



Universidad de Valladolid

E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

“Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas”

Alumno: Mario del Blanco Rojo

Tutor académico: Carlos Blanco Fuentes

Tutor de empresa: Mario González Angulo

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Cepas y condiciones de mantenimiento.....	9
3.2. Medio de ensayo	11
3.3. Inoculación	11
3.4. Tratamiento por HPP	11
3.5. Análisis microbiológico y recuentos	13
3.6. Análisis estadístico	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1. Estudio de variabilidad de las cepas. Histogramas de frecuencia	15
4.2. Análisis de componentes principales (PCA).....	19
4.3. Análisis descriptivo. Análisis de agrupamientos (Cluster)	21
4.4. Selección de cepas con potencial para ser utilizadas en estudios de validación de procesos de HPP	23
5. CONCLUSIONES	24
6. BIBLIOGRAFÍA.....	25

RESUMEN

En el presente estudio se evalúa el comportamiento de distintas cepas de *Salmonella* spp. respecto a su inactivación por altas presiones hidrostáticas (HPP). Se trabajó con 48 cepas, cubriendo un amplio rango de serotipos. Con unas condiciones de procesamiento moderadas (500 MPa durante 1 minuto) bajo condiciones físico-químicas diferentes, pH 4,5 y 6, para analizar su comportamiento en diferentes medios. Realizando un seguimiento en el tiempo; días 0, 1, 7, 14 y 21; de las muestras incubadas a 12°C para analizar la inactivación, la recuperación y el daño subletal con el objetivo de seleccionar aquellas cepas con potencial para ser empleadas en estudios de validación.

Se observó una gran variabilidad de *Salmonella* spp. respecto a su inactivación por altas presiones, con recuentos que a día 21 variaron entre 2,00 y 10,69 log UFC/mL. Inmediatamente después del tratamiento de HPP todas las muestras se situaron por debajo del límite de detección de (100 UFC/mL). Se observaron diferencias en la capacidad de recuperación de las cepas en los diferentes medios de ensayo. A pH 4,5 la mayoría de las cepas no fueron capaces de recuperarse mientras que en el medio de ensayo con pH 6 si lo hicieron. Se seleccionaron un total de 9 cepas entre las 48. Estas cepas mostraron una rápida capacidad de adaptación al medio y un daño subletal bajo siendo las de mayor potencial para ser utilizadas en estudios de validación de procesos de HPP.

ABSTRACT

This report discusses the results obtained in the evaluation of the behaviour of *Salmonella* spp. towards its inactivation by means of high pressure processing (HPP). Forty-eight strains were studied, covering a wide range of serotypes. Processing conditions of 500 MPa and 1 minute were selected under different physicochemical conditions (pH 4.5 and 6) to determine its behaviour in different culture broths. Samples stored at 12 °C were periodically analysed in days 0, 1, 7, 14 and 21 to assess inactivation, recovery and sublethal injury aiming to select those strains with potential to be used in validation studies.

Results revealed a great variability of *Salmonella* spp. towards high pressure processing. Counts after 21 days ranged between 2,00 y 10,69 log UFC/mL. Immediately after HPP treatment all samples were below the detection limit (100 UFC/mL). Differences in resilience of the strains were observed in the culture broth. At pH 4,5 the most of the strains were not able to recover, whereas at pH 6 they did. A total of 9 strains were selected from among the initial 48. These strains were able to withstand the HPP process and showed a quickly adaptation to culture broth with low sublethal injury, which makes them of great potential to be used in validation studies of HPP.

1. INTRODUCCIÓN

Las nuevas tecnologías de procesado de alimentos se están convirtiendo en esenciales para ofrecer al consumidor productos con una seguridad microbiológica casi absoluta sin renunciar a la calidad nutricional y sensorial de los alimentos (Welti-Chanes et al., 2009; Jofre et al., 2010).

Para que esto sea posible es necesario estudiar la variabilidad existente entre microorganismos de diferentes especies (variabilidad inter-especie) y de la misma especie (variabilidad intra-especie) en la resistencia a las nuevas tecnologías de procesado para cada tipo de alimento (Lado et al., 2002). Disponer de datos experimentales contrastados y de calidad para la correcta inactivación microbiana se hace fundamental a la hora de diseñar los procesos industriales de una manera correcta, eficiente y económicamente viable (Mújica-Paz et al., 2011).

Algunas agencias de seguridad alimentarias, como la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, están requiriendo la realización de estudios de validación para asegurar que el riesgo asociado a la presencia de patógenos sea reducido a niveles de probabilidad aceptable (FDA, 2004). El problema que se plantea es que actualmente no existen criterios para la selección de cepas patógenas empleadas en los estudios de validación, lo que podría suponer un riesgo para la seguridad de los consumidores al infravalorar o sobrestimar la eficacia de las nuevas tecnologías de procesado de alimentos.

La tecnología de altas presiones hidrostáticas (High Pressure Processing - HPP) es una de las que mayor crecimiento ha mostrado en la última década. Esta tecnología permite mejorar la calidad y extender la vida útil de los productos alimenticios frescos sin alterar las propiedades sensoriales y nutricionales, al mismo tiempo que se alcanza el nivel requerido de seguridad alimentaria (Hygreeva et al., 2016).

Estas mejoras están atrayendo cada vez a un mayor número de empresas que incorporan la tecnología de HPP como una alternativa a los procedimientos convencionales de tratamiento térmico (Cebrian et al., 2016). Estos tratamientos a menudo puede conducir a cambios en la calidad de los alimentos, como la destrucción de nutrientes, desarrollo de sabores extraños, modificaciones de la textura y el color de los alimentos. (Wang et al., 2013).

El funcionamiento de la tecnología de HPP consiste en la aplicación de altas presiones (450-600 MPa, en condiciones industriales) con temperaturas de 4-25 °C durante un periodo corto de tiempo (unos pocos segundos a 9 min) en alimentos ya envasados. La

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

presión se transmite de una forma uniforme e instantánea por todo el alimento evitando problemas de convección o baja penetración como ocurre con tratamientos térmicos, microondas o de radiación (Rastogi et al., 2007; Muñoz-Cuevas et al., 2013), con el fin de eliminar los patógenos vegetativos e inactivar enzimas (Bull et al., 2005; Andrés et al., 2015).

Como consecuencia del tratamiento de HPP en alimentos se ha demostrado variabilidad inter e intra-especie en la resistencia a las altas presiones de los microorganismos (Benito et al., 1999; Alpas et al., 1999 Jofre et al., 2010). Esta demostración indica la inactivación por altas presiones depende de la combinación de una serie de factores relacionados con la propia bacteria (la especie, el tipo de Gram, el estado fisiológico y las particularidades de la cepa), la naturaleza del medio (el pH, la actividad de agua $-a_w-$ y/o determinados nutrientes) y las variables del proceso (nivel de presión, tiempo de presurización y temperatura) (Smelt, 1998).

Se han estudiado algunos de los mecanismos de acción de las HPP para conseguir la inactivación microbiana. La aplicación de presión altera la estructura celular, las funciones fisiológicas de la célula y rompe las cadenas de ADN, alterando la integridad de la membrana celular, inactivando enzimas clave y desnaturalizando proteínas (Koseki et al., 2006; Wang et al., 2013). No obstante, algunas de las células pueden sobrevivir después de este tratamiento, por ser resistentes a las altas presiones o por producirse en ellas un daño subletal. El daño subletal es un fenómeno por el cual las células dañadas por la presión son capaces de recuperarse y proliferar si las condiciones del medio son favorables (pH próximo al óptimo del microorganismo, a_w elevada, temperatura óptima). Por ello será importante el control del tiempo y de la temperatura de conservación posterior al tratamiento de HPP (Bozoglu et al., 2004; Rendueles et al., 2011).

A finales de 2015, se habían instalado alrededor de 320 unidades industriales de procesamiento por HPP en todo el mundo procesando alrededor de 1.200 millones de kg/año de alimentos. En la última década, el mercado mundial ha experimentado un crecimiento muy significativo en la incorporación de equipos a nivel industrial (figura 1) (hiperbaric, 2016).

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

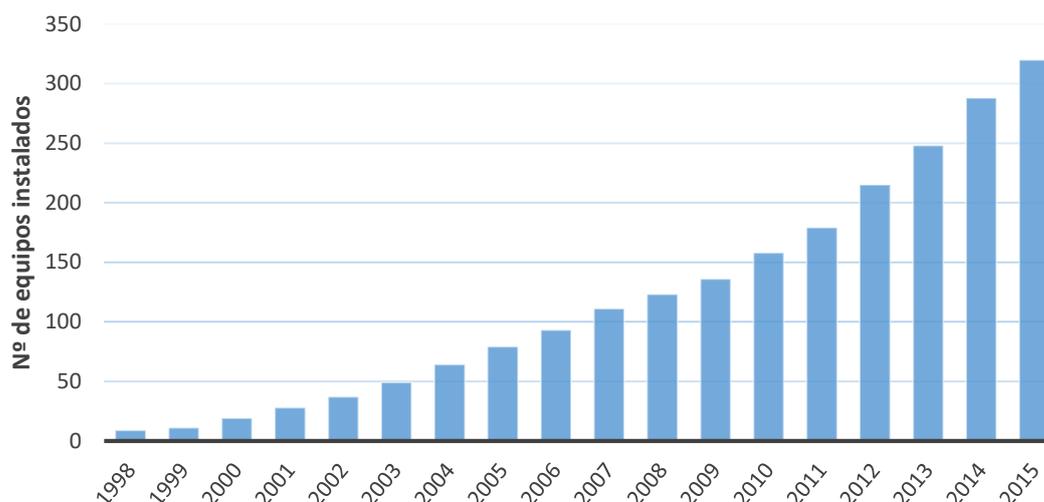


Figura 1. Crecimiento mundial del uso de la tecnología de HPP en la industria alimentaria. Fuente: Hiperbaric S.A., Burgos.

