

## Resistencia térmica de *Salmonella*. Efecto del pH y la actividad del agua

Lound, L.; Aleu, H.; Broggi, L.; Genaro, V.; Tesouro, R.; Favre, L.; Plem, S.; Tofolón, E.

AUTORES: Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos, Gualeguaychú. (Entre Ríos, Argentina)

CONTACTO: [lilianalound@fb.uner.edu.ar](mailto:lilianalound@fb.uner.edu.ar)

### Resumen

En este trabajo se determinaron las cinéticas de inhibición por pH 3.5 en ácido acético y las de muerte térmica en caldo nutritivo y en albúmina de huevo deshidratada a 72, 77 y 82 °C de tres serotipos de *Salmonella enterica*: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Montevideo* con la finalidad de evaluar el efecto del pH y la temperatura. Se encontró que *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* presentaron mayor capacidad de supervivencia a pH 3.5 y mayor resistencia térmica que *S. Montevideo*. Las curvas de supervivencia obtenidas para *Salmonella* spp. a pH 3.5 en ácido acético, en caldo nutritivo y en albúmina de huevo deshidratada se ajustaron a una cinética de inactivación de primer orden por lo que los valores D, tiempo necesario para reducir a la décima parte la población microbiana, resultaron parámetros adecuados para comparar la resistencia que exhibieron las células en las distintas matrices y a las diferentes temperaturas. Estos resultados son importantes en el campo de la tecnología de alimentos y la seguridad alimentaria, dado que aportan tiempos y temperaturas de muerte para *Salmonella*.

**Palabras clave:** *Salmonella*; resistencia térmica; ácido resistencia

### Summary

In this work the kinetics of inhibition by pH 3.5 in acetic acid and the thermal death in nutrient broth and dried egg albumin at 72, 77 and 82 °C for three serotypes of *Salmonella enterica* were identified: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and *S. Montevideo* in order to evaluate the effect of pH and temperature. We found that *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* had higher survivability at pH 3.5 and higher thermal resistance than *S. Montevideo*. The survival curves obtained for *Salmonella* spp. at pH 3.5 in acetic acid, in nutrient broth and albumin dried egg were adjusted to inactivation kinetics of the first order so that the values D, time required to reduce one-tenth the microbial population, were adequate parameters to compare the cells exhibited resistance to the various matrices and different temperatures.

These results are important in the field of food technology and food security, as they inform about times and temperatures of *Salmonella* thermal death.

**Keywords:** *Salmonella*; thermal resistance; acid resistance

## Introducción

La albúmina de huevo deshidratada es el producto obtenido de la clara de huevo, separada mecánicamente de la yema y la cáscara, con eliminación del contenido de agua, con o sin el agregado de aditivos autorizados y pasteurizada a 55°C durante 7 días ininterrumpidos o hasta la eliminación de microorganismos patógenos una compleja mezcla de proteínas que contiene todos los aminoácidos esenciales. Es utilizada como suplemento alimenticio, por sí sola o mezclada con otros componentes. La industria de productos de huevo elabora, según la temperatura de pasteurización que utilice, productos con propiedades de batido con tratamientos térmicos entre 70 y 75°C, y con capacidad de formar geles firmes cuando la temperatura aplicada es de 80-85°C.

La optimización de los tratamientos térmicos requiere disponer de datos precisos del grado y biovariabilidad de la resistencia al calor de los microorganismos, teniendo en cuenta también las posibles respuestas de adaptación que pueden desarrollar cuando han sido sometidos a condiciones adversas.

*Salmonella* tiene la capacidad de sobrevivir y adaptarse a condiciones extremas tales como la disminución en los niveles de nutrientes, desecación y un amplio espectro de temperaturas y valores de pH.

La respuesta adaptativa frente a la acidez ha sido ampliamente estudiada en *S. Typhimurium*, probablemente debido al buen conocimiento de su genoma y a la capacidad que poseen de sobrevivir en un amplio rango de condiciones de estrés ácido. También se ha descrito para otras serovariedades, como *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Gaminara*, *S. Michigan*, *S. Montevideo*, *S. Poona* y *S. Senftenberg* (Alvarez., 2009).

En un estudio Berk *et al.* (2005), demostraron que el uso de ácidos orgánicos para la descontaminación de los alimentos para aves que puede dar lugar a la selección de cepas tolerantes a ácido que tienen más probabilidades de sobrevivir en el medio ambiente y también a la acidez gástrica estomacal en los seres humanos, así como para desarrollar la tolerancia a otros factores de estrés tales como el calor, la ósmosis y sales.

