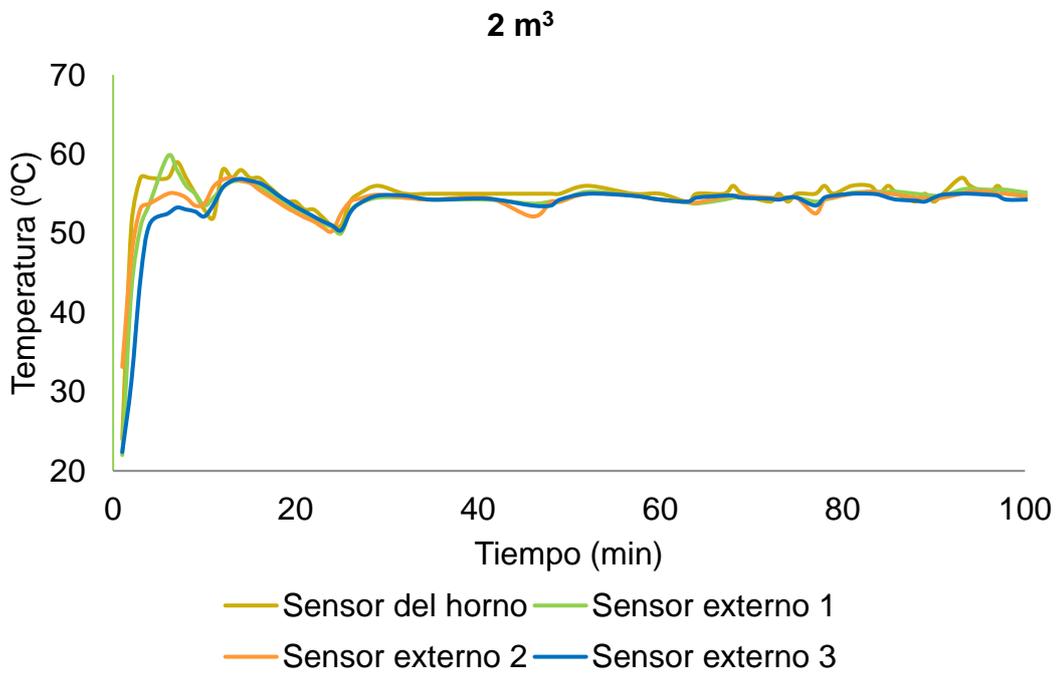
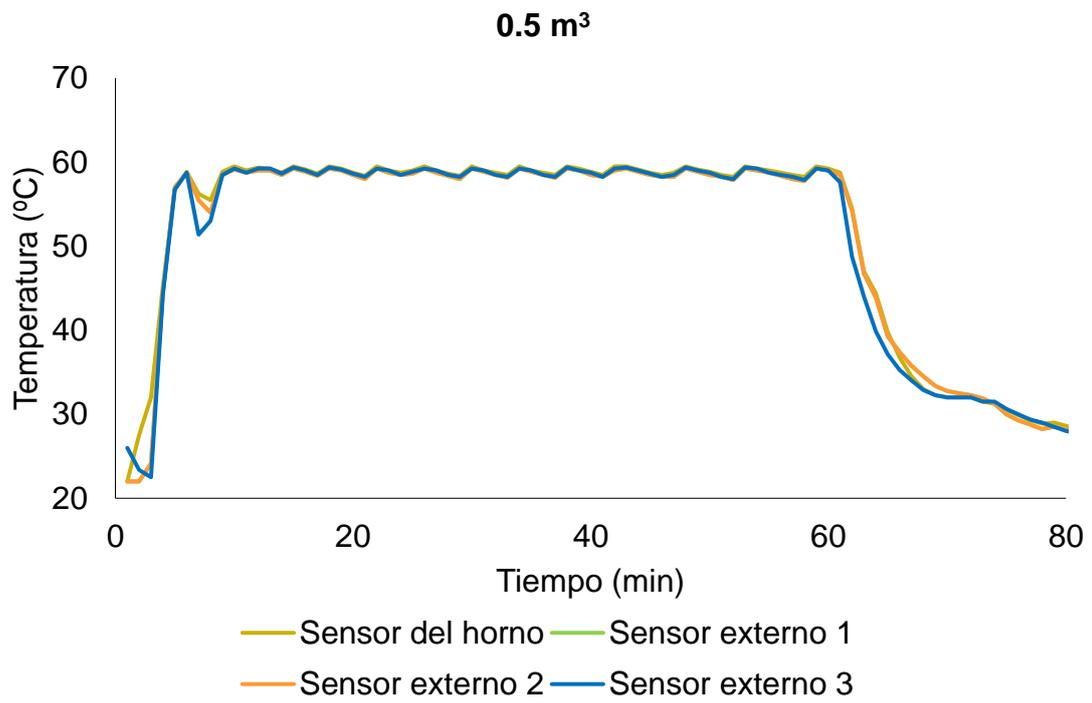
<sup>d</sup> muestras conservadas a 8 °C

#### 4.1.2 | Validación del proceso térmico por calor

Las empresas alimentarias que elaboran productos envasados y que posteriormente se procesan mediante tratamientos térmicos, utilizan dos sistemas de medición de temperatura para validar la seguridad de los productos: (1) las pruebas de homogeneidad de distribución de la temperatura (DT) y (2) las pruebas de penetración de calor (PC). La primera tiene como objetivo demostrar que el sistema de procesamiento (baño de agua, horno o autoclave) distribuye el calor de forma uniforme. Mientras que las pruebas de penetración de calor, se insertan sondas en el alimento con el objetivo de conocer la cinética de calentamiento o enfriamiento del producto, con el fin de establecer un régimen de proceso térmico seguro y proporcionar datos para analizar futuras desviaciones del proceso. En los últimos años, se han desarrollado *hardware* de medición de temperatura y *software* de análisis para hacer mediciones de los tratamientos térmicos, siendo de especial relevancia en los alimentos mínimamente procesados, cuya demanda ha aumentado por parte de los consumidores (Tucker, 2004). En los diferentes experimentos se realizaron pruebas DT y PC, para determinar si el funcionamiento del horno condicionaba, tanto la temperatura de la cámara de cocción como la temperatura de las muestras. Los resultados se muestran en las secciones siguientes.

#### **4.1.2.1 | Pruebas de distribución de la temperatura**

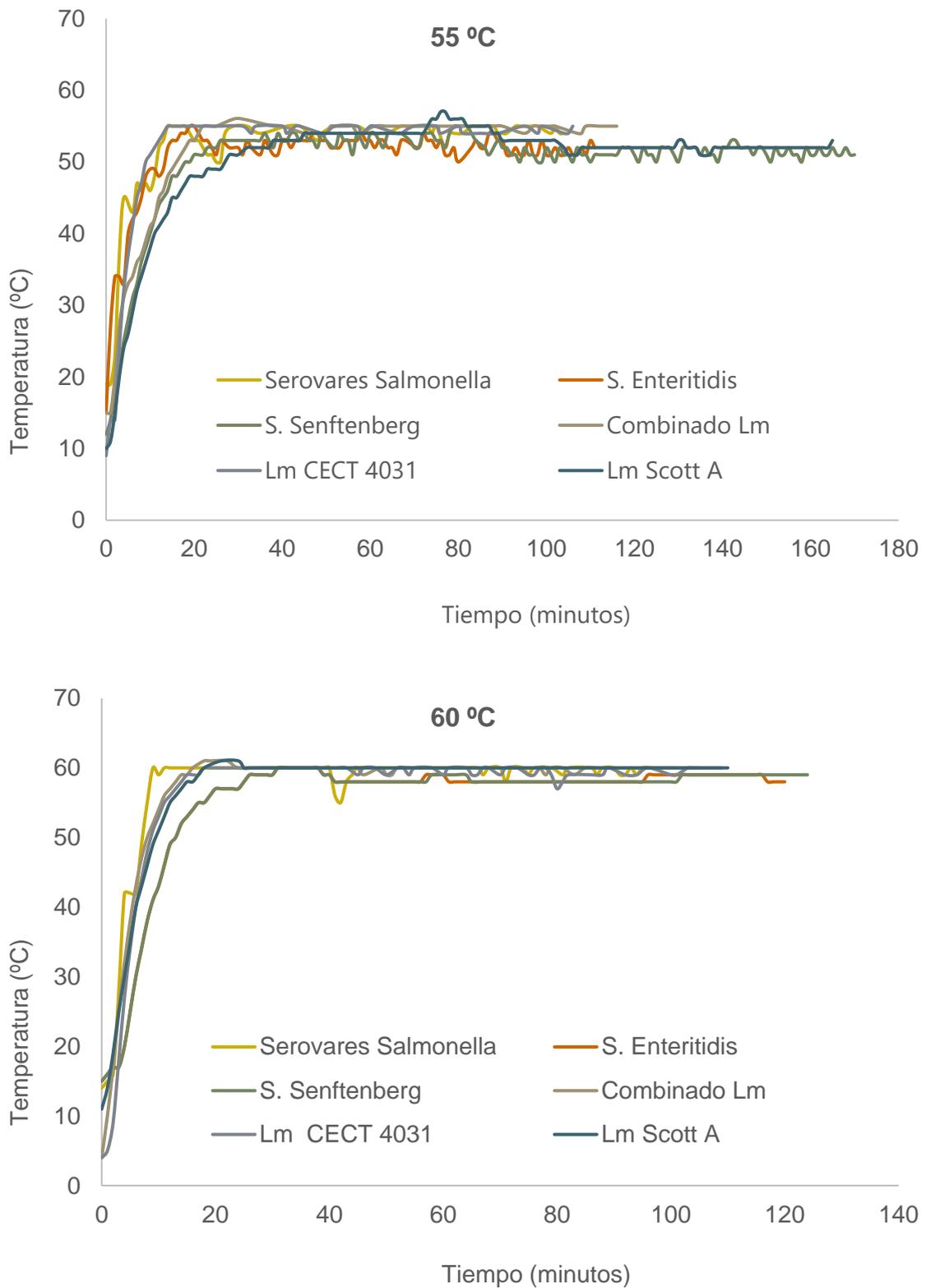
En los dos hornos utilizados se registró la temperatura con tres sensores de temperatura colocados en diferentes ubicaciones dentro de la cámara del horno (TELID®251 device, Microsensys iID, Swizertland) y el sensor del ambiente de la cámara del propio horno. Los registros obtenidos durante la fase de mantenimiento mostraron muy poca variabilidad, como se presenta en la Figura 10, con una desviación estándar de 0.20 y 0.47 °C en los hornos de 0.5 y de 2 m<sup>3</sup>, respectivamente. Esta desviación fue correcta, si se tiene en cuenta que en la práctica común se considera que la fase de mantenimiento se inicia cuando la temperatura se ha estabilizado y se obtiene una oscilación de la temperatura de alrededor de 1 °C (Tucker, 2004).



**Figura 10** | Registros de las pruebas de distribución de temperatura de los hornos de 0.5 m<sup>3</sup> y 2 m<sup>3</sup>.

#### **4.1.2.2 | Pruebas de penetración del calor**

En la Figura 11 se muestra las curvas de penetración térmica en los lomos de salmón inoculados para los tratamientos a 55 y 60 °C de cocción durante 30, 60 y 90 min. La prueba de penetración del calor se realizó en una muestra de lomo de salmón no inoculada a corazón del producto, ubicada en la zona más fría del horno de convección-vapor. Como se puede observar, tanto en la fase de mantenimiento como en la fase de calentamiento, se aprecian oscilaciones cuya relevancia se desarrollará a continuación de forma individual en función del microorganismo estudiado.

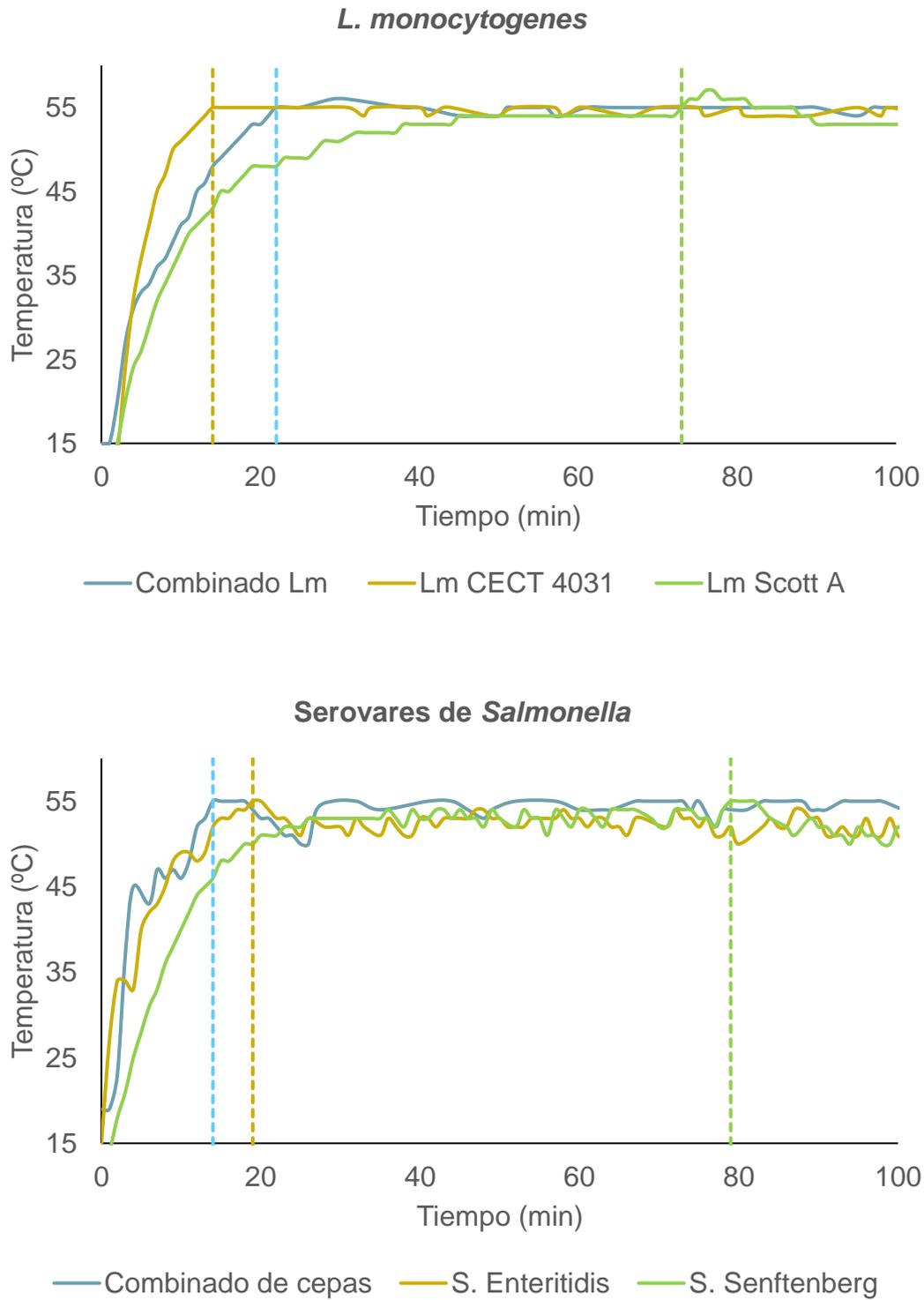


**Figura 11** | Curvas de penetración térmica para los tratamientos térmicos a 55 y 60 °C de cocción durante 30, 60 y 90 minutos.

Las oscilaciones registradas en la temperatura medida en el centro del producto durante la fase de calentamiento y mantenimiento de cada tratamiento térmico, se consideraron una fuente de variabilidad en los resultados derivados de la letalidad de los microorganismos. Aunque, si bien es cierto que, al realizar una modelización dinámica en condiciones no isotérmicas, este factor ya se tiene en cuenta. En la determinación de la variabilidad de cada ciclo de cocción, se calculó la desviación estándar de la temperatura a centro del producto. Se obtuvieron valores amplios de entre 0.2 y 1.5 °C, con una desviación estándar en las medias de temperatura del centro del producto de 1.4 °C para los tratamientos a 55 °C y 1.1 °C para los tratamientos a 60 °C.

La variabilidad en el proceso de cocción se puede apreciar a modo de ejemplo, en la cocción a 55 °C de las muestras inoculadas con *Listeria monocytogenes* (Figura 12). Así, en las muestras inoculadas con Lm Scott A se determinó que permanecieron 50 minutos más entre 50 y 55 °C que las inoculadas con la cepa Lm CECT 4031 o el combinado de cepas. Por otra parte, la velocidad de calentamiento hasta 50 °C fue mayor en el caso de las muestras inoculadas con la cepa Lm 4031, siendo ésta de 4.6 °C/min. Ambos ejemplos ponen en evidencia la dificultad de realizar un tratamiento térmico de forma uniforme en los alimentos en el rango de temperatura entre 55 y 60 °C de los hornos de convección-vapor.

En los procesos de cocción a 55 °C de las muestras inoculadas con *Salmonella* (Figura 12), se observó que si bien la duración de la fase de calentamiento (líneas verticales) fue mayor para *Salmonella* Senftenberg que para *Salmonella* Enteritidis o el combinado de serovares, la velocidad de calentamiento hasta 50 °C fue similar para los tres procesos, entre 2.1 y 2.8 °C/min. Concretamente, en el proceso de cocción de las muestras inoculadas con *S.* Senftenberg, la temperatura en el centro del producto se mantuvo entre 50 y 55 °C, alrededor de 60 minutos más que en los procesos de cocción de *S.* Enteritidis o el combinado de serovares.



**Figura 12** | Fase de calentamiento de las curvas de penetración térmica para los tratamientos térmicos a 55 °C de las muestras inoculadas con *Listeria monocytogenes* y Serovares de *Salmonella*. Las líneas punteadas indican el momento en el que la temperatura en el centro del producto alcanza los 55 °C.

### 4.1.3 | Consideraciones iniciales sobre la letalidad (valor F)

El tratamiento térmico diseñado para lograr una letalidad específica en patógenos transmitidos por los alimentos es un punto de control crítico en el procesamiento de alimentos y fundamental para garantizar la vida útil y la seguridad microbiológica de los alimentos procesados térmicamente. Una clave para la optimización del tratamiento de los alimentos por calor es definir la resistencia del patógeno significativo. Una sobreestimación de la resistencia al calor afecta negativamente la calidad del producto al alterar los atributos organolépticos y las cualidades nutricionales de un alimento. Mientras que, la subestimación aumenta la probabilidad de que el patógeno contaminante persista después de la cocción aplicada. Por lo tanto, un tratamiento térmico inadecuado, o la falta de cocción es un factor importante que contribuye en la aparición de brotes de toxiinfección alimentaria (Juneja *et al.*, 2011).

En la determinación de la eficacia de los procesos térmicos con el objetivo de eliminar microorganismos es de especial importancia la definición de los parámetros cinéticos que describen la inactivación microbiana en diversos entornos alimentarios (Fleischman, 2015). Por su amplia aplicabilidad, el concepto D/z es el más apropiado para obtener una primera impresión sobre el efecto de un proceso de inactivación (van Asselt y Zwietering, 2006). En el tratamiento térmico de los alimentos, predecir la reducción del número de organismos implica determinar los valores D y z a diferentes temperaturas (Juneja y Marks, 2003). El valor D se define como el tiempo necesario requerido para reducir 90 % de la población inicial de un microorganismo a una temperatura determinada y asume una inactivación logarítmica lineal durante el tiempo. El valor z es la constante de resistencia térmica que indica el incremento en la temperatura necesaria para que el valor D reduzca una décima parte (van Asselt y Zwietering, 2006; Fleischman, 2015).

No obstante, para evaluar la eficacia de los tratamientos térmicos de pasteurización o esterilización, la industria alimentaria utiliza el término del valor F o P (pasteurización). Ambos definen la intensidad de los tratamientos térmicos en condiciones prácticas, con el objetivo de lograr la seguridad del producto. El valor F o valor P se define como el número de minutos a una temperatura de

referencia para alcanzar una letalidad definida, siendo una medida de la equivalencia del efecto letal integrado de la temperatura cambiante teniendo como base un proceso isotérmico a una temperatura de referencia (Peleg, 2004). En la actualidad los equipos de cocción en la restauración comercial vienen equipados con sensores que permiten determinar el valor P durante los ciclos de cocción (Pittia *et al.*, 2008). Sin embargo, para calcular este valor, se considera una reducción microbiana logarítmica lineal, de modo que no se tiene en cuenta que la heterogeneidad genética o fenotípica de las poblaciones microbianas puede provocar una inactivación no lineal. En este caso, los cálculos de la letalidad térmica de los microorganismos son más complejos (Smelt y Brul, 2014; Desriac *et al.*, 2019). A pesar de que los tratamientos isotérmicos, se han utilizado durante años para fines de seguridad y calidad alimentaria, la investigación de modelos térmicos que puedan predecir con precisión la inactivación térmica para tratamientos térmicos no isotérmicos sigue siendo un desafío para la industria alimentaria (Desriac *et al.*, 2019).

En los tratamientos de cocción de este estudio, se realizó una primera aproximación en la predicción de la letalidad, teniendo como base los registros de temperatura para calcular el valor F de cada uno de los tratamientos térmicos en función de modelos de inactivación lineal (Bigelow, 1921). Para ello, se tomaron los valores z reportados por van Asselt y Zwietering (2006), que fue de 7 °C para *Listeria monocytogenes* y de 9.1 °C para *Salmonella* spp. Tras el análisis, el valor de F (media  $\pm$  desviación estándar) obtenido en los tratamientos térmicos aplicados durante 30, 60 y 90 min, fueron de  $36.22 \pm 9.72$  min,  $59.82 \pm 9.07$  y  $82.57 \pm 12.83$  min, respectivamente (Tabla 4). En los tratamientos a 60 y 90 minutos el tiempo objetivo fue inferior al esperado, aunque los resultados variaron en función del ensayo realizado con los diferentes microorganismos (Tabla 4). Este desajuste, posiblemente se debió a las oscilaciones de la temperatura en el centro del producto durante el proceso de cocción a 55 y 60 °C. La temperatura promedio alcanzada en los diferentes tratamientos y que se muestra en la Tabla 4 proporciona una idea de su magnitud.

**Tabla 4** | Temperatura media (°C) durante la fase de mantenimiento y el valor F (min) estimado del lomo de salmón sometido a tratamientos de cocción al vacío a 55 y 60 °C.

Temperatura de cocción (°C)	Microorganismo	Temperatura media (°C)			Valor F (min.)		
		t30	t60	t90	30	60	90
55	<i>Lm.</i> CECT 4031	54.83	54.55	54.36	32.81	60.65	85.29
	<i>Lm.</i> Scott A	54.60	51.96	51.97	55.96	67.12	77.99
	Combinado <sup>a</sup>	54.91	54.88	54.82	36.96	66.48	94.81
	<i>S.</i> Enteritidis	52.68	52.29	51.83	22.37	38.44	52.60
	<i>S.</i> Senftenberg	54.50	53.21	52.75	54.28	66.23	78.48
	Combinado <sup>b</sup>	53.53	54.47	54.48	27.95	54.80	81.16
60	<i>Lm.</i> CECT 4031	59.94	59.45	59.14	36.16	62.49	87.37
	<i>Lm.</i> Scott A	60.00	59.88	60.06	35.14	65.14	97.14
	Combinado <sup>a</sup>	60.21	59.77	59.83	35.92	65.36	93.52
	<i>S.</i> Enteritidis	59.96	59.28	59.60	31.80	50.21	71.57
	<i>S.</i> Senftenberg	58.71	58.00	58.75	34.15	52.56	74.88
	Combinado <sup>b</sup>	58.71	58.00	58.75	31.14	68.30	96.04

<sup>a</sup>Combinado de las cepas de *L. monocytogenes* Scott A y CECET 4031

<sup>b</sup>Combinado de los dos serovares de *Salmonella enterica* (Enteritidis y Senftenberg)

Cuando se aplican temperaturas suaves sobre las bacterias vegetativas, el concepto D/z no permite evaluar con precisión la mayoría de las curvas de supervivencia, ya que se produce una gran variabilidad en los recuentos de las células supervivientes (Geeraerd *et al.*, 2005). Según Vila (2019), a temperaturas más suaves, la curva de supervivencia de muchos microorganismos no es lineal, por lo que, trazar una línea recta a través de los datos de supervivencia con esta tendencia puede dar lugar a la sobre o subestimación del efecto letal del tratamiento térmico aplicado.

Es difícil generalizar acerca de la eficacia de los tratamientos térmicos de inactivación térmica debido a la gran variabilidad encontrada en la letalidad de los microorganismos. Entre los factores que pueden afectar el valor D de un microorganismo se encuentran: las variables de procesamiento (temperatura y tiempo), las características del producto (por ejemplo, pH y  $a_w$ ) y su variabilidad, los efectos de la matriz, la cepa específica del organismo y el estado fisiológico

de las células para ser inactivado ( van Asselt y Zwietering, 2006; Aryani *et al.*, 2016; Wells-Bennik *et al.*, 2019; Zwietering *et al.*, 2021).

Por otro lado, cuando se prolonga la fase de calentamiento se debe considerar el fenómeno de aclimatación de la célula microbiana al estrés térmico (Juneja y Novak, 2005; Garre *et al.*, 2018a). En nuestro estudio, las velocidades de calentamiento de los ciclos de cocción fueron inferiores a 10 °C/min, con valor medio en °C/min de  $2.28 \pm 1.13$  °C/ min y un intervalo entre 0.54 – 4.56 °C/min. Como se ha mencionado en la sección anterior, destaca el tiempo adicional (50-60 minutos) de los tratamientos de cocción de los lomos de salmón inoculados con *Listeria monocytogenes* Scott A y los inoculados con *Salmonella Senftenberg*. Cuando la velocidad de calentamiento es tan baja, se produce una inactivación demasiado lenta y las células microbianas podrían desarrollar una aclimatación efectiva a la temperatura (Vila, 2019), adquiriendo y manteniendo posteriormente, cierta resistencia tanto a los tratamientos térmicos como a la refrigeración.

## **4.2 *Listeria monocytogenes***

### **4.2.1 | Efecto del tratamiento térmico de cocción al vacío en lomo de salmón (*Salmo salar*) inoculados con *Listeria monocytogenes***

Tras el tratamiento térmico a 55 °C la letalidad obtenida fue de entre 2.93 y 3.84 log UFC/g a los 30 min, 3.01 y 5.16 log UFC/g a los 60 min, y de entre 3.52 y 5.55 log UFC/g a los 90 min de tratamiento (Tabla 5). De forma general, se apreció, un incremento en la letalidad a medida que aumentaba el tiempo de cocción aplicado. En el caso de las muestras inoculadas con la cepa Lm CECT 4031 y el combinado de cepas, la letalidad obtenida fue similar en el tratamiento realizado durante 30 min (aproximadamente 3.75 log UFC/g), mientras que a 60 y 90 min la letalidad alcanzada fue superior a 5 log UFC/g, aunque no completa. En las muestras inoculadas con el combinado de cepas la letalidad obtenida a los 90 min fue total, posiblemente porque el inóculo inicial fue inferior (aproximadamente 5.5 log UFC/g), a las muestras inoculadas con las cepas individualmente (aproximadamente 6.2 log UFC/g) (Tabla 3). Sin embargo, en

las muestras inoculadas con la cepa Lm Scott A, la letalidad obtenida fue inferior en los tres tiempos de cocción aplicados (Tabla 5).

En las muestras tratadas a 60 °C, se alcanzó desde el punto de vista cuantitativo, una letalidad total en todos los tiempos aplicados, siendo la reducción superior a 5 log UFC/g (Tabla 5). No obstante, tras la incubación de las muestras y la correspondiente investigación, se detectó la presencia de *L. monocytogenes* en algunas de las muestras tratadas durante 30 y 60 min, tanto en las inoculadas con las cepas individuales como en forma combinada.

**Tabla 5** | Efecto del tratamiento térmico sobre *Listeria monocytogenes* spp. en función del tiempo y tratamiento de cocción aplicado.

Cepa	Temperatura °C	Letalidad (log UFC/g)		
		Tiempo de cocción		
		30	60	90
CECT 4031	55	3.71 ± 0.31 <sup>aA</sup>	5.16 ± 1.02 <sup>bA</sup>	5.30 ± 0.84 <sup>bA</sup>
Scott A		2.93 ± 0.27 <sup>aB</sup>	3.01 ± 0.51 <sup>aB</sup>	3.52 ± 0.71 <sup>aB</sup>
Combinado		3.84 ± 0.62 <sup>aA</sup>	4.39 ± 0.65 <sup>aA</sup>	5.55 ± 0.00 <sup>bA</sup>
CECT 4031	60	5.35 ± 0.00 <sup>aC</sup>	5.35 ± 0.00 <sup>aC</sup>	5.35 ± 0.00 <sup>aC</sup>
Scott A		5.37 ± 0.00 <sup>aC</sup>	5.37 ± 0.00 <sup>aC</sup>	5.37 ± 0.00 <sup>aC</sup>
Combinado		6.54 ± 0.00 <sup>aC</sup>	6.54 ± 0.00 <sup>aC</sup>	6.54 ± 0.00 <sup>aC</sup>

<sup>a-b</sup> Diferentes letras minúsculas en las filas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de cocción y una misma cepa.

<sup>A-C</sup> Diferentes letras mayúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes cepas a una misma temperatura de cocción.

Diversos estudios han establecido la cinética de inactivación de *L. monocytogenes* mediante el uso de cepas de laboratorio o cepas de referencia como Scott A, apreciándose diferencias en la resistencia térmica en función de la cepa y/o serotipo (Lianou *et al.*, 2006; Van Der Veen *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2014). Lianou *et al.*, (2006) realizaron un estudio a 55 °C en condiciones isotermas, con 25 cepas y serotipos, determinando que las cepas del serotipo 4b, como *L. monocytogenes* Scott A, tenían menor tolerancia al calor a 55 °C que las cepas de otros serotipos. Por otra parte, en otro estudio realizado por Shen *et al.* (2014) a 60 °C, las 37 cepa de *L. monocytogenes* estudiadas se clasificaron en tres grupos (baja, media y alta) basado en su tolerancia al calor inherente a esta temperatura. Los resultados obtenidos mostraron que casi el 90% de las cepas de serotipo 1/2a, como sería la cepa *L. monocytogenes* CECT

4031, presentaron una tolerancia al calor relativamente baja. Solo el 50% de las cepas de serotipo 4b se incluyeron en este subgrupo, aunque Lm Scott A se clasificó como de tolerancia media, coincidiendo con la clasificación realizada en estudios anteriores (Doyle *et al.*, 2001). Dicha termorresistencia, concretamente en el caso de *L. monocytogenes* Scott A, se puede asociar a la presencia de subpoblaciones termorresistentes que contienen una mutación en el gen *ctsR* (regulador de choque térmico de clase III) (Karatzas *et al.*, 2003). A diferencia de lo observado por otros autores, De Jesús y Whiting, (2003) no determinaron un patrón de tolerancia al calor entre los diversos serotipos de *L. monocytogenes*. Por lo tanto, el serotipo parece que no es el único factor que contribuye a las diferencias en la tolerancia al calor entre las cepas de *L. monocytogenes* (Shen *et al.*, 2014). Los factores que pueden afectar a la variabilidad son los protocolos utilizados en los experimentos de pruebas de desafío (*Challenge test*), las diferencias entre matrices y la variabilidad inherente de cada cepa (Aryani *et al.*, 2015a).

#### **4.2.2 | Modelización de la inactivación térmica en condiciones no isotermas de *Listeria monocytogenes***

La aplicación de un tratamiento térmico inadecuado es el principal problema en los procesos de cocción al vacío al utilizar temperaturas suaves o bajas, siendo importante la determinación de la cinética de letalidad de los microorganismos más relevantes para la seguridad de este tipo de producto (Dogruyol *et al.*, 2020).

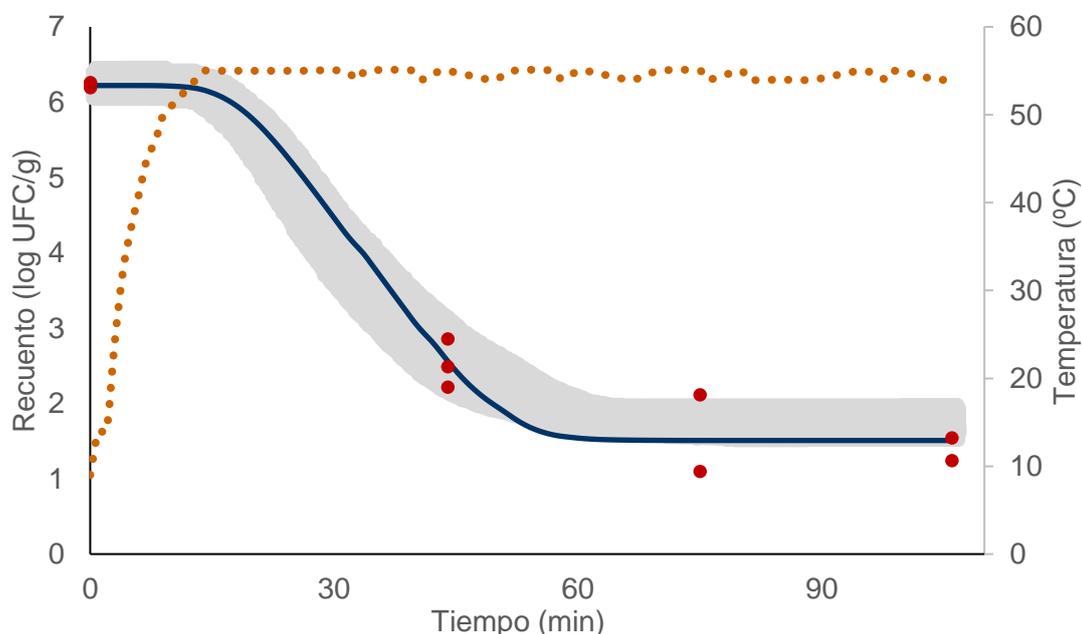
El análisis de los datos experimentales se realizó aplicando el programa *Bioinactivation FE*, que permite caracterizar experimentos no isotérmicos. Dicho programa incluye cuatro modelos de inactivación microbiana que son comúnmente utilizados por parte de los investigadores, y en menor medida por parte de la industria. Además, incluye los parámetros de incertidumbre del modelo y los intervalos de predicción de la curva de inactivación (Garre *et al.*, 2017). La modelización de los datos se realizó solo en las muestras tratadas a 55 °C e inoculadas con *Listeria monocytogenes* de forma individual. Se excluyeron los modelos de letalidad que presentaron recuentos por debajo del límite de cuantificación. Concretamente, las muestras inoculadas con el combinado de cepas y tratadas a 55 °C y todos los tratamientos a 60 °C, ya que

según Aryani *et al.* (2015b) estos resultados no deben ser incluidos en el ajuste los datos, pues el valor numérico del recuento real es desconocido.

En las Figuras 13, 14 y 15 se presenta la curva de supervivencia ajustada al modelo de inactivación óptimo con los intervalos de predicción del 90% generados por *Bioinactivation FE*, junto al perfil de temperatura y los datos experimentales de los tratamientos que pudieron ser modelizados. El programa también generó varios índices estadísticos que miden la bondad de la predicción y que se presentan en la Tabla 6. Para propósitos de esta tesis y poder determinar el modelo que mejor se ajustaba al proceso de cocción, se tuvo en consideración la raíz del error cuadrático medio (*RMSE*) y el factor sesgo (*B<sub>f</sub>*). La raíz del error cuadrático medio (*RMSE*) es el índice más común para probar la bondad de ajuste de los modelos a los datos experimentales. Su sencillez y fácil interpretación lo hacen apto para un primer acercamiento al modelo ajustado. El *RMSE* se utiliza para evaluar los valores predichos por el modelo y los obtenidos experimentalmente. Un valor *RMSE* bajo significa un mejor ajuste del modelo, mientras que un valor alto indica que los puntos están lejos del modelo ajustado lo que representará un mal ajuste de datos (Ross, 1996; Pérez-Rodríguez y Valero, 2013). El factor sesgo (*B<sub>f</sub>*) es una estimación de la confiabilidad del modelo que compara predicciones y observaciones independientes. Permite valorar si el modelo, en promedio, subestima o sobreestima la respuesta, de forma que da una idea de si las predicciones dadas por el modelo se sitúan en el “lado-seguro” ( $B_f > 1$ , sobreestimación del crecimiento) o en el “lado-peligroso” ( $B_f < 1$ , subestimación del crecimiento) (Bover-Cid y Garriga, 2008). Un valor *B<sub>f</sub>* aceptable para un modelo predictivo puede variar entre 0.75 a 1.25 (Ross, 1996; Pérez-Rodríguez y Valero, 2013).