Algunos de los motivos que llevan a las empresas a invertir en tecnología de HPP son las demandas de los consumidores hacia productos más naturales, sin aditivos (clean label), mínimamente procesados y con un sabor similar al del producto fresco. También la posibilidad de alcanzar nuevos mercados de alto valor añadido, como los productos premium, alimentos funcionales con altos contenidos en compuestos bioactivos (Torres et al., 2010), productos novedosos y nuevos productos desarrollados gracias a las altas presiones. Otro de los objetivos que se persigue es la obtención de una mayor vida útil que permita la exportación y el acceso a mercados exigentes como EE.UU., Japón o Australia (Mújica-Paz et al., 2011).

En este momento entre las principales aplicaciones de la tecnología de HPP destacan productos como guacamole, zumos de frutas, platos preparados, productos cárnicos, agua de coco, bebidas isotónicas, comida para bebés, pescados y mariscos, relleno de sándwiches y alimentación animal. En relación al total de utilización de los equipos de HPP los sectores con mayor utilización (figura 2) son frutas y vegetales (25%), seguido de productos cárnicos (22%), zumos y bebidas (20%) y productos del mar (8%). En el 25% restante se englobarían diferentes actividades como procesos de maquila, investigación y desarrollo, o sector lácteo (Hipebaric, 2016).

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

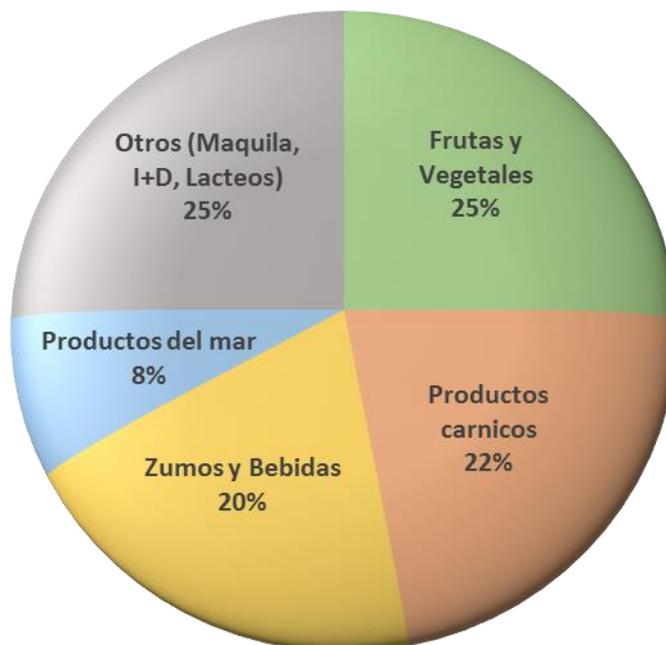


Figura 2. Distribución según el sector de utilización de los *equipos de HPP instalados en el mundo hasta 2015*. Fuente: Hiperbaric S.A., Burgos.

El sector en el que más relevancia ha adquirido la tecnología de HPP en los últimos años es en el de zumos y bebidas. Una de cada dos máquinas que fueron instaladas en el mundo durante los años 2015 y 2016 fueron para la producción de zumos y bebidas, además gran parte de la producción en procesos de maquila va a parar a este sector, que se ha consolidado con volúmenes de producción de 250-300 millones de L/año y con precios de venta al consumidor que en la Unión Europea oscilan entre los 3-10 €/L y en EE.UU. entre los 7-20 \$/L (Hipebaric, 2016).

Hasta la fecha la distribución de equipos de HPP en el mundo (figura 3) es muy desigual, adquiriendo gran importancia en Norteamérica, donde se encuentran el 54% de los equipos, especialmente en Estados Unidos, seguido de Europa (25%), Asia (12%) y Oceanía (6%) y con muy poca importancia en Latinoamérica (3%) y África (1%) (Hipebaric, 2016).

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

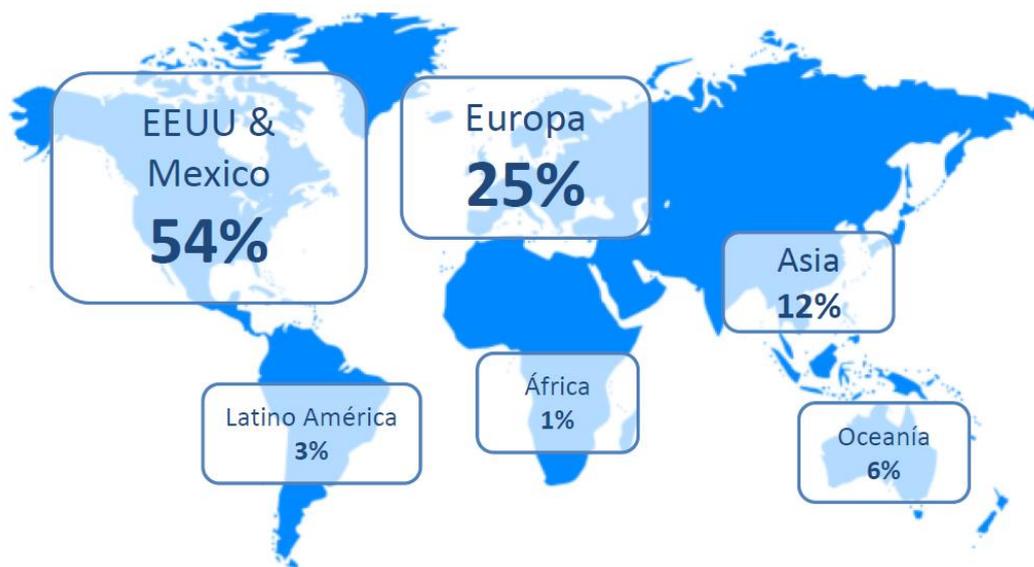


Figura 3. Distribución según el destino de los equipos de HPP instalados en el mundo hasta 2015.

Fuente: Hiperbaric S.A., Burgos.

Esta distribución se debe a los cambios que se están produciendo en los países desarrollados en el ámbito de la producción de alimentos (Siró et al., 2008). Los consumidores son cada vez más conscientes de que una adecuada dieta contribuye directamente a la salud (Mollet et al., 2002). Hoy en día, los alimentos no pretenden satisfacer solamente el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios sino también prevenir las enfermedades relacionadas con la nutrición y mejorar el bienestar físico y mental de los consumidores (Menrad, 2003).

La creciente demanda de productos frescos y nutritivos desencadenó tanto la investigación académica como industrial para la aplicación de nuevas tecnologías de procesamiento en productos convencionales. (McArdle et al., 2013; Hygreeva et al., 2016). Una de las grandes beneficiarias de esta demanda son las empresas productoras de zumos tratados por altas presiones en los Estados Unidos (figura 4). Tanto es así que en 6 años se ha multiplicado el número de marcas productoras por 12, pasando de 8 en 2008 a 100 en 2014.

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

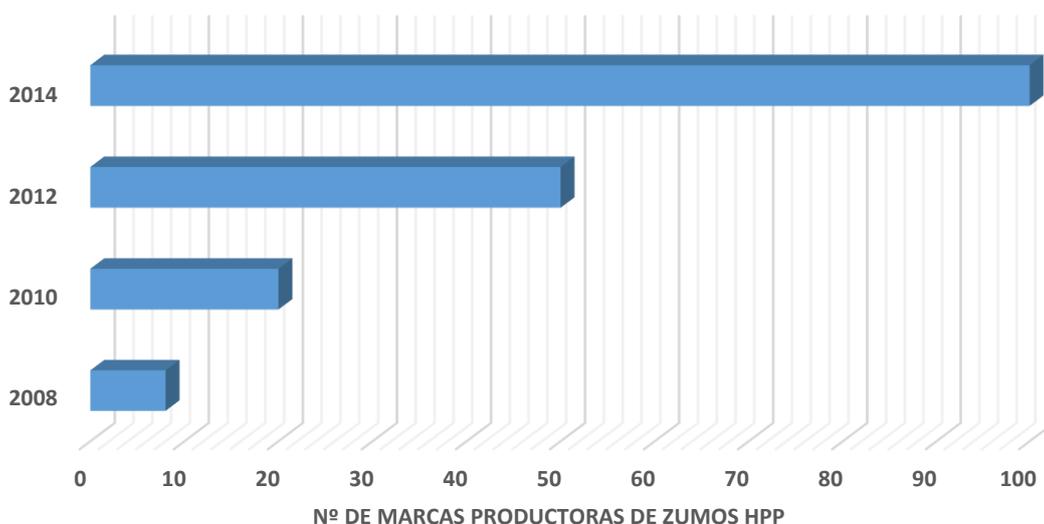


Figura 4. Incremento del número de marcas productoras de zumos tratados por HPP en Estados Unidos entre los años 2008 y 2014. Fuente: Hiperbaric S.A., Burgos.

La normativa que las empresas productoras de zumo deben cumplir en Estados Unidos se modificó debido a varios brotes asociados al consumo de zumos no pasterizados en los años 90 (Danyluk et al., 2012). En consecuencia la FDA introdujo regulación para que los zumos vendidos al por mayor se produjeran bajo un plan de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), que debe incluir un manual de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y la exigencia de validar la tecnología de procesado usada en el proceso productivo obteniendo una reducción de 5.0 log UFC/mL para el microorganismo pertinente (FDA, 2004). Este será el microorganismo más resistente, de importancia para la salud pública, que es posible que ocurra en el producto. Para identificarlo habrá que considerar el historial de brotes producido y comprobar si se puede considerar como un contaminante potencial. En zumos estos microorganismos serán generalmente: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y/o *Cryptosporidium parvum* (FDA, 2004).

En el caso de *Salmonella* spp. se han producido varios brotes a lo largo de los años con diferentes tipos de zumo. En el año 2005 se produjo un brote en zumo de naranja que afectó a 23 estados dejando más de 150 afectados (Jain et al., 2009). En el año 2010 se produjo un brote en pulpa congelada de Mamey que afectó a 2 estados dejando 9 casos (CDC, 2010).