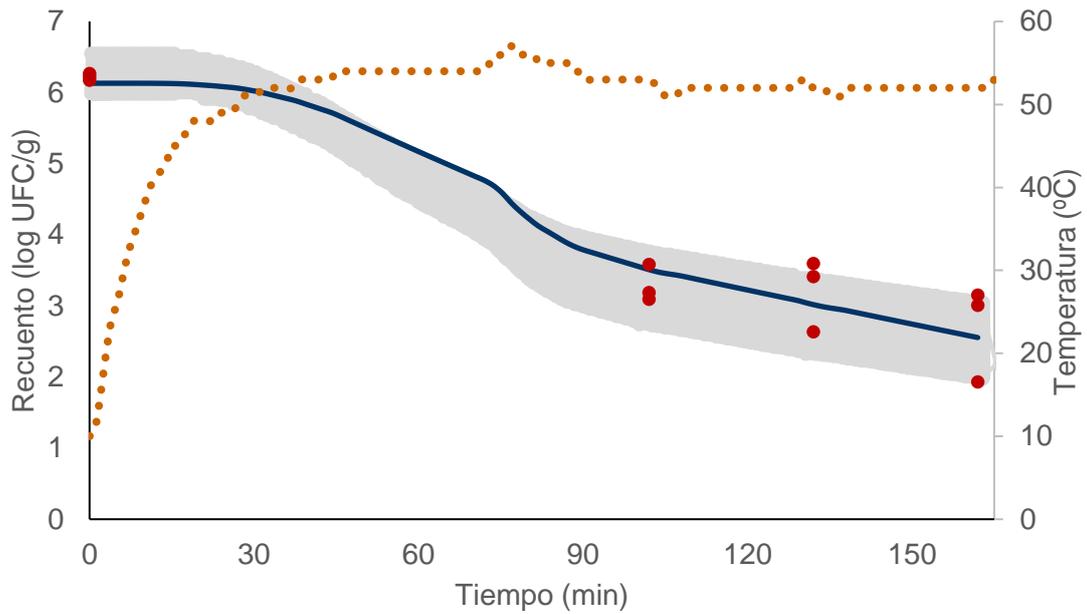
En la evaluación de la cinética de letalidad de Lm 4031 inoculada en lomo de salmón tratada a 55 °C, el modelo que presentó mejor ajuste, considerando los valores de *RMSE* y de *B<sub>f</sub>* (Tabla 6), fue el de Geeraerd de tipo sigmoidal con una fase de hombro, una fase de inactivación logarítmica lineal y una fase de cola (Figura 13). En este modelo, los resultados de una de las réplicas del proceso de cocción a 60 y 90 min no se incluyeron debido a que los recuentos obtenidos estaban por debajo del límite de cuantificación. El parámetro que determina la

fase de hombro es el valor  $C_c$  que se relaciona con el estado fisiológico de las células, y se basa en la hipótesis de la presencia de un conjunto de componentes protectores o críticos alrededor o dentro de cada célula. Respecto a la cola, el parámetro que lo describe es el  $N_{res}$  que equivale al número de células en una subpoblación de la población total  $N_0$  (Valdramidis *et al.*, 2006). Estos valores representan la densidad de la población residual, en otras palabras, la población más resistente ( $N_{res}$ ) (Geeraerd *et al.*, 2005). En el modelo, el valor obtenido fue de 1.51 log UFC/g (Tabla 6), aunque los valores reales oscilaron entre 1.10 y 2.86 log UFC/g, considerando que la concentración inicial fue de 6.22 log UFC/g ( $N_0$ ). Según Stringer *et al.* (2000), cuando en una cinética de inactivación se presenta la fase de hombro y cola puede atribuirse a dos razones: (1) por limitaciones del procedimiento experimental como la heterogeneidad del tratamiento y el uso de combinaciones de cepas, entre otros y (2) por la adaptación al calor durante un tratamiento térmico. En nuestro caso, cualquiera de estas dos circunstancias podría explicar los resultados obtenidos.

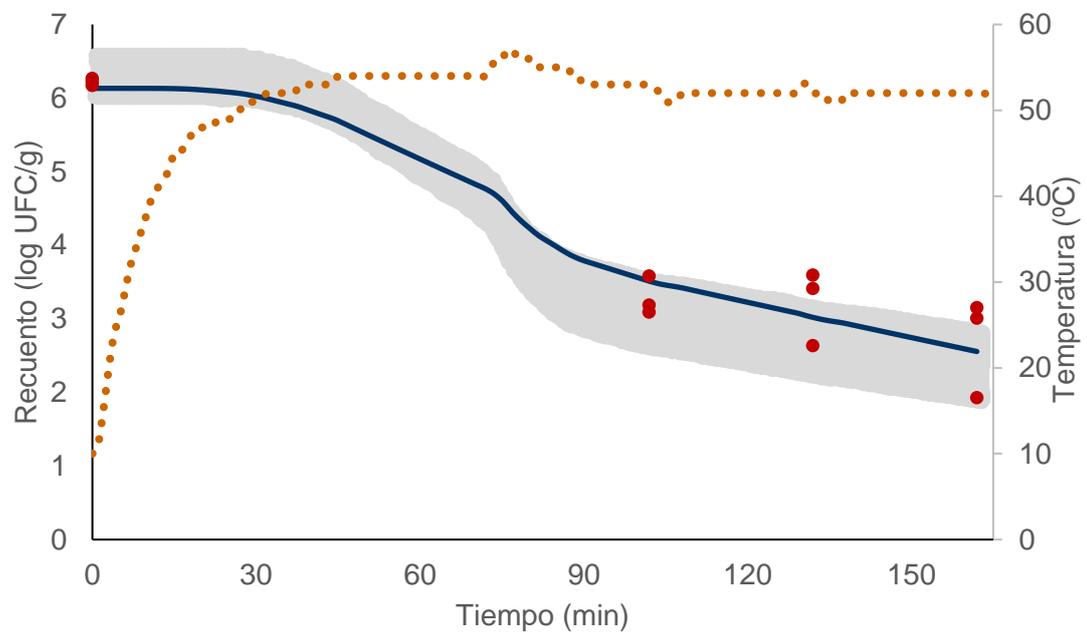


**Figura 13** | Curva de supervivencia de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 a 55 °C generada por *Bioinactivation FE* (línea azul) ajustada al modelo **Geeraerd**. También, se presenta el recuento total (puntos rojos) de las muestras tratadas durante 30, 60 y 90 minutos, el perfil de temperatura registrado durante el experimento (línea discontinua naranja) y el intervalo de predicción del 90% de la reducción microbiana.

Respecto a la cepa de *Lm* Scott A inoculada en lomo de salmón tratada a 55 °C, el mejor ajuste obtenido fue para los modelos Bigelow (Figura 14) y Mafart (Figura 15). Ambos modelos presentaron curvas muy similares, que se confirmó con los valores obtenidos en los parámetros RMSE y  $B_f$  de ajuste del modelo. Si bien el valor  $z$  obtenido en el modelo Bigelow y Mafart fue similar, en el valor  $\delta$  del modelo Mafart fue mayor al valor  $D$  del modelo Bigelow (Tabla 6). Ello se debe a que el modelo Bigelow (1921) es la representación de una cinética de inactivación de primer orden, en donde todas las células tienen la misma sensibilidad, y la inactivación depende de la posibilidad de recibir un tratamiento letal (Waal, 2017). Mientras que en el modelo Mafart, se considera el parámetro  $\delta$  como el tiempo de la primera reducción decimal y el factor  $p$  la forma de la curva. Si el valor  $p$  es igual a 1, indica un modelo de inactivación de primer orden, en donde la probabilidad de muerte sigue una reducción log-lineal. Mientras que si  $p$  es mayor a 1, como el obtenido en nuestro estudio, se refleja una función de una curva cóncava, con un ligero efecto de hombro (Mafart *et al.*, 2002). A diferencia del modelo Bigelow, el modelo Mafart considera que las desviaciones en la línea logarítmica se deben a la variación biológica entre las células microbianas causadas por el estrés térmico (Garre *et al.*, 2018a).



**Figura 14** | Curva de supervivencia de *Listeria monocytogenes* Scott A a 55 °C generada por *Bioinactivation FE* (línea azul) ajustada al modelo **Bigelow**. También, se presenta el recuento total (puntos rojos) de las muestras tratadas durante 30, 60 y 90 minutos, el perfil de temperatura registrado durante el experimento (línea discontinua naranja) y el intervalo de predicción del 90% de la reducción microbiana.



**Figura 15** | Curva de supervivencia de *Listeria monocytogenes* Scott A a 55 °C generada por *Bioinactivation FE* (línea azul) ajustada al modelo **Mafart**. También, se presenta el recuento total (puntos rojos) de las muestras tratadas durante 30, 60 y 90 minutos, el perfil de temperatura registrado durante el experimento (línea discontinua naranja) y el intervalo de predicción del 90% de la reducción microbiana.

El valor  $z$  observado fue ligeramente superior en Lm CECT 4031, aunque en ambas cepas el intervalo de confianza al 95% fue de entre 6 y 8 °C, aproximadamente. Sin embargo, se apreciaron diferencias en el valor  $D$ , siendo superior en el caso de Lm Scott A con un valor de 20.70 min y en Lm CECT 4031 de 6.77 min (Tabla 6). En comparación con otros autores se observa que hay una gran variabilidad en los valores  $D$  y  $z$  de este microorganismo, en función de las condiciones experimentales y la matriz utilizada. Si se tiene en consideración los parámetros determinados por van Asselt y Zwietering (2006), en la revisión de los estudios experimentales realizados en diferentes alimentos y caldos de cultivo, el valor  $z$  obtenido fue muy similar al de nuestro estudio (7 °C). Mientras que el valor  $D$  medio obtenido en dicho estudio fue de 12.51 min, siendo inferior en el caso de Lm CECT 4031 y superior en el de Lm Scott A (Tabla 6). En otro estudio realizado en 20 cepas de *L. monocytogenes* con caldos de cultivo y en condiciones isotérmicas el valor  $D$  osciló entre 9 y 30 min a 55 °C, siendo el valor  $z$  estimado en todas las cepas de 4.4 y 5.7 °C (Aryani *et al.*, 2015b). Con relación a otros estudios de inactivación térmica a 55 °C realizados en productos de la pesca, como el cangrejo azul y cangrejo de río (Harrison y Huang, 1990; Dorsa *et al.*, 1993), el valor  $D$  fue muy similar al obtenido en nuestro estudio. Sin embargo, si se compara con un estudio realizado en salmón con tratamiento de cocción al vacío, aunque el valor  $z$  fue ligeramente inferior (5.5 °C), el valor  $D$  de la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644 a 55 °C fue de 33.38 min, muy superior al de nuestro estudio si se considera el ajuste al modelo Bigelow, pero no así si se toma como referencia el modelo Mafart en el caso de Lm Scott A. En otro estudio realizado en huevos de salmón a temperaturas ligeramente superiores el valor  $z$  determinado fue de 5.99 °C (Li *et al.*, 2017).

El uso de los modelos terciarios de comportamiento microbiano pueden ser una herramienta en la toma de decisiones de evaluación del riesgo. Sin embargo, e se ha de tener en cuenta que muchos de ellos se basan en resultados obtenidos en medios de cultivos. Es conveniente validar los modelos cuidadosamente en el momento de su aplicación, y tener en cuenta las diferencias que podrían ocurrir debido a factores dependientes de la matriz alimentaria, la microbiota autóctona competidora, la composición, textura y las características fisicoquímicas (Wang *et al.*, 2015; Vila, 2019).

**Tabla 6** | Parámetros del modelo (media  $\pm$  desviación estándar e intervalos de confianza del 95%) de inactivación Bioinactivation FE de *Listeria monocytogenes* a 55 °C.

Cepa	Modelo	$D_{ref}^1$	$\delta_{ref}^1$	$p$	$z^2$	$\log N_0^3$	$\log N_{res}^3$	Cc	RMSE	$B_f$
CECT 4031	Geeraerd	6.77 $\pm$ 0.80 (6.05 - 8.85)	-	-	7.77 $\pm$ 0.57 (6.07 - 7.96)	6.22 $\pm$ 0.09 (6.01 - 6.29)	1.51 $\pm$ 1.43 0.88 - 1.99	9.91 $\pm$ 5.66 (2.47 - 22.13)	0.82	1.05
	Mafart	-	35.92 $\pm$ 3.45 (28.32 - 41.99)	1.48 $\pm$ 0.06 1.31 - 1.50	6.15 $\pm$ 0.60 6.04 - 7.93	6.27 $\pm$ 0.12 6.01 - 6.39	-	-	1.77	1.09
	Bigelow	20.70 $\pm$ 2.51 (17.33 - 26.38)	-	-	6.16 $\pm$ 0.57 (6.08 - 7.94)	6.13 $\pm$ 0.11 6.01 - 6.39	-	-	1.84	1.01

Unidades: <sup>1</sup>minutos, <sup>2</sup> temperatura °C, <sup>3</sup> log UFC/g.

### **4.2.3 | Efecto del tratamiento térmico de cocción al vacío en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en lomo de salmón (*Salmo salar*)**

El efecto del tratamiento de cocción sobre el grado de lesión y la recuperación de *Listeria monocytogenes* se evaluó durante el almacenamiento en frío de las muestras de lomo de salmón a 4 y 8 °C. Como resultado de la alta heterogeneidad mostrada en los recuentos, los datos se procesaron considerando los valores individuales de los triplicados. Los resultados se muestran en Tablas o Figuras dependiendo de cómo el tratamiento de cocción o almacenamiento en frío afectó al comportamiento de las diferentes cepas ya que el crecimiento, supervivencia y muerte de *Listeria monocytogenes* puede ocurrir simultáneamente después del estrés por calor y por frío (Hansen y Knøchel, 2001). Además, se ha observado que al aplicar tratamientos en condiciones que se acercan a los límites de crecimiento, como los tratamientos térmicos suaves, se produce una alta heterogeneidad de las respuestas celulares individuales. En consecuencia, aumenta la complejidad en el comportamiento de las poblaciones microbianas (Koutsoumanis y Aspridou, 2017).

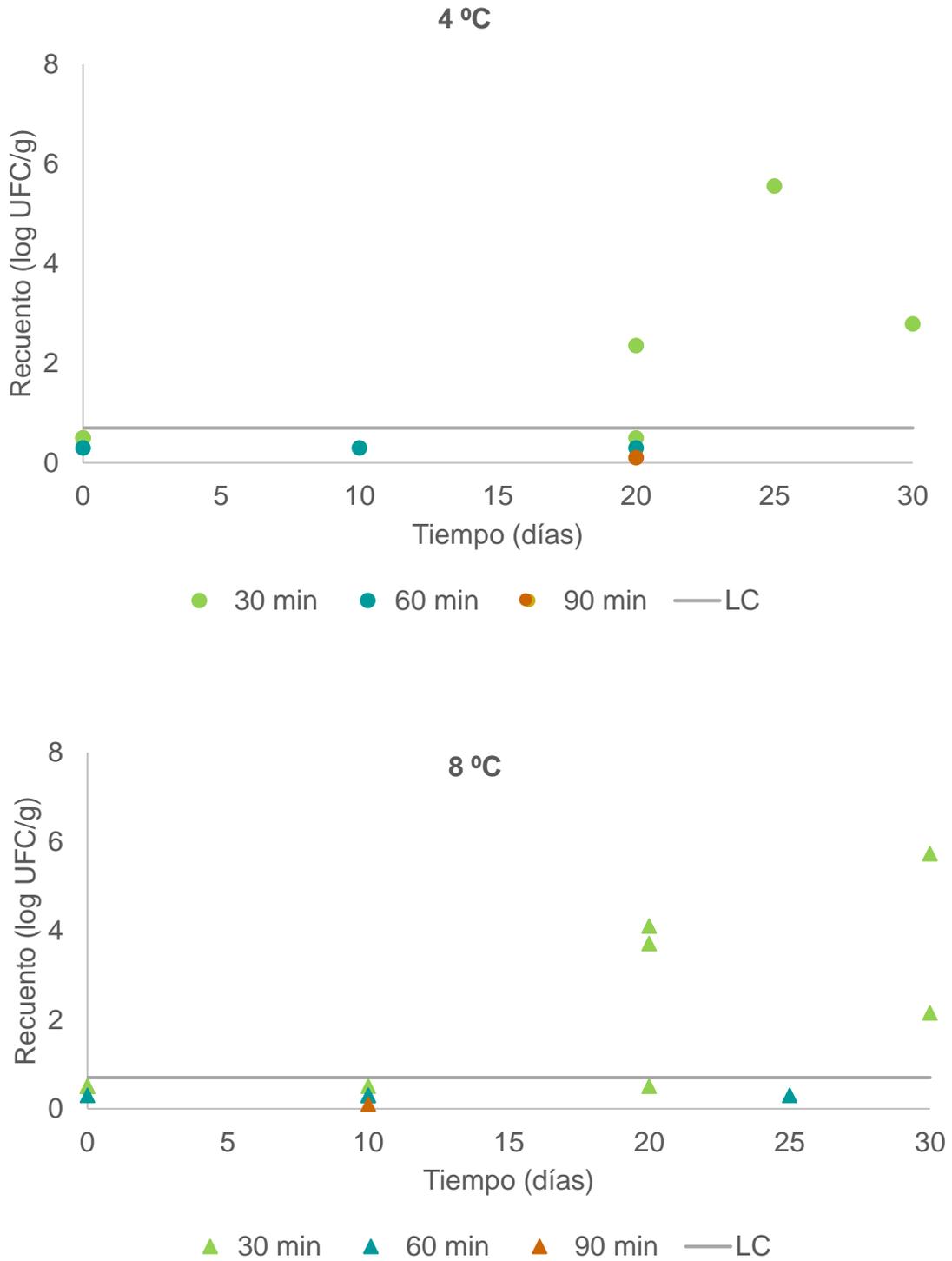
### **4.2.4 | Supervivencia y recuperación de *Listeria monocytogenes* en lomo de salmón (*Salmo salar*) tratado a 60 °C**

#### **4.2.4.1 | *Listeria monocytogenes* CECT 4031**

La letalidad de Lm CECT 4031 tras el tratamiento de las muestras de lomo de salmón a 60 °C fue superior a 5 unidades logarítmicas en todos los tiempos de cocción (Tabla 5). Sin embargo, esta letalidad no fue completa en los tratamientos de 30 y 60, ya que tras realizar su investigación a 37 °C se detectó su presencia, siendo su recuento inferior al límite de cuantificación (< LC). Tras el tratamiento durante 90 min la letalidad fue aparentemente completa, aunque durante su conservación en refrigeración se detectó su supervivencia. Este resultado también se observó en las muestras inoculadas con Lm Scott A y en el combinado de cepas.

La intensidad del tratamiento térmico causó una importante lesión en Lm CECT 4031, que en combinación con la temperatura de conservación limitó su crecimiento, tanto a temperaturas óptimas de 4 °C como de abuso a 8 °C (Figura

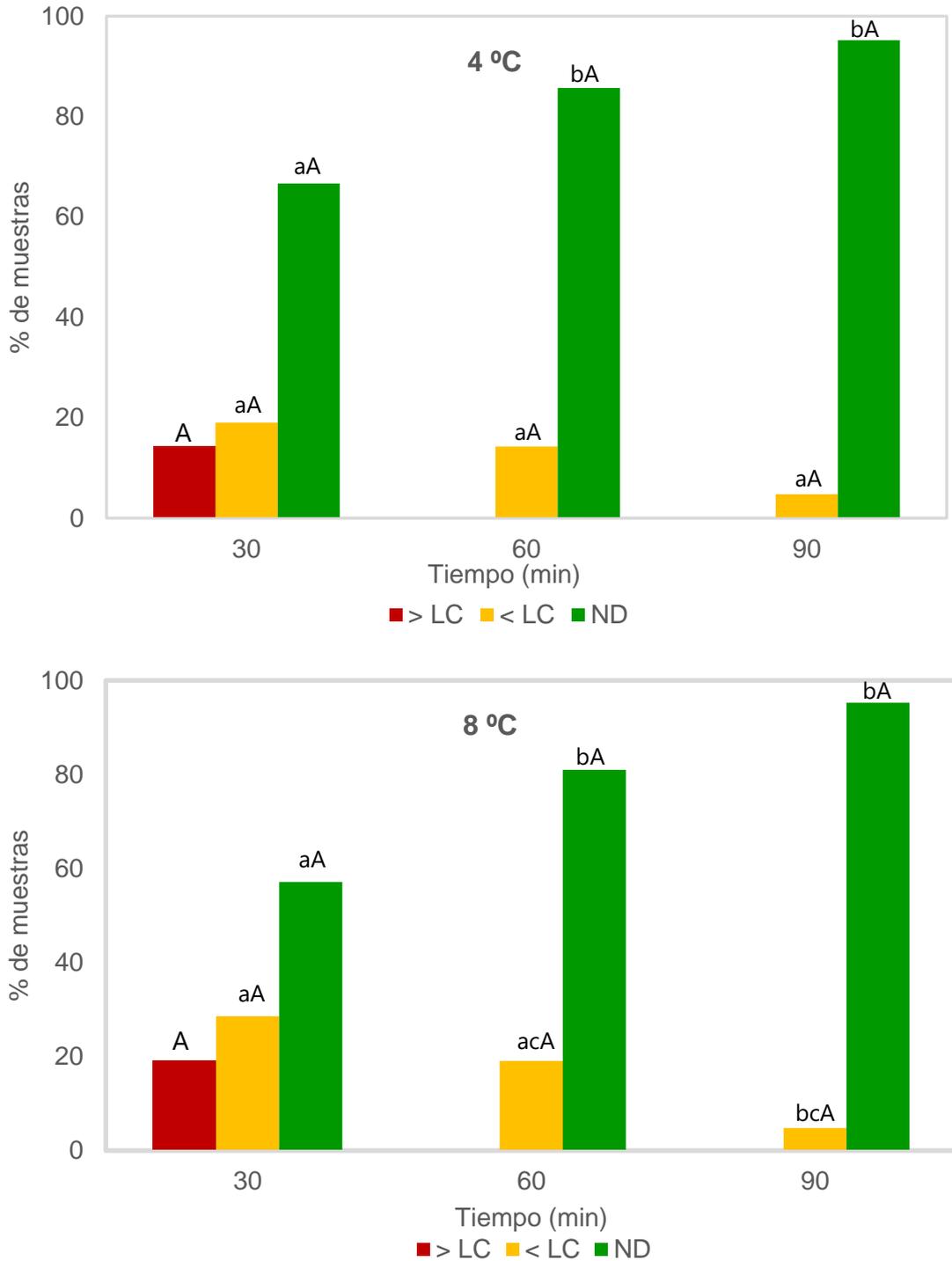
16). Aunque los tratamientos tuvieron un efecto significativo en la reducción de Lm CECT 4031 a los tres tiempos de cocción, durante su conservación y de forma puntual se evidenció la presencia de células supervivientes, especialmente en las tratadas durante 30 y 60 min. En las muestras tratadas durante 30 min y posiblemente debido al menor efecto lesivo causado, a partir del día 20 presentaron un recuento superior a 2 log UFC/g, (Figura 16), límite establecido por el Reglamento 2073/2005 sobre criterios microbiológicos para alimentos.



**Figura 16 |** Recuento total de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 en las muestras tratadas a 60 °C y almacenadas a 4 y 8 °C. La línea gris muestra el límite de cuantificación (LC) de 5 UFC/g.

Para determinar las diferencias entre los tres tiempos de cocción y la temperatura de conservación a 4 y 8 °C, se agruparon las muestras en función de tres criterios: 1) muestras con recuento superior al límite de cuantificación (>LC), es decir, aquellas en las que se obtuvo recuento en el medio de cultivo selectivo, 2) muestras con recuento inferior al límite de cuantificación (<LC), en las que no hubo recuento, pero sí detección de bacterias supervivientes, y 3) muestras en las que no se detectó la presencia de *Lm* CECT 4031(ND), considerándose que hubo una inactivación total.

Como se comentó anteriormente, sólo en las muestras tratadas durante 30 min se evidenció un leve crecimiento a partir del día 20, que representó un 14 % y 19 % de las muestras almacenadas a 4 y 8 °C, respectivamente, sin apreciarse diferencias estadísticas entre ambas temperaturas. La mejor recuperación de *Lm* CECT 4031 en las muestras tratadas a 30 min, se ratificó en el menor porcentaje ( $p < 0.05$ ) de las muestras (60 %) en las que no se detectó *Lm* CECT 4031 a ambas temperaturas de conservación. Al aumentar el tiempo de cocción, hubo un incremento significativo de muestras en las que no se detectó el microorganismo, siendo aproximadamente un 80 y 90 % en los tratamientos de 60 y 90 min, respectivamente (Figura 17).



**Figura 17** | Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con *Listeria monocytogenes* CECT 4031 y tratadas a 60 °C y con recuento superior del límite de cuantificación (>LC) (en rojo), recuento inferior al (<LC) (en amarillo) y muestras en las que la inactivación fue completa (ND) (en verde) durante el almacenamiento a 4 y 8 °C. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de cocción con el mismo criterio de agrupación del comportamiento de *L. monocytogenes* (> LC, < LC y ND). Diferentes letras mayúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre temperaturas de conservación con el mismo criterio de agrupación del comportamiento de *L. monocytogenes* (> LC, < LC y ND).

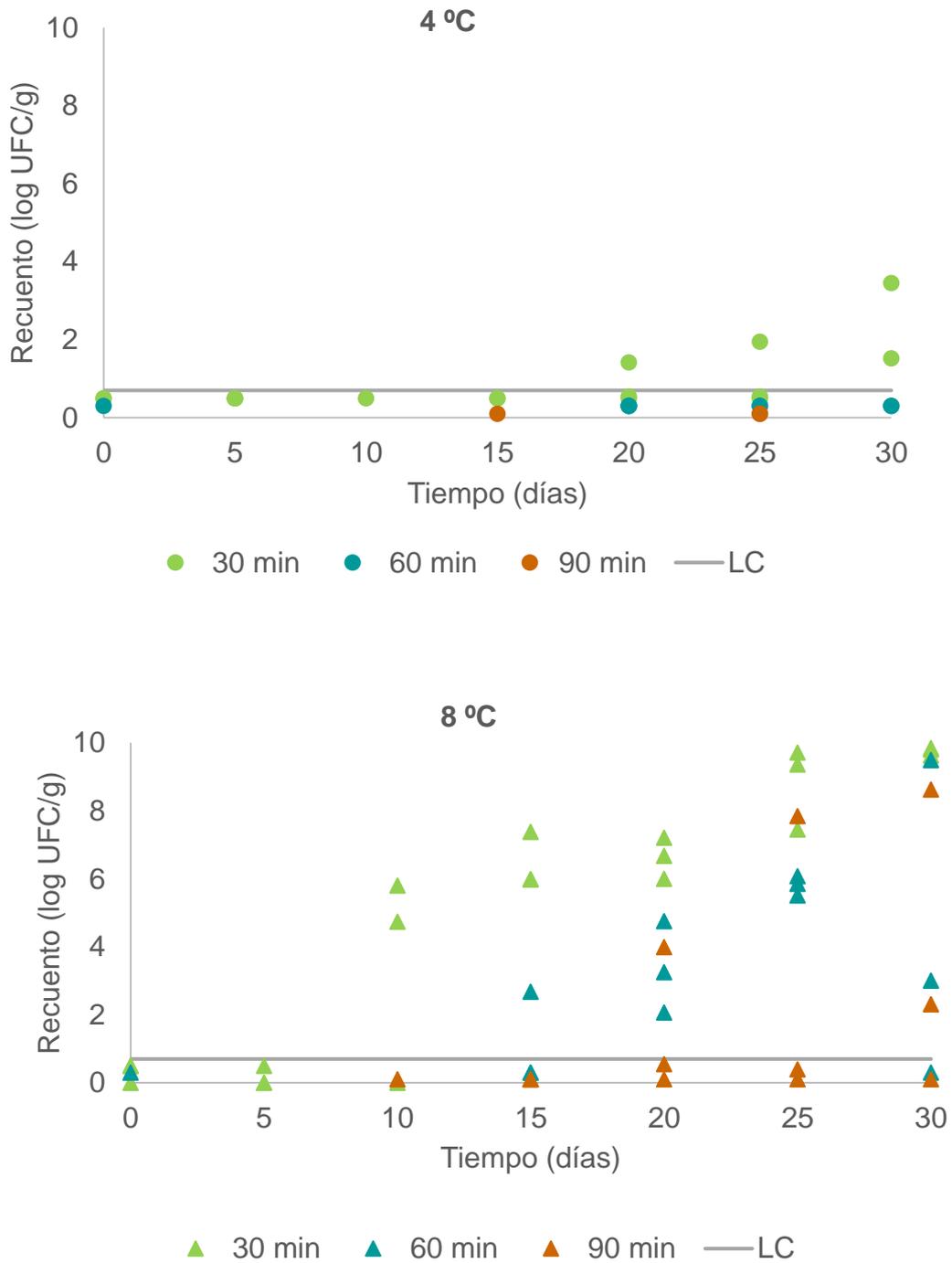
#### 4.2.4.2 | *Listeria monocytogenes* Scott A

En el caso de la cepa de Lm Scott A, tras la aplicación del tratamiento térmico a 60 °C, se obtuvo una letalidad superior a 5 log UFC/g en los tres tiempos de cocción aplicados (Tabla 5). De forma similar a Lm CECT 4031, esta letalidad no fue completa en los tratamientos de 30 y 60 min, ya que se detectó su presencia tras la incubación a 37 °C (< LC).

Del mismo modo, la evolución del crecimiento de la cepa Lm Scott A se vio condicionada por la intensidad del tratamiento, aunque a diferencia de la cepa Lm CECT 4031, se apreciaron diferencias en su recuperación en función de la temperatura de conservación. En las muestras conservadas a 4 °C, sólo se obtuvieron recuentos por encima del límite de cuantificación (>LC) en el tratamiento de 30 min. Al igual que en el caso de Lm CECT 4031, en las que se observó recuentos por encima del LC a partir del día 20, Lm Scott A presentó recuentos superiores a 2 unidades logarítmicas a partir del día 30. Los tratamientos de 60 y 90 min en combinación con la temperatura de almacenamiento limitaron el crecimiento de Lm Scott A, de forma similar a Lm CECT 4031, aunque se detectó su presencia (< LC) en un mayor número de muestras (Figura 18).

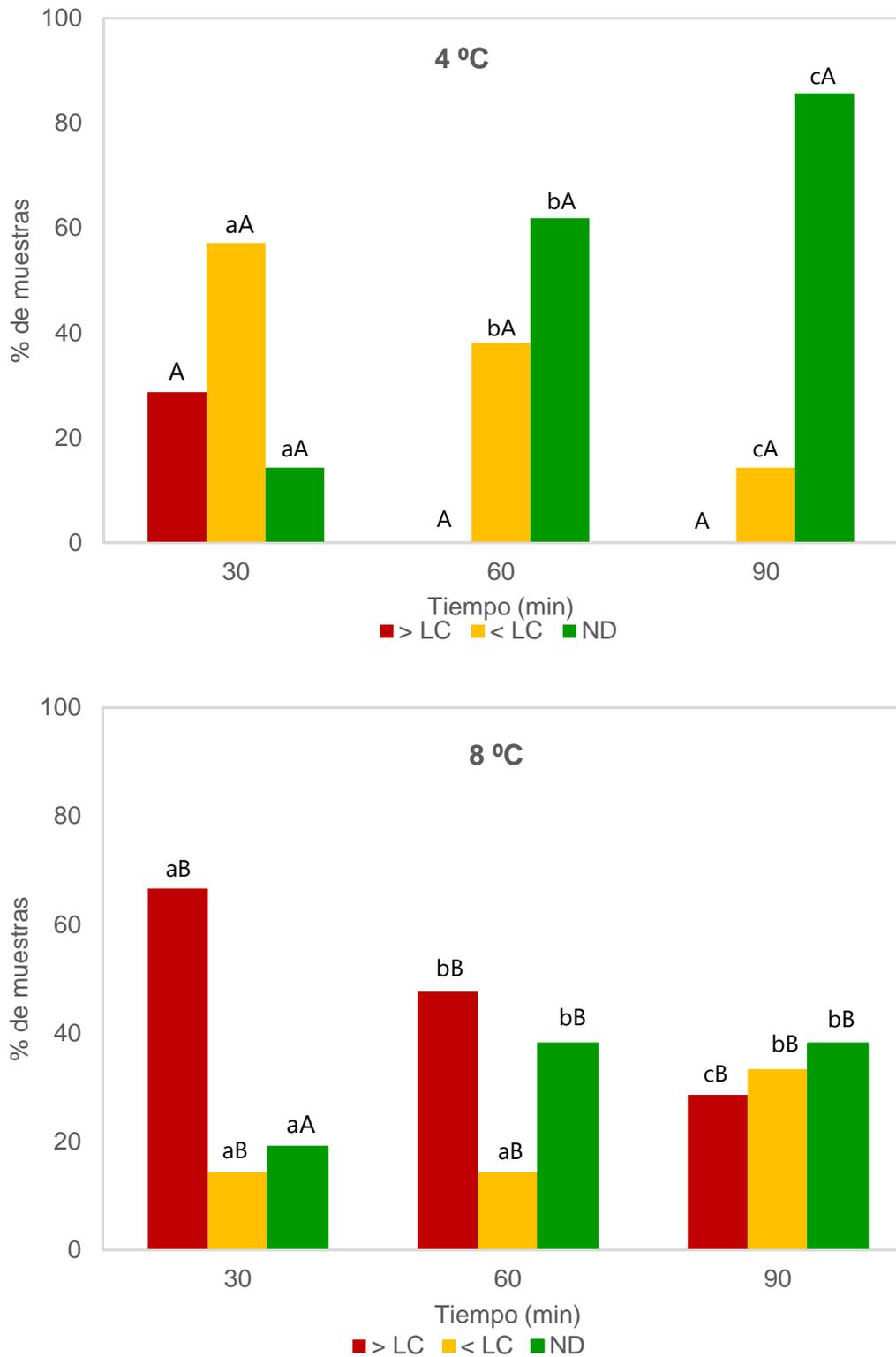
A 8 °C Lm Scott A, presentó un mayor crecimiento en los tres tratamientos de cocción, aunque con ciertas diferencias en función de la intensidad del tratamiento. Este hecho, posiblemente fue debido a que es un patógeno de resistencia media a los tratamientos térmicos, por lo que sufrió menor lesión térmica. Además, de un menor estrés asociado a la temperatura de conservación más suave como son los 8°C. En las muestras tratadas durante 30 min, se alcanzaron recuentos superiores a 4 log UFC/g en el día 10 en dos de las réplicas, y en las tres réplicas a partir del día 15 (Figura 18), alcanzando recuentos de hasta 9 log UFC/g. En algunas de las muestras tratadas durante 60 y 90 min, hubo un recuento de más de 2 log UFC/g, siendo las tratadas a 60 min en las que se desarrollaron más a medida que se prolongaba el tiempo de conservación. A pesar de que en todos los tratamientos térmicos Lm Scott A presentó una tendencia de crecimiento, la curva obtenida mediante el *software DMFIT*, no presentó un buen ajuste al modelo debido a la variabilidad obtenida

entre las muestras, con valores de error estándar de 1.42, 1.88 y 2.23, durante los tratamientos de 30, 60 y 90 min, respectivamente.



**Figura 18** | Recuento total de *Listeria monocytogenes* Scott A en las muestras tratadas a 60 °C y almacenadas a 4 y 8 °C. La línea gris muestra el límite de cuantificación (LC) de 5 UFC/g.

En la evaluación cualitativa, agrupando las muestras a base de los criterios del comportamiento de *L. monocytogenes* (> LC, < LC y ND), se observaron claras diferencias en función de la intensidad del tratamiento térmico. Se obtuvo un mayor porcentaje de muestras en las que Lm Scott A no fue detectada al aumentar el tiempo de cocción, especialmente en las conservadas a 4 °C. A 8 °C, la recuperación de Lm Scott A fue evidente, con recuentos por encima del límite de cuantificación en todos los tiempos de cocción, aunque disminuyó su porcentaje a medida que aumentó el tiempo de cocción. En los tratamientos durante 30 min, el efecto lesivo del calor fue mucho menor, apreciándose un elevado porcentaje de muestras con crecimiento o supervivencia, tanto a 4 °C como a 8 °C. También se observaron diferencias en el efecto lesivo, entre los tratamientos de 60 y 90 min. Así, en los tratamientos de 60 min, se obtuvo un mayor porcentaje de muestras con supervivencia de Lm Scott A a 4 °C o con crecimiento a 8 °C que en el tratamiento realizado durante 90 min (Figura 19).



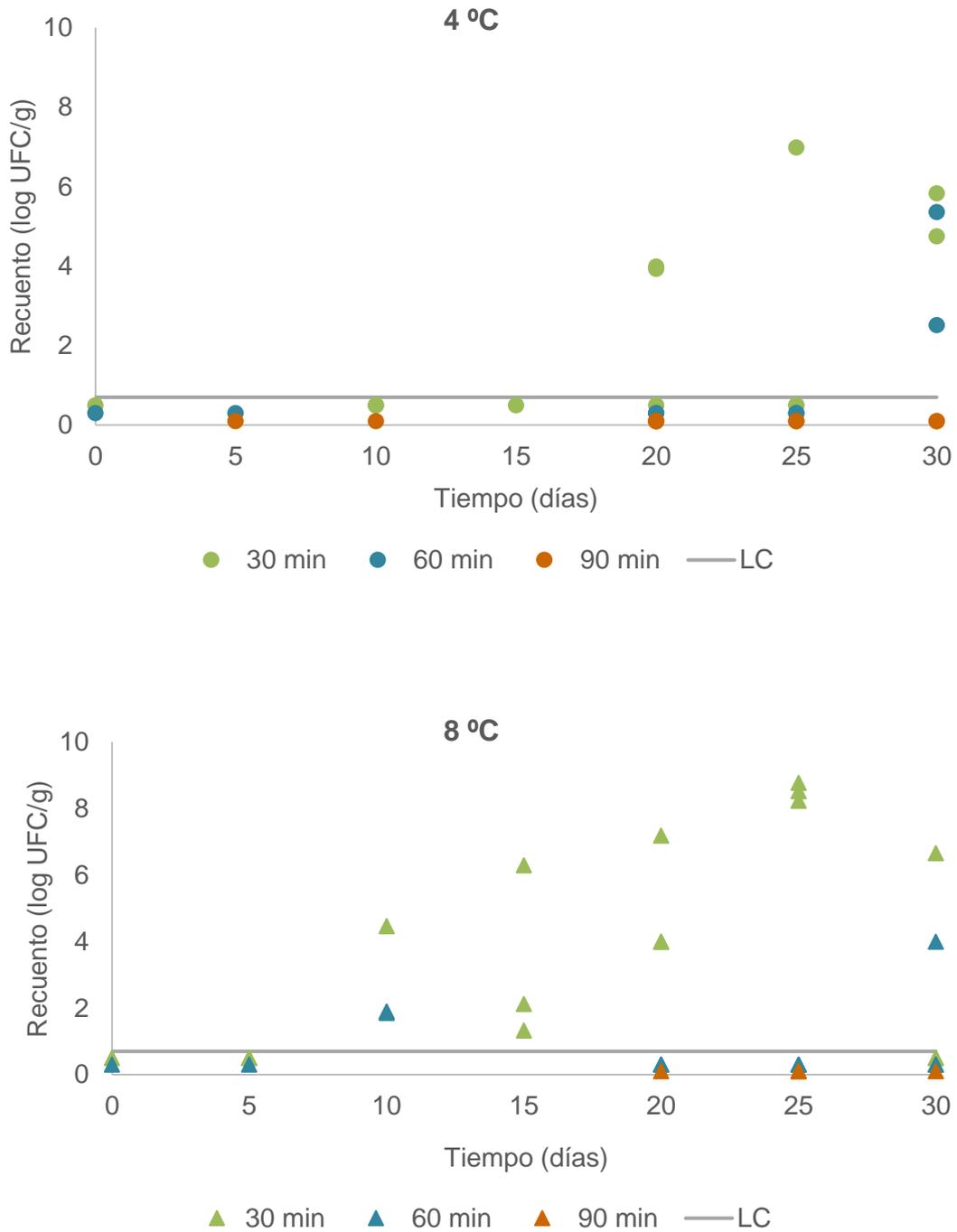
**Figura 19** | Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con *Listeria monocytogenes* Scott A y tratadas a 60 °C con recuento superior del límite de cuantificación (>LC) (en rojo), recuento inferior al (<LC) (en naranja) y muestras en las que la inactivación fue completa (ND) (en verde) durante el almacenamiento a 4 y 8 °C. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de cocción con el mismo criterio de agrupación del comportamiento de *L. monocytogenes* (> LC, < LC y ND). Diferentes letras mayúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre temperaturas de conservación con el mismo criterio de agrupación del comportamiento de *L. monocytogenes* (> LC, < LC y ND).

#### 4.2.4.3 | Combinado de cepas *Listeria monocytogenes* CECT 4031 y Scott A

En el desarrollo a 4 y 8 °C de ambas cepas de *L. monocytogenes* inoculadas en lomo de salmón de forma combinada, se apreció un comportamiento intermedio a lo que se había observado al realizar su evaluación individual, aunque con una mayor similitud respecto a Lm Scott A. Tras la aplicación del tratamiento térmico a 60 °C en las muestras de lomo de salmón, la letalidad obtenida fue superior a 6 log UFC/g en los tres tiempos de cocción aplicados (Tabla 5). Sin embargo, como en las cepas inoculadas individualmente, la letalidad no fue completa en los tratamientos de 30 y 60 min, ya que se detectó su presencia tras la incubación a 37 °C (< LC).

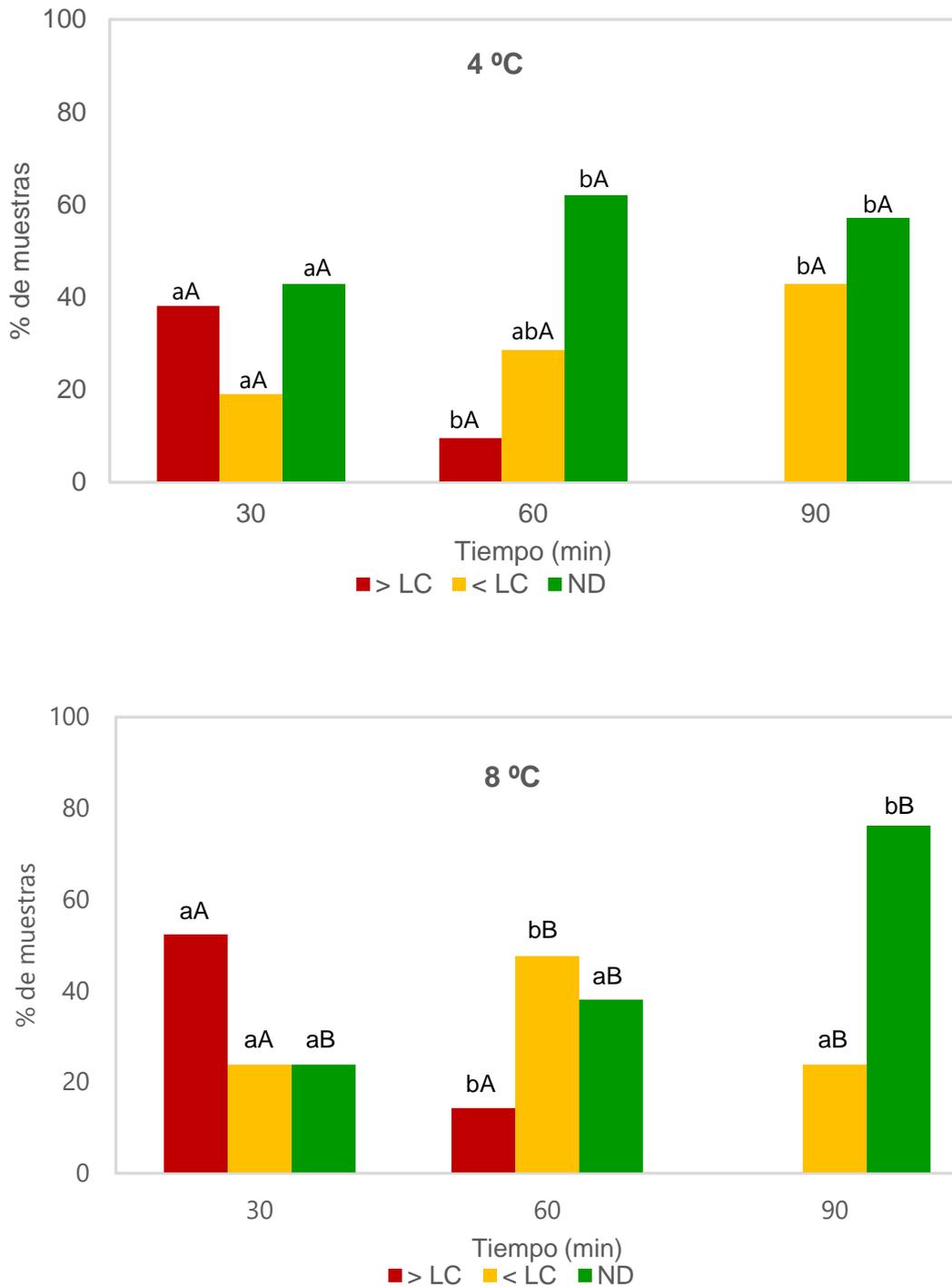
De igual forma, la evolución del crecimiento del combinado se vio condicionada por la intensidad del tratamiento, apreciándose como en el caso de Lm Scott A diferencias en función de la temperatura de conservación. En las muestras conservadas a 4 °C, se obtuvieron recuentos por encima del límite de cuantificación en los tratamientos de 30 y 60 min. Al igual que Lm CECT 4031, a partir del día 20, se observaron recuentos superiores a 2 unidades logarítmicas. Tras el tratamiento de 90 min, en combinación con la temperatura de almacenamiento, no se observó crecimiento del combinado de cepas. El número de muestras en la que se detectó su presencia (< LC) respecto al obtenido en las muestras inoculadas con la cepa individual, fue intermedio (Figura 20).

A 8 °C, el comportamiento en la evolución del combinado de cepas fue también intermedio. En las muestras tratadas durante 30 min se obtuvieron recuentos por encima de 2 log UFC/g en el día 10. Sin embargo, se apreció más variabilidad en su crecimiento, con muestras en las que el recuento era elevado mientras que, en otras sólo se detectaba la presencia de *L. monocytogenes*. Este fenómeno también se evidenció en las muestras tratadas durante 60 min. Puntualmente, se alcanzaron recuentos elevados, aunque en general, el número de muestras en las que sólo se detectaba el patógeno se asemejó más a los resultados obtenidos en Lm CETC 4031.



**Figura 19 |** Recuento total del **Combinado de cepas** de *Listeria monocytogenes* en las muestras tratadas a **60 °C** y almacenadas a **4 y 8 °C**. La línea gris muestra el límite de cuantificación (LC) de 5 UFC/g.

Si bien se apreciaron diferencias en función de la intensidad del tratamiento y de la temperatura de conservación, respecto a la evaluación cualitativa del combinado de *L. monocytogenes* (Figura 21), la tendencia observada fue una mezcla de lo ocurrido en la cepa Lm CECT 4031 y Lm Scott A. Durante el tratamiento a 30 y 60 min, *L. monocytogenes* se recuperó y/o creció a ambas temperaturas de conservación. No obstante, el porcentaje de muestras en las que no se detectó el microorganismo fue significativamente mayor en las muestras conservadas a 4 °C que a 8 °C. Posiblemente, por el efecto combinado del calor y del frío, aunque a 90 min no se apreció este fenómeno.



**Figura 20 |** Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con el **Combinado de cepas** de *Listeria monocytogenes* y tratadas a **60 °C** con recuento superior del límite de cuantificación (>LC) (en rojo), recuento inferior al (<LC) (en amarillo) y muestras en las que la inactivación fue completa (ND) (en verde) durante el almacenamiento a **4 y 8 °C**. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de cocción con el mismo criterio de agrupación del comportamiento de *L. monocytogenes* (> LC, < LC y ND). Diferentes letras mayúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre temperaturas de conservación con el mismo criterio de agrupación del comportamiento de *L. monocytogenes* (> LC, < LC y ND).

Finalmente, y para realizar una comparativa del efecto del tratamiento térmico de 60 °C en el lomo de salmón inoculado de forma individual o combinada con Lm CECT 4031 y Lm Scott A, se agruparon los datos bajo dos criterios. El primer criterio agrupa las muestras en las que se detectó la supervivencia de *Listeria monocytogenes* (presencia o crecimiento), y el segundo las muestras en las que no se detectó su presencia. Cuando se detectó o se obtuvo un recuento de *L. monocytogenes* en las tres réplicas se le asignó el color rojo; el color azul significa que el patógeno se detectó en una o dos réplicas, mientras que el color verde indica la inactivación completa del patógeno. En la Tabla 7 se presentan los resultados obtenidos en función de la cepa, la temperatura de almacenamiento y la duración del tratamiento térmico.

La lesión causada por el calor fue mayor al aumentar el tiempo de cocción, apreciándose como disminuye el número de muestras en las que se detectó su supervivencia. Como era de esperar el tratamiento de 90 min fue el más severo (Tabla 7). Lm Scott A inoculada en lomos de salmón, fue la cepa que se recuperó mejor, especialmente a 8 °C. El combinado de cepas mostró una recuperación intermedia, aunque a 4 °C la supervivencia fue elevada en los tres tiempos de cocción. La cepa de Lm CECT 4031 fue la más sensible, mostrando una gran heterogeneidad en los resultados obtenidos durante su conservación a 4 y 8 °C.

A pesar de que los tratamientos de cocción al vacío a 60 °C durante 30, 60 y 90 min en condiciones no isotermas permitieron reducir de forma significativa a *L. monocytogenes*, su vida útil sería muy reducida (< 5 días), sobre todo si no se controlan adecuadamente las condiciones de conservación del producto.

**Tabla 7** | Porcentaje de supervivencia de *Listeria monocytogenes* en las muestras tratadas a 60 °C durante 30, 60, y 90 minutos y refrigeradas a 4 y 8 °C.

	Temperatura de almacenamiento °C	Tiempo de cocción (min)	Tiempo de almacenamiento (días)						
			0	5	10	15	20	25	30
4031	4	30	100	0	0	0	66	33	33
		60	33	0	33	0	33	0	0
		90	0	0	0	0	33	0	0
	8	30	100	0	33	0	100	0	66
		60	33	0	66	0	0	33	0
		90	0	0	33	0	0	0	0
Scott A	4	30	66	100	33	66	100	100	66
		60	33	0	0	0	100	66	66
		90	0	0	0	33	0	66	0
	8	30	66	33	66	100	100	100	100
		60	33	0	0	100	100	100	100
		90	0	0	33	100	100	100	100
Combinado de cepas	4	30	33	0	66	33	100	100	66
		60	33	33	0	0	66	66	66
		90	0	33	33	0	100	66	66
	8	30	33	66	33	100	100	100	100
		60	33	33	66	0	100	100	100
		90	0	0	0	0	33	100	33

Celdas en rojo representa detección y/recuento de *Listeria monocytogenes*. en las tres réplicas, el color azul detección y/recuento en una o dos réplicas y en verde inactivación completa.

#### 4.2.5 | Supervivencia y recuperación de *Listeria monocytogenes* en lomo de salmón (*Salmo salar*) tratado a 55 °C

Como realizó Vila (2019) en un estudio similar en lomo de cerdo cocido, la alta variabilidad obtenida entre las réplicas, los intervalos de confianza de los parámetros cinéticos estimados ( $G_{max}$  y lag), así como las bandas de confianza para el modelo de crecimiento, se ajustaron mediante el método Monte Carlo, considerando el error estándar ( $SE$ ) obtenido de los cálculos proporcionados por el software *DMFit*. En cada iteración de Monte Carlo, se generaron conjuntos de datos al azar para cada tiempo de muestreo y se ajustaron con el modelo de Baranyi y Roberts. El análisis de Monte Carlo dio como resultado una distribución de densidad de probabilidad para cada uno de los parámetros del modelo y también una distribución de probabilidad para la predicción de la concentración microbiana en un momento determinado. Los intervalos de confianza definen el rango de incertidumbre en los parámetros de regresión estimados ( $G_{max}$  y lag)

mientras que las bandas de confianza definen gráficamente el rango de incertidumbre en el modelo de crecimiento de mejor ajuste (es decir, curva de crecimiento) (Posada-Izquierdo *et al.*, 2013).

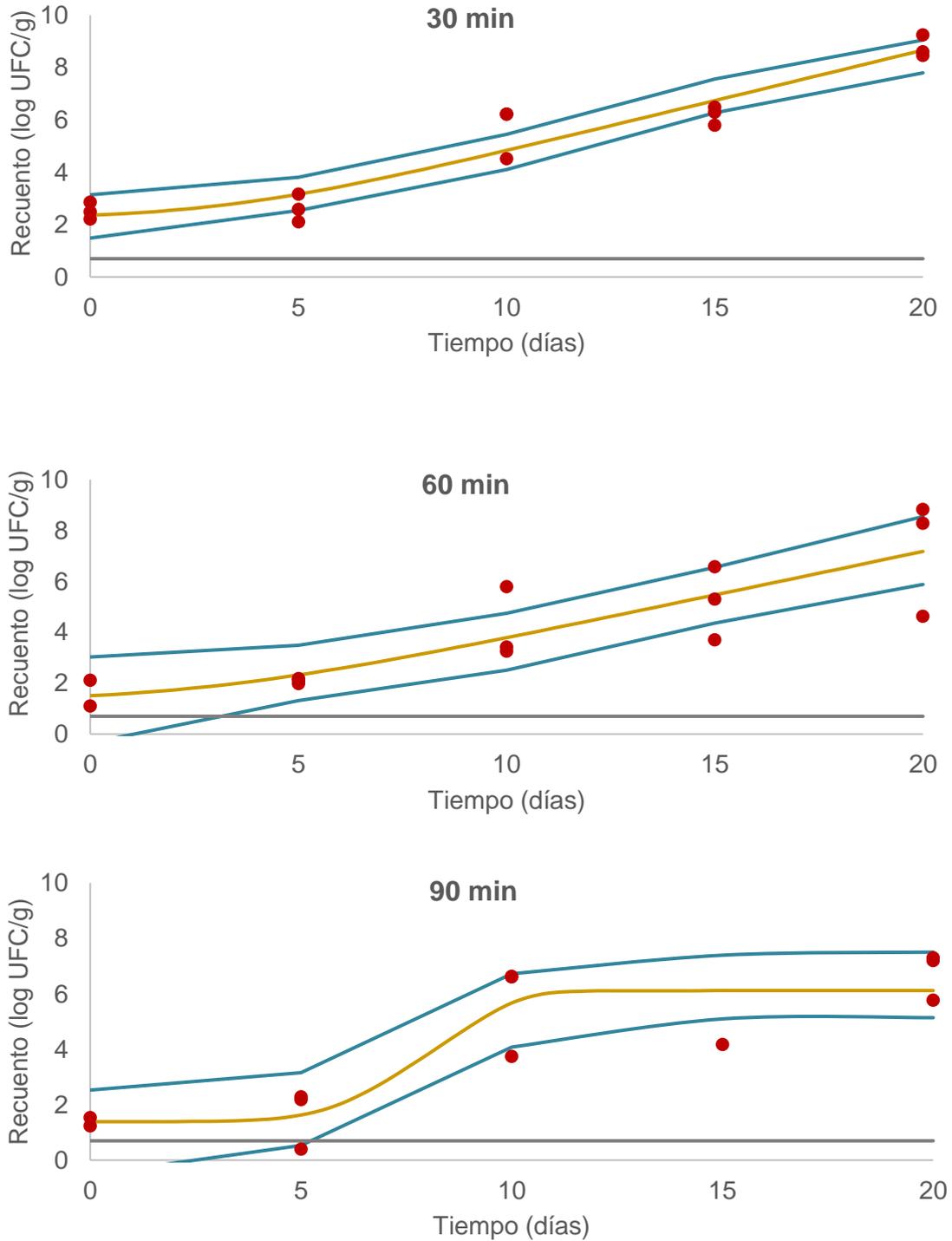
En las Figuras 22 a 27 se presenta la evolución del crecimiento de las cepas de Lm CECT 4031, Lm Scott A y el combinado de ambas cepas inoculadas en lomo de salmón tratados a 55 °C durante 30, 60 y 90 min y conservados a 4 y 8 °C. El análisis de los datos se realizó con los recuentos obtenidos del triplicado de forma individual y se representan en el gráfico con puntos rojos. Los modelos de crecimiento se fundamentan en el modelo de Baranyi y Robert (1994) con una línea amarilla, así como las bandas de confianza generadas por el análisis de Monte Carlo, que se indican con líneas azules. La línea gris muestra el límite de cuantificación que fue de 5 UFC/g. En adición, las Tablas 8 a 10 muestran los valores de los parámetros cinéticos obtenidos mediante el análisis de Monte Carlo de la tasa máxima de crecimiento ( $G_{max}$ , log UFC/día), fase de latencia (días) y el error estándar ( $SE$ ) generado por *DMFit*.

#### **4.2.5.1 / *Listeria monocytogenes* CECT 4031**

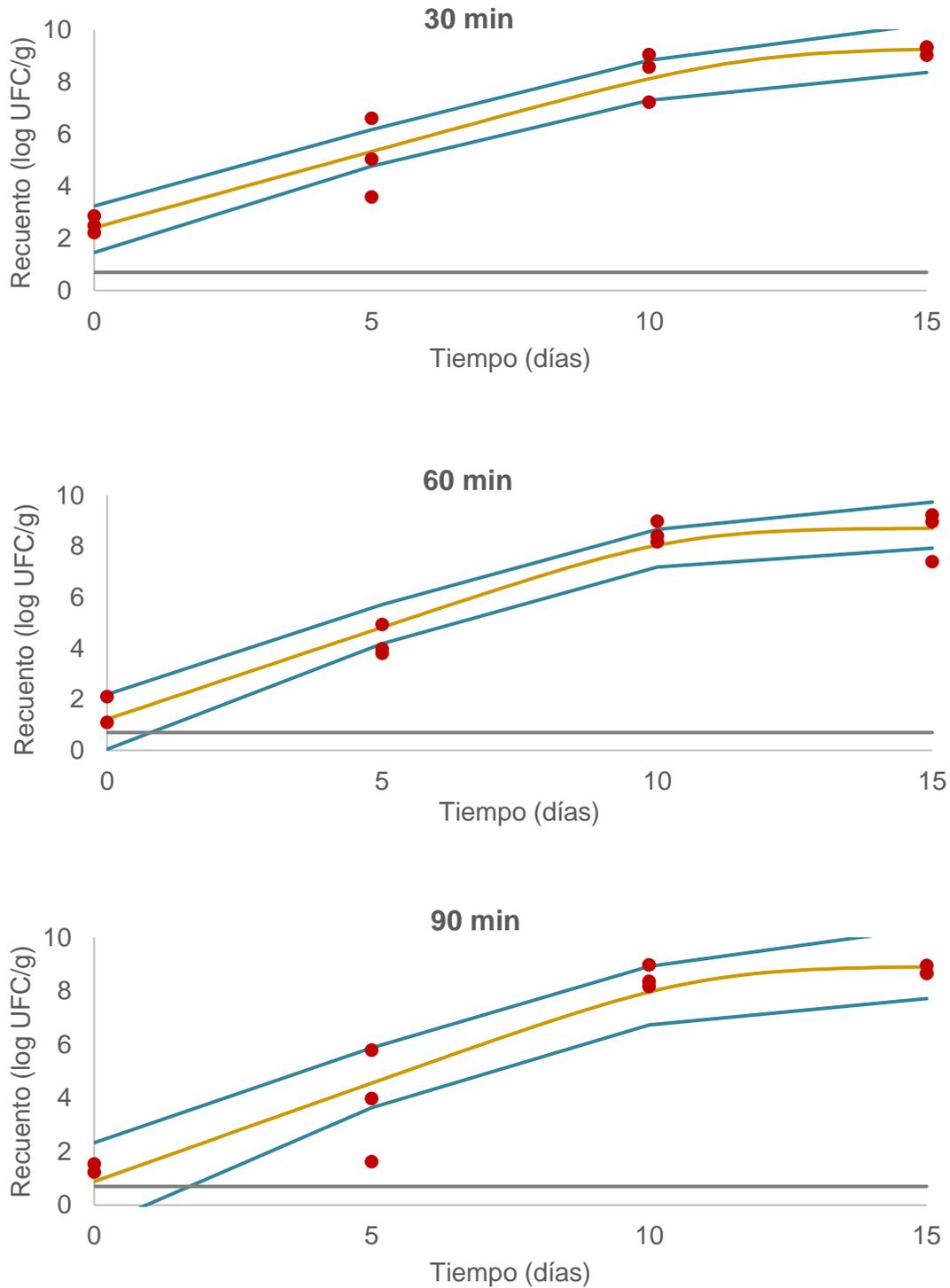
Tras la aplicación del tratamiento térmico a 55 °C, las muestras de lomo de salmón inoculadas con Lm CECT 4031 y conservadas a 4 y 8 °C, mostraron una gran variabilidad asociada sobre todo a la intensidad del tratamiento térmico, y en menor grado a la temperatura de conservación en refrigeración. En el factor intensidad de tratamiento, se debe tener en cuenta las diferencias en la letalidad, y posiblemente al distinto grado de estrés causado por el tratamiento térmico.

En las muestras almacenadas a 4 °C, se apreciaron mayores discrepancias entre la línea de mejor ajuste y los valores obtenidos a medida que aumentaba la intensidad del tratamiento térmico. Además, se observó que a mayor tiempo de cocción el intervalo comprendido entre las bandas de confianza fue más amplio (Figura 22). Las bandas de predicción son buenos indicadores del error asociado a cada punto de tiempo (Posada-Izquierdo *et al.*, 2013) y por lo tanto, de la variabilidad de los datos obtenidos. La bondad de ajuste se puede observar en la Tabla 8, con valores obtenidos ( $SE$ ) de 0.77, 1.32 y 1.34 en los tratamientos a 30, 60 y 90 min, respectivamente. A 8 °C, se observó un fenómeno similar, pero

con una mejor recuperación de la bacteria (Figura 23). Como se aprecia, tanto en la bondad de ajuste como el intervalo entre bandas, en los tratamientos de 60 y 90 min (Figura 22 y 23) fueron menores, con una bondad de ajuste de 0.84 y 1.24, respectivamente (Tabla 8). Como se indicó en estudios anteriores, cuanto más severo fue el tratamiento térmico, menor fue el promedio de bacterias supervivientes y mayor la variabilidad observada en el crecimiento microbiano (Koutsoumanis, 2008; Aguirre *et al.*, 2009).



**Figura 21** | Evolución del recuento total (puntos rojos) de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 4 °C junto a la curva de predicción basado en Baranyi y Roberts 1994 (línea amarilla), los intervalos de confianza (líneas azules) generados por el análisis de Monte Carlo (ad hoc) y el límite de cuantificación de 5 UFC/g (línea gris).



**Figura 22** | Evolución del recuento total (puntos rojos) de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 8 °C junto a la curva de predicción basado en Baranyi y Roberts 1994 (línea amarilla), los intervalos de confianza (líneas azules) generados por el análisis de Monte Carlo (ad hoc) y el límite de cuantificación de 5 UFC/g (línea gris).

En relación con los parámetros cinéticos de la tasa máxima de crecimiento ( $G_{max}$ ) y el tiempo de latencia generados por el análisis de Monte Carlo, justamente debido a la variabilidad obtenida, no es fácil su interpretación. Las muestras a 4 °C presentaron un valor medio en la fase de latencia de entre 3 y 6 días en los tres tiempos de cocción. A 8 °C, las células se recuperaron de forma rápida, sin apreciarse esta fase de adaptación tras el tratamiento térmico. En la  $G_{max}$ , y debido a la mejor recuperación de las células supervivientes de Lm CECT 4031, el valor obtenido a 8 °C fue superior al observado a 4 °C. Sin embargo, hay dos aspectos que debemos considerar:

- 1) El hecho de que la velocidad máxima de crecimiento a 8 °C de Lm CECT 4031 fue superior en los tratamientos más intensos de 60 y 90 min puede ser debido a que las células de Lm CECT 4031 tratadas a 30 min no se vieron tan afectadas, pudiendo crecer de forma inmediata, aunque más lentamente. Sin embargo, en los tratamientos más intensos, aunque quizás necesitaran más tiempo de adaptación, al comenzar la fase exponencial su crecimiento más tardío se inició a mayor velocidad. Ello puede estar asociado a una mayor aclimatación al estrés, fenómeno que como se comentó anteriormente, se puede desarrollar durante tratamientos dinámicos con una baja tasa de calentamiento (Garre *et al.*, 2018a), así como a una mayor termotolerancia y adaptación al frío de *Listeria monocytogenes* al exponerse a temperaturas subletales ligeramente por encima de la temperatura óptima de crecimiento (Sergelidis y Abraham, 2009; Shen *et al.*, 2014). Se puede ver que los tratamientos térmicos más prolongados tuvieron una mayor desviación estándar de  $G_{max}$ , por lo que las predicciones tuvieron una mayor incertidumbre, especialmente en las muestras sometidas al tratamiento de 90 min y conservadas a 4 °C.
- 2) Durante la conservación a 4 °C, en los tratamientos de 30 y 60 min, se determinaron en la fase de latencia límites de confianza al 95% inferiores negativos. Estos valores son resultados artificiales relacionados con el algoritmo de ajuste, ya que genera intervalos de confianza simétricos para

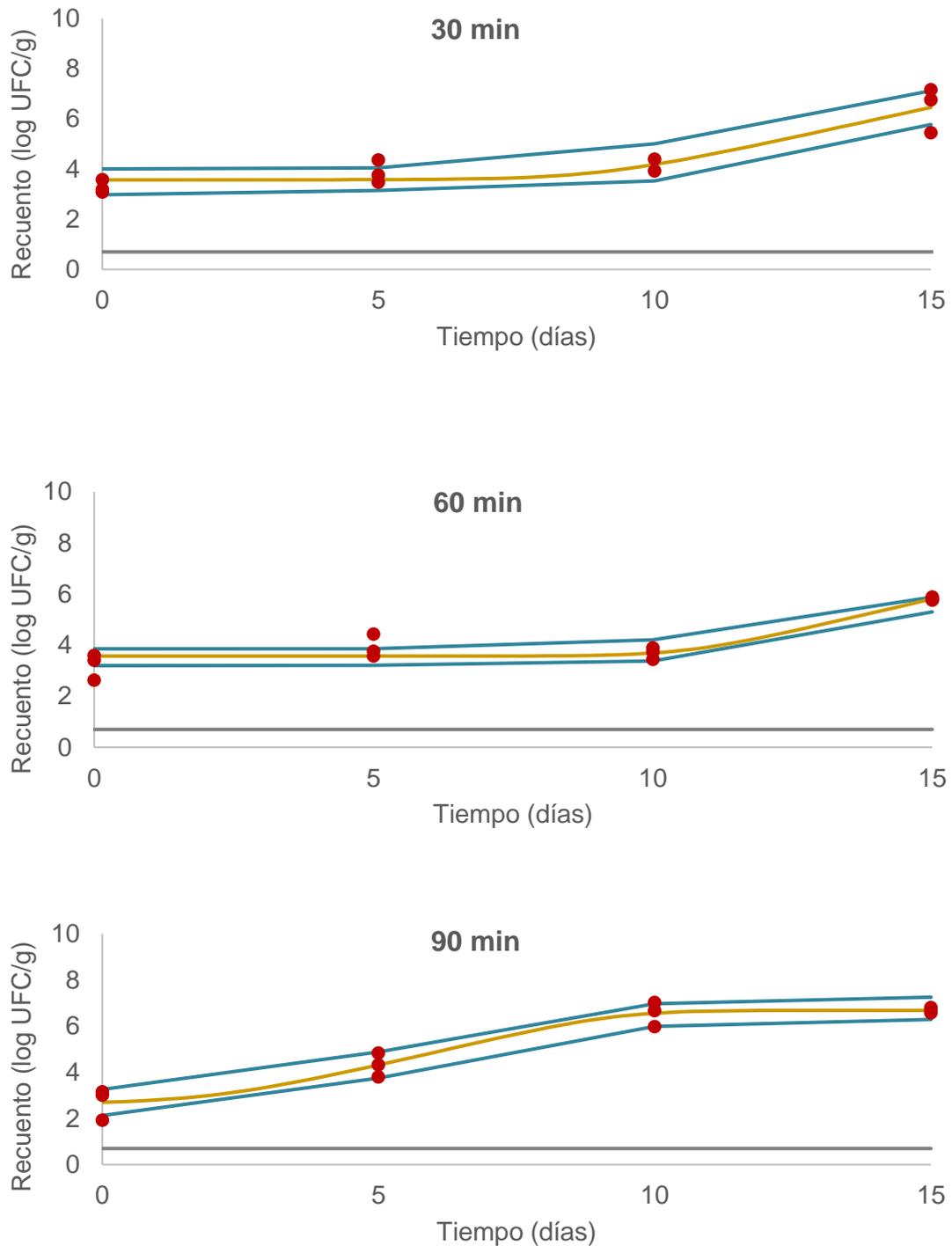
los parámetros de crecimiento. En estos casos, se sugiere el uso de otros algoritmos de ajuste, pero no los proporciona la herramienta utilizada en este estudio (Vila, 2019). La fase de latencia se define como el periodo que se puede observar, cuándo los microorganismos colonizan un nuevo hábitat, en el que las células se adaptan al nuevo entorno (Pérez-Rodríguez, 2014). Según diversos autores, es importante para la predicción, pero es difícil de definir y determinar genéricamente en condiciones representativas para escenarios prácticos de contaminación, debido a lo cual no se incluye en muchas pruebas de desafío (Beaufort *et al.*, 2014; Aryani, 2016).

**Tabla 8** | Valores de los parámetros cinéticos estimados de la evolución de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 generados por el análisis de Monte Carlo y DMFit en las muestras tratadas a 55 °C y almacenamiento a 4 y 8 °C.