En la actualidad *Salmonella* spp. es una de las causas más frecuentes de gastroenteritis transmitida por los alimentos en seres humanos. Durante el año 2016 el CDC (Center for Disease Control and Prevention) de Estados Unidos identificó 24.029 casos

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

causados por infecciones alimentarias, para un total de 10 estados, de los cuales 8.172 fueron *Salmonella* spp. (34% del total) convirtiéndola en el segunda causa más común de infección alimentaria por detrás de *Campylobacter* sp. Los serotipos más comunes fueron *Enteritidis* (17%), *Newport* (11%) y *Typhimurium* (9%) (Marder et al., 2017). Datos similares se produjeron en Europa según la EFSA (Agencia Europea sobre Seguridad Alimentaria) siendo también la segunda causa más común de infección alimentaria con 94.625 casos reportados, un 28% del total. Los serotipos más comunes fueron *Enteritidis* (45%) y *Typhimurium* (16%) (EFSA, 2015).

Salmonella spp. son miembros de la familia Enterobacteriaceae, un gran grupo de facultativos, Gram-negativos, muchos de los cuales son parte normal de la microbiota intestinal de los vertebrados. La enfermedad se presenta como una gastroenteritis autolimitada o fiebre entérica o tifoidea (Ibarra et al., 2009).

El género *Salmonella* está formado por las especies *enterica* y *bongori*. La especie *S. enterica* contiene seis subespecies, *enterica* (subespecie I), *salamae* (subespecie II), *arizonae* (subespecie IIIa), *diarizonae* (subespecie IIIb), *houtenae* (subespecie IV) e *indica* (subespecie VI) (Brenner et al., 2000). Las subespecies se dividen en serogrupos y serovares (Grimont et al., 2007). La diversidad de *Salmonella* spp. está representada por más de 2600 serovares. Es importante destacar que *S. enterica* subsp *enterica* es el grupo clínicamente más significativo causante del 99% de los casos de salmonelosis (Shi et al., 2015).

La validación de los parámetros del proceso de HPP para garantizar la inactivación de 5 log UFC/ml de *Salmonella* spp. en zumos permite garantizar la ausencia del microorganismo a lo largo de la vida útil del producto, minimizando así el riesgo de infección. No obstante, dada la variabilidad intra-especie en la resistencia a los tratamientos de HPP (Benito et al., 1999; Alpas et al., 1999) es fundamental validar los parámetros de procesamiento para cada alimento concreto (Bayindirli et al., 2006).

Actualmente no hay ningún criterio para la selección de las cepas que deben emplearse en estudios de validación. Los laboratorios usan cocteles de 5-10 cepas según las disponibles en cada laboratorio, sin haber evaluado su resistencia a la presión. Es de vital importancia que las agencias de seguridad alimentaria que desarrollan estudios de validación de patógenos seleccionen las cepas más resistentes a la presión para cada microorganismo y las utilicen como patrones para garantizar una mayor seguridad alimentaria. En el presente estudio se pretende evaluar la resistencia y la capacidad de adaptación al medio de numerosas cepas después de un tratamiento de HPP para seleccionar aquellas con potencial para ser empleadas en estudios de validación.

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este estudio fueron evaluar la variabilidad de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por tratamientos de altas presiones en medios de laboratorio que simulan las condiciones fisicoquímicas de zumos de acidez alta (pH < 4.6) y acidez baja (pH > 4.6) e identificar cepas que puedan ser utilizadas en estudios de validación.

Estos objetivos se han desarrollado tratando de cumplir los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar la respuesta (resistencia) de *Salmonella* spp. frente a tratamientos moderados de altas presiones (500 MPa durante 1 minuto) en medios con condiciones físico-químicas distintas.
2. Evaluar el comportamiento de *Salmonella* spp. en ese medio tras un tratamiento por HPP.
3. Seleccionar cepas con mayor resistencia y mayor capacidad de adaptación al medio para su potencial uso en cocteles de estudios de validación de zumos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas y condiciones de mantenimiento

Para la elaboración de este estudio se ha seleccionado una colección de 48 cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Estas cepas se obtuvieron de la colección del International Life Sciences Institute (ILSI, Universidad de Cornell) y del Hospital Universitario de Burgos (HUBU, aislados clínicos de pacientes).

En la siguiente tabla se detallan las características de las cepas utilizadas:

Tabla 1. Descripción de las cepas de *Salmonella* spp. empleadas en el estudio.

Código	Serovar	Origen	Procedencia
FSL S5-580	4,5,12:l:-	Humano	ILSI
FSL S5-517	Agona	Humano	ILSI
FSL S5-540	Anatum	Humano	ILSI
FSL S5-648	Blockley	Humano	ILSI
FSL S5-373	Braenderup	Humano	ILSI
FSL R8-2528	Derby	Cacahuete	ILSI
FSL R8-6671	Dessau	Humano	ILSI
FSL R8-7229	Dessau	Humano	ILSI
FSL S5-439	Dublin	Humano	ILSI

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

FSL S5-415	Enteritidis	Humano	ILSI
FSL S5-483	Enteritidis	Humano	ILSI
FSL R8-5224	G (1):b,-	Humano	ILSI
FSL S5-487	Give	Humano	ILSI
FSL S5-543	Hadar	Humano	ILSI
FSL R8-5223	Hartford	Humano	ILSI
FSL S5-448	Heidelberg	Cacahuete	ILSI
FSL S5-480	Heidelberg	Humano	ILSI
FSL S5-406	Javiana	Cacahuete	ILSI
FSL S5-395	Javiana	Humano	ILSI
FSL S5-451	Mbandaka	Humano	ILSI
FSL R8-6670	Meleagridis	Humano	ILSI
FSL A4-633	Mississippi	Humano	ILSI
FSL S5-504	Muenchen	Humano	ILSI
FSL S5-639	Newport	Humano	ILSI
FSL S5-642	Oranienburg	Humano	ILSI
FSL S5-447	Paratyphi B var. Java	Humano	ILSI
FSL S5-649	Saintpaul	Humano	ILSI
FSL S5-458	Schwarzengrund	Humano	ILSI
FSL S5-658	Senftenberg	Humano	ILSI
FSL S5-408	Stanley	Humano	ILSI
FSL R8-5221	Tennessee	Humano	ILSI
FSL S5-523	Thompson	Humano	ILSI
FSL R8-5222	Tornow	Humano	ILSI
FSL R6-540	Typhi	Humano	ILSI
FSL S5-536	Typhimurium	Humano	ILSI
FSL W1-030	Typhimurium DT104	Humano	ILSI
FSL W1-029	Typhimurium U302	Humano	ILSI
FSL S5-961	Virchow	Humano	ILSI
FSL S5-438	Weltevreden	Cacahuete	ILSI
FSL S5-490	Worthington	Humano	ILSI
34301	Typhimurium	Humano	HUBU
790	Typhimurium	Humano	HUBU
72732	Enteritidis	Humano	HUBU
71110	Typhimurium	Humano	HUBU
37190	Enteritidis	Humano	HUBU
90108	Enteritidis	Humano	HUBU
7144	Enteritidis	Humano	HUBU
90196	Enteritidis	Humano	HUBU

Estas cepas compusieron el cultivo stock de estudio, que se conservó en congelación a -80 °C en una solución de glicerol al 20 % hasta su uso. Las cepas se revivificaron realizando tres pases consecutivos en placas de tripteína-soja (TSA) (Conda, España) enriquecidas con un 0,6 % de extracto de levadura (YE) (Oxoid, Inglaterra) (TSAYE).

3.2. Medio de ensayo

Para evaluar la variabilidad de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por altas presiones se empleó como medio de ensayo una solución elaborada a partir de caldo tripteína-soja (TSB) (Conda, España) enriquecido con un 0,6 % de YE (TSBYE).

A este medio de ensayo, de acuerdo al objetivo del trabajo, se le modificó el pH mediante la adición de ácido cítrico (Prolab, Bélgica), que es el mayoritario de las frutas (Andrés et al., 2015) para lograr dos soluciones modelo diferentes, una a pH 4,5 (4,26 g/L ácido cítrico) y otra a pH 6 (1,56 g/L ácido cítrico). Se estudió el comportamiento de cada cepa en ambos medios.

Las soluciones de ensayo elaboradas se envasaron por triplicado para cada valor de pH en botellas estériles de politereftalato de etileno (PET) (Sunbox, España) con un volumen de 27 ml.

3.3. Inoculación

Para llevar a cabo la inoculación se realizó una dilución 1:10. Se transfirió 1 ml de las cepas obtenidas en la revivificación en el medio de cultivo TSBYE a tubos de 9 ml de la solución modelo (TSBYE con el pH ajustado a 4,5 y 6 con ácido cítrico). Estos tubos contaban con una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL.

De estos tubos se transfirieron 3 ml a las botellas que poseían 27 ml de solución modelo completando la capacidad de las mismas hasta 30 ml y obteniendo una concentración final de 10^7 UFC/mL. Para cada cepa se inocularon seis botellas: un triplicado con valor de pH 4,5 y otro triplicado con valor de pH 6 obteniendo un total de 288 muestras.

Finalmente se comprobó que el sellado de las botellas era correcto y se mantuvieron en refrigeración (< 1 h) hasta el tratamiento por HPP.

3.4. Tratamiento por HPP

El tratamiento por HPP se realizó inmediatamente después de la inoculación (< 1 h). La presión aplicada fue de 500 MPa durante 1 min empleando el equipo Hiperbaric 135 (figura 5) fijando una temperatura de procesado inferior de 25°C.

Con este tratamiento se obtiene información para descartar las cepas menos resistentes, y observar diferencias en la inactivación y en la recuperación de las cepas más resistentes (Van Opstal et al. 2005).