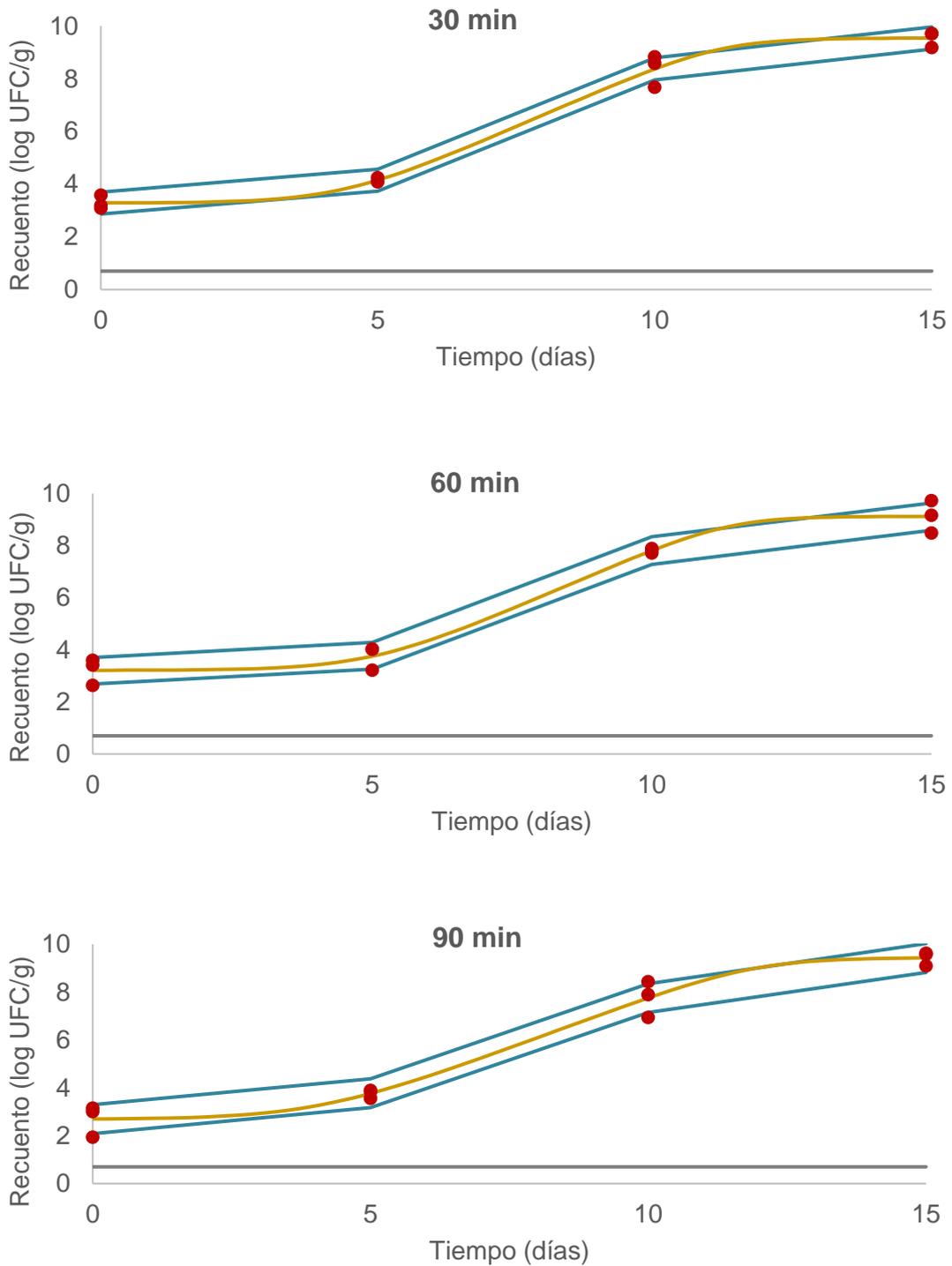
Temperatura (°C)	tiempo (min.)	Grmax (log UFC/g/d)		Tiempo de latencia (días)		SE
		Media	95 %	Media	95 %	
4 °C	30	0.44 ± 0.08	0.30 - 0.64	4.18 ± 2.29	-0.63 - 8.46	0.77
	60	0.42 ± 0.26	0.17 - 0.89	3.20 ± 7.13	-10.63 - 13.08	1.32
	90	4.15 ± 5.70	0.44 - 19.39	5.92 ± 2.72	0.86 - 9.07	1.34
8 °C	30	0.61 ± 0.09	0.45 - 0.83	-----	-----	0.88
	60	0.76 ± 0.12	0.56 - 1.03	-----	-----	0.84
	90	0.78 ± 0.17	0.51 - 1.17	-----	-----	1.24

#### 4.2.5.2 | *Listeria monocytogenes* Scott A

Debido al menor efecto del tratamiento térmico a 55 °C en los diferentes tiempos de cocción, y a diferencia de lo observado en la cepa Lm CECT 4031, se apreciaron que las diferencias entre la línea de mejor ajuste y los valores obtenidos fueron más reducidas. De igual forma ocurrió en el intervalo entre bandas, tanto a 4 °C como a 8 °C y en los tres tiempos de cocción (Figura 24 y 25), lo que se confirma en la bondad del ajuste obtenida entre 0.37 y 0.60 (Tabla 9).



**Figura 23** | Evolución del recuento total (puntos rojos) de *Listeria monocytogenes* Scott A en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 4 °C junto a la curva de predicción basado en Baranyi y Roberts 1994 (línea amarilla), los intervalos de confianza (líneas azules) generados por el análisis de Monte Carlo (ad hoc) y el límite de cuantificación de 5 UFC/g (línea gris).



**Figura 24** | Evolución del recuento total (puntos rojos) de *Listeria monocytogenes* Scott A en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 8 °C junto a la curva de predicción basado en Baranyi y Roberts 1994 (línea amarilla), los intervalos de confianza (líneas azules) generados por el análisis de Monte Carlo (ad hoc) y el límite de cuantificación de 5 UFC/g (línea gris).

Los parámetros cinéticos de la tasa máxima de crecimiento ( $G_{max}$ ) y del tiempo de latencia generados por el análisis de Monte Carlo, muestran una mayor variabilidad en el crecimiento de Lm Scott A a 4 °C. En las muestras de lomo de salmón tratadas durante 30 y 60 minutos, Lm Scott A almacenada a 4 °C fue muy similar en apariencia (Figura 24), aunque se apreció una gran variabilidad, en el parámetro de  $G_{max}$  en las muestras tratadas a 60 min. Si bien la letalidad obtenida en la cepa Scott A, en los tratamientos de 30 y 60 min, fue inferior y menos variable, el tiempo de latencia observado (alrededor de 10-12 días) fue superior al determinado en la cepa CECT 4031. De forma que, aunque la cepa Scott A es más resistente, su recuperación a 4 °C fue menor. Sin embargo, en las muestras tratadas a 90 min, si se tiene en cuenta el tiempo de latencia (unos 3 días) tuvo una mejor recuperación (Figura 24 y Tabla 9), aunque dicha fase de latencia presentó un límite de confianza inferior negativo que son resultados artificiales relacionados con el algoritmo de ajuste. Al igual en el caso de Lm CECT 4031, es posible que se haya producido una mayor aclimatación al estrés, fenómeno que se puede desarrollar durante tratamientos dinámicos con una baja tasa de calentamiento, así como a la mayor termotolerancia y adaptación al frío de *Listeria monocytogenes* (Sergelidis y Abraham ,2009; Shen *et al.*, 2014; Garre *et al.*, 2018a). Sin embargo, en las muestras conservadas a 8 °C, en la que el efecto del estrés por el frío disminuye, la recuperación fue considerablemente mejor. La cepa de Lm Scott A se recuperó más lentamente que la cepa de Lm CECT 4031, con un periodo de latencia que osciló entre 4.5 y 5.5 días en los tres tiempos de cocción aplicados (Figura 25, y Tabla 9).

**Tabla 9** / Valores de los parámetros cinéticos estimados de la evolución de *Listeria monocytogenes* Scott A generados por el análisis de Monte Carlo y DMFit en las muestras tratadas a 55 °C y almacenamiento a 4 y 8 °C.

Temperatura (°C)	tiempo (min.)	G <sub>max</sub> (log UFC/g/d)		Tiempo de latencia (días)		SE
		Media	95 %	Media	95 %	
4 °C	30	0.99 ± 0.93	0.34 – 3.34	9.95 ± 2.21	5.32 – 13.96	0.59
	60	3.77 ± 4.01	0.60 – 13.08	11.60 ± 1.51	9.71 – 14.16	0.45
	90	1.63 ± 1.28	0.38 – 3.94	3.27 ± 1.72	-0.83 – 4.88	0.50
8 °C	30	1.05 ± 0.14	0.84 – 1.31	4.71 ± 0.58	3.64 – 5.89	0.37
	60	1.22 ± 0.53	0.79 - 3.00	5.51 ± 1.14	3.80-8.46	0.47
	90	0.96 ± 0.23	0.69 – 1.29	4.31 ± 0.92	2.58 – 6.16	0.53

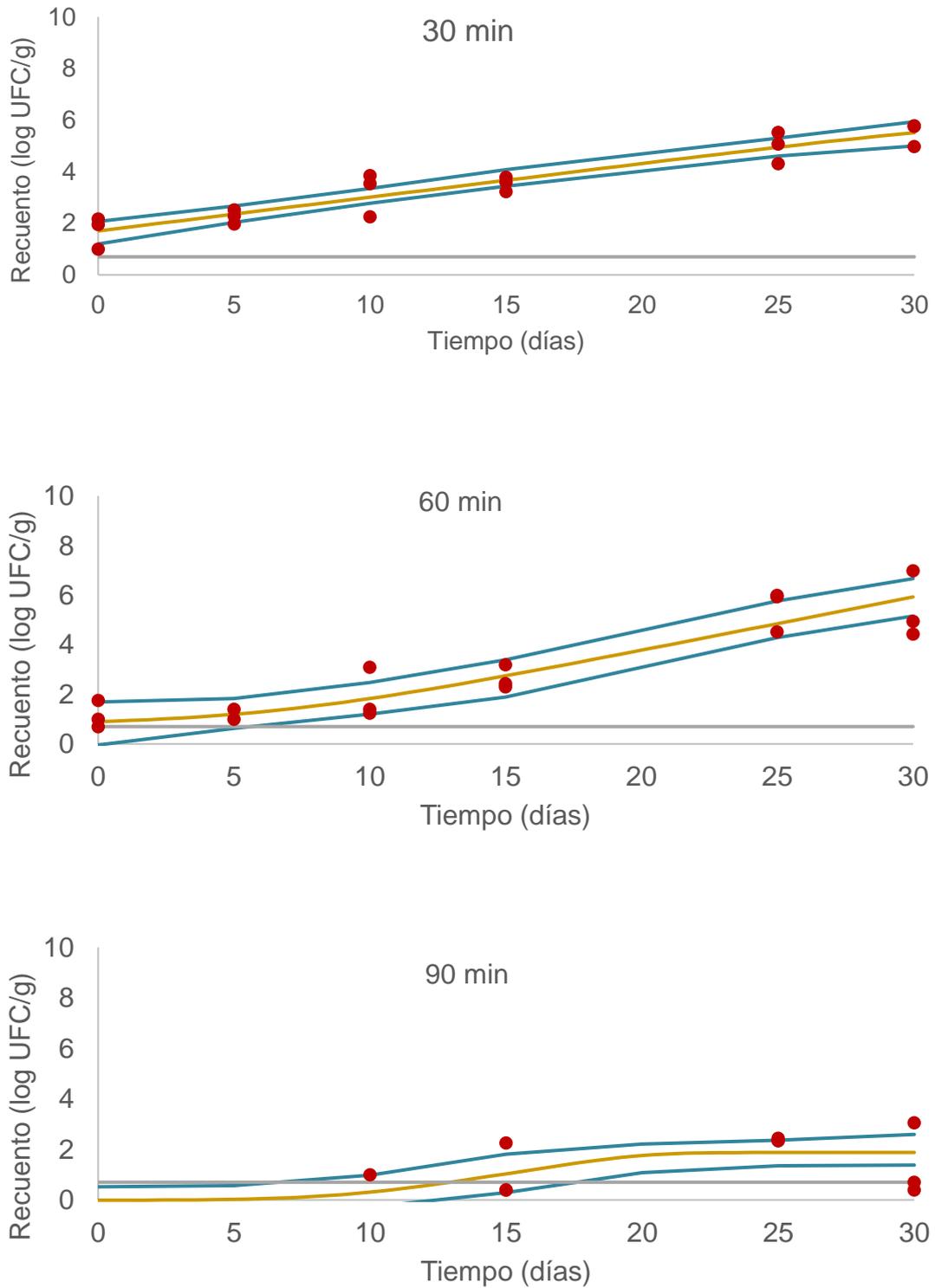
A pesar de la diferencia de letalidad obtenida entre ambas cepas de forma individual siendo la cepa Lm Scott A más termorresistente, la cepa CECT 4031 mostró una mejor recuperación durante su conservación en frío con una menor fase de latencia tanto a 4 °C como a 8 °C en los tres tiempos de cocción aplicados. Otros autores han observado un menor crecimiento de *Listeria monocytogenes* del grupo 4b como lo es Lm Scott A (aislado mayoritariamente en muestras clínicas), en relación al grupo 1/2a como es Lm CECT 4031 (Gorski *et al.*, 2006; Lianou *et al.*, 2006), tanto en estudios realizados en medio de cultivo como en alimentos.

#### 4.2.5.3 | Combinado de cepas de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 y Scott A

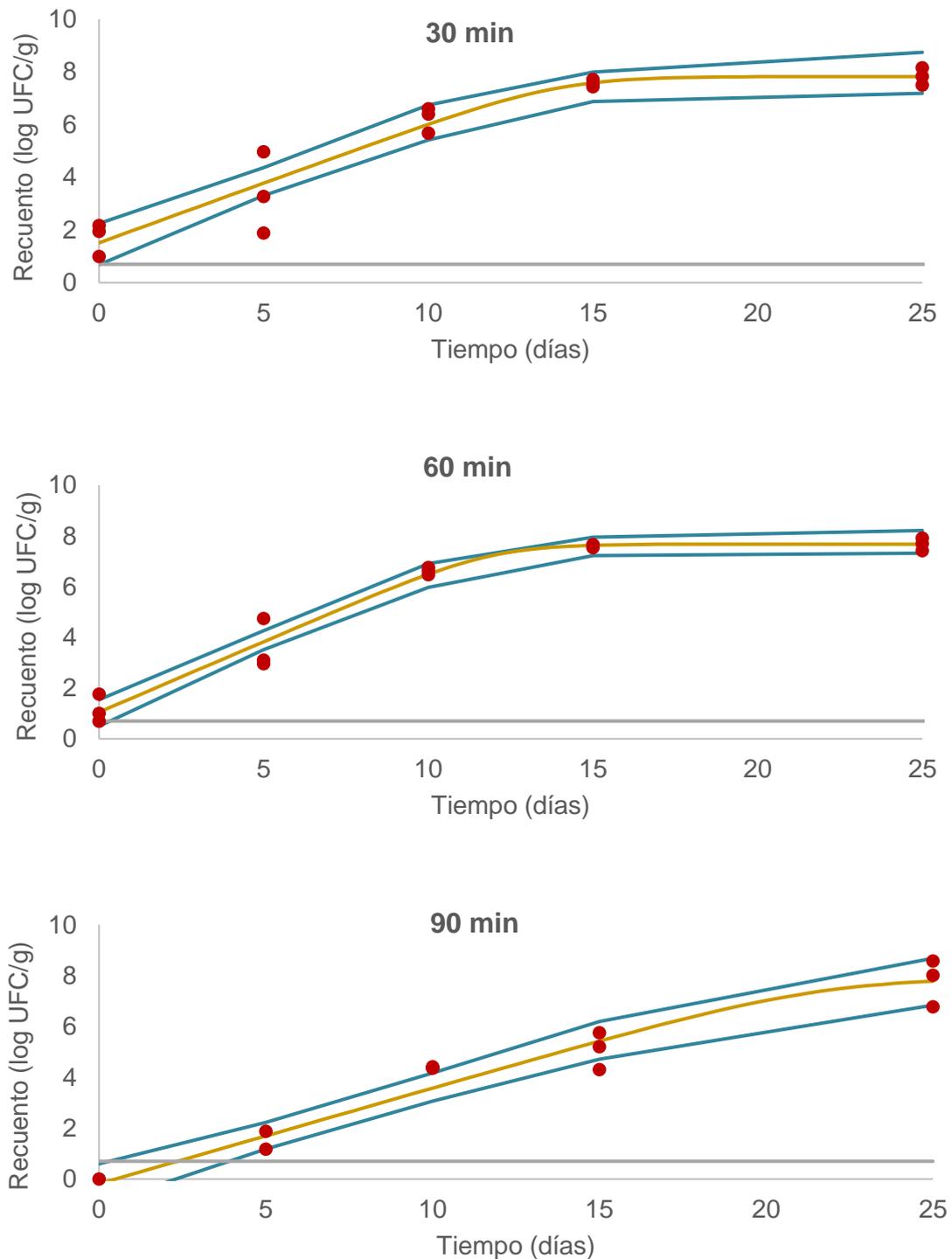
Al igual que lo observado en las muestras de lomo de salmón tratadas a 60 °C, los resultados de recuperación y crecimiento obtenidos en el combinado de cepas de Lm CECT 4031 y Lm Scott A, tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 min y conservadas a 4 y 8 °C, fueron intermedios respecto a los obtenidos con las cepas individuales. La letalidad observada fue de  $3.84 \pm 0.62$ ,  $4.39 \pm 0.65$  y  $5.55$  log UFC/g, respectivamente, con el inconveniente de que, al obtener una letalidad completa a los 90 min no pudo modelizarse.

En las muestras almacenadas a 4 °C, se apreciaron mayores discrepancias entre la línea de mejor ajuste y los valores obtenidos a medida que aumentaba la intensidad del tratamiento térmico similar a lo obtenido con Lm CECT 4031.

Además, se observó que, a mayor tiempo de cocción, el intervalo comprendido entre las bandas de confianza fue más amplio (Figura 26). Sin embargo, la bondad de ajuste (SE) fue mejor que el obtenido con Lm CECT 4031 (Tabla 8), oscilando entre 0.51 y 0.89 (Tabla 10), aunque algo más alto que el obtenido con Lm Scott A (Tabla 9). De forma similar a Lm Scott, en las muestras conservadas a 8 °C las diferencias entre la línea de mejor ajuste y los valores obtenidos fueron más reducidos. También, en el intervalo entre las bandas en los tres tiempos de cocción (Figura 26 y 27) y que se ratifica con la bondad de ajuste obtenida que, si bien fue superior para Lm Scott A, se puede considerar adecuada, oscilando entre 0.50 y 0.84 (Tabla 10).



**Figura 25** | Evolución del recuento total (puntos rojos) del **Combinado de cepas de *Listeria monocytogenes*** en las muestras tratadas a **55 °C** durante 30 y 60 minutos refrigeradas a **4 °C** junto a la curva de predicción basado en Baranyi y Roberts 1994 (línea amarilla), los intervalos de confianza (líneas azules) generados por el análisis de Monte Carlo (ad hoc) y el límite de cuantificación de 5 UFC/g (línea gris).



**Figura 26** | Evolución del recuento total (puntos rojos) del **Combinado de cepas de *Listeria monocytogenes*** en las muestras tratadas a **55 °C** durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a **8 °C** junto a la curva de predicción basado en Baranyi y Roberts 1994 (línea amarilla), los intervalos de confianza (líneas azules) generados por el análisis de Monte Carlo (ad hoc) y el límite de cuantificación de 5 UFC/g (línea gris).

En relación con los parámetros cinéticos de la tasa máxima de crecimiento ( $G_{max}$ ) y el tiempo de latencia generados por el análisis de Monte Carlo, la mayor variabilidad se determinó a 4 °C, igual que en el crecimiento de Lm Scott A. Al aumentar el tiempo de cocción se afectó principalmente la fase de latencia, en la que se observó un fenómeno similar al de Lm CECT 4031 a 8 °C. La velocidad máxima de crecimiento fue superior en los tratamientos más intensos, sobre todo de 90 min, y que puede ser debido a que las células de *Listeria monocytogenes* tratadas a 30 min no se vieron tan afectadas, pudiendo crecer de forma inmediata, pero más lentamente (0.14 log UFC/g/día). Sin embargo, en el tratamiento de 60 min, aunque precisara de más tiempo de adaptación (7.9 días), al comenzar la fase exponencial, su crecimiento se inició a mayor velocidad (0.27 log UFC/g/día). En el caso de los tratamientos de 90 min, en los que a tiempo 0 se determinó la letalidad total en las muestras analizadas, la variabilidad tanto en el valor  $G_{max}$  como en la fase de latencia fue muy elevada (Tabla 10). De hecho, se puede considerar que su crecimiento fue insignificante (Figura 26). Tanto a 60 como a 90 min, la fase de latencia presentó el límite de confianza inferior negativo.

A 8 °C, la temperatura de almacenamiento permitió la recuperación y crecimiento del combinado de cepas de *Listeria monocytogenes* sin determinarse la fase de latencia en ninguno de los tres tratamientos aplicados (Figura 27, Tabla 10). Como ya se observó en las muestras inoculadas con Lm CECT 4031 que presentaron una  $G_{max}$  muy similar, a esta temperatura de 8 °C hasta las células más lesionadas (las tratadas a 90 min) pudieron recuperarse igual que las menos afectadas por el tratamiento térmico (Tabla 10).

**Tabla 10** | Valores de los parámetros estimados de la evolución del **Combinado de cepas de *Listeria monocytogenes*** generados por el análisis de Monte Carlo y *DMFit* en las muestras tratadas a **55 °C** y almacenamiento a **4 y 8 °C**.

Temperatura (°C)	tiempo (min.)	Grmax (log UFC/g/d)		Tiempo de latencia (días)		SE
		Media	95 %	Media	95 %	
4 °C	30	0.14 ± 0.02	0.11 – 0.20	-----	-----	0.51
	60	0.27 ± 0.12	0.16 – 0.42	7.89 ± 4.69	-2.45 – 16.04	0.89
	90	1.85 ± 2.77	0.06 – 7.59	10.46 ± 11.71	-14.00 – 19.07	0.75
8 °C	30	0.48 ± 0.07	0.36 – 0.62	-----	-----	0.76
	60	0.58 ± 0.05	0.48 – 0.68	-----	-----	0.50
	90	0.38 ± 0.05	0.30 – 0.47	-----	-----	0.84

La variabilidad de las cepas se define como una característica inherente de los microorganismos que no se puede reducir cuando las cepas se tratan de manera idéntica en el mismo conjunto de condiciones (Whiting y Golden, 2002). Si bien las diferencias entre cepas se ha demostrado que puede ser una fuente importante de variabilidad en la cinética de inactivación térmica (Doyle *et al.*, 2001; Aryani *et al.*, 2015b;) explicaría entre 1/2 y 2/3 de la variabilidad encontrada en la literatura (Aryani *et al.*, 2015b). Por el contrario, la contribución de la variabilidad de la cepa a la variabilidad total en la cinética de crecimiento aún se desconoce. En un estudio realizado por Aryani *et al.* (2015a), en el que se cuantificó el impacto de la variabilidad sobre la tasa máxima de crecimiento, y en el que se utilizaron 20 cepas distintas de *L. monocytogenes*, se determinó que la variabilidad experimental fue claramente menor que la variabilidad biológica (reproducibilidad entre experimentos). Este aspecto se ha observado en esta tesis, concretamente en los resultados diferenciales obtenidos entre las cepas individuales y los del combinado de cepas, de forma que, en nuestro caso, la variabilidad biológica fue similar a la variabilidad de la cepa. Además, Aryani *et al.* (2015a), para ilustrar el efecto de la variabilidad de la cepa sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en productos alimenticios con varias características, obtuvieron, diferencias de entre 2-4 log UFC/g en la predicción del crecimiento entre las cepas menos y más robustas, siendo Lm Scott A considerada como una cepa robusta. Es por ello, que estos autores subrayaron la importancia de obtener datos cuantitativos de la influencia de los factores de variabilidad para predecir de una manera realista la cinética del crecimiento microbiano. Por lo

tanto, para tener en cuenta las variaciones en el crecimiento y la supervivencia entre las cepas, se aconsejaría que los estudios de desafío (*Challenge test*) se realicen utilizando un inóculo compuesto por múltiples cepas (es decir, un cóctel) de un patógeno dado. Esto ayudaría a abarcar la variabilidad entre organismos y pudiera reducir el número de pruebas requeridas (NACMCF, 2010).

### 4.3 *Salmonella enterica* subsp *enterica*

#### 4.3.1 | Efecto del tratamiento térmico de cocción al vacío en lomo de salmón (*Salmo salar*) inoculado con serovares de *Salmonella enterica* subsp *enterica*

Tras el tratamiento térmico a 55 °C durante 30, 60 y 90 min, la letalidad obtenida en las cepas de los serovares *S. Enteritidis*, *S. Senftenberg* y el combinado de cepas fueron de entre 0.31 y 3.62 log UFC/g, 1.25 y 5.43 log UFC/g, y 1.65 y 5.29 log UFC/g, respectivamente (Tabla 11). En general, se observó un incremento en la letalidad a medida que aumentó el tiempo de cocción aplicado, aunque se apreciaron diferencias en función del serovar.

La cepa del serovar de *Salmonella* Enteritidis mostró una mayor letalidad en los tres tiempos de cocción aplicados (Tabla 11), incluso considerando que el valor  $F_{9,1}^{55}$ , o valor de cocción obtenido fue inferior a los aplicados al otro serovar o a su combinación (Tabla 4). Estos resultados confirman la mayor termosensibilidad de este serovar (Jay *et al.*, 2005). Por otra parte, el serovar Senftenberg y el combinado de cepas de los dos serovares de *Salmonella* presentaron letalidades más reducidas, siendo similares a los 30 y 60 min de cocción. Sin embargo, la letalidad de *S. Senftenberg* tras 90 minutos de cocción fue significativamente inferior a la del combinado de cepas. A pesar de que el serovar Senftenberg se haya descrito como más termorresistente (Murphy *et al.*, 2004a; Wareing *et al.*, 2010), la fase de calentamiento de *S. Senftenberg* fue más prolongada que para el combinado de serovares. Si se aplica el modelo de inactivación log lineal de Bigelow, el serovar Senftenberg tuvo un tratamiento térmico a 55 °C de 27 y 12 minutos más que el aplicado en el combinado de serovares, en los procesos de 30 y 60 minutos, respectivamente (Tabla 4).

En las muestras de salmón tratadas a 60 °C, se alcanzó desde el punto de vista cuantitativo una letalidad total en todos los tiempos de cocción aplicados en *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Senftenberg, siendo la reducción observada superior o igual a 5 log UFC/g (Tabla 11). Sin embargo, tras la incubación de las muestras se detectó la presencia de células viables de *S. Enteritidis* en algunas muestras tratadas durante 30 y 60 min, y en todas las muestras de *S. Senftenberg*, independientemente del tratamiento térmico.

Debido a problemas técnicos que surgieron durante la conservación de las muestras inoculadas con la combinación de serovares, el tratamiento térmico a 60 °C se realizó en diferentes períodos. En las muestras que posteriormente se conservaron a 4 °C, se consiguió la letalidad completa aparente (cuantitativa) en los tratamientos de 60 y 90 min. De forma similar, se detectó la presencia de células de *Salmonella* en todas las muestras del serovar Senftenberg. Sin embargo, en las muestras que posteriormente se conservaron a 8 °C, este resultado sólo se observó en las muestras tratadas durante 90 min, mientras que en las tratadas durante 30 y 60 min no se consiguió la letalidad cuantitativamente completa, lo cual afectará a su posterior recuperación y crecimiento, como se comentará más adelante.

**Tabla 11** | Efecto del tratamiento térmico sobre *Salmonella* spp. en función del tiempo y tratamiento de cocción aplicado.

Serovar	Temperatura °C	Letalidad (log UFC/g)		
		Tiempo de cocción		
		30	60	90
Enteritidis	55	3.62 ± 0.14 <sup>aB</sup>	5.43 ± 0.66 <sup>bA</sup>	5.29 ± 0.68 <sup>bAB</sup>
Senftenberg		0.65 ± 0.33 <sup>aD</sup>	1.74 ± 0.48 <sup>bC</sup>	1.65 ± 0.48 <sup>bD</sup>
Combinado		0.31 ± 0.09 <sup>aD</sup>	1.25 ± 0.02 <sup>bC</sup>	3.70 ± 0.50 <sup>cC</sup>
Enteritidis	60	4.96 ± 0.00 <sup>aA</sup>	4.96 ± 0.00 <sup>aA</sup>	4.96 ± 0.00 <sup>aAB</sup>
Senftenberg		5.71 ± 0.00 <sup>aA</sup>	5.71 ± 0.00 <sup>aA</sup>	5.71 ± 0.00 <sup>aA</sup>
Combinado		<sup>x</sup> 4.20 ± 0.74 <sup>aB</sup>	5.03 ± 0.00 <sup>aA</sup>	5.03 ± 0.00 <sup>aAB</sup>
		<sup>y</sup> 1.59 ± 0.50 <sup>aC</sup>	3.92 ± 0.45 <sup>bB</sup>	4.44 ± 0.00 <sup>bBC</sup>

<sup>x</sup> muestras refrigeradas a 4 °C

<sup>y</sup> muestras refrigeradas a 8 °C

<sup>a-b</sup> Diferentes letras minúsculas en las filas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de cocción y una misma cepa.

<sup>A-D</sup> Diferentes letras mayúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes cepas a una misma temperatura de cocción.

La mayor resistencia del serovar *S. Senftenberg* 775W ha sido descrita desde hace mucho tiempo por diversos autores (Davidson *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 1969; Doyle y Mazzota, 2000; Murphy *et al.*, 2001; Mañas *et al.*, 2003; O'Bryan *et al.*, 2006; Koyama *et al.*, 2017). Si bien no es el serovar más frecuentemente implicado en casos de toxiinfección alimentaria, a menudo se utiliza como microorganismo de referencia. De manera que, si un proceso térmico es eficaz frente a este serovar, también lo será para los serovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* más comunes (Doyle y Mazzota, 2000). Es por ello por lo que Jarvis *et al.* (2016) consideran que las cepas y serovares altamente resistentes al calor deben identificarse y utilizarse en estudios posteriores para determinar los criterios de procesamiento que permitan obtener un alimento seguro. Sin embargo, hay discrepancias en cuanto a su utilización, justamente porque no son representativas de las cepas que razonablemente se esperan que estén presentes en los alimentos correspondientes (NACMCF, 2010).

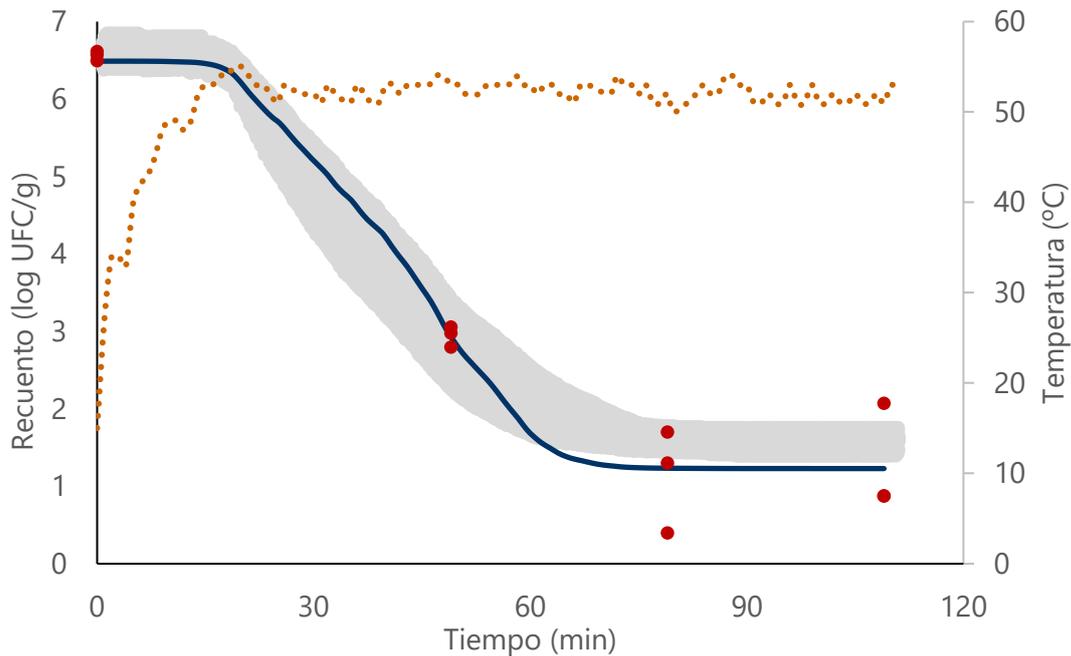
#### **4.3.2 | Modelización de la inactivación térmica en condiciones no isotermas de *Salmonella enterica***

Como en el caso de *Listeria monocytogenes*, se utilizó el programa *Bioinactivation FE* para modelizar la curva de supervivencia de las muestras inoculadas de forma individual y combinada con cepas de dos serovares de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Esto ocurrió en los tratamientos realizados a 55 °C durante 30, 60 y 90 min, en los cuales los recuentos de las tres réplicas de los tres experimentos fueron superiores al límite de cuantificación (5 UFC/g). No se realizó la modelización del tratamiento a 60 °C debido a que los recuentos fueron inferiores al límite de cuantificación en la mayor parte de las muestras.

En las Figuras 28, 29, 30 y 31 se presentan los modelos de inactivación con mejor ajuste a los datos experimentales de los tratamientos con los intervalos de predicción del 90% generados por *Bioinactivation FE* y el perfil de temperatura, siendo los modelos de Geeraerd, de Mafart y de Bigelow los que mostraron el mejor ajuste para los diferentes serovares. En la Tabla 12 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos de los modelos, así como los índices estadísticos que miden la bondad de la predicción (RSME y  $B_f$ ).

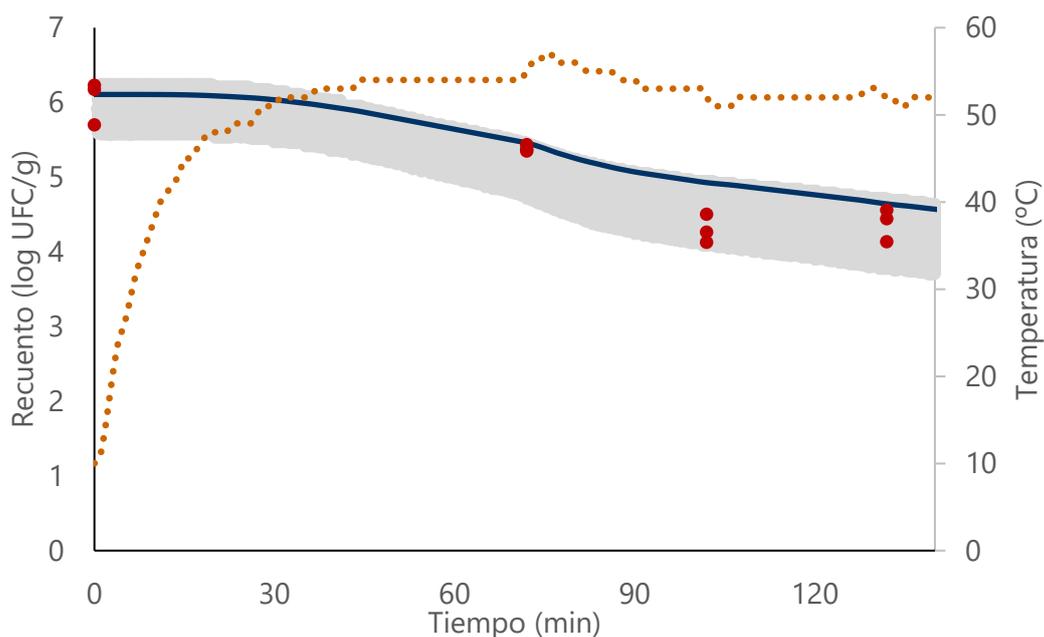
En la evaluación de la cinética de letalidad de *Salmonella* Enteritidis inoculada en lomo de salmón tratada a 55 °C, el modelo que presentó un mejor ajuste, considerando los valores *RMSE* y *B<sub>f</sub>* (Tabla 12), fue el de Geeraerd de tipo sigmoideal con una fase de hombro, una fase de inactivación logarítmica lineal y una fase de cola (Figura 28). Respecto a la fase de hombro, el valor *C<sub>c</sub>*, el cual se relaciona con un conjunto de componentes protectores o críticos alrededor o dentro de cada célula, presentó un valor medio alrededor de 21. Este valor fue menor del obtenido con el combinado de serovares de *Salmonella*, que presentó un valor de aproximadamente 483, lo que indica su mayor termosensibilidad (Tabla 12). Con relación a la cola, el valor de densidad de la población residual o *N<sub>res</sub>* según Geeraerd *et al.*, (2005), fue de  $1.23 \pm 0.96$  log UFC/g, valor final que puede ser considerado elevado, si bien es cierto que se partió de una concentración inicial de 6.56 log UFC/g (*N<sub>0</sub>*).

Como se comentó anteriormente, este fenómeno en las curvas de inactivación se ha atribuido a la heterogeneidad en una población microbiana con respecto a la resistencia de las células individuales frente al estrés letal (Abee *et al.*, 2016). En los tratamientos durante 60 y 90 min se apreció esta dispersión o heterogeneidad, obteniendo recuentos que oscilan entre 0.40 y 2.07 log UFC/g (Figura 28). El fenómeno de las colas es importante desde un punto de vista práctico, ya que la posible presencia de un pequeño porcentaje de células capaces de sobrevivir a un tratamiento térmico representa un riesgo para la seguridad alimentaria. En muchos casos, las colas se atribuyen a causas metodológicas, como la heterogeneidad de la distribución del calor. Sin embargo, factores relacionados con la fisiología celular también pueden explicar la presencia de colas. La existencia de una distribución de termotolerancia intrínseca dentro de la población bacteriana da lugar a la presencia de fenómenos de adaptación microbiana que ocurren durante el tratamiento, incluso a temperaturas letales (Mackey y Derrick, 1987).