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas



Figura 5. Equipo de HPP empleado en los experimentos. Hiperbaric 135. (Hiperbaric S.A., Burgos).

Durante el ciclo del tratamiento (figura 6) inicialmente se produce un aumento progresivo de la presión, durante 2 minutos aproximadamente, hasta llegar a la presión fijada, 500 MPa. Esta presión se mantiene durante el tiempo de tratamiento estipulado, 1 minuto, y finalmente se produce la despresurización de la vasija, que ocurre en un tiempo inferior a 3 segundos.

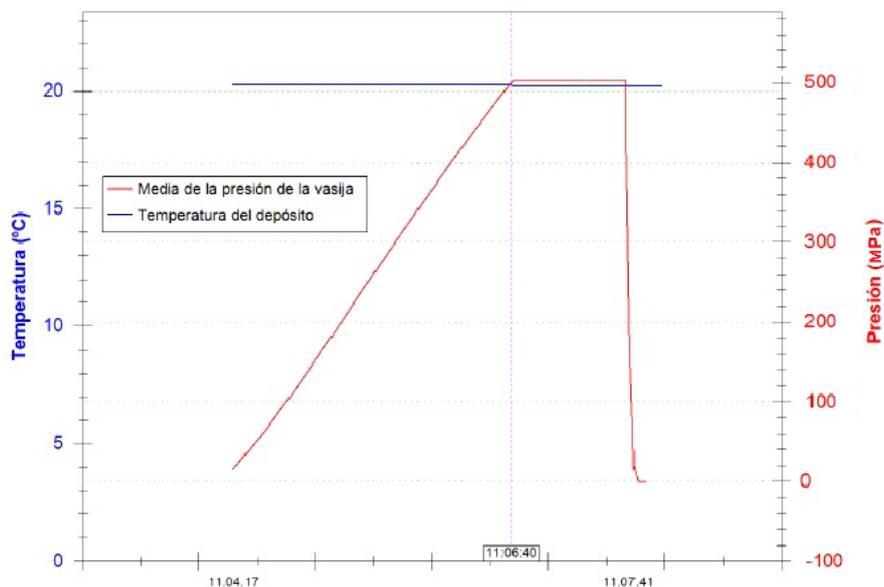


Figura 6. Ciclo del tratamiento por HPP a 500 MPa durante 1 minuto. Azul - temperatura del agua durante el ciclo. Rojo - presión durante todo el ciclo.

Después del tratamiento por HPP las muestras se conservaron a una temperatura de 12° C, hasta el final del experimento. Esta temperatura simula unas condiciones de “abuso” de temperatura (frigorífico abierto) (Russel, 2002) que podrían favorecer la recuperación de las células dañadas por las HPP y arrojar información sobre aquellas cepas que puedan adaptarse a abuso moderado de temperatura

3.5. Análisis microbiológico y recuentos

Se realizó el análisis microbiológico de las muestras, antes de ser tratadas por HPP (control) y después de ser tratadas (inmediatamente después de su tratamiento por HPP y 1, 7, 14 y 21 días después). Para los diferentes análisis se utilizaron dos medios de cultivo diferentes. En TSAYE se cuantificaron los recuentos obtenidos para cada uno de los diferentes análisis microbiológicos, expresando los recuentos como logaritmos de unidades formadoras de colonia (log UFC/mL) para lo cual se empleó la siguiente fórmula:

$$\log UFC/ml = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times 10^{\text{dilución}}}{\text{volumen inoculado (0.01)}}$$

En el medio, TSAYE suplementado con un 3 % NaCl se evaluó el daño subletal mediante el cálculo de la diferencia entre la concentración obtenida en TSAYE y la concentración obtenida en TSAYE+3 % NaCl para cada uno de los diferentes análisis expresando la inactivación como $\Delta \log$ UFC/mL (Wuytack et al., 2003).

$$\Delta \log \frac{UFC}{mL} = \log (\overline{TSAYE}) \frac{UFC}{mL} - \log (\overline{TSAYE + 3\%NaCl}) \frac{UFC}{mL}$$

Para la realización de las diluciones decimales se empleó la solución de Ringer (Oxoid, Inglaterra) y la siembra se realizó mediante el método Drop-plate o goteo en placa, que consiste en sembrar en una misma placa diferentes muestras, mediante la aplicación de una gota de 10 μ l sin extender en la superficie de la placa. Este método supone un gran ahorro de material y de tiempo, ya que permite hacer la siembra y recuento de varias cepas a la vez. El nivel de detección que se puede alcanzar con esta técnica es de 2 log UFC/mL.

En el estudio se sembraron en una misma placa para cada cepa las muestras correspondientes a los dos valores de pH estudiados, las tres réplicas y dos o tres diluciones para cada muestra (Corral-Lugo et al., 2012) en función del día de análisis y el grado de crecimiento esperado.

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

Las placas se incubaron a 37 ° C durante 24-48 h antes de llevar a cabo su recuento. Las colonias obtenidas de *Salmonella* spp. son blancas, con forma redondeada y con diferentes tamaños dependiendo del medio de cultivo y serovar. En el caso de existir dudas sobre la naturaleza de alguna de las colonias se empleó como medio de cultivo selectivo Brilliance Salmonella Agar (BSA) (Oxoid, Inglaterra). En este medio las colonias de *Salmonella* spp. son fácilmente identificadas por su desarrollo en color morado. Las comprobaciones de posibles contaminaciones en este medio se realizan mediante una siembra de agotamiento por estrías.

Después del análisis a día 21, en aquellas muestras donde no se cuantificó *Salmonella* spp. a lo largo del experimento, se transfirió 1 ml de las botellas tratadas a tubos con 9 ml de TSBYE, que a diferencia de la solución modelo no se le ajustó el pH para favorecer el crecimiento de los microorganismos, y se incubaron a 37° durante 24 horas. Pasado este tiempo en las muestras donde se produjo turbidez, se realizó una siembra de agotamiento por estrías en medio selectivo BSA con el objetivo de confirmar si la turbidez observada se debe a la presencia de *Salmonella* spp. De este modo se pudo comprobar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en 1 mL de solución ensayo (< 1 UFC/mL).

3.6. Análisis estadístico

Los datos de los recuentos obtenidos para cada muestra se representaron mediante histogramas de frecuencia. Adicionalmente se realizaron análisis por componentes principales y de agrupamiento por cluster con el fin de diferenciar grupos de cepas con características similares atendiendo a todas las variables del proceso (inactivación pH y día de análisis). Para ello se utilizó el software estadístico Statgraphics Centurion XVI 16.1.05.

3.6.1. Histogramas de frecuencia

Se trata de una representación gráfica que muestra la distribución de una variable. Los recuentos obtenidos para el conjunto de las cepas se agrupan por clases. La longitud de cada barra representa la frecuencia relativa (porcentaje) de cepas que se encuentran en esa clase. De este modo se obtiene una visión global de la variabilidad de las cepas utilizadas.

3.6.2. Componentes principales

Análisis multivariante aplicado sobre las variables del proceso para diferenciar grupos de cepas con características similares.

3.6.3. Análisis de agrupamientos o cluster

Técnica multivariante que genera grupos en función de su grado de similitud atendiendo a su respuesta al conjunto de variables. Se empleó un análisis jerárquico con la distancia euclídea y el método de Ward.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizados los recuentos de todos los análisis descritos en el apartado 3.5. *Análisis microbiológico y recuentos*, se procedió a estudiar los resultados producidos para cada cepa. A través del histograma de frecuencia se pretende analizar la variabilidad de *Salmonella* spp. tras un tratamiento de HPP a 500 MPa durante 1 minuto y mediante el análisis de componentes principales y el análisis de agrupamientos (Cluster) se pretende agrupar las cepas en torno a su variabilidad.

4.1. Estudio de variabilidad de las cepas. Histogramas de frecuencia

En las Figuras 7 y 8 están representados los histogramas de frecuencia de las muestras analizadas en función de los recuentos logrados en el control, a día 0, día 1, día 7, día 14 y día 21, en dos condiciones fisicoquímicas diferentes, pH 4,5 y 6. En el eje de abscisas se muestran los recuentos obtenidos (log UFC/mL), y en el eje de ordenadas, un valor comprendido entre 1 y 100 que corresponde al porcentaje de muestras donde se ha conseguido un determinado recuento.

En la Figura 7 se encuentran los histogramas de las muestras inoculadas en el medio de ensayo con pH 4,5. En el histograma del control (figura 7A) se observa que los recuentos varían entre 7,51 y 5,30 log UFC/mL esto se debe al efecto que la propia matriz tiene sobre el microorganismo, la mayoría de las muestras se adaptan bien a la misma, pero hay otras que tienen algunas dificultades. En cuanto al efecto que el ácido

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

cítrico pueda tener sobre las células, no se puede descartar que exista, pero de haberlo es muy limitado.

En los histogramas del día 0, día 1, día 7, día 14 y día 21 (figuras 7B, 7C, 7D, 7E y 7F respectivamente) los recuentos se mantuvieron por debajo del límite de detección de la técnica (2 log UFC/mL). Esto sucedió para el 100% de las muestras en los días 0 y 1, para el 99% en el día 7, y para 94 y 92% en los días 14 y 21 respectivamente. Por lo que la inmensa mayoría de las muestras estudiadas en el medio con pH 4,5 inmediatamente después del tratamiento de HPP han sido inactivadas y posteriormente han sido incapaces de recuperarse del daño sufrido en este medio de cultivo.