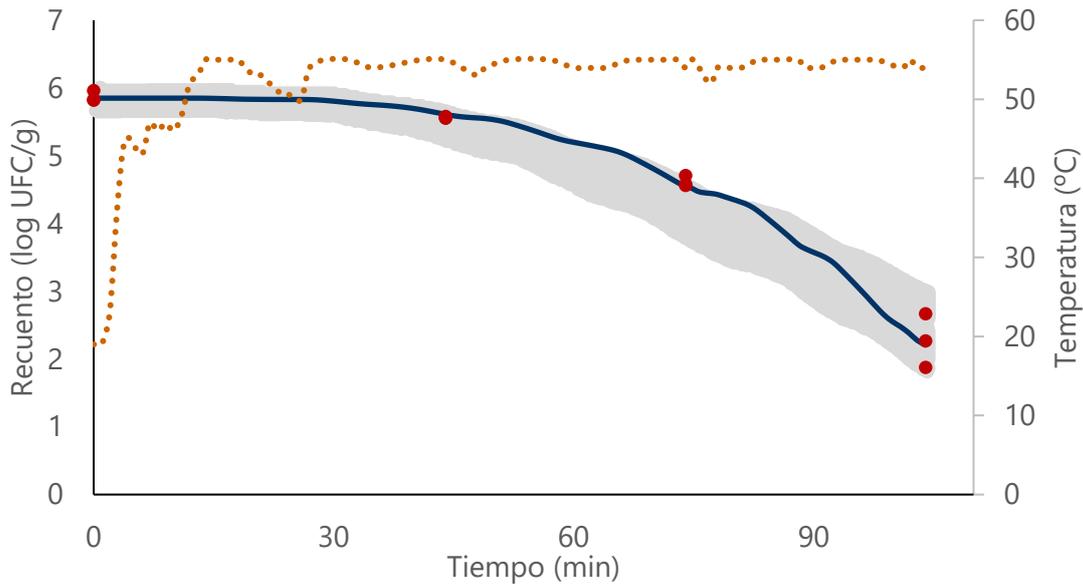
**Figura 27** | Curva de supervivencia de *Salmonella Enteritidis* a 55 °C generada por *Bioinactivation FE* (línea azul) ajustada al modelo **Geeraerd**. También, se presenta el recuento total (puntos rojos) de las muestras tratadas durante 30, 60 y 90 minutos, el perfil de temperatura registrado durante el experimento (línea discontinua naranja) y el intervalo de predicción del 90% de la reducción microbiana.

Respecto al serovar *S. Senftenberg*, el mejor ajuste obtenido fue para el modelo lineal de Bigelow. Es decir, que a una temperatura constante la densidad microbiana sigue una relación logarítmica lineal en el tiempo, asociada al hecho de que todas las células tienen la misma sensibilidad al efecto letal del calor (Mackey y Derrick, 1987; Waal, 2017). Desde el inicio, la velocidad de inactivación fue muy lenta (Figura 29), siendo el valor D obtenido de aproximadamente 52 min (Tabla 12) lo que quizás le permita mantener su capacidad de crecer en condiciones de refrigeración, como se comentará en los siguientes apartados.

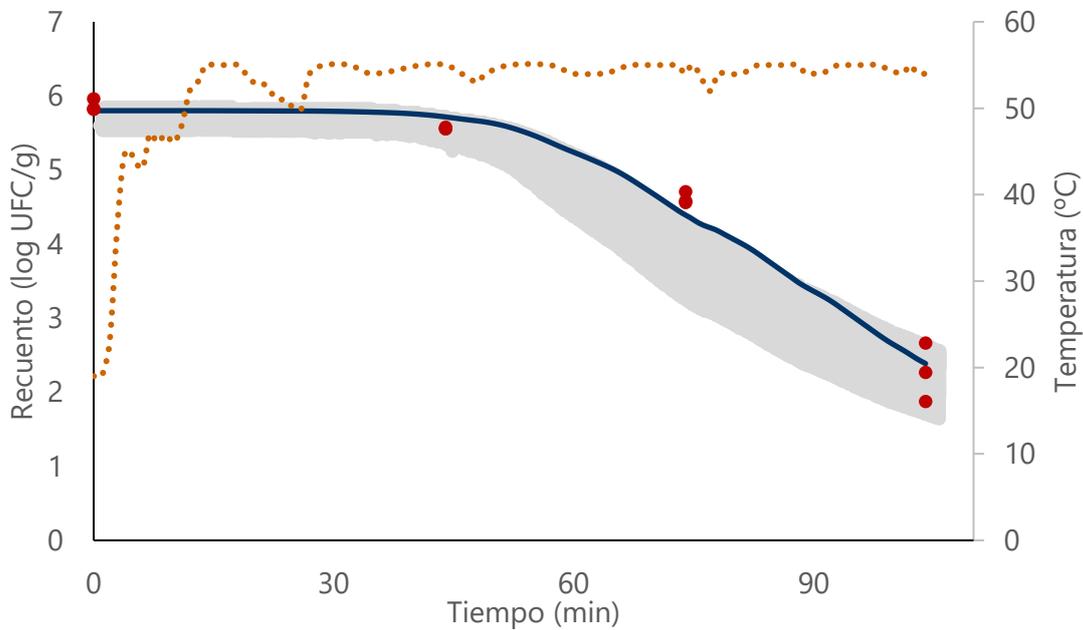


**Figura 28** | Curva de supervivencia de *Salmonella Senftenberg* a 55 °C generada por *Bioinactivation FE* (línea azul) ajustada al modelo **Bigelow**. También, se presenta el recuento total (puntos rojos) de las muestras tratadas durante 30, 60 y 90 minutos, el perfil de temperatura registrado durante el experimento (línea discontinua naranja) y el intervalo de predicción del 90% de la reducción microbiana.

En la evaluación de la cinética de letalidad del combinado de serovares *S. Enteritidis* y *S. Senftenberg* inoculados en lomo de salmón tratada a 55 °C, el mejor ajuste obtenido fue para los modelos de Mafart y de Geeraerd (Figura 30 y 31). Ambos modelos son bastante similares, ya que en el modelo de Geeraerd el efecto cola es inapreciable ( $N_{res}$  fue 0). Lo que fue más singular fue el efecto hombro, evidenciado en el modelo de Mafart por la obtención de un valor  $p$  muy superior a 1 (3.10), que refleja una función cóncava, y en el modelo de Geeraerd por un valor  $C_c$  de 483. De forma similar a lo observado en *S. Enteritidis*, el efecto hombro se atribuye a la presencia de células con lesiones subletales. De modo que el recuento microbiano no comienza a descender hasta que la cantidad y la gravedad de la lesión celular superan un umbral determinado (Geeraerd *et al.*, 2000; Cebrián *et al.*, 2017).



**Figura 29** | Curva de supervivencia del **Combinado de serovares de *Salmonella*** a **55 °C** generada por *Bioinactivation FE* (línea azul) ajustada al modelo **Mafart**. También, se presenta el recuento total (puntos rojos) de las muestras tratadas durante 30, 60 y 90 minutos, el perfil de temperatura registrado durante el experimento (línea discontinua naranja) y el intervalo de predicción del 90% de la reducción microbiana.



**Figura 30** | Curva de supervivencia del **Combinado de serovares de *Salmonella*** a **55 °C** generada por *Bioinactivation FE* (línea azul) ajustada al modelo **Geeraerd**. También, se presenta el recuento total (puntos rojos) de las muestras tratadas durante 30, 60 y 90 minutos, el perfil de temperatura registrado durante el experimento (línea discontinua naranja) y el intervalo de predicción del 90% de la reducción microbiana.

La estimación del valor  $z$  fue similar al presentado por van Asselt y Zwietering (2006), con un valor de 9.1 °C. Sin embargo, y al igual que en el caso del valor  $D$ , hay diferencias según la matriz de análisis. Se han descrito valores inferiores, entre 4 y 6.5 °C, en tampón fosfato, en alimentos a base de pollo, carne de cerdo o espinacas (Murphy *et al.*, 2004b, 2002; Osaili *et al.*, 2007; Monu *et al.*, 2015; Karyotis *et al.*, 2017). Pero también, muy superiores, concretamente de 43 °C en matrices cárnicas con alto contenido en grasa inoculada con el serovar *S. Senftenberg* (Ramirez-Hernandez *et al.*, 2017).

Respecto al valor  $D$  generado al aplicar el *software* de *Bioinactivation FE*, se observa en la Tabla 12 que hay claras diferencias entre los serovares *S. Enteritidis*, *S. Senftenberg* o la combinación de serovares. El serovar *S. Enteritidis* tuvo un valor  $D$  medio de 4.26 min. Mientras que, la combinación de serovares y el serovar *S. Senftenberg*, osciló entre 13 min en el modelo Geeraerd, a más de 50 min en el combinado de serovares con el modelo Mafart y el serovar *S. Senftenberg* (Tabla 12). En el combinado de serovares, hay una clara diferencia entre el modelo Geeraerd y Mafart, en función de cuando comienza la fase de inactivación lineal. Por su mejor bondad de ajuste y su mayor similitud con el modelo del serovar *S. Senftenberg*, el modelo de Mafart fue el que mejor se ajustó al comportamiento del efecto térmico a 55 °C en lomo de salmón.

En estudios realizados en condiciones similares, tanto en matrices alimentarias como en medios de cultivo (caldo o agar), los valores  $D$  obtenidos han sido muy variables en función del serovar estudiado. En el caso de *S. Enteritidis*, muy estudiado en huevo, el valor  $D$  determinado osciló entre 1.2 y 6 min, según sea clara o huevo líquido entero (Doyle y Mazzota, 2000; Jin *et al.*, 2008). En otros estudios, realizados en su mayoría con una combinación de serovares en los que habitualmente se incluye a *S. Senftenberg*, los valores oscilaron entre 10 y 45 min (Murphy *et al.*, 2004a; Jarvis *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). También, se han determinado valores  $D$  que se aproximan o son incluso superiores al de nuestro estudio (Osaili *et al.*, 2007; Karyotis *et al.*, 2017; Vila, 2019). Asimismo, esta dispersión fue evaluada por van Asselt y Zwietering (2006), en la revisión de los valores  $D$  de diversos patógenos, obteniendo para *Salmonella* un valor  $D$  medio de 6.58 min, y de 173.1 min en el intervalo de confianza al 95%.

En relación con la destrucción térmica de *Salmonella* durante el procesado y preparación de los alimentos, la revisión más reciente realizada por Jarvis *et al.* (2016) concluyó que a pesar de que las matrices cárnicas han sido muy estudiadas aún falta información sobre la resistencia al calor en productos de la pesca, frutas y verduras, teniendo en cuenta que los componentes de los alimentos también influyen en la resistencia al calor. Además, destacan las diferencias existentes entre los distintos serovares, por lo que se necesita una comprensión más profunda de la biología de *Salmonella* y la capacidad mecanicista de los diferentes serovares para responder al estrés térmico.

**Tabla 12** | Parámetros del modelo (media  $\pm$  desviación estándar e intervalos de confianza del 95%) de inactivación *Bioinactivation FE* de *Salmonella enterica* subsp *enterica* a 55 °C.

Serovar	Modelo	$D_{ref}^1$	$\delta_{ref}^1$	$p$	$z^2$	$\log N_0^3$	$\log N_{res}^3$	Cc	RMSE	$B_f$
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Geeraerd	4.26 $\pm$ 0.52 (4.07 – 5.86)	- -	- -	8.65 $\pm$ 0.56 (8.05 – 9.93)	6.49 $\pm$ 0.08 (6.21 – 6.49)	1.23 $\pm$ 0.96 (0.52-1.56)	21.39 $\pm$ 5.97 (10.28 – 31.13)	1.91	1.04
<i>Salmonella</i> Senftenberg	Bigelow	52.06 $\pm$ 10.69 (46.12- 82.87)	- -	- -	9.84 $\pm$ 0.57 (8.05 - 9.97)	6.12 $\pm$ 0.14 (5.71 - 6.18)	- -	- -	1.16	0.92
Combinado <i>Salmonella</i>	Mafart	- -	62.00 $\pm$ 4.30 (50.48 – 66.09)	3.10 $\pm$ 0.35 (2.21 – 3.39)	9.00 $\pm$ 0.61 (8.04 – 9.97)	5.85 $\pm$ 0.07 (5.75 – 5.99)	- -	- -	0.35	0.94
	Geeraerd	12.94 $\pm$ 1.04 (11.18 – 14.86)			8.48 $\pm$ 0.59 (80.3 – 9.92)		0.00	482.54 $\pm$ 27.52 (403.48 – 497.39)	0.59	1.04

Unidades: <sup>1</sup>minutos, <sup>2</sup> temperatura °C, <sup>3</sup> log UFC/g.

De los resultados obtenidos, especialmente en *L. monocytogenes*, pero también en *Salmonella*, se demuestra que los tiempos de inactivación de las células dentro de una población no son variables aleatorias distribuidas de manera idéntica. Por lo tanto, la población incluye subpoblaciones de células con diferentes distribuciones para los parámetros de resistencia. Por esta razón, a medida que aumenta la intensidad del tratamiento térmico, aumentó la variabilidad tanto a los 60 min como especialmente a los 90 min, fenómeno que ya había sido descrito por otros autores (Aguirre *et al.*, 2009; Lianou y Koutsoumanis, 2011; Vila, 2019).

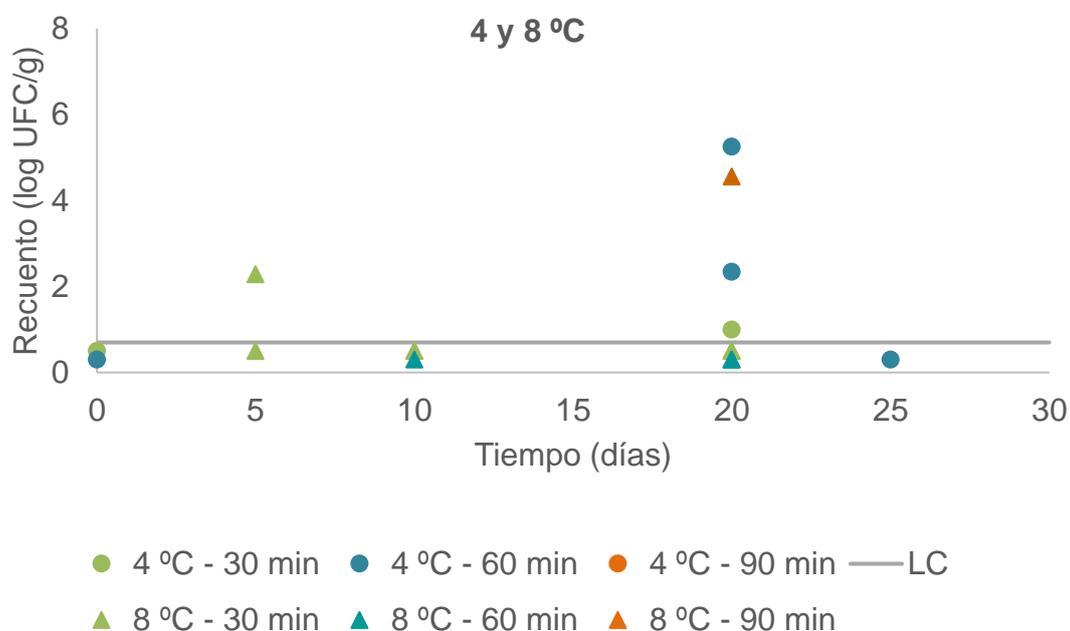
#### **4.3.3 | Efecto del tratamiento térmico de cocción al vacío en la supervivencia de *Salmonella enterica* subsp *enterica* en lomo de salmón**

De forma similar a lo que se realizó con *Listeria monocytogenes*, el efecto del tratamiento de cocción sobre el grado de lesión y su recuperación posterior se evaluó durante la conservación en frío de las muestras de lomo de salmón a 4 y 8 °C. Los resultados se muestran en Tablas o Figuras dependiendo de cómo el tratamiento de cocción o conservación en frío afectó el comportamiento de los diferentes serovares, ya que el crecimiento, supervivencia y muerte de *Salmonella* puede ocurrir simultáneamente, después del estrés por calor, por frío o por choque osmótico (Aguirre *et al.*, 2009; Aspridou *et al.*, 2018; Vila, 2019). Como se ha comentado en el apartado anterior, al aplicar tratamientos térmicos suaves, se produce una alta heterogeneidad en la respuesta individual de las células, especialmente al aumentar la intensidad del tratamiento. En consecuencia, la complejidad en el comportamiento de las poblaciones microbianas aumenta en la fase de recuperación y supervivencia del microorganismo (Aspridou y Koutsoumanis, 2015), como ya se observó en el caso de *L. monocytogenes*.

### 4.3.4 | Supervivencia y recuperación de *Salmonella enterica* en lomo de salmón cocinado al vacío a 60 °C

#### 4.3.4.1 | *Salmonella* Enteritidis

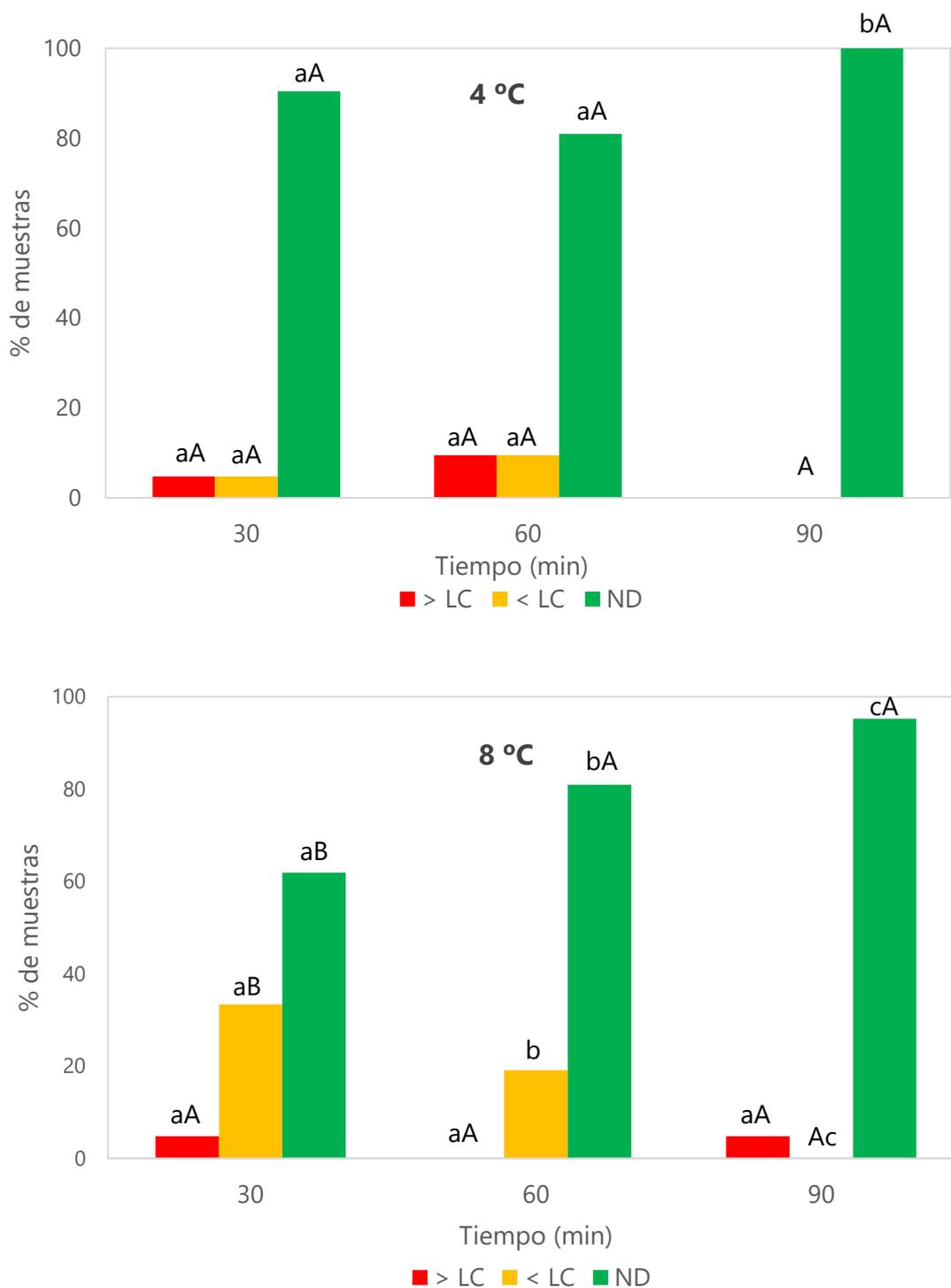
La letalidad de la cepa de *Salmonella* Enteritidis tras el tratamiento de las muestras de salmón a 60 °C fue, desde el punto de vista cuantitativo total en todos los tiempos de cocción (Tabla 11). Sin embargo, esta letalidad no fue completa en los tratamientos de 30 y 60 min, ya que al realizar su investigación a 37 °C, se detectó su presencia en una de las tres réplicas analizadas. Tras el tratamiento de 90 min la letalidad fue aparentemente completa. No obstante, durante su conservación en refrigeración se detectó su supervivencia, recuperación y, puntualmente, crecimiento (Figura 32). El tratamiento térmico causó una importante lesión en *S. Enteritidis* que, en combinación con la temperatura de conservación baja, limitó su crecimiento tanto a temperaturas a 4 °C como 8 °C en los tres tiempos de cocción. Sin embargo, puntualmente en algunas de las muestras se determinó la presencia de células supervivientes, y en algunos casos se obtuvieron recuentos superiores al límite de cuantificación (5 UFC/g) (Figura 32).



**Figura 31** | Recuento total de *Salmonella* Enteritidis en las muestras tratadas a 60 °C y almacenadas a 4 y 8 °C. La línea gris muestra el límite de cuantificación (LC) de 5 UFC/g.

En la evaluación cualitativa, agrupando las muestras en función del comportamiento de *S. Enteritidis* (> LC, < LC y ND), se observaron diferencias en la intensidad del tratamiento térmico. En las muestras en las que no se detectó el patógeno, se apreciaron diferencias entre los tratamientos de 30 y 60 min con respecto al de 90 min. De hecho, en este último tratamiento, no se detectó el patógeno en el 100% de las muestras conservadas a 4 °C (Figura 33). A 8 °C, las diferencias entre tratamientos fueron más evidentes en el porcentaje de muestras en las que no se detectó el patógeno. El tratamiento de 30 min fue en el que se evidenció el menor efecto lesivo del calor, con un porcentaje de muestras significativamente más elevado que presentaron supervivencia de *S. Enteritidis* (38 %) (Figura 33).

Es evidente que el tratamiento térmico a 60 °C, con independencia del tiempo de aplicación, tuvo un efecto importante en la viabilidad de *S. Enteritidis*. Éste causó daños en los componentes celulares, ocasionando la muerte de algunas células bacterianas, pero no de todas. De forma que en función del estrés producido su supervivencia y/o crecimiento se vio muy limitada en el tiempo (Yousef y Abdelhamid, 2019).



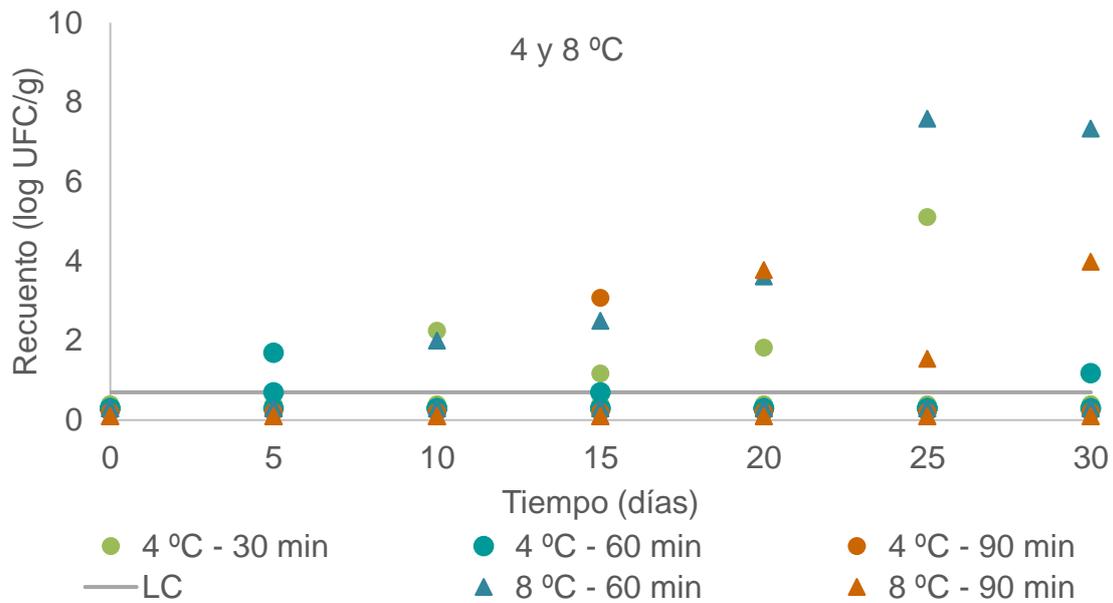
**Figura 32** | Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con *Salmonella Enteritidis* y tratadas a 60 °C, con recuento superior del límite de cuantificación (>LC) (en rojo), recuento inferior al (<LC) (en amarillo) y muestras en las que la inactivación fue completa (ND) (en verde) durante el almacenamiento a 4 y 8 °C. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de cocción con el mismo criterio de agrupación del comportamiento de *Salmonella Enteritidis* (> LC, < LC y ND). Diferentes letras mayúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre temperaturas de conservación con el mismo criterio de agrupación del comportamiento de *Salmonella Enteritidis* (> LC, < LC y ND).

#### 4.3.4.2 | *Salmonella* Senftenberg

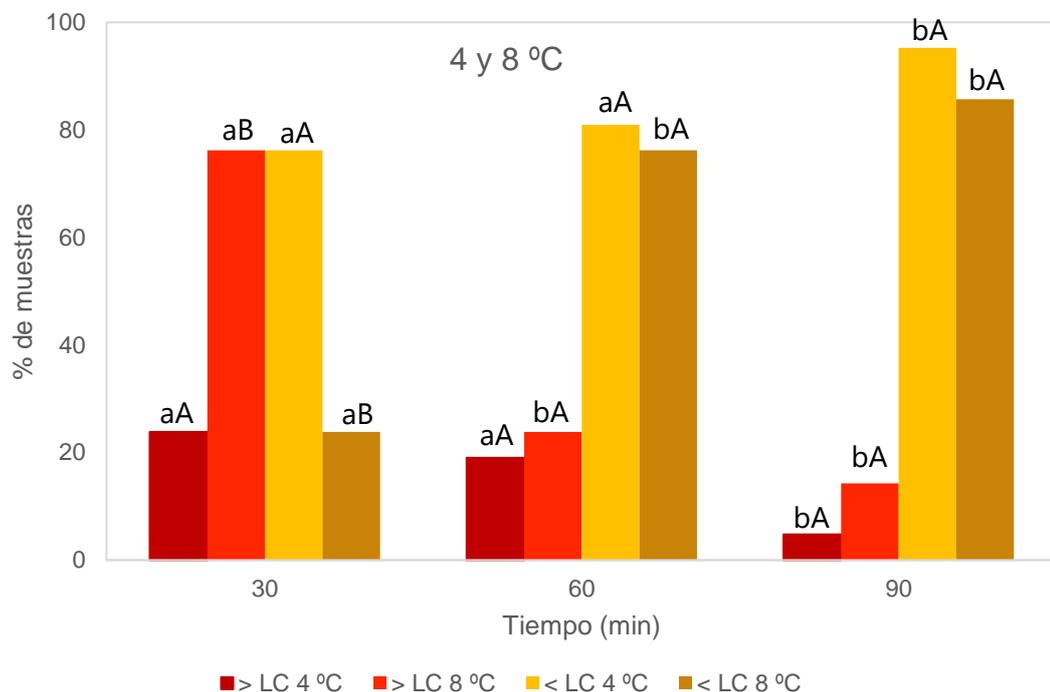
En el caso de la cepa de *Salmonella* Senftenberg, tras la aplicación del tratamiento térmico a 60 °C, se obtuvo una letalidad superior a 5 log UFC/g en los tres tiempos de cocción aplicados (Tabla 11). A diferencia de lo observado en *S. Enteritidis*, en todas las muestras analizadas, e independientemente del tratamiento térmico y de la temperatura de conservación se detectó la presencia de *S. Senftenberg* (Figura 34). Posiblemente, debido a su mayor resistencia a los tratamientos térmicos (O'Brien *et al.*,2009). No obstante, al igual que en *S. Enteritidis* su desarrollo también se vio condicionado por la intensidad del tratamiento y la temperatura de conservación.

A 4 °C predominaron las muestras con un recuento inferior al límite de cuantificación en todos los tratamientos, especialmente en las tratadas durante 90 min (Figura 34). Cualitativamente, en las muestras tratadas durante 30 y 60 min, el porcentaje de muestras con recuentos por encima del límite de detección fue similar (entorno al 20 %) (Figura 35), aunque los recuentos alcanzados en las muestras tratadas durante 30 min fueron superiores (Figura 34).

A 8 °C el desarrollo de *S. Senftenberg* fue también limitado en los tratamientos de 60 y 90 min, con un porcentaje de muestras por encima del límite de detección similar al obtenido en la conservación a 4 °C (Figura 35). Sin embargo, los recuentos obtenidos fueron muy superiores desde el día 10 en los tratados durante 60 min. A partir del día 25 se alcanzaron recuentos de 8 log UFC/g, mientras que los tratados durante 90 min alcanzaron recuentos de 4 log UFC/g entre el día 20 y 30 (Figura 34). En el caso del tratamiento durante 60 min, aunque se puede observar una tendencia positiva de crecimiento, los datos experimentales no se ajustaron al modelo crecimiento de Baranyi. Sin embargo, sí se pudo modelizar en las muestras tratadas durante 30 min (Figura 36).

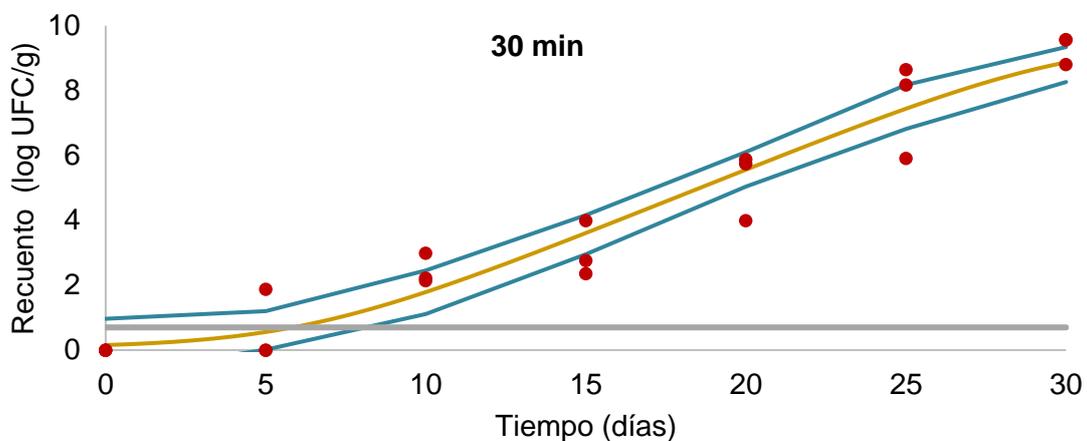


**Figura 33** | Recuento total de *Salmonella Senftenberg* en las muestras tratadas a 60 °C y almacenadas a 4 y 8 °C. La línea gris muestra el límite de cuantificación (LC) de 5 UFC/g.



**Figura 34** | Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con *Salmonella Senftenberg* y tratadas a 60 °C con recuento superior del límite de cuantificación (>LC), recuento inferior al límite de cuantificación (<LC) durante el almacenamiento a 4 y 8 °C. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de cocción con el mismo criterio de agrupación del comportamiento de *S. Senftenberg* (> LC y < LC). Diferentes letras mayúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre temperaturas de conservación con el mismo criterio de agrupación del comportamiento de *S. Senftenberg* (> LC y < LC).

El tratamiento de 60 °C durante 30 min fue insuficiente para inactivar por completo las células de *S. Senftenberg*, lo que permitió su desarrollo a 8 °C (Figura 36). A pesar de ello, se apreciaron discrepancias entre la línea de mejor ajuste y los valores obtenidos. Si bien en los parámetros cinéticos se apreció una bondad de ajuste aceptable ( $SE=0.94$ ) y una tasa máxima de crecimiento estimada ( $G_{max}$ ) de  $0.40 \pm 0.05$  log UFC/g/día, la fase de latencia obtenida fue más variable, con un valor de  $6.37 \pm 2.20$  días, aunque el intervalo de confianza al 95 % osciló entre 1.81- 10.41 días.



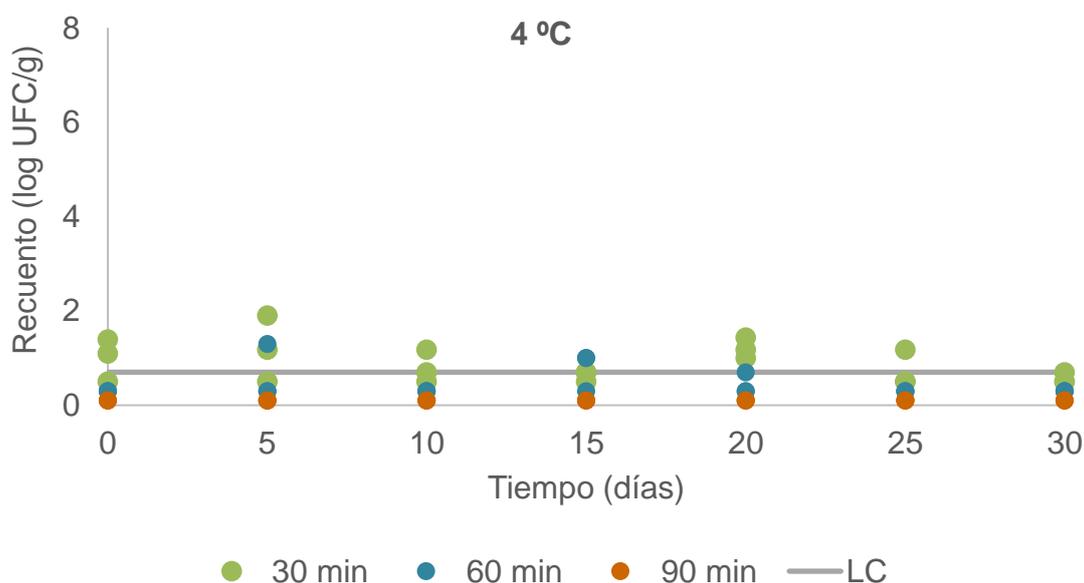
**Figura 35** | Evolución del recuento total (puntos rojos) de *Salmonella Senftenberg* en las muestras tratadas a 60 °C durante 30 minutos refrigeradas a 8 °C junto a la curva de predicción basado en Baranyi y Roberts 1994 (línea amarilla), los intervalos de confianza (líneas azules) generados por el análisis de Monte Carlo (ad hoc) y el límite de cuantificación de 5 UFC/g (línea gris).