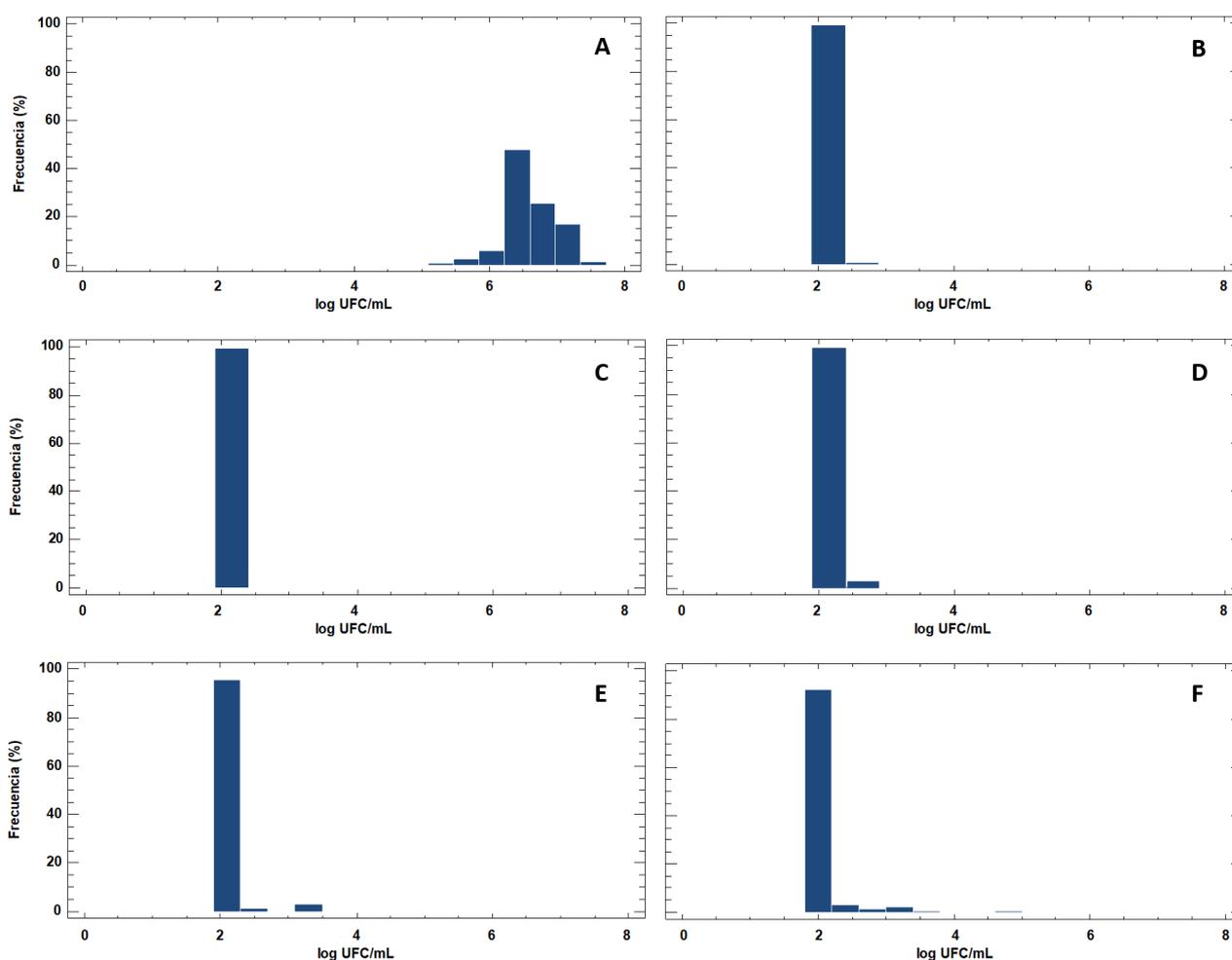


Figura 7. Histogramas de frecuencia de las muestras analizadas a pH 4,5 a 500 MPa durante 1 minuto en el control (A), a día 0 (B), a día 1 (C), a día 7 (D), a día 14 (E) y a día 21 (F).

Estos resultados se ajustan a los encontrados previamente por Álvarez-Ordóñez et al., 2010 que no encontraron crecimiento en *Salmonella Typhimurium* en medio de cultivo

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

BHI con un valor de pH 4,5 a 10°C (en el estudio a 12°C) pero sí que lo encontraron a otras temperaturas como 25 o 37°C. Otros estudios analizaron la inactivación producida por el tratamiento de HPP para *Salmonella typhimurium* inoculada en TSB con diferentes pH, logrando inactivaciones completas en pH por debajo de 5,5 (Erkmen, 2009).

En cuanto a la minoría de células que sí lograron crecer a día 14 y 21 (6 y 8% respectivamente), estos datos concuerdan con los resultados de Koutsoumanis et al., 2003 que logro crecimientos de *Salmonella Typhimurium* en medio de cultivo TSB a 15°C a valores mínimos de pH de 4,24.

El efecto inhibitor de los ácidos orgánicos ha sido ampliamente reportado causado por su forma no disociada ($\text{pH} < \text{pK}_a$). De esta forma serán más hidrófobos y podrán atravesar las membranas celulares bacterianas. El pH en el interior de la célula (pH_i) ronda la neutralidad, lo que producirá su disociación liberando protones y causando daños en la célula, como la desnaturalización de proteínas, la inactivación de enzimas o la activación de la bomba de protones que para expulsar el exceso de protones en el medio interno necesitara ATP dejando a la célula sin energía (McLaggan et al., 1998).

En la Figura 8 se encuentran los histogramas de las muestras inoculadas en el medio de ensayo con pH 6. En el histograma del control (figura 8A) se puede observar que los recuentos varían entre 7,61 y 5,60 log UFC/mL esto se debe, del mismo modo que para el medio de ensayo a pH 4,5; al efecto que la propia matriz tiene sobre las cepas, la mayoría se adapta bien a la misma, pero hay algunas que tienen problemas en su adaptación.

En los histogramas del día 0 y día 1, (figuras 8B y 8C respectivamente) se observa, como ya ocurrió para el medio de ensayo a pH 4,5; que la concentración de bacterias en la mayoría de las muestras se encontró por debajo del límite de detección de la técnica (90% de las muestras a día 0 y 87% de las muestras a día 1) pero a diferencia de lo que ocurre en el medio de ensayo con pH 4,5; gran parte de estas bacterias han sufrido un daño subletal y con el paso del tiempo serán capaces de recuperarse y proliferar.

En el histograma del día 7 (figura 8D) se observa una gran variabilidad en los resultados, obteniendo recuentos en el 92% de las muestras que oscilan entre 2,48 y 8,95 log UFC/mL. Esto indica que la mayoría de las bacterias pudieron adaptarse al medio y empezaron a crecer.

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

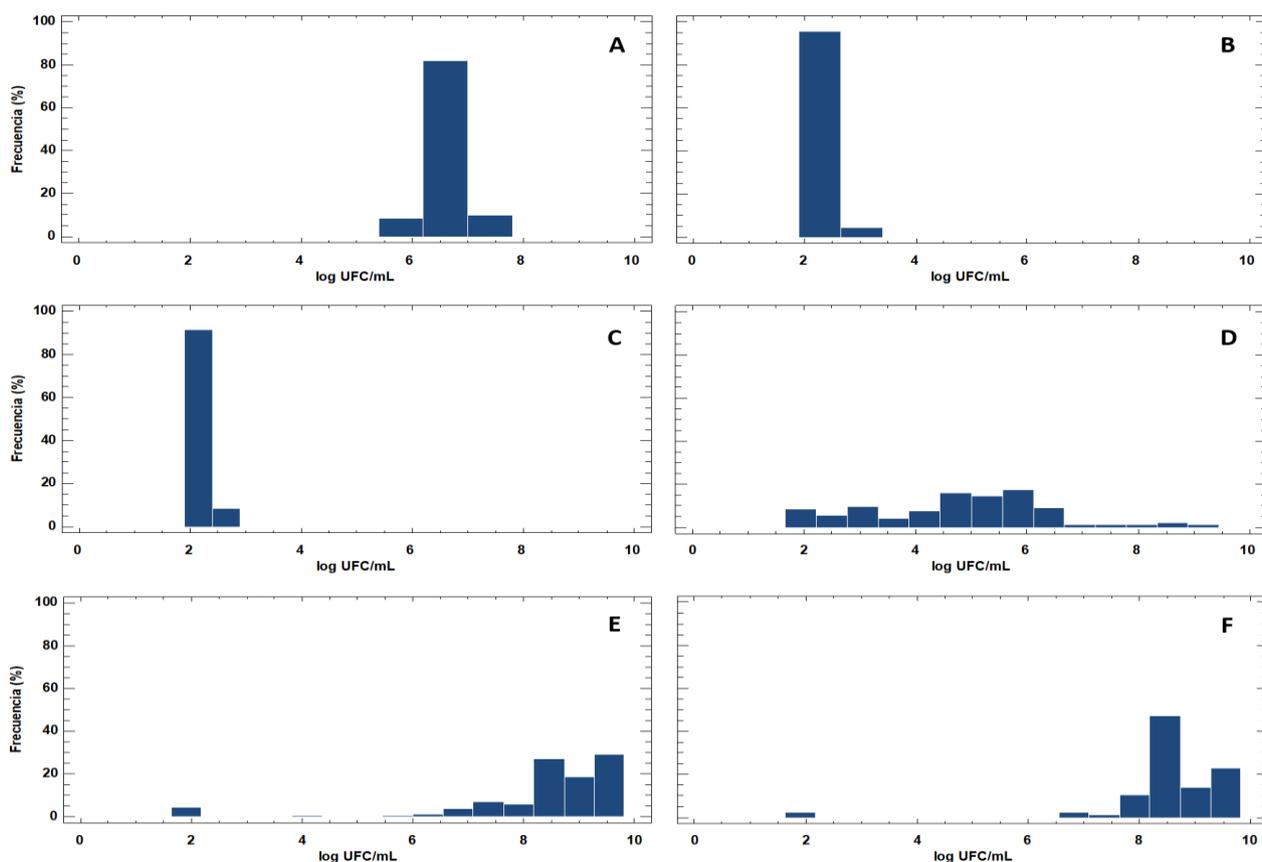


Figura 8. Histogramas de frecuencia de las muestras analizadas a pH 6 a 500 MPa durante 1 minuto en el control (A), a día 0 (B), a día 1 (C), a día 7 (D), a día 14 (E) y a día 21 (F).

En los histogramas del día 14 y día 21, (figuras 8E y 8F respectivamente) se sigue observando la adaptación al medio y el crecimiento de la mayoría de las cepas. Se contabilizan recuentos para el 96 y 98% de las muestras (para el día 14 y día 21 respectivamente) cuyos recuentos oscilan entre 3,85 y 9,90 log UFC/mL a día 14 y entre 7,00 y 10,69 log UFC/mL a día 21. También se observa una pequeña parte de las muestras que aún se encuentran por debajo del límite de detección, se trataría de las muestras más susceptibles al tratamiento de HPP.

Hay que destacar las similitudes en los resultados del estudio respecto a otros con tratamientos similares como Whitney et al., 2007 que inocularon diferentes serovares de *Salmonella* spp. en TSB y las sometieron a un tratamiento de HPP de 550 MPa durante 2 minutos a 6°C, obteniendo inactivaciones 24 horas después que oscilaban entre 3,29 y 5,45 log UFC/mL. Estas inactivaciones son prácticamente iguales a las obtenidas en este estudio que oscilaron entre 3,30 y 5,51 log UFC/mL. En otros estudios donde

inocularon 8 log UFC/mL (en nuestro caso fueron 7 UFC/mL) de diferentes serovares de *Salmonella* spp. en TSB y se sometieron a un tratamiento por HPP de 450 y 550 MPa durante 2 minutos, obteniendo inactivaciones máximas 24 horas después de 5,74 y 7,09 log UFC/mL respectivamente (Maitland et al., 2011), frente a las 5,51 log UFC/mL obtenidas en este estudio.

4.2. Análisis de componentes principales (PCA)

Esta técnica estadística consiste en la realización de un análisis multivariante que se aplica sobre variables del proceso para agrupar los elementos que constituyen un sistema en función de su grado de similitud.

Para este análisis se utilizaron los datos obtenidos en los recuentos de las células viables (log UFC/mL) y de la evaluación del daño subletal (diferencia entre los recuentos obtenidos en TSAYE y los recuentos obtenidos en TSAYE+3 % NaCl) para los análisis a día 0, 1, 7, 14 y 21 en el medio a pH 4,5 y 6, sumando un total de 20 variables que permitirán agrupar a las cepas de *Salmonella* spp. en distintos grupos según su grado de similitud

Las componentes principales serán una combinación lineal de las variables originales no correlacionadas entre sí que busquen restituir la máxima cantidad de información posible contenida en las variables originales en un número mínimo de componentes. En este caso las componentes 1 y 2 explicaron la mayor parte de la variabilidad del sistema.

En la Figura 9 se representan las cepas en el gráfico de puntuaciones (o scores) de las componentes 1 y 2. Además se representan los pesos (o loadings) de las variables.

Se comprueba que las variables a día 0 y día 1 a pH 4,5 y pH 6 para los recuentos de células viables (d0_4,5, d1_4,5, d0_6 y d1_6) y la evaluación del daño subletal (d0_4,5_S, d1_4,5_S, d0_6_S y d1_6_S) no aparecen representadas en las figuras 9 y 10, tampoco lo están para pH 4,5 los recuentos de células viables a día 7 y 14 (d7_4,5 y d14_4,5) y la evaluación del daño subletal a día 7, 14 y 21 (d7_4,5_S, d14_4,5_S y d21_4,5_S). Esto se debe a que estas variables explican poca variabilidad en el comportamiento de las cepas por lo que no tienen peso relevante en la formación de ninguna de las dos componentes.

La distribución de las cepas en el plano definido por las dos primeras componentes permite diferenciar cuatro grupos diferentes de cepas (figura 10)

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

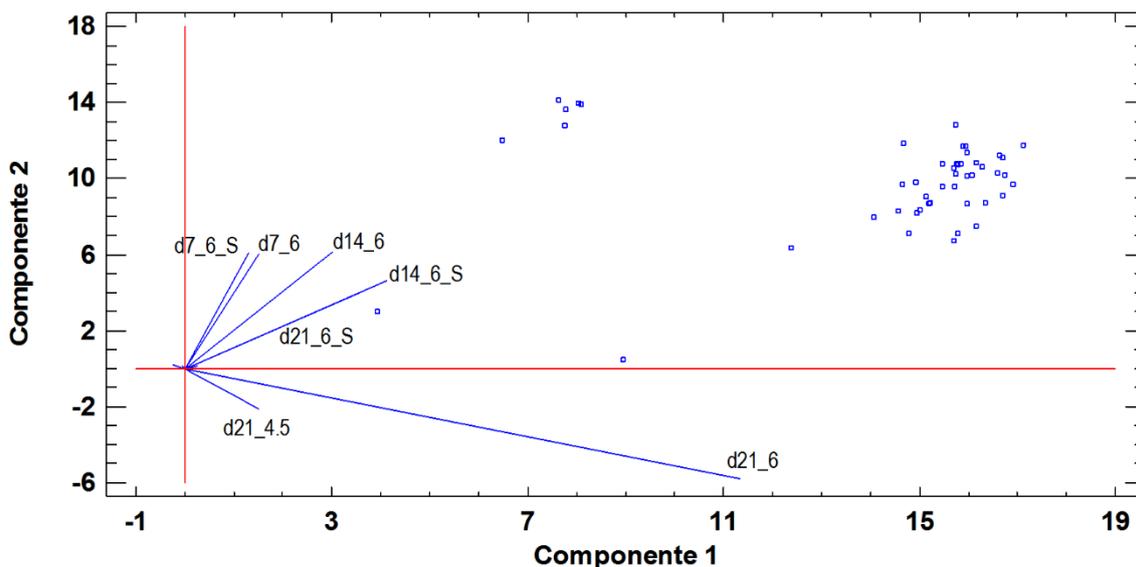


Figura 9. Gráfico de puntuaciones de las cepas en las componentes 1 y 2. Puntos azules – puntuaciones de las cepas; Líneas rojas – ejes de coordenadas; Líneas azules – pesos de las variables. (d7_6_S, d14_6_S, d21_6_S, variables de daño subletal a días 7, 14 y 21 a pH 6 respectivamente; d7_6, d14_6, d21_6, variables de recuentos a día 7, 14 y 21 a pH 6 respectivamente; d21_4.5, variable de recuento a día 21 a pH 4,5).

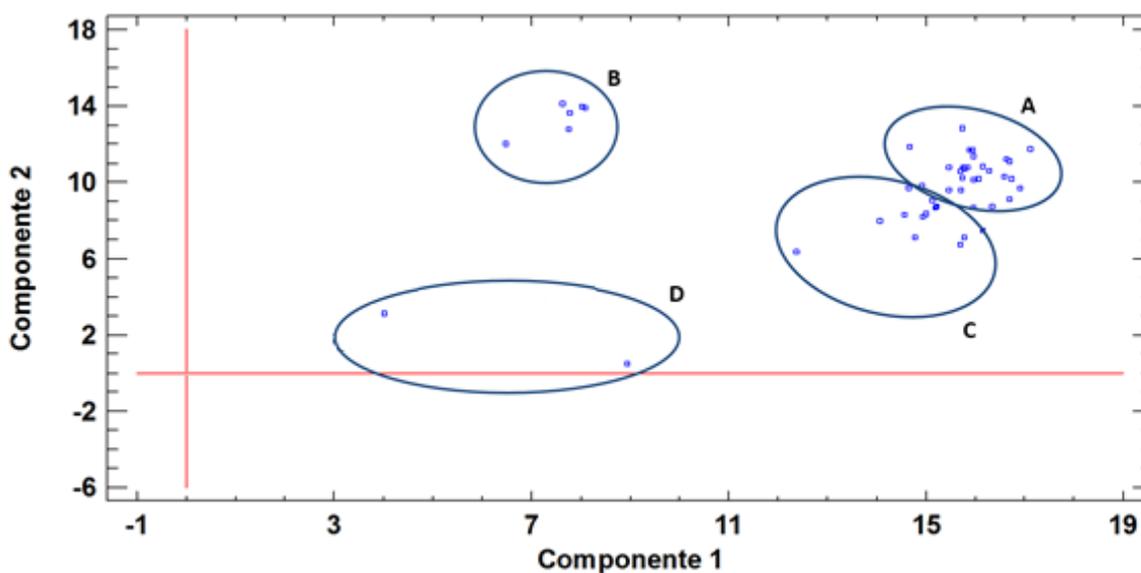


Figura 10. Grupos de cepas según su distribución en el análisis de componentes principales.

Las variables a pH 6 a día 7, 14 y 21 para los recuentos (d7_6, d14_6 y d21_6) y para el daño subletal (d7_6_S, d14_6_S, d21_6_S) junto con la variable a pH 4,5 a día 21 para los recuentos (d21_4.5), son las que más peso tienen en la construcción de las componentes.

La variable del recuento a pH 6 a día 21 es la que más peso tiene en la componente 1 (figura 9). Por tanto las cepas que se encuentren más a la derecha en el eje de abscisas serán las que se obtuvieron mayores recuentos a día 21 en el medio de ensayo con pH 6 y las que se encuentren más cerca del eje de coordenadas serán las que obtuvieron un menor recuento

Por otro lado, la componente 2 explica la variabilidad entre las muestras para los recuentos de células viables y la evaluación del daño subletal para los diferentes días de análisis (figura 9), encontrándose pesos similares para los recuentos a pH 6 de los días 7 y 14 (d7_6 y d14_6) y para el daño subletal a pH 6 de los días 7, 14 y 21 (d7_6_S, d14_6_S y d21_6_S). Esto quiere decir que las cepas que se encuentren más arriba en el eje de ordenadas serán aquellas que hayan obtenido los recuentos más altos y el menor daño subletal para los análisis señalados.