#### 4.3.4.3 | Combinado de serovares de *Salmonella*

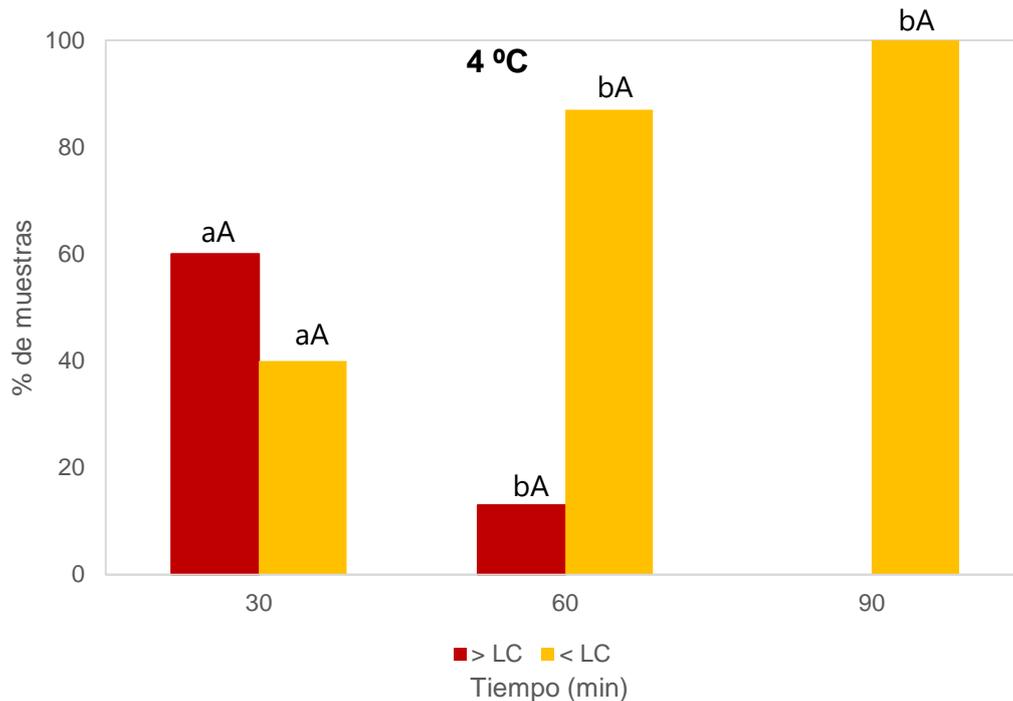
En el caso del combinado de serovares de *Salmonella*, los resultados obtenidos en su supervivencia y recuperación a 4 y 8 °C fueron muy diferentes entre ellos, debido a que los tratamientos térmicos se realizaron en diferentes períodos. A pesar de que el control del proceso se realizó de forma similar, la letalidad obtenida fue superior en las muestras conservadas a 4 °C que en las conservadas a 8 °C (Tabla 11). Estas condiciones experimentales evidencian la presencia de variabilidad biológica o de reproducción, que se define como las diferencias halladas entre experimentos reproducidos de forma independiente

con la misma cepa. Es decir, realizados en diferentes ensayos a partir de nuevos cultivos y medios de cultivo. Aryani (2015) diferencia este tipo de variabilidad que se observa entre distintas cepas de un mismo microorganismo y la variabilidad experimental observada entre las réplicas de una misma condición experimental.

La letalidad del combinado de serovares de *Salmonella* tras el tratamiento de las muestras de lomo de salmón a 60 °C y conservadas a 4 °C, fue total desde el punto de vista cuantitativo en las muestras tratadas durante 60 y 90 min (Tabla 11). Sin embargo, se detectó su presencia tras la incubación de la muestra a 37 °C. Además, en estos mismos tratamientos predominaron las muestras con un recuento inferior al límite de cuantificación (> 85 %), de forma similar a lo obtenido en el serovar *S. Senftenberg*. En las muestras tratadas durante 30 min el porcentaje de muestras con recuentos por encima de límite de detección fue de un 60%, muy superior al obtenido en *S. Senftenberg* (Figura 35 y 38). A pesar de ello, el crecimiento a esta temperatura fue muy limitado, con recuentos inferiores a 1.9 log UFC/g en los tratamientos de 30 min y de 1 log UFC/g en los de 60 min (Figura 37).



**Figura 36** | Recuento total de **Combinado de serovares** de *Salmonella* en las muestras tratadas a 60 °C y almacenadas a 4 °C. La línea gris muestra el límite de cuantificación (LC) de 5 UFC/g.

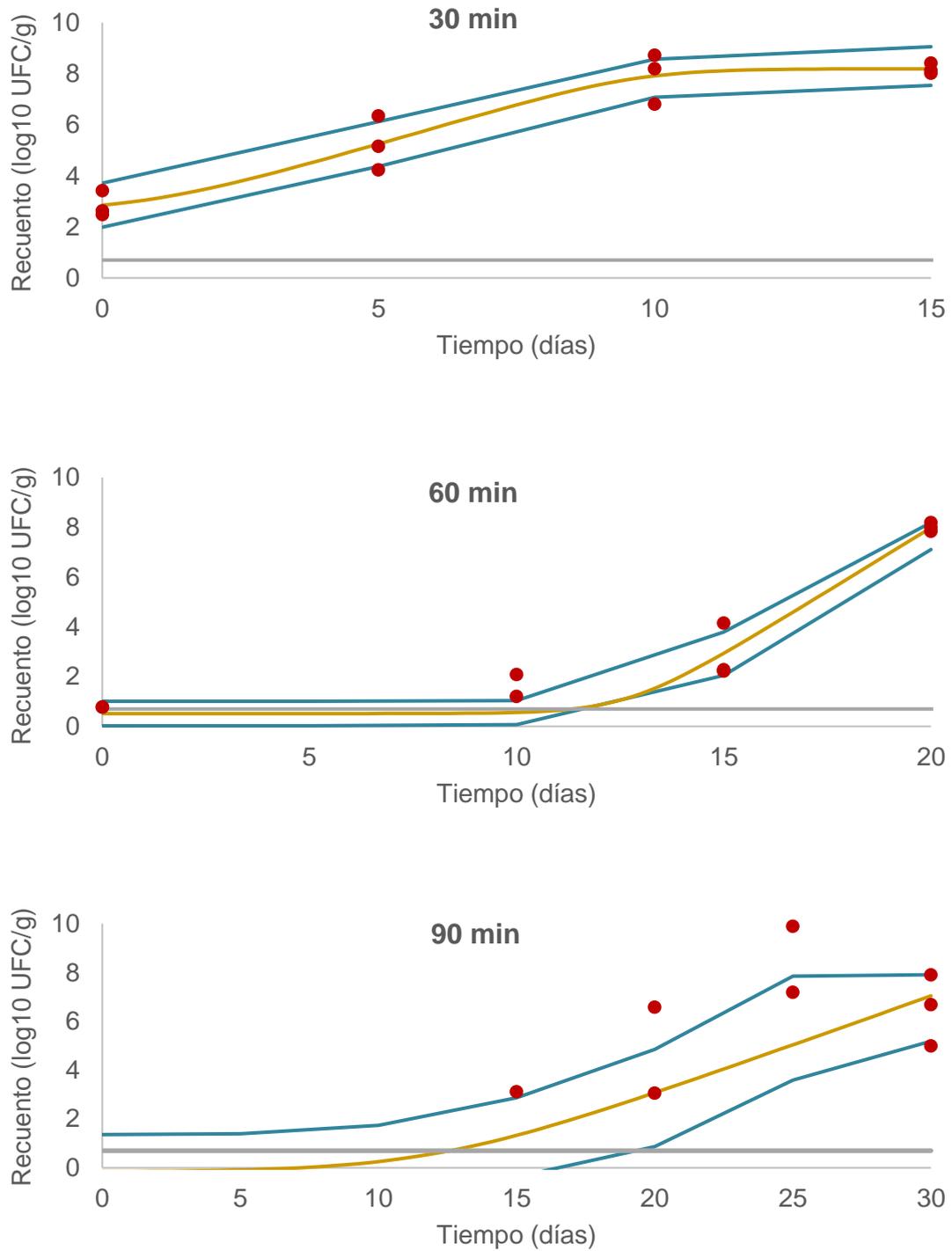


**Figura 37** | Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con el **Combinado de serovares de *Salmonella*** tratadas a **60 °C**, con recuento superior del límite de cuantificación (>LC), recuento inferior al límite de cuantificación (<LC) durante el almacenamiento a **4 °C**. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de cocción con el mismo criterio de agrupación del comportamiento del combinado de serovares de *Salmonella* (> LC y < LC). Diferentes letras mayúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre temperaturas de conservación con el mismo criterio de agrupación del comportamiento del combinado de serovares de *Salmonella* (> LC y < LC).

La letalidad del combinado de serovares de *Salmonella* tras el tratamiento de las muestras de lomo de salmón a 60 °C que posteriormente se conservaron 8 °C, fue inferior ( $p < 0.05$ ) tanto si se compara con las muestras conservadas a 4 °C, como respecto a los serovares individualmente inoculados en los lomos de salmón (Tabla 11). La letalidad a 30 y 60 min de cocción fue de 1.6 y 4 log UFC/g, respectivamente, lo que afectó a la recuperación y crecimiento del combinado de serovares (Figura 39). En el tratamiento de 90 min la letalidad fue cuantitativamente completa, aunque en todas las muestras se evidenció la presencia de *Salmonella*.

En la evaluación de su recuperación durante la conservación a 8 °C se apreciaron mayores diferencias entre la línea de mejor ajuste y los valores obtenidos a medida que aumentaba la intensidad del tratamiento térmico. Además, se observó que a mayor tiempo de cocción el intervalo comprendido

entre las bandas de confianza fue más amplio, especialmente en las muestras tratadas durante 90 min. En gran medida, esto se ratifica con los valores de bondad de ajuste del modelo ( $SE$ ) que fue de 0.77, 0.75 y 2.21 en los tratamientos a 30, 60 y 90 min, respectivamente (Tabla 13).



**Figura 39** | Evolución del recuento total (puntos rojos) del **Combinado de serovares de Salmonella** en las muestras tratadas a **60 °C** durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a **8 °C** junto a la curva de predicción basado en Baranyi y Roberts 1994 (línea amarilla), los intervalos de confianza (líneas azules) generados por el análisis Monte Carlo (ad hoc) y el límite de cuantificación de 5 UFC/g (línea gris).

En relación con los parámetros cinéticos de la tasa máxima de crecimiento (Grmax) y tiempo de latencia generados por el análisis de Monte Carlo, se aprecia la variabilidad en los resultados obtenidos, especialmente en el tratamiento de 90 min en el parámetro del tiempo de latencia (IC -2.89 – 22.99 días). Si bien a 30 y 60 min la velocidad máxima de crecimiento fue similar, las diferencias en la recuperación, posiblemente debido a una menor lesión causada por el calor, viene determinada por la fase de latencia, que fue muy inferior en el caso del tratamiento de 30 min. Tanto en el tratamiento de 30 min como de 90 min se obtuvieron valores de latencia negativos, que son resultados artificiales relacionados con el algoritmo de ajuste, debido a que el modelo utilizado genera intervalos de confianza simétricos para los parámetros de crecimiento (Tabla 13).

**Tabla 13|** Valores de los parámetros cinéticos estimados de la evolución del **Combinado de serovares de *Salmonella*** generados por el análisis de Monte Carlo y *DMFit* en las muestras tratadas a **60 °C** y almacenamiento a **8 °C**.

Temperatura (°C)	tiempo (min)	Grmax (log UFC/g/día)		Tiempo de latencia (días)		SE
		Media	95 %	Media	95 %	
8 °C	30	1.44 ± 1.10	0.31 – 3.55	1.95 – 2.98	-5.34 – 4.66	0.77
	60	2.02 ± 1.19	0.88 – 4.37	13.48 ± 0.87	11.53 – 14.67	0.75
	90	0.66 ± 0.83	0.22 – 3.31	12.29 ± 6.33	-2.89 – 22.99	2.21

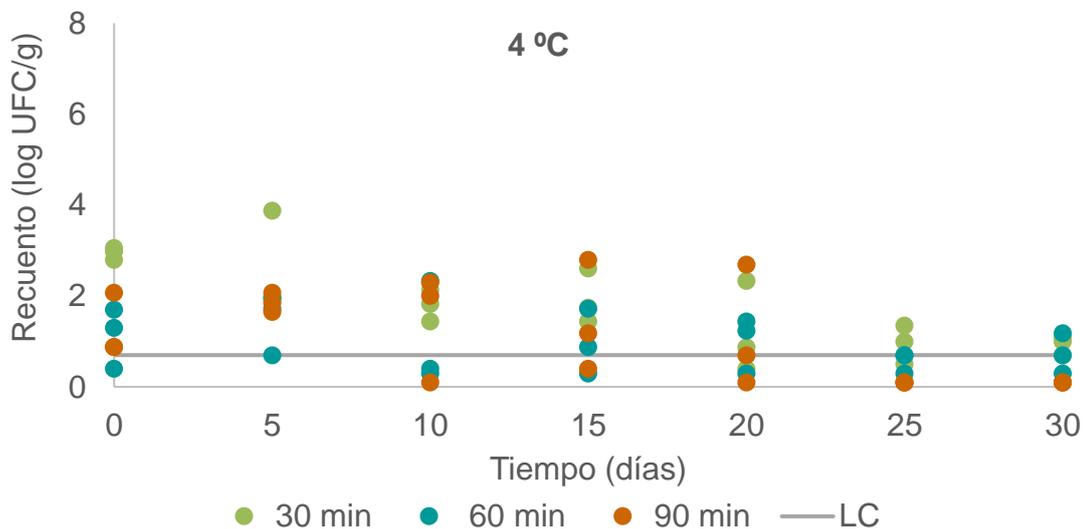
#### 4.3.5 | Supervivencia y recuperación de *Salmonella enterica* en lomo de salmón cocinado al vacío a 55 °C

En el caso de *L. monocytogenes*, y debido a su carácter psicotrofo (Tienungoon *et al.*,2000), se pudo modelizar su crecimiento en el lomo de salmón conservado a 4 y 8 °C mediante el modelo de Baranyi y Robert (1994). No obstante, en el caso de *Salmonella*, debido a que su capacidad de crecimiento se vio más limitada a 4 °C, la modelización sólo se pudo realizar a partir de los datos de las muestras conservadas a 8 °C. Aunque se ha descrito un posible crecimiento de cepas de *Salmonella* a bajas temperaturas (de 4 a 5.9 °C) durante períodos de almacenamiento prolongados (10 a 28 días) (D'Aoust,1991), el efecto de lesión subletal del tratamiento térmico posiblemente no le permitió desarrollarse en el periodo de almacenamiento de este estudio.

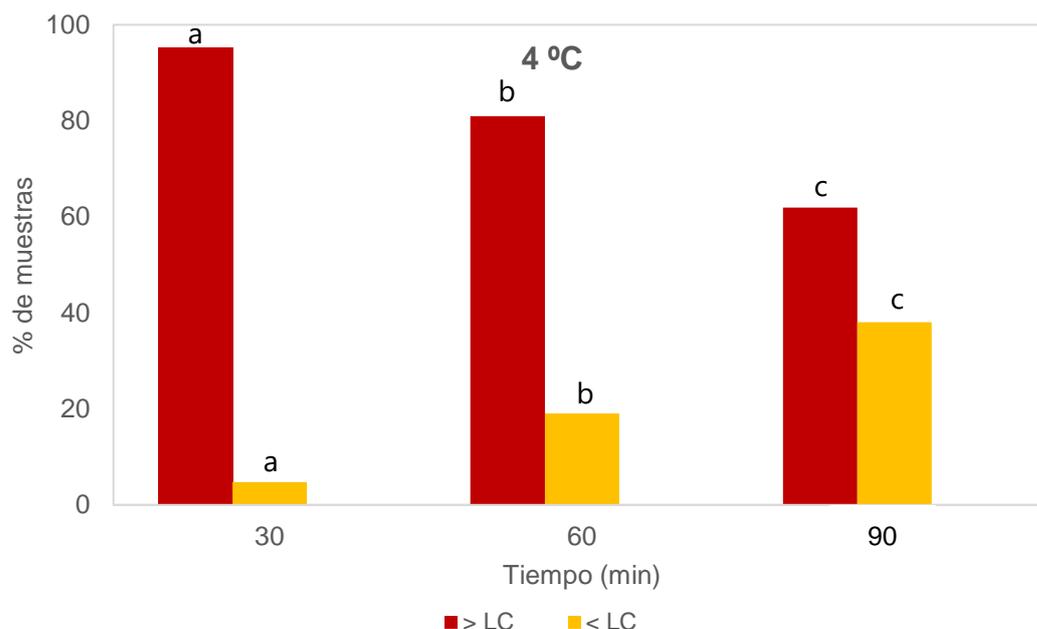
#### 4.3.5.1 | *Salmonella* Enteritidis

La letalidad obtenida de *Salmonella* Enteritidis tras el tratamiento térmico de 55 °C de los lomos de salmón incrementó al aumentar el tiempo de cocción, siendo de más de 5 log UFC/g en los tratamientos de 60 y 90 min (Tabla 11). Por lo que, su supervivencia, recuperación y/o crecimiento se afectó de forma significativa durante la conservación a 4 y 8 °C.

En las muestras de lomo de salmón inoculadas con *Salmonella* Enteritidis conservadas a 4 °C se observó que se producía una disminución en los recuentos al prolongarse el tiempo de conservación, independientemente del tratamiento térmico aplicado (Figura 40). A lo largo del estudio se refleja un incremento de muestras con recuentos inferiores al límite de detección, especialmente a partir del día 25, siendo más evidente este hecho en las muestras tratadas durante 90 min (Figura 40 y 41). Este fenómeno pudo ser causado por el frío, provocando un mayor daño en las células que presentaban ya un estrés letal causado por el calor (Wesche *et al.*, 2009).



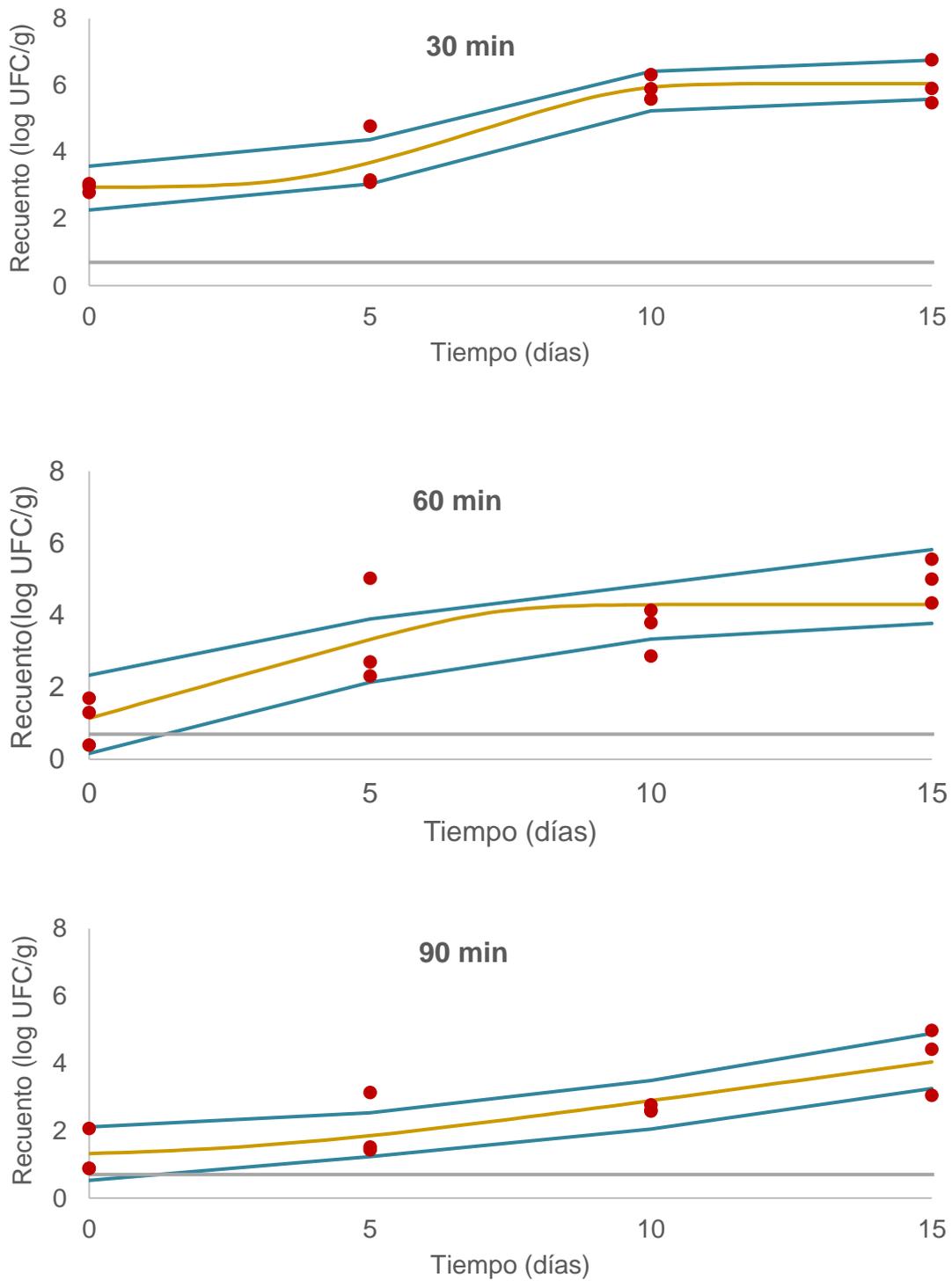
**Figura 40** | Recuento de *Salmonella* Enteritidis en las muestras tratadas a 55 °C almacenadas a 4 °C. La línea gris muestra el límite de cuantificación (LC) de 5 UFC/g.



**Figura 38** | Proporción de muestras de lomo de salmón, inoculadas con *Salmonella* Enteritidis y tratadas a 55 °C con recuento superior del límite de cuantificación (>LC) (en rojo) y recuento inferior al (<LC) (en amarillo) durante su conservación a 4 °C. Diferentes letras minúsculas en las columnas de datos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tiempos de cocción con el mismo criterio de agrupación del comportamiento de *Salmonella* Enteritidis (> LC, < LC y ND).

La Figura 42 muestra los datos de crecimiento de *Salmonella* Enteritidis inoculada en las muestras de lomo de salmón cocidas al vacío a 55 °C y almacenadas a 8 °C, junto a la curva de crecimiento ajustada mediante el modelo de Baranyi y Robert (1994) (línea amarilla) y las bandas de confianza (líneas azules) generadas por el análisis de Monte Carlo. A diferencia de las muestras almacenadas a 4 °C, la temperatura de abuso a 8 °C favoreció la recuperación y el crecimiento de este serovar incluso en las muestras tratadas durante 60 y 90 min. En ambos tratamientos inicialmente se produjo una inactivación importante de *S. Enteritidis*, aunque en su modelización se observó una gran variabilidad en el efecto térmico producido en las diferentes réplicas (Figura 28). Por ello, entre los diferentes tratamientos y en función de su intensidad, se apreciaron diferencias entre la línea de mejor ajuste y los valores obtenidos, indicativo de la afectación diferencial del tratamiento térmico en las bacterias supervivientes, especialmente en el tratamiento de 60 min. Así, en las bandas de confianza, el intervalo más amplio (de 1.52 a 2.17 log UFC/g) se observó en el tratamiento de

60 min, mientras que en el de 90 min fue de 1.3 a 1.63 log UFC/g, y de 1.17 a sólo 1.32 log UFC/g en el de 30 min. A pesar de ello, en los tres tratamientos (30, 60 y 90 min), la bondad de ajuste (*SE*) fue aceptable (de 0.61, 1.03 y 0.75, respectivamente).



**Figura 42** | Evolución del recuento total (puntos rojos) de *Salmonella Enteritidis* en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a 8 °C junto a la curva de predicción basado en Baranyi y Roberts 1994 (línea amarilla), los intervalos de confianza (líneas azules) generados por el análisis de Monte Carlo (ad hoc) y el límite de cuantificación de 5 UFC/g (línea gris).

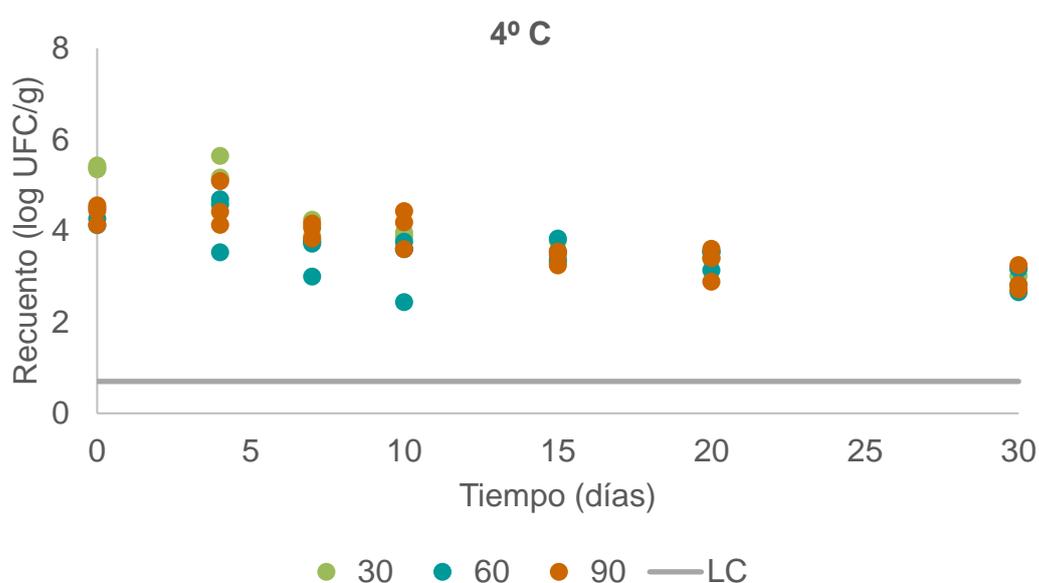
En los parámetros cinéticos de la tasa máxima de crecimiento ( $G_{max}$ ) y del tiempo de latencia generados por el análisis de Monte Carlo, se aprecia la variabilidad en los resultados obtenidos en los tres tiempos de cocción. En la velocidad máxima de crecimiento se observa que a medida que aumenta el tiempo de cocción, disminuye la velocidad, siendo muy evidente en los tratamientos de 60 y 90 min. Tanto en los tratamientos de 30 como de 60 min la variabilidad en este parámetro fue muy elevada. Hay que recordar que la curva de inactivación de este serovar presentó una forma sigmoidea, con una cola que ya es estable en el minuto 60 de tratamiento (Figura 28). Las muestras tratadas durante 90 min se han expuesto más tiempo a un estrés. Esto podría haber generado una respuesta adaptativa, disminuyendo la variabilidad en su recuento respecto a las células menos expuestas a las condiciones de estrés (Wesche 2009). En el tratamiento de 60 min, el modelo no determinó la existencia de la fase de latencia, presentando valores muy variables a los 90. A pesar del buen ajuste del modelo, considerando la velocidad máxima de crecimiento obtenida y los resultados en la fase de latencia en los tratamientos de 60 y 90 min, la tendencia observada se ajustaría más a una fase de adaptación de las células a las condiciones de almacenamiento de 8 °C (Figura 42). Por lo tanto, se correspondería todavía a la fase de latencia de crecimiento debido a una lesión importante, de forma que su reparación y adaptación se prolongó más en el tiempo cuanto más largo fue el tratamiento térmico (Wesche *et al.*, 2009).

**Tabla 14** | Valores de los parámetros cinéticos estimados de la evolución de *Salmonella* Enteritidis generados por el análisis de Monte Carlo y *DMFit* en las muestras tratadas a 55 °C y almacenamiento a 8 °C.

Temperatura (°C)	tiempo (min)	G <sub>max</sub> (log UFC/g/d)		Tiempo de latencia (días)		SE
		Media	95 %	Media	95 %	
8 °C	30	2.77 ± 4.26	0.36 – 10.98	4.85 ± 1.74	1.51 – 8.86	0.61
	60	0.59 ± 2.43	0.16 – 0.87	-----	-----	1.03
	90	0.46 ± 0.64	0.07 – 1.69	2.60 ± 20.24	-24.03 – 11.77	0.75

#### 4.3.5.2 / *Salmonella* Senftenberg

En el caso de la cepa de *Salmonella* Senftenberg, tras la aplicación del tratamiento térmico a 55 °C, la letalidad obtenida en los tres tiempos aplicados fue reducida, concretamente de  $0.65 \pm 0.33$ ,  $1.74 \pm 0.48$  y  $1.65 \pm 0.48$  log UFC/g durante 30, 60 y 90 min, respectivamente. Se ajustó al modelo de Bigelow con una escasa dispersión en los datos indicativo del efecto homogéneo en las células durante el tratamiento de cocción (Figura 29). El comportamiento de *Salmonella* Senftenberg en las muestras de salmón conservadas a 4 °C fue similar al serovar de *Salmonella* Enteritidis. Se observó que la temperatura de conservación no sólo condicionó su crecimiento, sino que en los tres tratamientos se apreció una tendencia progresiva a disminuir. Posiblemente, debido a la acción combinada del estrés por el calor y la lesión por el frío (Figura 43).

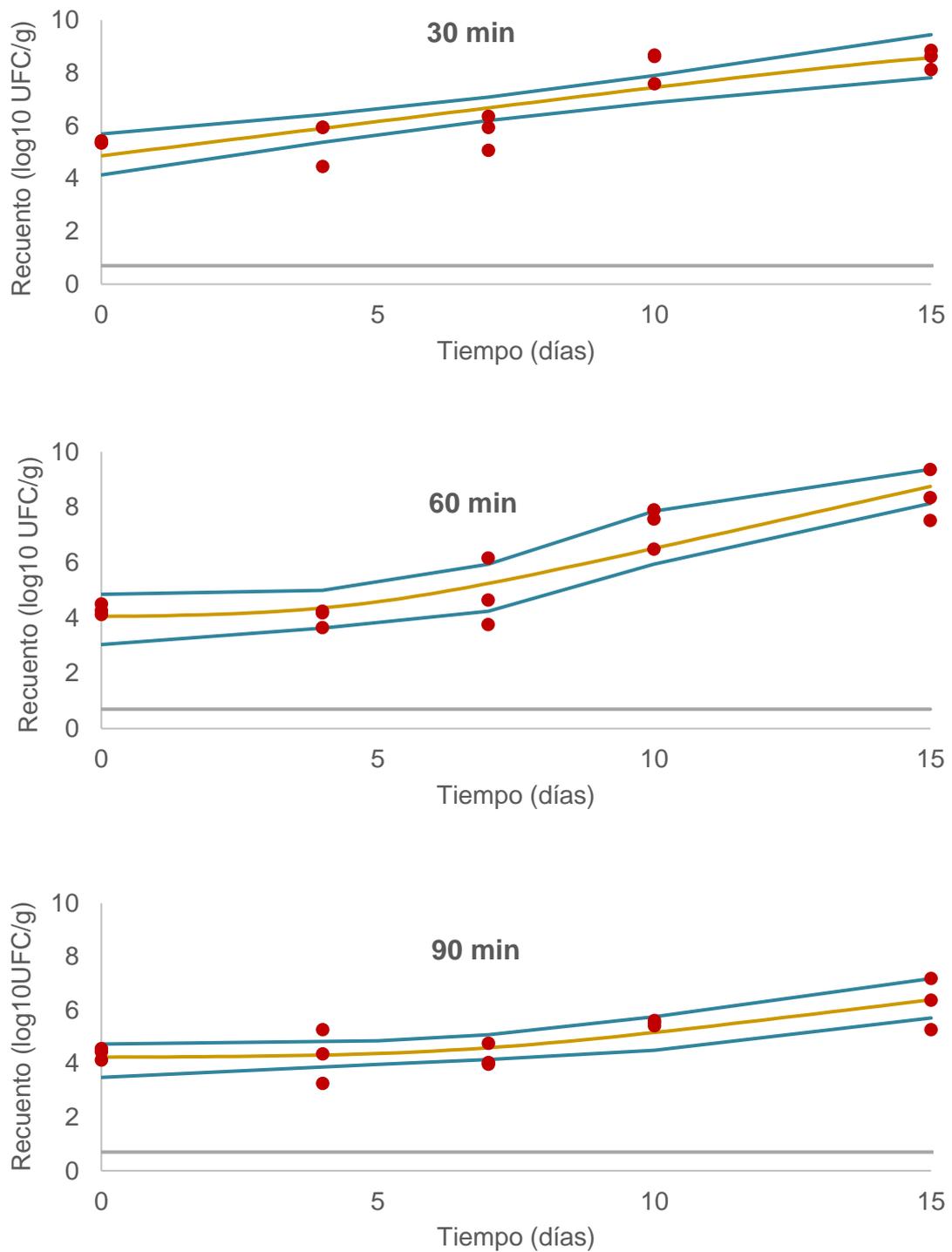


**Figura 39** | Recuento total de *Salmonella* Senftenberg en las muestras tratadas a 55 °C y almacenadas a 4 °C. El límite de cuantificación (5 UFC / g) se muestra con una línea gris.

Al contrario de lo que ocurre en cuanto a la resistencia al calor del serovar *S. Senftenberg*, no parece que haya serovares de *Salmonella* con características de crecimiento a temperaturas de refrigeración muy diferentes, aunque sí se han descrito cepas que crecen más rápidas que otras (Oscar, 2000). Así, en un estudio realizado con dos cepas del mismo serovar *S. Enteritidis* PT4, se

determinó que una de las cepas mostró un recuento constante durante su conservación en frío durante 12 días, mientras que la segunda cepa mostró una reducción significativa (Phillips *et al.*, 1998). Por lo tanto, incluso cepas de la misma especie y/o serovar pueden responder al estrés de manera diferente, como se ha visto en la respuesta de *Salmonella* a otros tipos de estrés (Andino y Hanning, 2015). Este efecto diferencial se ha determinado tanto en *S. Senftenberg* como en el combinado de serovares. Si bien en el caso de *S. Senftenberg* se debe tener en cuenta, que posiblemente la lesión subletal fue más intensa, a pesar de que se recuperó muy bien a 8 °C en los tratamientos de 30 y 60 min.

Debido al menor efecto letal del tratamiento térmico a 55 °C en los distintos tiempos de cocción, se apreció que las diferencias entre la línea de mejor ajuste y los valores obtenidos fueron más reducidas. También en el intervalo entre bandas en los tres tiempos de cocción (Figura 44), lo que se ratifica en la bondad de ajuste obtenida, que osciló entre 0.66 y 0.80 (Tabla 15). Como se comentó en la sección 4.1 sobre el control del proceso, la fase de precalentamiento fue más prolongada en el tiempo de 60 min y los valores de cocción fueron más elevados (Tabla 4), por lo que las células estarían sujetas a mayor estrés térmico. Sin embargo, debido probablemente a su mayor termorresistencia y robustez, el mayor estrés térmico no implica en este caso una mayor variabilidad, sino al contrario. Los resultados experimentales fueron muy homogéneos, lo que significa que la letalidad fue muy similar en toda la población.



**Figura 40** | Evolución del recuento total (puntos rojos) de *Salmonella Senftenberg* en las muestras tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos y refrigeradas a 8 °C, junto a la curva de predicción basado en Baranyi y Roberts 1994 (línea amarilla), los intervalos de confianza (líneas azules) generados por el análisis de Monte Carlo (ad hoc) y el límite de cuantificación de 5 UFC/g (línea gris).

En relación con los parámetros cinéticos de la tasa máxima de crecimiento ( $G_{max}$ ) y del tiempo de latencia generados por el análisis de Monte Carlo, la temperatura de almacenamiento a 8 °C permitió la recuperación y crecimiento de *S. Senftenberg* en los tres tratamientos aplicados. Se obtuvo un valor  $G_{max}$  similar, pero con una fase de latencia que aumentó al intensificarse el tratamiento. Dicha fase no se apreció en el tratamiento de 30 min, siendo de aproximadamente 6 y 7.5 días en los tratamientos de 60 y 90 min, respectivamente. El mayor efecto del estrés térmico también se evidenció en el tratamiento de 90 min, ya que en el período estudiado de 15 días no alcanzó el máximo de crecimiento de 8 log UFC/g, mientras que sí se alcanzó en los tratamientos de 30 y 60 min (Figura 44).

**Tabla 15** | Valores de los parámetros cinéticos estimados de la evolución de *Salmonella Senftenberg* generados por el análisis de Monte Carlo y *DMFit* en las muestras tratadas a 55 °C y almacenamiento a 8 °C.

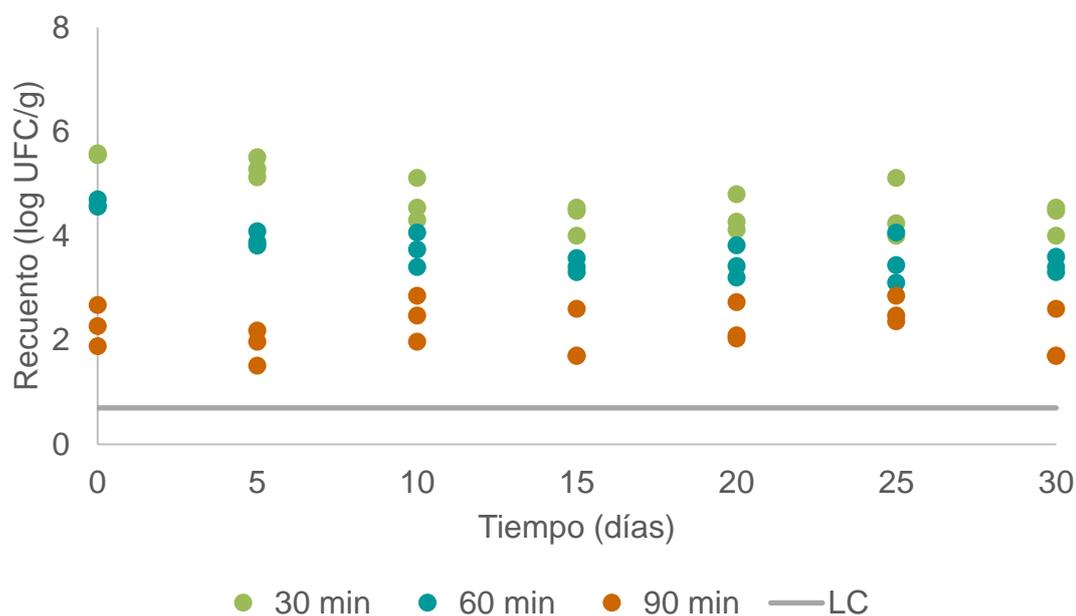
Temperatura (°C)	tiempo (min.)	$G_{max}$ (log UFC/g/d)		Tiempo de latencia (días)		SE
		Media	95 %	Media	95 %	
8 °C	30	0.68 ± 0.88	0.04 – 0.25	-----	-----	0.88
	60	0.79 ± 0.88	0.86 – 0.95	5.85 ± 2.03	1.36 – 9.48	0.88
	90	0.68 ± 1.11	0.15 – 3.81	7.53 ± 8.39	-1.30 – 14.00	0.66

#### 4.3.5.3 | Combinado de serovares de *Salmonella*

Para evaluar el efecto del tratamiento térmico en la recuperación del combinado de serovares de *Salmonella* inoculadas en muestras de salmón a 55 °C, es necesario comentar el efecto diferencial causado en la letalidad inicial. Así, en los tratamientos de 30 y 60 min, la letalidad fue muy similar a la obtenida en *S. Senftenberg* ( $0.31 \pm 0.09$  y  $1.25 \pm 0.02$  Log CFU/g), respectivamente, aunque fue más elevada en el de 90 min ( $3.70 \pm 0.50$  Log CFU/g), de forma que posiblemente el serovar que se recuperó y/o creció, fue el de *S. Senftenberg*.

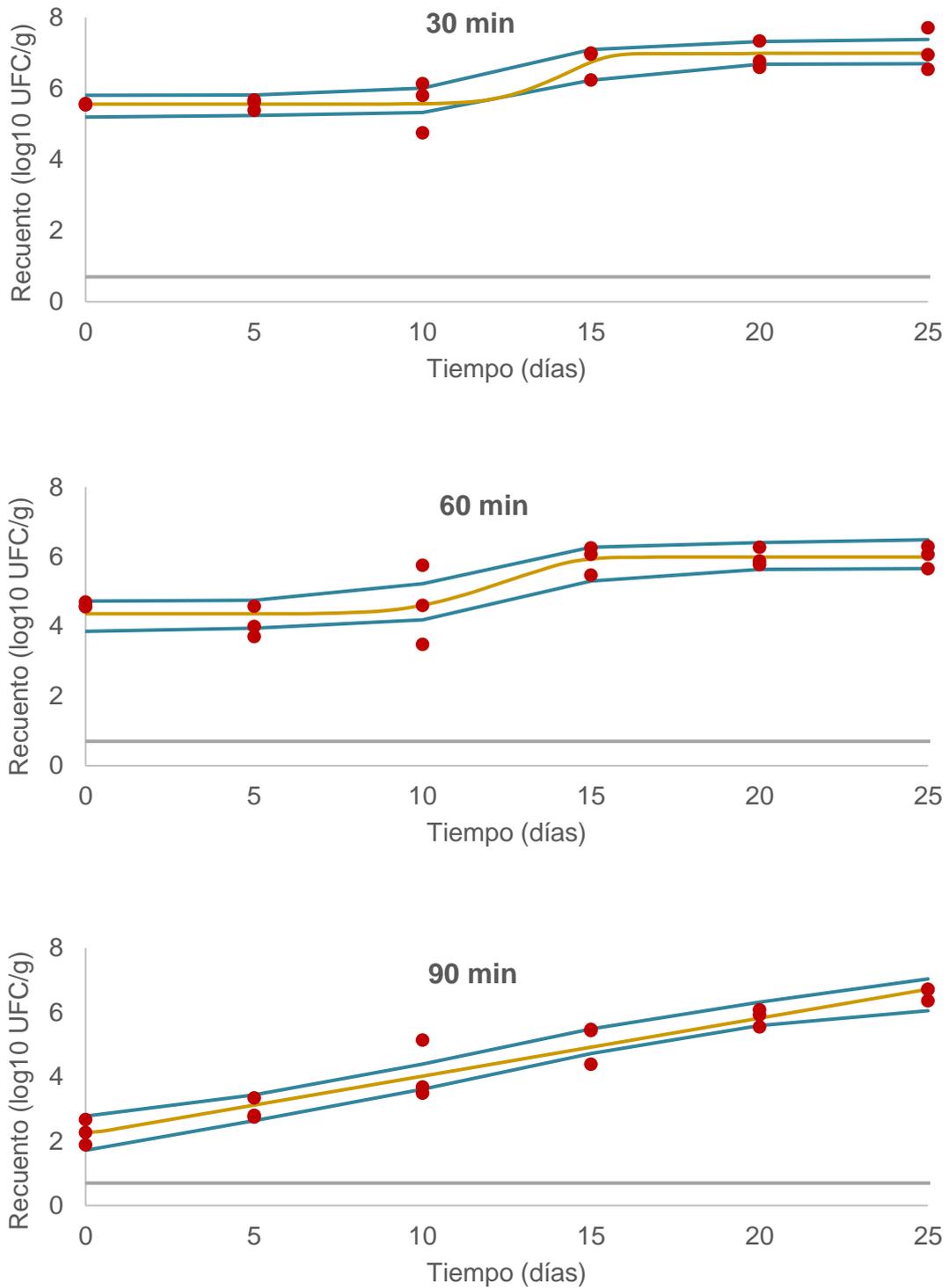
Durante la conservación a 4 °C, al igual que en los serovares individuales, se apreció que a dicha temperatura el microorganismo no pudo desarrollarse. La lesión causada por el calor no fue tan intensa, ya que los recuentos se mantuvieron constantes durante todo el periodo de conservación,

independientemente de la intensidad del tratamiento térmico aplicado (Figura 45).



**Figura 41** | Recuento total de **Combinado de serovares** de **Salmonella** en las muestras tratadas a **55 °C** y almacenadas a **4 °C**. El límite de cuantificación (5 UFC / g) se muestra con una línea gris.

En las muestras conservadas a 8 °C, el hecho de presentar durante el tratamiento térmico una fase de hombro tan prolongada, afectó a su desarrollo (Figura 30). Por lo que, se produciría el fenómeno de aclimatación al estrés, confiriéndole una mayor resistencia al frío. Por otra parte, disminuyó su metabolismo de forma que necesitó más tiempo para adaptarse. Se observó que en las muestras tratadas durante 30 y 60 min la fase de latencia fue mucho más prolongada (unos 10 días) (Tabla 16) que la obtenida en *S. Senftenberg*. Además, el recuento máximo obtenido fue inferior a 8 log UFC/g, incluso tras 30 días de conservación (Figura 46). En las muestras tratadas a 90 min, debido a que el efecto letal fue mayor, este comportamiento no se apreció, siendo difícil de explicar la evolución obtenida. Este caso se asemejaría más a lo obtenido en la evolución de *S. Senftenberg* en la que el mayor estrés térmico limitó mucho la velocidad de crecimiento. La  $G_{max}$  fue de sólo  $0.25 \pm 0.08$  log UFC/g/d y un recuento máximo en el día 30 de conservación de 6 log UFC/g (Tabla 16 y Figura 46).



**Figura 42** | Evolución del recuento total (puntos rojos) de **Combinado de serovares de *Salmonella*** en las muestras tratadas a **55 °C** durante 30, 60 y 90 minutos refrigeradas a **8 °C** junto a la curva de predicción basado en Baranyi y Roberts 1994 (línea amarilla), los intervalos de confianza (líneas azules) generados por el análisis de Monte Carlo (ad hoc) y el límite de cuantificación de 5 UFC/g (línea gris).

**Tabla 16** | Valores de los parámetros cinéticos estimados del crecimiento del **Combinado de serovares de *Salmonella*** generados por el análisis de Monte Carlo y *DMFit* en las muestras tratadas a **55 °C** y almacenamiento a **8 °C**.

Temperatura (°C)	tiempo (min)	Grmax (log UFC/g/d)		Tiempo de latencia (días)		SE
		Media	95 %	Media	95 %	
8 °C	30	2.96± 3.20	0.26 – 11.01	12.66 – 2.30	9.40 – 14.81	0.42
	60	3.69 ± 4.58	0.17 – 15.26	10.79 ± 3.37	5.11 – 14.55	0.54
	90	0.25 ± 0.08	0.14 – 0.43	2.19 ± 3.72	-6.54 – 8.19	0.48

## 4.4 Discusión General

### 4.4.1 | Lesión y estrés bacteriano

En la industria alimentaria la aplicación de calor se ha utilizado ampliamente como agente de conservación ya que es capaz de inactivar la mayoría de los microorganismos y enzimas presentes en los alimentos (Cebrián *et al.*, 2017). En este estudio tras la aplicación de diferentes tratamientos térmicos a 55 y 60 °C de cocción durante 30, 60 y 90 minutos en lomo de salmón se determinó el efecto letal del tratamiento térmico y la posibilidad de recuperación y crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. durante su conservación a temperaturas óptima (4 °C) y de abuso (8 °C). Por lo tanto, para comprender el comportamiento de los microorganismos lesionados es necesario definir dos conceptos; lesión y estrés bacteriano.

La lesión bacteriana puede definirse como el efecto de uno o más tratamientos subletales sobre un microorganismo, que puede ser de tipo químico o físico. La lesión puede ocasionar daño a los componentes celulares, pero no elimina al microorganismo, produciendo cierta pérdida de la función celular que puede ser transitoria o permanente (Wesche *et al.*, 2009; Abee, 2016; Yousef y Abdelhamid, 2019). De acuerdo con la lesión microbiana observada en nuestro estudio, y según una clasificación propuesta por Vila (2019), se determinaron tres posibles escenarios para analizar el comportamiento de los microorganismos patógenos inoculados en las muestras de lomo de salmón. En la Tabla 17, se muestran los resultados de los diferentes escenarios, los cuales fueron analizados en dos tiempos diferentes, inmediatamente después del tratamiento térmico y durante el tiempo de almacenamiento a 4 y 8 °C. Dichos

escenarios se definieron de la siguiente manera: a) inactivación total (verde) correspondiente a los tratamientos en los que en ninguna de las tres réplicas se detectó la presencia del microorganismo patógeno durante el periodo de estudio; b) crecimiento/no crecimiento (amarillo), correspondiente a situaciones en las que ocurren diferentes eventos simultáneamente en el conjunto de réplicas tomadas en consideración. Dichos eventos abarcan desde la viabilidad hasta la lesión o muerte celular ocasionada por el tratamiento térmico aplicado, por la temperatura baja de conservación o por ambas circunstancias. Además, en este mismo escenario se incluyeron las muestras en las que los recuentos permanecieron por debajo del límite de cuantificación. El último escenario es: c) viabilidad (rojo) y correspondiente a los tratamientos en los que se observaron recuentos superiores al límite de cuantificación (>LC) en todas las réplicas. Los modelos ajustados a los datos experimentales se indican en letras mayúsculas. En alguno de los escenarios de crecimiento/no crecimiento y de viabilidad, los recuentos describieron una tendencia de crecimiento o inactivación que pudo ser modelizada.

**Tabla 17** | Comportamiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. posterior al tratamiento térmico en la cocción al vacío y durante su conservación en refrigeración

Temperatura (°C)	Microorganismo	Inmediatamente la cocción al vacío			Almacenamiento					
					4 °C			8 °C		
		t30	t60	t90	t30	t60	t90	t30	t60	t90
60	Lm CECT 4031				*	*		*	*	
	Lm Scott A				*	*				
	Combinado					*				*
55	Lm CECT 4031		G		BR	BR	BR	BR	BR	BR
	Lm Scott A		M		BR	BR	BR	BR	BR	BR
	Combinado				BR	BR	BR	BR	BR	BR
60	S. Enteritidis							*		
	S. Senftenberg							BR		
	Combinado					*		1		
55	S. Enteritidis		G					BR	BR	BR
	S. Senftenberg		BI					BR	BR	BR
	Combinado		M					BR	BR	BR

	Inactivación total	<b>G</b> - modelo Geeraerd
	Crecimiento / No Crecimiento	<b>M</b> - modelo Mafart
*	Crecimiento / No Crecimiento con todos los recuentos <LC	<b>BR</b> - modelo Baranyi y Roberts
	Viabilidad	<b>BI</b> – modelo Bigelow

1, 2 Experimentos en períodos diferentes

El estrés se define como cualquier desviación de las condiciones óptimas que promueva una disminución en el crecimiento bacteriano. En este proceso se induce la expresión de genes que responden a condiciones ambientales desfavorables. Dicho estrés es clasificado en función de su severidad como menor, moderado, severo, extremo y eventualmente letal (Yousef y Abdelhamid, 2019). Teniendo en cuenta la clasificación del estrés en función de su severidad, en el caso de un estrés menor, las células bacterianas se adaptan completamente a las condiciones cambiantes y la tasa de crecimiento no se ve afectada. Estas condiciones pueden causar una adaptación transitoria

acompañada de un cambio fisiológico temporal que a menudo resulta en una mayor tolerancia al estrés (Huertas *et al.*, 2018; Garre *et al.*, 2019a; Yousef y Abdelhamid, 2019). En nuestro estudio se observó un estrés menor, (definida como viable rojo) tras el tratamiento y su conservación en refrigeración en las muestras de lomo de salmón tratadas a 55 °C durante 30, 60 y 90 minutos, conservadas tanto a 4 como a 8 °C para Lm Scott A, S. Senftenberg y el combinado de serovares, en las muestras tratadas durante 30 min para Lm CECT 4031 y el combinado de *Listeria monocytogenes* durante 30 y 60 min. Así como también, en todas las muestras conservadas a 8 °C de S. Enteritidis. Por lo que respecta a las cocciones a 60 °C, sólo el combinado de serovares de *Salmonella* tratado durante 30 minutos y conservado a 8 °C mostró viabilidad en todas sus réplicas. Como se ha comentado anteriormente, este ensayo tuvo una letalidad significativamente menor al resto de ensayos realizados con *Salmonella* spp., debido a la variabilidad biológica o de reproducción entre ensayos. En todos estos casos, se observó un mayor crecimiento en los tratamientos más cortos.

Cuando ocurre una serie de lesiones que van de leves a graves, observando un comportamiento variable se puede describir como un estrés moderado. A medida que el estrés moderado sea mayor, eventualmente resulta el estrés letal con una mezcla de células sanas y muertas. Es decir, puede causar la muerte de algunas, pero no necesariamente de todas las células bacterianas (Wesche *et al.*, 2009). Cuando la letalidad sólo es de una fracción de la población, las respuestas genéticas acompañantes y las mutaciones adaptativas pueden mejorar la supervivencia de la población en general (Archer, 1996). Esta situación en nuestro estudio correspondería a los casos en los que se encuentran simultáneamente muestras en las que el patógeno se observa con recuentos superiores al límite de cuantificación (>LC), con recuentos inferiores al límite de cuantificación (<LC) y muestras en las que el patógeno no es detectado. En los tratamientos a 55 °C esta situación se observó en los tratamientos realizados durante 60 y 90 min de Lm CECT 4031 a 4 y 8 °C de conservación, y el combinado de *Listeria monocytogenes* durante 90 min. En el caso de S. Enteritidis ocurrió un estrés moderado en las muestras conservadas a 4 °C tratadas durante 60 y 90 minutos. El fenómeno de estrés moderado se observó

durante la conservación de todas las muestras tratadas a 60 °C inoculadas con *L. monocytogenes* de forma individual o combinada. También, en todas las muestras inoculadas con *Salmonella* spp. excepto en el caso del serovar Enteritidis tratado durante 90 minutos y conservado a 4 °C en el que se obtuvo una letalidad total, y en el caso de la combinación de serovares tratado durante 30 minutos y conservada a 4 °C en la que se observó viabilidad, como se ha comentado anteriormente. También, en este grupo se han incluido aquellos tratamientos en los que la lesión fue mayor por no presentar ninguna muestra con recuentos superiores al límite de cuantificación. En la Tabla 17 se presentan con un asterisco siendo más frecuente para *L. monocytogenes* que a pesar de su carácter psicotrofo (Bover y Garriga, 2014; Matthew *et al.*, 2017), no pudo recuperar la viabilidad y crecer tras la lesión causada por el tratamiento a 60 °C.

En cuanto al estrés letal, sólo se observó en las muestras tratadas a 60 °C durante 90 min y conservadas a 4 °C para *S. Enteritidis*. En el caso de *Listeria monocytogenes*, este tratamiento parecería el más seguro, ya que no se detectó al patógeno tras el tratamiento térmico. Sin embargo, a lo largo del estudio, algunas de las células bacterianas pudieron sobrevivir, aunque en casi todos los tratamientos se mantuvieron por debajo del límite de cuantificación durante los 30 días de conservación en refrigeración.

Las bacterias han desarrollado diversas estrategias de adaptación para hacer frente a las condiciones ambientales que cambian y de esta forma garantizan su supervivencia en nichos inhóspitos. Las respuestas al estrés son sistemas de defensa complejos y globales que les permiten adaptarse a los entornos cambiantes y sobrevivir en condiciones adversas (Cebrián *et al.*, 2017). En este estudio se evidenció que cuando se expone a un microorganismo a estas condiciones, la respuesta microbiana a ese estrés no es " todo o nada ". Se pueden inducir a diferentes grados de lesión dependiendo de la situación fisiológica y el estado de las células individuales dentro de una población. Las bacterias típicamente responden al estrés (p. ej., calor, frío, ácido, álcali, inanición y/o estrés osmótico), alterando su morfología celular, composición de la membrana, metabolismo celular y grado de virulencia (Archer, 1996; Wesche *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2015). Como respuesta, aquellos organismos son

"fortalecidos por el estrés" produciendo una variedad de proteínas que con frecuencia permiten obtener una resistencia cruzada contra otros tipos de estrés. Por ejemplo, se ha descrito para *L. monocytogenes* el desarrollo de antibioresistencias en los entornos de procesamiento de alimentos que favorecen la transferencia horizontal de genes, como la exposición y adaptación a un estrés ambiental subletal o la formación de *biofilms* (Olaimat *et al.*, 2018; Matereke y Okoh, 2020).

En la literatura las respuestas más comúnmente reportadas son por la exposición de células bacterianas a temperaturas subletales denominada "respuesta al choque térmico" (Cebrián *et al.*, 2017) y por el frío, circunstancias que se han presentado en este estudio. Las consecuencias del choque térmico es que aumenta la termoestabilidad de varios componentes y la capacidad celular para reparar lesiones subletales (Cebrián *et al.*, 2017). Un pequeño aumento de temperatura puede provocar el despliegue, entrelazamiento y la agregación inespecífica de las proteínas (Richter *et al.*, 2010), en el que se pueden producir diversas proteínas de choque térmico (*HSP*, por sus siglas en inglés) que actúan como chaperonas o chaperoninas moleculares y que ayudan a las células a sobrevivir en su nuevo entorno. Además, la respuesta al estrés térmico puede influir en la activación de genes asociados con la virulencia, lo que permitiría que microorganismos, como *Salmonella*, aumente su resistencia en el organismo (Dawoud *et al.*, 2017) y por lo tanto disminuir su dosis-respuesta.

Debido a la resistencia cruzada o como consecuencia de períodos largos de adaptación, los microorganismos también reaccionan al choque por el frío, generando modificaciones celulares físicas y bioquímicas en respuesta a la regulación de la expresión génica. Esto incluye el mantenimiento de la fluidez de la membrana celular, modificaciones del superenrollamiento del ADN, proteínas de respuesta al choque por el frío (*CSP*, por sus siglas en inglés), modulación de la estructura secundaria del ARNm y otros mecanismos que dependen del nivel de choque frío y el tiempo de exposición (Ricke *et al.*, 2018), y que puede afectar a la fase de latencia y/o a la velocidad de crecimiento.

En general, las células bacterianas expuestas al frío o a baja temperatura, pasan por unas etapas que se ajustan al concepto clásico de etapa de latencia del crecimiento microbiano (Weber y Marahiel, 2003). La primera etapa es la respuesta transitoria inmediatamente después de la exposición que se conoce como fase de aclimatación (*post-shock*). El tiempo de duración de esta respuesta puede variar con respecto a la reducción de la tasa de crecimiento, la expresión génica y posterior síntesis de proteínas para la respuesta de supervivencia al frío. Recientemente, Aguirre y Koutsoumanis (2016) propusieron un nuevo enfoque, en la que se propone que la extensión de la fase de latencia o de aclimatación contribuyen dos poblaciones distintas: (a) las que se encuentran en una latencia fisiológica, con células que están en proceso de ajuste a su nuevo entorno y que acaban creciendo y (b) las que se encuentran en la denominada pseudo-latencia, cuyo recuento permanece estable puesto que las células no son capaces de iniciar el crecimiento, de forma que el recuento medido experimentalmente durante la fase de latencia se corresponde a la suma de ambas poblaciones, y su duración depende de la proporción entre un tipo y otro de células. En el caso del combinado de serovares de *Salmonella* a 55 °C de cocción y conservados a 4 °C, las bacterias permanecieron estables en fase de aclimatación a lo largo de los 30 días de ensayo, sin tendencia a crecer o decrecer, posiblemente con un predominio de la población en pseudo-latencia.

En la segunda etapa conocida como fase de recuperación, las células bacterianas crecen más rápido y reanudan gradualmente la biosíntesis de proteínas celulares. Dicha fase fue evidente en los tratamientos a 55 °C y conservados a 8 °C para *Salmonella*, o a ambas temperaturas de conservación para *Listeria monocytogenes* CECT 4031 y el combinado de cepas en los que se obtuvieron tiempos variables en la velocidad de crecimiento y fase de latencia en la que posiblemente hubo un predominio de la población en fase de latencia. En la última etapa, las células se adaptan permanentemente a la temperatura fría con modificación de la expresión génica, y esto ocurre cuando las células bacterianas alcanzan la fase de crecimiento estacionario. Las tres etapas descritas se evidenciaron claramente en algunos tratamientos a 55 °C durante la conservación de las muestras a 8 °C, como en Lm Scott A en los tres tiempos de cocción aplicados y en *S. Enteritidis* a 30 min. Además, durante los últimos 10

días de ensayo fue la población del combinado de serovares de *Salmonella* tratados a 55 °C durante 30 y 60 minutos y conservados a 8 °C, se hizo más evidente la fase de crecimiento estacionario.

#### 4.4.2 | Variabilidad e incertidumbre

La variabilidad es una fuente inherente de heterogeneidad en la respuesta microbiana (por ejemplo, diferencias en la respuesta de células individuales o en la composición de los medios alimentarios) que debe ser considerada. Este hecho es diferente a la incertidumbre, que abarca aquellas fuentes de variación que no se consideran en el sistema (por ejemplo, errores de medición o especificaciones incorrectas del modelo). Mientras que la incertidumbre puede reducirse recopilando más datos experimentales de mayor calidad, la variabilidad es parte del proceso y no puede reducirse simplemente con más y mejor experimentación (Nauta, 2000; Thompson, 2002). Aunque conceptualmente existe una clara separación entre variabilidad e incertidumbre, la cuantificación de estos términos y la incorporación en las predicciones es un problema complejo desde el punto de vista del diseño experimental y del análisis estadístico (Garre *et al.*,2020). Por lo tanto, conocer los factores que influyen en la variabilidad de la resistencia térmica y su magnitud son de relevancia para aplicar un tratamiento térmico adecuado para un producto alimenticio específico (Aryani *et al.*,2015b).

En términos de seguridad alimentaria, la seguridad microbiana de los alimentos procesados térmicamente depende de garantizar que durante el proceso de calentamiento se eliminen posibles patógenos de transmisión alimentaria que pudieran estar presentes en los alimentos. En la elaboración de alimentos mediante la cocción al vacío con frecuencia se aplica un tratamiento térmico a una velocidad de calentamiento lenta con tiempo prolongado y temperaturas bajas (<65 °C) (Juneja y Marks, 2003; Garre *et al.*, 2018b; Vila, 2019). Por lo que, es de especial importancia práctica para los procesadores de alimentos que elaboran estos productos ya que se debe considerar que la cinética de inactivación no sigue un modelo de reducción log lineal, como se evidenció en este estudio para los tratamientos más suaves (55°C durante 30 minutos) sobre

las dos cepas más sensibles (*Lm* CECT 4031 y *S. Enteritidis*). En ambos casos se describió una cola en la curva de inactivación térmica correspondiente a una población resistente (o adaptada) al tratamiento de cocción a temperatura moderada. Si la velocidad de calentamiento se aplica de una forma determinada, afecta a la aclimatación, supervivencia y crecimiento de los microorganismos patógenos. De modo que, se ha sugerido que es necesario mejorar los modelos predictivos actuales en los que se integren los cambios de temperatura que ocurren durante el proceso térmico (Lianou y Koutsoumanis, 2011).

En un estudio reciente de Clemente-Carazo *et al.* (2020) analizaron la variabilidad en la respuesta microbiana a los tratamientos térmicos en condiciones isotérmicas y dinámicas tanto de forma empírica como a través de modelos matemáticos. Los autores determinaron que la resistencia al calor de los microorganismos de 4 cepas de *L. monocytogenes* (Scott A, CECT 4031, CECT 4032 y 12MOB052) inoculada en tres matrices diferentes (agua con peptona tamponada, tampón McIlvaine pH 7 y leche semidesnatada) bajo condiciones dinámicas, a veces está determinada por mecanismos que no se pueden observar cuando las células se tratan en condiciones isotérmicas (por ejemplo, aclimatación al estrés). Una hipótesis para justificar esta desviación es que algunos procesos fisiológicos solo son relevantes en condiciones dinámicas y no se pueden observar en tratamientos isotérmicos, donde el calentamiento de las células microbianas es instantáneo. Hay evidencia experimental que demuestran que la aclimatación al estrés se puede desarrollar durante tratamientos dinámicos con una baja tasa de calentamiento y que han sido publicado por diversos autores ( Valdramidis *et al.*, 2006; Garre *et al.*, 2018b, 2018c;) . Clemente-Carazo *et al.*, (2020) afirman que cuando la variabilidad no es relevante en condiciones isotérmicas, la variabilidad entre medios y entre cepas puede tener un efecto muy importante en la aclimatación al estrés de las células microbianas en condiciones dinámicas. Por lo que, para el desarrollo de modelos predictivos más precisos que describan la cinética microbiana de los tratamientos térmicos moderados se requiere conocimientos sobre la influencia de la microestructura alimentaria y las condiciones celulares iniciales en la cinética de inactivación de los patógenos transmitidos por los alimentos (Verheyen *et al.*, 2019). Sin embargo, dicha variabilidad sólo la han demostrado

en la fase de tratamiento térmico, pero no ha sido evaluada en procesos posteriores que afectan al comportamiento de las bacterias, como la conservación en frío, en presencia de sal, de ácidos.

Otros factores que añaden variabilidad a la respuesta microbiana son los asociados al diseño experimental por lo que se ha de tomar en cuenta la selección de la cepa y la matriz de estudio. En consonancia con otros autores y como se ha observado, las diferencias inherentes entre cepas de la misma especie microbiana tratadas de manera idéntica constituyen una fuente importante de variabilidad (Whiting y Golden, 2002). Por consiguiente, los hallazgos de investigación que se refieren a una determinada cepa microbiana no pueden extenderse de manera segura a ninguna otra cepa del mismo género o especie. Es por ello, que la selección de cepas es una decisión de vital importancia a la hora de diseñar y realizar estudios destinados a evaluar el comportamiento de patógenos bacterianos en productos alimenticios o en sistemas que simulan entornos relacionados con los alimentos (Lianou y Koutsoumanis, 2011).

#### **4.4.3 | Seguridad Alimentaria**

En los estudios de investigación para evaluar seguridad alimentaria al aplicar diferentes tratamientos tecnológicos, se recomienda el uso de una combinación de cepas (cóctel), como una forma de determinar rápidamente la influencia de las diferentes condiciones aplicadas en el ensayo. De esta forma, se reduce la posibilidad de seleccionar la cepa incorrecta, así como también se minimiza el número de pruebas a realizar. En estos casos, es preferible que se utilicen cepas con características de inactivación o crecimiento robusto (Scott *et al.*, 2005). Sin embargo, la selección de cepas suele estar determinada por la naturaleza y/o los objetivos del estudio de investigación realizado. Por ejemplo, si se necesitan datos precisos de resistencia al calor para parametrizar un tratamiento térmico, se debe usar una cepa individual que sea la más resistente dentro del grupo objetivo porque las variaciones en la resistencia al calor de las diferentes cepas pueden causar irregularidades en los datos (Podolak *et al.*, 2017). Aunque la posibilidad de encontrar una cepa extremadamente resistente al calor es muy

baja, estas cepas tienen una supervivencia mucho mayor y determinan la supervivencia general de una población mixta de cepas. Por lo tanto, la variabilidad entre cepas puede ser potencialmente muy relevante para evaluar la eficacia del tratamiento de inactivación (Zwietering *et al.*, 2021).

En relación con el efecto matriz, al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Vila (2019), en lomo de cerdo inoculado con los mismos microorganismos y aplicando la misma metodología se hizo evidente la variabilidad debido a este factor. En su caso, se obtuvo un escenario de inactivación (estrés letal) mucho más extenso en los tratamientos a 60 °C, especialmente para *Listeria monocytogenes*. En cuanto a los tratamientos a 55 °C se observó que durante el almacenamiento a 4 °C el estrés ocasionado por el frío junto con las lesiones subletales causadas por el tratamiento térmico interfirieron en los mecanismos de reparación y crecimiento de las células supervivientes. En nuestro estudio, de forma similar a lo obtenido por Vila (2019) tras la aplicación de los tratamientos térmicos a 55 °C, *Salmonella* spp. mostró ser más termorresistente que *Listeria monocytogenes*. Durante la conservación en refrigeración *Listeria monocytogenes* pudo crecer a 4 °C, mientras que *Salmonella* spp. presentó un escenario de crecimiento /no crecimiento (*S. Enteritidis*) o de viabilidad (*S. Senftenberg* y el combinado de serovares). A 60 °C, si bien la intensidad del tratamiento térmico limitó el crecimiento de ambos microorganismos, presentó un escenario de crecimiento/no crecimiento en la gran mayoría de las muestras conservadas a ambas temperaturas (estrés moderado), y de viabilidad en el combinado de serovares de *Salmonella* tratado a 60 °C y conservado a 8 °C (estrés menor).

Finalmente, una reflexión relacionada con los planes de autocontrol basados en el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control de los procesos de elaboración de alimentos es que en el establecimiento de los límites críticos de un punto de control crítico basado en la aplicación de un tratamiento térmico se debe considerar la determinación de una combinación de tiempo y temperatura, mediante el cual se consiga la eliminación de los microorganismos patógenos significativos. Los resultados obtenidos en este estudio indican que esta no es la única consideración necesaria en relación con la inocuidad del producto final.

Otros factores, como la aplicación de temperaturas moderadas, la velocidad de calentamiento lenta, y/o la conservación de los productos durante períodos prolongados en refrigeración controlada (4°C) y en condiciones de abuso (8°C), favorecen los fenómenos de adaptación al estrés subletal y la recuperación de la lesión celular. Por lo tanto, los resultados de letalidad calculada inmediatamente tras el tratamiento térmico no son indicadores fiables de evaluación de la inocuidad de los alimentos. Así, considerando los resultados que se han obtenido en esta tesis, es muy difícil establecer un margen de seguridad en el lomo de salmón aplicando un tratamiento térmico suave y prolongado, y que permita su conservación durante un largo período de tiempo.



---

## Capítulo 5 | Conclusiones



1. Durante los procesos de cocción al vacío en horno de vapor-convección, la distribución de calor a una temperatura de 55 y 60 °C no fue homogénea. Se determinó como importantes fuentes de variabilidad experimental, la duración y la temperatura de la fase de calentamiento y las oscilaciones de temperatura a corazón del producto durante la fase de mantenimiento. Esta variabilidad se puede incorporar en los modelos predictivos de inactivación térmica y crecimiento aplicando el análisis de Monte Carlo.
2. En la inactivación térmica tras 90 minutos de cocción de los patógenos inoculados en lomos de salmón se observaron cuatro escenarios diferenciales, ajustándose a modelos no lineales los tres primeros. Los escenarios fueron: 1) de inactivación limitada (por ejemplo: *Salmonella* Senftenberg a 55 °C); 2) de inactivación con presencia de un fenómeno de cola (por ejemplo: *Listeria monocytogenes* CECT 4031), 3) de inactivación sin la presencia de un fenómeno de cola (por ejemplo, el combinado de serovares de *Salmonella* a 55 °C) y 4) de inactivación severa, en los que los patógenos se mantuvieron con reducidos niveles de contaminación (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* a 60 °C).
3. Durante el período de conservación a 4 y 8 °C, tras el tratamiento térmico los patógenos inoculados presentaron, en función del estrés sufrido tres escenarios diferentes: 1) de inactivación total (por ejemplo, *Salmonella* Enteritidis durante 90 min y conservada a 4 °C); 2) de interfaz de crecimiento/no crecimiento, con diferentes proporciones de letalidad, células viables y lesionadas, probablemente debido a diferentes grados de lesiones subletales a nivel celular causadas por calor y frío. Esta situación tuvo lugar en muestras inoculadas cocinadas a 60 °C (por ejemplo, *Listeria monocytogenes* Scott A) y 55 °C (por ejemplo, *Salmonella* Enteritidis) y 3) de presencia de células viables, en la que todas las réplicas que mostraron recuentos por encima del límite de cuantificación, con o sin crecimiento (por ejemplo, *Salmonella* Senftenberg a 55 °C).

4. En el caso de *Listeria monocytogenes* el ajuste a modelos de crecimiento primario, se realizó solo en los tratamientos a 55 °C que causaron o bien una inactivación limitada o bien un efecto de cola en la curva de supervivencia, y que pudieron desarrollarse durante el período de almacenamiento a 4 y 8 °C.
  
5. En el caso de *Salmonella* spp, el ajuste a modelos de crecimiento primario se realizó sólo en algunos tratamientos térmicos a 60 °C y para todos los tratamientos a 55°C que causaron una inactivación limitada o con un efecto de cola en la curva de supervivencia, y que mostraron una tendencia de crecimiento durante el período de conservación a 8 °C. Durante el almacenamiento a 4°C, las lesiones subletales causadas por los tratamientos térmicos junto con el estrés por el frío interfirieron en los mecanismos de reparación y crecimiento de las células supervivientes.
  
6. En las condiciones de este estudio, la cocción al vacío de lomo de salmón a 55 y 60 °C durante 30, 60 y 90 minutos no puede considerarse segura debido a la presencia de células supervivientes viables tanto de *Salmonella* spp como de *L. monocytogenes*.