Según lo expuesto anteriormente, se puede decir que las cepas más interesantes son aquellas que se encuentran más a la derecha en el eje de abscisas y más arriba en el eje de ordenadas en el plano, pues pudieron adaptarse mejor frente a un mayor número de variables.

4.3. Análisis descriptivo. Análisis de agrupamientos (Cluster)

Para el análisis “cluster” se ha utilizado la misma matriz de datos que para el análisis de componentes principales. Este método multivariante trata de agrupar los objetos de una tabla en función de su similitud. Para la elaboración de este trabajo se ha utilizado la distancia euclídea entre los objetos y se ha realizado el agrupamiento mediante el método de Ward construyendo un dendograma.

En la Figura 11 se puede ver la representación gráfica de este análisis, el dendograma. En el mismo, se puede observar que hay 4 grupos diferenciados. Las cepas que se encuentran en un mismo grupo tuvieron un comportamiento similar teniendo en cuenta todas las variables en conjunto. Dentro de cada grupo, las cepas que se encuentran a la misma distancia (eje x) se comportaron de forma similar. Cuanta mayor sea la distancia, más diferente el comportamiento entre sí.

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

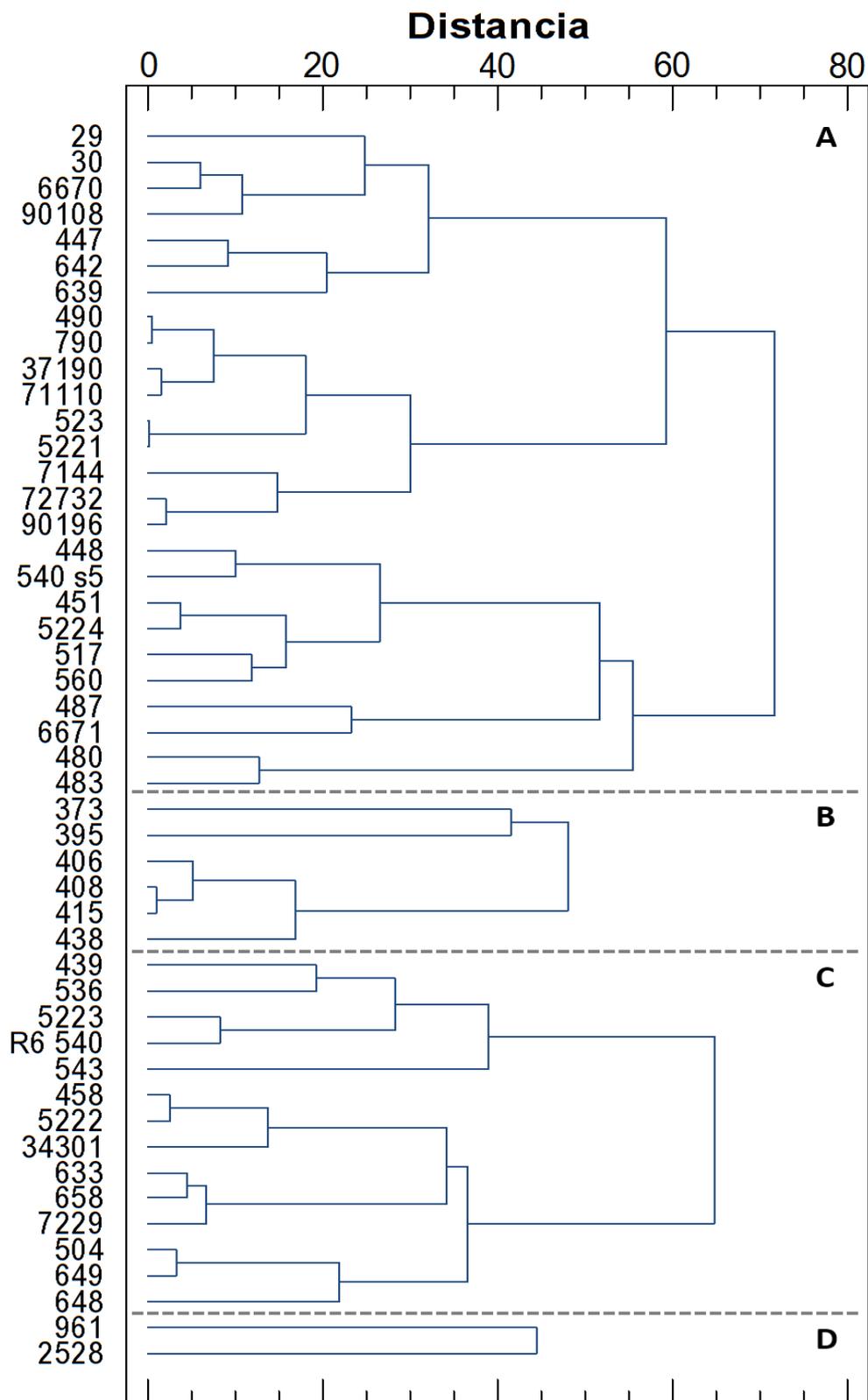


Figura 11. Dendrograma. Eje de ordenadas - Código de referencia para cada cepa; Eje de abscisas - Distancia en el comportamiento de cada cepa. Letras A, B, C y D hacen referencia al grupo en el que se engloban las cepas.

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

Contrastando los resultados del análisis de componentes principales, los resultados de los análisis microbiológicos realizados y la organización de las cepas en el dendograma se puede observar que las cepas más débiles son las del grupo D, seguidas de las del grupo B. Las cepas de grupo C y A tienen una resistencia similar, si bien analizando los datos de los análisis microbiológicos se comprueba que las cepas del grupo A han tenido una mejor adaptación al medio y han sufrido un menor daño subletal.

4.4. Selección de cepas con potencial para ser utilizadas en estudios de validación de procesos de HPP

Una vez que se ha comprobado que el grupo A es el más resistente es interesante estudiar el comportamiento de los subclústeres que se pueden encontrar en ese clúster (figura 12) para identificar las características que los hacen diferentes

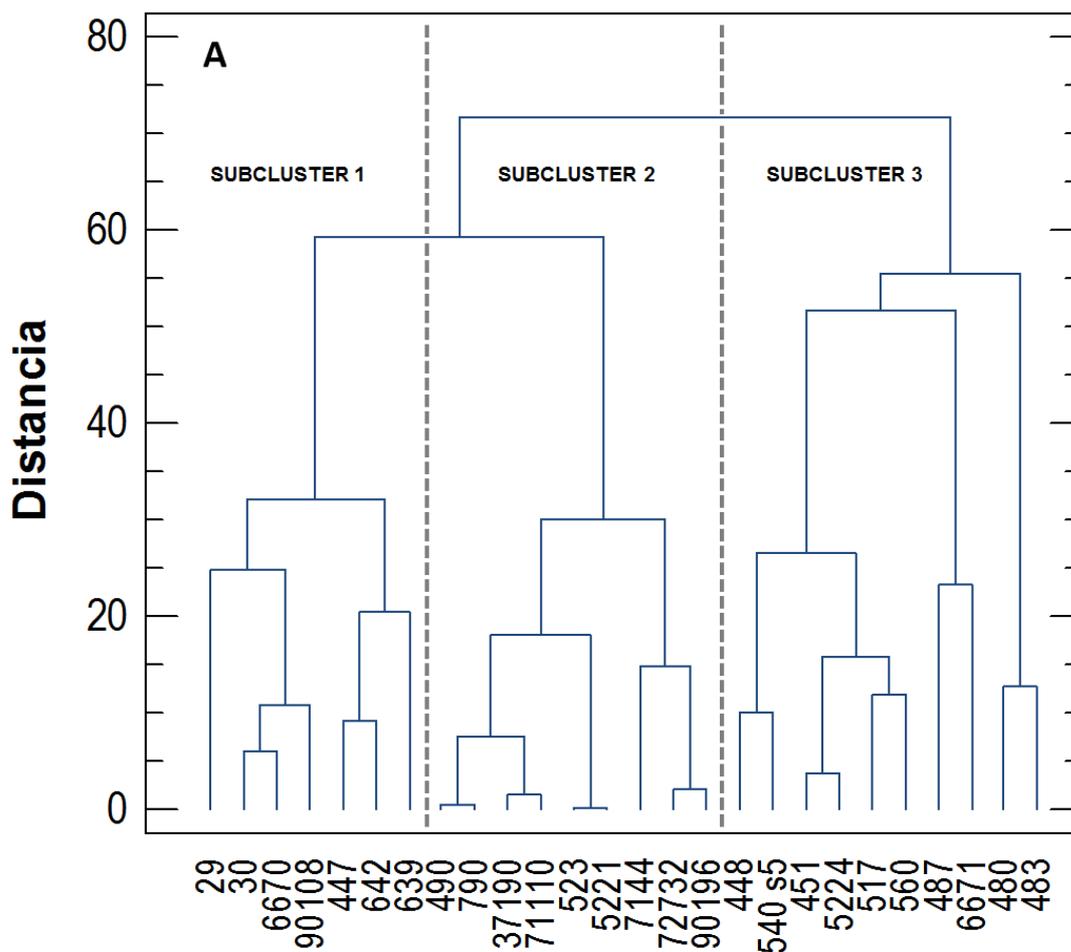


Figura 12. División por subclústeres del grupo A en el dendograma.

Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación por Altas Presiones Hidrostáticas

Revisando los análisis microbiológicos de cada subcluster y de acuerdo al análisis de componentes principales, se podría seleccionar como las cepas más resistentes las del subcluster 2. Estas cepas son las que se encuentran más alejadas de los ejes de coordenadas en el análisis de componentes principales y según los análisis microbiológicos habría que destacar sus recuentos de células viables para el día 14, que está entre las más abundantes, lo cual indicaría la rápida capacidad de adaptación al medio que tienen estas cepas y la evaluación del daño subletal para los días 7, 14 y 21 ya que son las que menos daño subletal han sufrido. Por lo que las cepas con mayor potencial para ser utilizadas en estudios de validación de procesos de HPP serían:

Tabla 2. Descripción de las cepas de *Salmonella* spp. con potencial para ser utilizadas en estudios de validación de procesos de HPP.