- Abee, T., J. Koomen, K. Metselaar, M. Zwietering, y H. den Besten. 2016. Impact of Pathogen Population Heterogeneity and Stress-Resistant Variants on Food Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*. 7:439-456. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033128>
- Adams, M.R., y M.O. Moss. 2007. Food Microbiology. *En* Factors affecting the growth and survival of micro-organisms in foods. 20-62.
- AENOR. 2008. UNE-EN ISO 7218. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico.
- AENOR. 2005. UNE-EN ISO 11290-2. Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales: Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes*: Parte 2: Método de recuento.
- AFSSA. 2014. Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. 1–47 pp.
- Agència de Salut Pública de Catalunya. 2012. Guia de pràctiques correctes d'higiene específica per a la cuina al buit.
- Aguirre, J.S., y K.P. Koutsoumanis. 2016. Towards lag phase of microbial populations at growth-limiting conditions: The role of the variability in the growth limits of individual cells. *International Journal of Food Microbiology*. 224:1–6.
- Aguirre, J.S. 2012. Variabilidad de la Inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a diferentes tratamientos conservantes de alimentos. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Aguirre, J.S., C. Pin, M.R. Rodríguez, y G.D. García De Fernando. 2009. Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6992–6997. <https://doi.org/10.1128/AEM.00452-09>
- Andino, A., y I. Hanning. 2015. *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Scientific World Journal*. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
- Anónimo. 1992. Report on Vacuum Packaging and Associated Processes. HMSO, London.

- Archer, D. 1996. Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. *Trends Food Sci. Technol.* 7:91–95.
- Armstrong, G.A. 2000. Sous Vide products. *En Stability and Shelf-Life of Food.* WoodheadPublishing.171-196.  
<https://doi.org/10.1533/9781855736580.2.171>
- Arroyo-López, F. N., J. Bautista Gallego , A. Valero, R.M. García-Gimeno Fernández, y A.G. 2014. Predictive Microbiology : A Valuable tool in Food Safety and Microbiological Risk Assessments. *En Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions.*, V.M. Bhat, Rajeev y Gómez-López, editor. 517-534.
- Aspidou, Z., T. Akritidou, y K.P. Koutsoumanis. 2018. Simultaneous growth, survival and death: The trimodal behavior of *Salmonella* cells under osmotic stress giving rise to “Phoenix phenomenon.” *International Journal of Food Microbiology.*285:103-109.<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.012>
- Aspidou, Z., y K.P. Koutsoumanis. 2015. Individual cell heterogeneity as variability source in population dynamics of microbial inactivation. *Food Microbiology.* 45: 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.008>
- Aryani, D.C. 2016. Impact of Microbial Variability on Food Safety and Quality. 198 pp.
- Aryani, D.C., M.H. Zwietering, y H.M.W. Den Besten. 2016. The effect of different matrices on the growth kinetics and heat resistance of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology.* 238:326-337.<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.012>
- Aryani, D.C., H.M.W. den Besten, W.C. Hazeleger, y M.H. Zwietering. 2015a. Quantifying strain variability in modeling growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology.* 208:19-29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.006>
- Aryani, D.C., H.M.W. den Besten, W.C. Hazeleger, y M.H. Zwietering. 2015b. Quantifying variability on thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology.* 193:130-138. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.021>
- Baerdemaeker, J. De, y B.M. Nicolai. 1995. Equipment considerations for sous vide cooking. *Food Control.* 6:229-236.
- Baldwin, D.E. 2012. Sous vide cooking: A review. *International Journal of Gastronomy and Food Science.* 1:15-30.

<https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2011.11.002>

- Baranyi, J., y T.A.T.A Roberts. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. 23:277-294.
- Beaufort, A., H. Bergis, A.L. Lardeux, y B. Lombard. 2014. Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *EURL Lm-ANSES*. 1–47.
- Bhaskar, S. V. 2016. Foodborne diseases-disease burden. *En Food Safety in the 21st Century: Public Health Perspective*. Elsevier Inc. 1-10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801773-9.00001-7>
- Bigelow, W.D. 1921. The Logarithmic Nature of Thermal Death Time Curves  
Author ( s ): W . D . Bigelow Published by : Oxford University Press Stable  
URL : <http://www.jstor.org/stable/30082910> Accessed : 21-04-2016 14 : 20  
UTC. *The Journal of Infectious Diseases*. 29:528–536.
- Bover, S., y M. Garriga. 2014. Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo.
- Bover, S., y M. Garriga. 2008. Microbiología predictiva : herramienta de soporte para la gestión de la seguridad y la calidad alimentaria. *Eurocarne*. 166:1-8.
- Carlin, F. 2014. *Microbiology of Sous-vide Products*. 2. Second Edition. Elsevier. 621–626 pp. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00205-6>
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). 2019. Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 2017: Annual Report. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2013.04.001>
- Cebrián, G., S. Condón, y P. Mañas. 2017. Physiology of the Inactivation of Vegetative Bacteria by Thermal Treatments: Mode of Action, Influence of Environmental Factors and Inactivation Kinetics. *Foods (Basel, Switzerland)*. 6.
- CFR (Code of Federal Regulations). 2020. Title 21 — Food and Drugs (Parts 100 to 169).
- Church, I. J., y A.L. Parsons. 2000. The sensory quality of chicken and potato products prepared using cook-chill and sous vide methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 35:155-162.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00361.x>

Clemente-Carazo, M., G. Cebrián, A. Garre, y A. Palop. 2020. Variability in the heat resistance of *Listeria monocytogenes* under dynamic conditions can be more relevant than that evidenced by isothermal treatments. *Food Research International*. 137:109538.

Creed, P.G. 1998. A Study of the Sensory Characteristics of Food produced by the Sous Vide system: the measure of pleasure. Bournemouth University.

Creed, P.G., y W.G. Reeve. 1998. Principles and applications of sous vide processed foods. *En Sous vide and cook chill processing for the food industry*. S. Ghazala, editor. Aspen Publishers Inc, Gaithersburg, EEUU. 25-56.

D'Aoust, J.-Y., 1991. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*. 13, 207–215. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90004-9)

Davidson, C.M., M. Boothroyd, y D.L. Georgala. 1996. Thermal Resistance of *Salmonella* Senftenberg. *Nature* 212:1060-1061. <https://doi.org/10.1038/2121060a0>

Dawoud, T.M., M.L. Davis, S.H. Park, S.A. Kim, Y.M. Kwon, N. Jarvis, C.A. O'Bryan, Z. Shi, P.G. Crandall, y S.C. Ricke. 2017. The Potential Link between Thermal Resistance and Virulence in *Salmonella*: A Review. *Front. Vet. Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00093>

De Jesús, A.J., y R.C. Whiting. 2003. Thermal inactivation, growth, and survival studies of *Listeria monocytogenes* strains belonging to three distinct genotypic lineages. *Journal of Food Protection*. 66, 1611–1617. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.9.1611>

Desriac, N., M. Vergos, V. Achberger, L. Coroller, y O. Couvert. 2019. Predicting heat process efficiency in thermal processes when bacterial inactivation is not log-linear. *International Journal of Food Microbiology*. 290:36-41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.028>

Díaz Molins, P. 2009. Calidad y deterioro de platos sous vide preparados a base de carne y pescado y almacenados en refrigeración. Universidad de Murcia. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2013.12.005>

Dogruyol, H., S. Mol, y S. Cosansu. 2020. Increased thermal sensitivity of *Listeria monocytogenes* in sous-vide salmon by oregano essential oil and citric acid.

- Food Microbiology*. 90:103496. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103496>
- Dorsa, W.J., D.L. Marshall, M.W. Moody, y C.R. Hackney. 1993. Low Temperature Growth and Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes* in Precooked Crawfish Tail Meat1. *Journal of Food Protection*. 56:106-109. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-56.2.106>
- Doyle, M.E., A.S. Mazzotta, T.I.M. Wang, D.W. Wiseman, y V.N. Scott. 2001. Heat Resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 64:410-429. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.3.410>
- Doyle, M.E., y A.S. Mazzota. 2000. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*. *Journal of Food Protection*. 63:779–795
- EFSA (European Food Safety Authority). 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2019;17(12):5926, 276 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- EFSA. 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014;12(2):3547, 312 pp. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3547>
- Espinosa, M.C., G. López, P. Díaz, M.B. Linares, y M.D. Garrido. 2016. Development of a convenience and safety chilled sous vide fish dish: Diversification of aquacultural products. *Food Science and Technology International*. 22:185–95
- FDA (Food and Drug Administration). 2017. Food Code. *US Public Health Service*. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/fda-code-2017>
- FDA. 2000. Department of Health and Human Services. Food Labeling, Safe Handling Statements, Labeling of Shell Eggs; Refrigeration of Shell Eggs Held for Retail Distribution. *Federal Register*. 65:76092–76114.
- Fellows, P.J. 2017. Industrial cooking. *Food Processing Technology*. 539-562. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100522-4.00010-9>
- Fernández, A., M.J. Ocio, P.S. Fernández, M. Rodrigo, y A. Martínez. 1999. Application of nonlinear regression analysis to the estimation of kinetic parameters for two enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology* 16, 607-613.
- Fleischman, G.J. 2015. Reducing the experimental effort in measuring D and z values for microorganism inactivation kinetics. *Journal of Food Engineering*. 155:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.12.023>

- FSAI (Food Safety Authority of Ireland). 2006. Guidance Note No.15 Cook-Chill Systems in the Food Service Sector.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service). 2018. Summary of Recall Cases. *USDA*. Disponible en: <https://fsis.usda.gov/food-safety/recall-public-health-alerts/annual-recall-summaries>.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service ). 2003. FSIS Risk Assessment for *Listeria monocytogenes* in Deli Meats. 95 pp.
- García-Linares, M.C., E. Gonzalez-Fandos, M.C. García-Fernández, y M.T. García-Arias. 2004. Microbiological and nutritional quality of sous vide or traditionally processed fish: influence of fat content. *Journal of Food Quality*. 27:371-387. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2004.00676.x>
- Garre, A., M.H. Zwietering, y H.M.W. den Besten. 2020. Multilevel modelling as a tool to include variability and uncertainty in quantitative microbiology and risk assessment. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as proof of concept. *Food Research International*. 137:109374. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109374>
- Garre, A., G.A. González-Tejedor, A. Aznar, P.S. Fernández, y J.A. Egea. 2019a. Mathematical modelling of the stress resistance induced in *Listeria monocytogenes* during dynamic, mild heat treatments. *Food Microbiology*. 84:103238. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.06.002>
- Garre, A., M. Clemente-Carazo, P.S. Fernández, R. Lindqvist, y J.A. Egea. 2018a. Bioinactivation FE: A free web application for modelling isothermal and dynamic microbial inactivation. *Food Research International*. 112:353-360. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.057>
- Garre, A., G. González-Tejedor, J.L. Peñalver-Soto, P.S. Fernández, y J.A. Egea. 2018b. Optimal characterization of thermal microbial inactivation simulating non-isothermal processes. *Food Research International*. 107:267-274. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.040>
- Garre, A., J.P. Huertas, G.A. González-Tejedor, P.S. Fernández, J.A. Egea, A. Palop, y A. Esnoz. 2018c. Mathematical quantification of the induced stress resistance of microbial populations during non-isothermal stresses. *International Journal of Food Microbiology*. 266:133-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.023>
- Garre, A., P.S. Fernández, R. Lindqvist, y J.A. Egea. 2017. Bioinactivation: Software for modelling dynamic microbial inactivation. *Food Research International*. 93:66-74. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.012>

- Gaze J. E., G.D. Brown, D.E. Gaskell, y J.G. Banks. 1989. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in homogenates of chicken, beef steak and carrot. *Food Microbiology*. 6: 251-259.
- Geeraerd, A.H., V.P. Valdramidis, y J.F. Van Impe. 2005. GInaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*. 102:95-105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038>
- Geeraerd, A.H., C.H. Herremans, y J.F. Van Impe. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 59:185–209.
- Ghazala, S. 2004. Developments in cook-chill and sous vide processing. *En Improving the thermal Processing of Foods*. P. Richardson, editor. Woodhead Publishing. 152-174. <https://doi.org/10.1016/B978-1-85573-730-3.50012-7>
- González-Fandos, E., A. Villarino-Rodríguez, M.C. García-Linares, M.T. García-Arias, y M.C. García-Fernández. 2005. Microbiological safety and sensory characteristics of salmon slices processed by the sous vide method. *Food Control*. 16:77–85.
- González, S.C., A. Possas, E. Carrasco, A. Valero, A. Bolívar, G.D. Posada-Izquierdo, R.M. García-Gimeno, G. Zurera, y F. Pérez-Rodríguez. 2019. 'MicroHibro': A software tool for predictive microbiology and microbial risk assessment in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 290:226-236. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.007>
- Gorski, L., D. Flaherty, y R.E. Mandrell. 2006. Competitive fitness of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed cultures with and without food in the U.S. Food and Drug Administration Enrichment Protocol. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:776-783. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.776-783.2006>
- Guevara, L., V. Antolinos, A. Palop, y P.M. Periago. 2015. Impact of Moderate Heat, Carvacrol, and Thymol Treatments on the Viability, Injury, and Stress Response of *Listeria monocytogenes*. *BioMed Research International*. 2015.
- Hansen, T.B., y S. Knøchel. 2001. Factors influencing resuscitation and growth of heat injured *Listeria monocytogenes* 13-249 in sous vide cooked beef. *International Journal of Food Microbiology*. 63:135-47. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00467-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00467-0)
- Harrison, M.A., y Y.W. Huang. 1990. Thermal death times for *listeria monocytogenes* (Scott A) in Crabmeat. *Journal of Food Protection*. 53:878-880. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.10.878>

- Huang, L. 2017. Dynamic identification of growth and survival kinetic parameters of microorganisms in foods. *Current Opinion in Food Science*. 14:85-92. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.013>
- Huertas Baquero, J.P. 2008. Efectos de tratamientos térmicos en combinación con los aceites esenciales de clavo y tomillo sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* evaluada in vitro y en una sopa comercial. I. Pontificia Universidad Javeriana. 127 pp.
- IFSAC. 2020. Foodborne Illness Source Attribution Estimates for *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 (E. coli O157), *Listeria monocytogenes* (Lm), and *Campylobacter* using Outbreak Surveillance Data Report Interagency Food Safety Analytics Collaboration. 1–14 pp.
- Jarvis, N.A., C.A. O'Bryan, T.M. Dawoud, S.H. Park, Y.M. Kwon, P.G. Crandall, y S.C. Ricke. 2016. An overview of *Salmonella* thermal destruction during food processing and preparation. *Food Control*. 68:280–290. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.04.006>
- Jay, James M., M. J. Loessner y D. A. Golden. 2005. Foodborne Gastroenteritis Caused by *Salmonella* and *Shigella*. *En Modern Food Microbiology*. Food Science Text Series. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/0-387-23413-6\\_26](https://doi.org/10.1007/0-387-23413-6_26)
- Jin, T., H. Zhang, G. Boyd, y J. Tang. 2008. Thermal resistance of *Salmonella* enteritidis and *Escherichia coli* K12 in liquid egg determined by thermal-death-time disks. *Journal of Food Engineering*. 84, 608–614. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.06.026>
- Juneja, V.K., L. Huang, y X. Yan. 2011. Thermal inactivation of foodborne pathogens and the USDA pathogen modeling program. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 106:191-198. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1453-5>
- Juneja, V.K., y J. Novak. 2005. Pathogen resistance and adaptation to heat stress. *En Understanding pathogen behaviour*. M. Griffiths, editor. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, United Kingdom. 422–441.
- Juneja, V.K., y H.M. Marks. 2003. Characterizing asymptotic D-values for *Salmonella* spp. subjected to different heating rates in sous-vide cooked beef. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 4:395-402. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(03\)00046-8](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00046-8)
- Karatzas, K.A.G., J.A. Wouters, C.G.M. Gahan, C. Hill, T. Abee, y M.H.J. Bennik. 2003. The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant

glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. *Molecular Microbiology*. 49:1227–1238.

Karyotis, D., P.N. Skandamis, y V.K. Juneja. 2017. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in sous-vide processed marinated chicken breast. *Food Research International*. 100:894–898. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.078>

Kelsey, R.J., 1985. *Packaging in Today's Society*, third ed. Technomic, Lancaster, PA.

Khelef, N., M. Lecuit, C. Buchrieser, y D. Cabanes. 2006. *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. En *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. E.R. Martin Dworkin, Stanley Falkow and E.S. Karl-Heinz Schleifer, editors. 404–476.pp.[https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3\\_11](https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_11)

Koutsoumanis, K.P., y Z. Aspidou. 2017. Individual cell heterogeneity in Predictive Food Microbiology: Challenges in predicting a “noisy” world. *International Journal of Food Microbiology*. 240:3-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.021>

Koutsoumanis, K.P. 2008. A study on the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behavior of microbial populations. *International Journal of Food Microbiology*. 128:116–121.

Koyama, K., H. Hokunan, M. Hasegawa, S. Kawamura, y S. Koseki. 2017. Modeling Stochastic Variability in the Numbers of Surviving *Salmonella enterica*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* Cells at the Single-Cell Level in a Desiccated Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 83:1–10. <https://doi.org/10.1128/AEM.02974-16>

Kumar, R., Datta, T.K., Lalitha, K.V., 2015. *Salmonella* grows vigorously on seafood and expresses its virulence and stress genes at different temperature exposure. *BMC Microbiol*. 15. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0579-1>

Lawley, R., L. Curtis, y J. Davis. 2012. Section 1:*Listeria monocytogenes* Biological Hazards. En *Food Safety Hazard Guidebook*. The Royal Society of Chemistry. 67-73.

Li, C., L. Huang, y C. Hwang. 2017. Effect of temperature and salt on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in salmon roe. *Food Control*. 73:406-410. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.027>

Lianou, A., y K.P. Koutsoumanis. 2011. Effect of the growth environment on the

- strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food Microbiology*. 28:828–837. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.006>
- Lianou, A., J.D. Stopforth, Y. Yoon, M. Wiedmann, y J.N. Sofos. 2006. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *Journal of Food Protection*. 69:2640-7. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.11.2640>
- Mackey, B.M., y C.M. Derrick. 1987. The effect of prior heat shock on the thermoresistance of *Salmonella thompson* in foods. *Letters in Applied Microbiology* 5, 115–118. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1987.tb01627.x>
- Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard, y I. Leguerinel. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: Application of the Weibull frequency distribution model. *Acta Horticulturae*. 566:107-114. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.566.11>
- Magalhaes, C.M., V. Ferreira, J. Silva, P.A. Gibbs, y P. Teixeira. 2014. *Listeria monocytogenes*. *Food Safety*. 450-461.
- Mañas, P., R. Pagán, I. Alvarez, y S.C. Usón. 2003. Survival of *Salmonella* Senftenberg 775W to current liquid whole egg pasteurization treatments. *Food Microbiology*. 20, 593–600. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00088-6)
- Mataragas, M., A. Bellio, F. Rovetto, S. Astegiano, L. Decastelli, y L. Cocolin. 2015. Risk-based control of food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in the Italian fermented sausages Cacciatore and Felino. *Meat Science*. 103:39-45. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.01.002>
- Matereke, L.T., y A.I. Okoh. 2020. *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: A review. *Pathogens*. 9:1–12.
- Matthew, K., K.E. Kniel, y T.J. Montville. 2017. *Food Microbiology - An Introduction* (4<sup>th</sup> Edition). American Society for Microbiology (ASM).
- McMeekin, T., y T. Ross. 2002. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*. 78:133-153. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12222630>
- McMeekin, T.A., J. Olley, D.A. Ratkowsky, y T. Ross. 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of*

*Food Microbiology*. 73:395-407. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00663-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00663-8)

McMeekin T.A., J.N.Olley, T. Ross y D.A. Ratkowsky. 1993. Predictive Microbiology: Theory and Application, New York, John Wiley and Sons.

Moir, C.J., y E.A. Szabo. 1998. Microbiological safety aspects of cook-chill foods. *En Sous Vide and Cook-Chill Processing for the Food Industry*. S. Ghazala, editor. 311-336.

Montville, T.J., y K.R. Matthews. 2008. Section II: Gram-Negative Foodborne Pathogenic Bacteria. *En Food Microbiology: An Introduction*. American Society for Microbiology (ASM). 97-112.

Monu, E.A., M. Valladares, D.H. D'Souza, y P.M. Davidson. 2015. Determination of the Thermal Inactivation Kinetics of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 in Buffer and a Spinach Homogenate. *Journal of Food Protection*. 78, 1467–1471. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-488>

Murphy, R.Y., T. Osaili, L.K. Duncan, y J.A. Marcy. 2004a. Thermal Inactivation of *Salmonella* and *Listeria Monocytogenes* in Ground Chicken Thigh/Leg Meat and Skin. *Poultry Science*. 83:1218-1225. <https://doi.org/10.1093/ps/83.7.1218>

Murphy, R.Y., B.L. Beard, E.M. Martin, L.K. Duncan, y J.A. Marcy. 2004b. Comparative Study of Thermal Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in Ground Pork. *Journal of Food Science*. 69, FMS97–FMS101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb06351.x>

Murphy, R.Y., L.K. Duncan, E.R. Johnson, M.D. Davis, y J.A. Marcy. 2002. Thermal Inactivation of *Salmonella* Senftenberg and *Listeria innocua* in Beef/Turkey Blended Patties Cooked via Fryer and/or Air Convection Oven. *Journal of Food Science*. 67, 1879–1885. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08740.x>

Murphy, R.Y., E.R. Johnson, B.P. Marks, M.G. Johnson, y J.A. Marcy. 2001. Thermal inactivation of *Salmonella* Senftenberg and *Listeria innocua* in ground chicken breast patties processed in an air convection oven. *Poultry Science*. 80, 515–521. <https://doi.org/10.1093/ps/80.4.515>

NACMCF. 2010. NACMCF Parameters for Determining Inoculated Pack / Challenge. *Journal of Food Protection*. 73:140-202. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.1.140>.

- NACMCF. 2005. Considerations for establishing safety-based consume-by date labels for refrigerated, ready to eat foods. *Journal of Food Protection*.68:1761-1775.
- Nauta, M.J. 2000. Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *International Journal of Food Microbiology*.57:9-18. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00225-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00225-7)
- Ng, H., H.G. Bayne, y J.A. Garibaldi. 1969. Heat Resistance of *Salmonella*: the Uniqueness of *Salmonella* Senftenberg 775W. *Applied Microbiology*. 17, 78–82. <https://doi.org/10.1128/AEM.17.1.78-82.1969>
- Nyati, H. 2000. An evaluation of the effect of storage and processing temperatures on the microbiological status of sous vide extended shelf-life products. *Food Control*. 11:471-476. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(00\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(00)00013-X)
- O'Brien, S., B. Healy, C. Negredo, W. Anderson, S. Fanning, y C. Iversen. 2009. Prevalence of Cronobacter species (*Enterobacter sakazakii*) in follow-on infant formulae and infant drinks. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 536–541. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02562.x>
- O'Bryan, C., P.G. Crandall, E.M. Martin, C.L. Griffis, y M.G. Johnson. 2006. Heat Resistance of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 : H7 , and *Listeria innocua* M1 , a Potential Surrogate for *Listeria monocytogenes* , in Meat and Poultry : A Review. *Journal of Food Science*. 71, 23–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb15639.x>
- Olaimat, A.N., M.A. Al-Holy, H.M. Shahbaz, A.A. Al-Nabulsi, M.H. Abu Ghoush, T.M. Osaili, M.M. Ayyash, and R.A. Holley. 2018. Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 17:1277–1292.
- O'Mahony, C., y D.L. Seman. 2016. Modeling the Microbiological Shelf Life of Foods and Beverages. *En The Stability and Shelf Life of Food*. 253-289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100435-7.00009-5>
- Organización Mundial de la Salud. 2019. Inocuidad de los alimentos, un asunto de todos. *Diciembre*. 1–7.
- Osaili, T.M., C.L. Griffis, E.M. Martin, B.L. Beard, A.E. Keener, y J.A., Marcy. 2007. Thermal Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in Breaded Pork Patties. *Journal of Food Science*. 72, 56–61. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00264.x>

- Oscar, T.P. 2000. Variation of lag time and specific growth rate among 11 strains of *Salmonella* inoculated onto sterile ground chicken breast burgers and incubated at 25°C. *Journal of Food Safety*. 20:225–236.
- Peck, M.W., y S.C. Stringer. 2005. The safety of pasteurised in-pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. *Meat Science*. 461-475.
- Peleg, M. 2004. Analyzing the effectiveness of microbial inactivation in thermal processing. *En Improving the Thermal Processing of Foods*. P. Richardson, editor. Woodhead Publishing. 411–426.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.019>
- Peleg, M., y M.B. Cole. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38: 353-380.
- Peñalver-Soto, J.L., A. Garre, A. Esnoz, P.S. Fernández, y J.A. Egea. 2019. Guidelines for the design of (optimal) isothermal inactivation experiments. *Food Research International*. 126:108714.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108714>
- Pérez-Rodríguez, F. 2014. Development and application of predictive microbiology models in foods. *En Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology*. G. Granato, D. y Ares, editor. John Wiley & Sons, Ltd. 321-361.
- Pérez-Rodríguez, F. y A. Valero. 2013. Predictive Microbiology in Foods. R.W. Hartel, editor. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5520-2>
- Petersen, M.A. 1993. Influence of sous vide processing, steaming and boiling on vitamin retention and sensory quality in broccoli florets. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Forschung*, 197: 375-390.
- Phillips, L.E., T.J. Humphrey, y H.M. Lappin-Scott. 1998. Chilling invokes different morphologies in two *Salmonella enteritidis* PT4 strains. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 820–826. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00417.x>
- Pin, C., A. Metris, y J. Baranyi. 2013. Next generation of predictive models. *En Advances in Microbial Food Safety*, vol 1. J. Sofos, editor. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, United Kingdom. 498-515.
- Pittia, P., R. Furlanetto, M. Maifreni, F. Tassan Mangina, y M. Dalla Rosa. 2008. Safe cooking optimisation by F-value computation in a semi-automatic oven. *Food Control*. 19:688–697.

- Podolak, R., y D. G. Black. 2017. Introduction and overview. Pages 1–27 in Control of *Salmonella* and Other Bacterial Pathogens in Low Moisture Foods. R. Podolak and D. G. Black, ed. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9781119071051.ch1>.
- Posada-Izquierdo, G.D., F. Pérez-Rodríguez, F. López-Gálvez, A. Allende, M. V. Selma, M.I. Gil, y G. Zurera. 2013. Modelling growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut lettuce submitted to commercial process conditions: Chlorine washing and modified atmosphere packaging. *Food Microbiology*. 33:131-138. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.010>
- Poschet, F., A.H. Geeraerd, N. Scheerlinck, y B.M. Nicola. 2003. Monte Carlo analysis as a tool to incorporate variation on experimental data in predictive microbiology. *Food Microbiology*. 20:285-295.
- Ramirez-Hernandez, A., B. Inestroza, A. Parks, M.M. Brashears, M.X. Sanchez-Plata, y A. Echeverry. 2017. Thermal Inactivation of *Salmonella* in High-Fat Rendering Meat Products. *Journal of Food Protection*. 81, 54–58. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-126>
- Ratkowsky, D.A. 2004. Model Fitting and Uncertainty. *En Modelling Microbial Responses in Food*. R.C. McKellar y X. Lu, editores. CRC Press LLC. 151-196.
- Restuccia, D., U.G. Spizzirri, O.I. Parisi, G. Cirillo, M. Curcio, F. Iemma, F. Puoci, G. Vinci, y N. Picci. 2010. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*. 21:1425–1435. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.028>
- Richter, K., M. Haslbeck, y J. Buchner. 2010. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*. 40:253–266.
- Ricke, S.C., T.M. Dawoud, S.A. Kim, S.H. Park, y Y.M. Kwon. 2018. Salmonella Cold Stress Response: Mechanisms and Occurrence in Foods. *Advances Applied Microbiology*. 104: 1–38. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.03.001>
- Rinaldi, M., C. Dall'Asta, M. Paciulli, M. Cirilini, C. Manzi, y E. Chiavaro. 2013. Physicochemical and Microbiological Quality of Sous-Vide-Processed Carrots and Brussels Sprouts. *Food Bioprocess Technology*. 6:3076-3087.
- Roberts, T.A., y Jarvis. B. 1983. Predictive modelling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems. *Society for Applied Bacteriology symposium series. Volume 11*. 85–95

- Rodgers, S. 2007. Innovation in food service technology and its strategic role. *International Journal of Hospitality Management*. 26:899-912. <https://doi.org/10.1016/j.ijhm.2006.10.001>
- Rodríguez, M. 2016. Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación. Universidad Complutense de Madrid.
- Roldán, M. 2014. Características físico-químicas, microbiológicas y estructurales de la carne de cordero cocinada al vacío. Universidad de Extremadura.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*. 81:501-508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x>
- Ryser, E.T., y R.L. Buchanan. 2013. *Listeria monocytogenes*. En *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. M.P. Doyle y R.L. Buchanan, editores. ASM Press, Washington,DC. 503-545. <https://doi.org/10.1128/9781555818463>
- Sanchez Del Pulgar, J., M. Roldan, y J. Ruiz-Carrascal. 2013. Volatile compounds profile of sous-vide cooked pork cheeks as affected by cooking conditions (vacuum packaging, temperature and time). *Molecules*. 18:12538-12547. <https://doi.org/10.3390/molecules181012538>
- Schafheitle, J. M. 1990. The sous vide system for preparing chilled meals. *British Food Journal*, 92:5, 23-27.
- Schellekens, M. 1996. New research issues in sous-vide cooking. *Trends in Food Science & Technology*. 7:256-262. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10027-3](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10027-3)
- Schellekens, M., y T. Martens. 1993. *Sous-Vide* cooking. FLAIR study report N° 2. Scott, V.N., K. Swanson, T.A. Frier, W.P. Pruett, W.H. Sveum, P.A. Hall, L.A. Smoot, y D.G. Brown. 2005. Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods. *Food Prot. Trend*. 25: 818–825.
- Sebastiá, C., J.M. Soriano, M. Iranzo, y H. Rico. 2010. Microbiological quality of sous vide cook-chill preserved food at different shelf life. *Journal of Food Processing and Preservation*. 34:964-974. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00430.x>
- Sergelidis, D., y A. Abraham. 2009. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control*. 20:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.01.006>

- Shen, Q., P.M. Jangam, K.A. Soni, R. Nannapaneni, W.E.S. Schilling, y J.L. Silva. 2014. Low , Medium , and High Heat Tolerant Strains of *Listeria monocytogenes* and Increased Heat Stress Resistance after Exposure to Sublethal Heat 3. *Food Protection*. 77:1298-1307. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-423>
- Smelt, J. P. P. M., y S. Brul. 2014. Thermal inactivation of microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54:1371–1385. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.637645>
- Stringer, S.C., M. a. Fernandes, y a. Metris. 2012. Final Report Safety of Sous - Vide Foods : Feasibility of Extending Combase To Describe the Growth / Survival / Death Response of Bacterial Foodborne Pathogens Between 40 °C and 60 °C. *Institute of Food Research Enterprises*. 1-55.
- Stringer, S.C., S.M. George, y M.W. Peck. 2000. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 88.<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05335.x>
- Sutherland, J.P., y A.J. Bayliss. 1994. Predictive modelling of growth of *Yersinia enterocolitica*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*. 21:197-215. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90028-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90028-0)
- Thompson, K.M. 2002. Variability and Uncertainty Meet Risk Management and Risk Communication. *Risk Analysis*. 22:647–654.
- Tienungoon, S., D.A. Ratkowsky, T.A. McMeekin, y T. Ross. 2000. Growth Limits of *Listeria monocytogenes* as a Function of Temperature, pH, NaCl, and Lactic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4979–4987.
- Tucker, G.S. 2004. Validation of heat processes: an overview. *En Improving the Thermal Processing of Foods*. P. Richardson, editor. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge. 334–352.
- Valdramidis, V. 2016. Predictive microbiology. *Modeling in Food Microbiology: From Predictive Microbiology to Exposure Assessment*. 1-15. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-155-0.50001-0>
- Valdramidis, V.P., A.H. Geeraerd, K. Bernaerts, y J.F. Van Impe. 2006. Microbial dynamics versus mathematical model dynamics: The case of microbial heat resistance induction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 7:80-87. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.09.005>
- van Asselt, E.D., y M.H. Zwietering. 2006. A systematic approach to determine

- global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 107:73-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.014>
- van Boekel, M.A.J.S. y M. H. Zwietering. 2007. Experimental design, data processing and model fitting in predictive microbiology. *En Modelling microorganisms in food*. S. van G. and M.Z. Stanley Brul, editor. Woodhead Publishing Limited, Abington Hall. 22-43.
- Van Der Veen, S., A. Wagendorp, T. Abee, y M.H.J. Wells-Bennik. 2009. Diversity assessment of heat resistance of *Listeria monocytogenes* strains in a continuous-flow heating system. *Journal of Food Protection*. 72:999-1004. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.999>
- Vaudagna, S.R., G. Sanchez, M.S. Neira, E.M. Insani, A.B. Picallo, M.M. Gallinger, y J.A. Lasta. 2002. Sous vide cooked beef muscles: effects of low temperature-long time (LT-LT) treatments on their quality characteristics and storage stability. *International Journal of Food Science and Technology*. 37:425-441. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00581.x>
- Verheyen, D., O. Altin, D. Skipnes, F. Erdogdu, T. Skåra, y J.F. Van Impe. 2021. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in the Shaka agitated reciprocal retort: Influence of food matrix rheology and fat content. *Food and Bioprocess Processing*. 125:22–36.
- Verheyen, D., M. Baka, S. Akkermans, T. Skåra, y J.F. Van Impe. 2019. Effect of microstructure and initial cell conditions on thermal inactivation kinetics and sublethal injury of *Listeria monocytogenes* in fish-based food model systems. *Food Microbiology*. 84:103267. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103267>
- Vila, M. 2019. Microbiological safety evaluation of sous-vide treatments at mild temperatures applied to pork loin. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Villarino Rodríguez, Á. 2009. Efecto del almacenamiento sobre el valor nutritivo, la calidad higiénico-sanitaria y sensorial de la trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) procesada mediante la tecnología sous-vide. Universidad de León.
- Waal, Z. Van Der. 2017. GInaFit A user guide 2015.
- Wang, X., F. Devlieghere, A. Geeraerd, y M. Uyttendaele. 2017. Thermal inactivation and sublethal injury kinetics of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in broth versus agar surface. *International Journal of Food Microbiology*. 243, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.008>
- Wang, X., E. Lahou, E. De Boeck, F. Devlieghere, A. Geeraerd, y M.

- Uyttendaele. 2015. Growth and inactivation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in broth and validation in ground pork meat during simulated home storage abusive temperature and home pan-frying. *Frontiers in Microbiology*. 6.
- Wareing, P., F. Stuart, y R. Fernandes. 2010. Foodborne Bacterial Pathogens. *En Micro-Facts: The Working Companion for Food Microbiologists*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. 104-120. <https://doi.org/10.1039/9781849732130-00008>
- Weber, M.H., y M.A. Marahiel. 2003. Bacterial cold shock responses. *Science progress*. 86:9–75.
- Wells-Bennik, M.H.J., P.W.M. Janssen, V. Klaus, C. Yang, M.H. Zwietering, y H.M.W. Den Besten. 2019. Heat resistance of spores of 18 strains of *Geobacillus stearothermophilus* and impact of culturing conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 291:161–172.
- Wesche, A.M., J.B. Gutler, B.P. Marks, y E.T. Ryser. 2009. Stress, Sublethal Injury, Resuscitation, and Virulence of Bacterial Foodborne Pathogens†. *Journal of Food Protection*. 72, 1121–1138. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.1121>
- Whiting, R.C., y M.H. Golden. 2002. Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation, and toxin production in broth. *International Journal of Food Microbiology*. 75:127-133. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00003-X)
- Whiting, R.C. y R.L. Buchanan. (1993). A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology*. 10: 175-177.
- Yousef, A.E., y A.G. Abdelhamid. 2019. Behavior of Microorganisms in Food: Growth, Survival, and Death. *En Food Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 3–21. <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch1>
- Zwietering, M.H., A. Garre, y H.M.W. den Besten. 2021. Incorporating strain variability in the design of heat treatments: A stochastic approach and a kinetic approach. *Food Research International*. 139:109973. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109973>