Código	Serovar	Origen	Procedencia
FSL S5-490	Worthington	Humano	ILSI
FSL S5-523	Thompson	Humano	ILSI
FSL R8-5221	Tennessee	Humano	ILSI
790	Typhimurium	Humano	HUBU
7144	Enteritidis	Humano	HUBU
37190	Enteritidis	Humano	HUBU
71110	Typhimurium	Humano	HUBU
72732	Enteritidis	Humano	HUBU
90196	Enteritidis	Humano	HUBU

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones establecidas a partir del análisis de los resultados anteriores son:

1. Existe gran variabilidad entre las cepas de *Salmonella* spp. respecto a su inactivación por altas presiones. En función de los distintos recuentos obtenidos y la evaluación del daño subletal frente a un mismo tratamiento fue posible clasificar a las cepas en grupos.
2. Inmediatamente después del tratamiento de HPP, e independientemente del pH del medio, la concentración de *Salmonella* spp. se situó por debajo del límite de detección de 100 UFC/mL para prácticamente todas las cepas. Con el paso del tiempo en el medio de ensayo con pH 4,5 la mayoría no fueron capaces de recuperarse mientras que en el medio de ensayo con pH 6 si lo hicieron.

3. Para seleccionar las cepas con mayor potencial para ser utilizadas en estudios de validación de procesos de HPP es necesario estudiar además de la inactivación tras el tratamiento, su capacidad de recuperación y de adaptación a la matriz donde se encuentra.
4. Las cepas FSL S5-490, FSL S5-523, FSL R8-5221, 790, 7144, 37190, 71110, 72732 y 90196 destacan como las más idóneas para ser utilizadas en estudios de validación de procesos de HPP por mostrar una rápida capacidad de adaptación al medio y un daño subletal bajo.
5. La eficacia de la tecnología de HPP dependerá de la variabilidad intra-especie y de la matriz del alimento por lo que se deben realizar estudios previos de los patógenos para sentar las bases y criterios para el diseño de cócteles que se utilicen en estudios de validación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C. P., & Ray, B. (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied and environmental microbiology*, 65(9), 4248-51.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A., & López, M. (2010). Acid tolerance in *Salmonella typhimurium* induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *Food Microbiology*, 27(1), 44-49.
- Andrés, V., Villanueva, M.J. & Tenorio M.D. (2015). Influence of high pressure processing on microbial shelf life, sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content of milk- and soy-smoothies. *Food Science and Technology*, 65, 98–105.
- Bayindirli, A., Alpas, H., Bozoglu, F., & Hizal, M. (2006). Efficiency of high-pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control*, 17(1), 52-58.
- Benito, A., Ventoura, G., Robinson, T., & Mackey, B. (1999). Variation in resistance of natural isolates of *Escherichia coli* O157 to high hydrostatic pressure, mild heat, and other stresses. *Applied and environmental microbiology*, 65(4), 1564-9.
-

**Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación
por Altas Presiones Hidrostáticas**

- Bozoglu, F., Alpas, H., & Kaletunç, G. (2004). Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *Immunology and Medical Microbiology*, 40(3), 243-247.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2465-2467.
- Bull, M.K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., Stockman, R, Sellahewa J., Szabo, E.A., Johson R.L. & Stewart, C.M. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 135–149.
- CDC. 2010. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human Typhoid Fever Infections Associated with Frozen Mamey Pulp. Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/2010/frozen-fruit-pulp-8-25-10.html>, Junio 2017.
- Cebrián, G., Mañas, P., & Condón, S. (2016). Comparative Resistance of Bacterial Foodborne Pathogens to Non-thermal. *Technologies for Food Preservation*, 7(May), 1-17.
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., & Pazos-rojas, L. A. (2012). Quantification of cultivable bacteria by the Massive Stamping Drop Plate method. *Colombia Biotecnología*, 14, 147–156.
- Danyluk, M. D., Goodrich-Schneider, R. M., Schneider, K. R., Harris, L. J., & Worobo, R. W. (2012). Outbreaks of Foodborne Disease Associated with Fruit and Vegetable Juices. University of Florida. *IFAS Extension*, 1-7.
- EFSA. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13, 4329. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zoonoses-trends-sources-EU-summary-report-2014.pdf>, Junio 2017.
- Erkmen, O. (2009). High hydrostatic pressure inactivation kinetics of *Salmonella typhimurium*. *High Pressure Research*, 29(1), 129-140.
- Food and Drug administration FDA (2004) Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition; Final Guidance. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm>, Junio 2017.
-

**Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación
por Altas Presiones Hidrostáticas**

- Grimont, P., & Weill, F. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Geneva, Switzerland.
- Hiperbaric. (2016). Comunicación personal de documentación interna de la empresa. Hiperbaric, Calle Condado de Treviño, Polígono industrial Villalonquejar, Burgos, España. Disponible en: <http://www.hiperbaric.com/es/>, Junio 2017.
- Hygreeva, D., & Pandey, M. C. (2016). Novel approaches in improving the quality and safety aspects of processed meat products through high-pressure processing technology, a review. *Trends in Food Science & Technology*, 54, 175-185.
- Ibarra, J. A., & Steele-Mortimer, O. (2009). *Salmonella* - the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular Microbiology*, 11(11), 1579-1586.
- Jain, S., Bidol, S. A., Austin, J. L., Berl, E., Elson, F., Lemaile-Williams, M. Lynch, M. F. (2009). Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium and Saintpaul infections associated with unpasteurized orange juice--United States, 2005. *Clinical infectious diseases*, 48(8), 1065-1071.
- Jofre, A., Aymerich, T., Bover-Cid, S., & Garriga, M. (2010). Inactivation and recovery of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* after high hydrostatic pressure treatments up to 900 MPa. *International Microbiology*, 13(3), 105-112.
- Koseki, S. & Yamamoto, K. (2006). Recovery of *Escherichia coli* ATCC 25922 in phosphate buffered saline after treatment with high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 108–111.
- Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2004). Modeling the boundaries of growth of *Salmonella* Typhimurium in broth as a function of temperature, water activity, and pH. *Journal of Food Protection*, 67(1), 53-9.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2002). Alternative food-preservation technologies: Efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4(4), 433-440.
- Maitland, J. E., Boyer, R. R., Eifert, J. D., & Williams, R. C. (2011). High hydrostatic pressure processing reduces *Salmonella enterica* serovars in diced and whole tomatoes. *International Journal of Food Microbiology*, 149(2), 113-117.

- Marder E.P., Cieslak P.R., Cronquist A.B. (2017) Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance, 10 U.S. Sites, 2013–2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2017, 66:397–403.
- McArdle, R. A., Marcos, B., Mullen, A. M., & Kerry, J. P. (2013). Influence of HPP conditions on selected lamb quality attributes and their stability during chilled storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 66-72.
- McLaggan, D., Stephen, J., & Booth, I. R. (1998). Chapter 5 Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Principles of Medical Biology*, 9(C), 65-77.
- Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*, 56(2-3), 181-188.
- Mollet, B., & Rowland, I. (2002). Functional foods: At the frontier between food and pharma. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(5), 483-485.
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Samson, C. T., Welte-Chanes, J., & Torres, J. A. (2011). High-Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 969.
- Muñoz-Cuevas, M., Guevara, L., Aznar, A., Martínez, A., Periago, P.M. & Fernández, P.S. (2013). Characterization of the resistance and the growth variability of *Listeria monocytogenes* after high hydrostatic pressure treatments. *Food Control*, 29, 409–415.
- Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjana & Knorr, K. (2007). Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods. *Food Science and Nutrition*, 1040- 8398 1457-7852.
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., & Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *Food Science and Technology*, 44(5), 1251-1260.
- Russell, N.J. (2002). Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 27-34.

**Variabilidad en la respuesta de *Salmonella* spp. frente a su inactivación
por Altas Presiones Hidrostáticas**

- Shi, C., Singh, P., Ranieri, M. L., Wiedmann, M., & Switt, I. M. (2015). Molecular methods for serovar determination of *Salmonella*. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(3), 309-325.
- Siró, I., Kapolna, E., Kapolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51(3), 456-467.
- Smelt, J. P. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 152-158.
- Torres, J. A., Chotyakul, N., Velazquez, G., Saraiva, J. A., & Perez Lamela, C. (2010). Integration of statistics and food process engineering: Assessing the uncertainty of thermal processing and shelf-life estimations. Logroño, La Rioja, España: *VI Congreso Español de Ingeniería de Alimentos*.
- Van Opstal I., Vanmuysen S. C., Wuytack E. Y., Masschalck B., y Michiels C. W. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure at different temperatures in buffer and carrot juice. *International Journal Food Microbiology*, vol. 98, no. 2, pp. 179–191.
- Wang, C. Y., Hsu, C. P., Huang, H. W., & Yang, B. B. (2013). The relationship between inactivation and morphological damage of *Salmonella enterica* treated by high hydrostatic pressure. *Food Research International*, 54(2), 1482-1487.
- Welti-Chanes, J., Ochoa-Velasco, C. E., & Guerrero-Beltran, J. A. (2009). High-pressure homogenization of orange juice to inactivate pectinmethylesterase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 457-462.
- Whitney, B. M., Williams, R. C., Eifert, J., & Marcy, J. (2007). High-pressure resistance variation of *Escherichia coli* O157:H7 strains and *Salmonella* serovars in tryptic soy broth, distilled water, and fruit juice. *Journal of food protection*, 70(9), 2078-83.
- Wuytack, E. Y., Phuong, D. T., Aertsen, A., Reyns, M. F., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Michiels, C. W. (2003). Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by heat and by different nonthermal treatments. *Journal of food protection*, 66(1), 31-7.