Se ha demostrado que la resistencia bacteriana a condiciones ácidas extremas se ve incrementada cuando se utilizan matrices alimentarias, especialmente, medios con un alto contenido graso o proteico, habiéndose descrito que los brotes de salmonelosis en los que se encuentra una baja dosis infectiva están a menudo asociados con el consumo de alimentos con un elevado contenido en grasa, como chocolate y queso, o un elevado contenido proteico, como carne picada o clara de huevo (Waterman y Small, 1998).

Varios autores han relacionado la resistencia térmica con la resistencia ácida en algunas serovariedades de *Salmonella* (Humphrey *et al.*, 1995; Doyle y Mazzotta, 2000) que presentan aumento en la capacidad de sobrevivencia en las condiciones estomacales aumentando sus posibilidades de producir infección en los seres humanos (Berk *et al.*, 2005, Da Silva, 2007, Koyuncu *et al.*, 2013).

Por otra parte, la baja actividad de agua ( $a_w$ ) de la albúmina de huevo deshidratada es una barrera para el crecimiento de *Salmonella*. En general se considera que las bacterias patógenas no crecen por debajo de un valor de actividad de agua de 0,85 y que *Salmonella* no sustenta crecimiento en alimentos con  $a_w \leq 0,93$  (Doyle *et al.*, 2001), sin embargo puede rápidamente adaptarse a condiciones extremas tales como la desecación (Podolak, 2010).

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la supervivencia de *Salmonella* en alimentos secos. Recientemente, en dos estudios, que investigaron los cambios transcriptómicos durante las primeras etapas de la desecación en *Salmonella* (Li *et al.*, 2012; Finn *et al.*, 2013), encontraron un aumento en la expresión de genes que codifican transportadores de membrana que permiten a las células incorporar sustancias osmoprotectoras del medio. También se ha demostrado la expresión de

genes que codifican para porinas de la membrana externa, responsables de la difusión pasiva de estas sustancias.

Finn *et al.*, (2013) demostraron que la biosíntesis del soluto compatible, trehalosa, demostró ser importante en la adaptación osmótica de *Salmonella*. La trehalosa es producida por la condensación enzimática de la glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa. En este proceso intervienen las enzimas trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa que son dependientes de un factor sigma alternativo.

Deng *et al.*, (2012) realizaron un estudio que proporcionó una visión inicial sobre los mecanismos empleados para la supervivencia *S. Enteritidis* cuando esta bacteria se cultivó en aceite de maní ( $a_w = 0,30$ ) se encontró que <5% del genoma de esta bacteria se transcribió en comparación con el 78% que lo hizo cuando la bacteria desarrolló en caldo nutritivo. Estos investigadores también observaron un aumento en la degradación del ARN ribosomal e infirieron que puede servir como fuente de nutrientes para las bacterias estresadas.

Se ha descrito también la habilidad de las salmonellas para cambiar a un estado viable pero no cultivable (VBNC), que representa un estado latente de las células vegetativas y una estrategia de supervivencia para muchas especies bacterianas no esporuladas (Lesne *et al.*, 2000) ya que pueden retornar a su estado normal cuando las condiciones se tornan favorables.

Otros investigadores han planteado la formación de formas filamentosas. Kieboom *et al.*, (2006) mostraron que al reducir la actividad de agua se afectaba la morfología de las células de *Salmonella Enteritidis* que se elongaban y formaban filamentos cuando se incubaban en medios con  $a_w$  de 0,94-0,95 a 25°C por 6 días. Finalmente también se ha sugerido, en *S. Typhimurium*, la activación de genes, como el  $\sigma^E$  o vías  $\sigma^S$ , factores sigma alternativos que controlan regulones específicos y que se activan en condiciones de estrés osmótico (Mc Meechan *et al.*, 2007).

Con respecto a la temperatura se conoce que el género *Salmonella* está integrado por microorganismos resistentes que se adaptan fácilmente a las condiciones extremas del medio. Crecen activamente en un amplio rango de temperatura entre 5,5 y 45 °C y también exhiben propiedades psicrótroficas, según se refleja en la capacidad de crecer en alimentos almacenados a temperaturas comprendidas entre 2 y 4 °C.

Si bien el rango de crecimiento de *Salmonella* se sitúa entre 5,5 y 45 °C, la temperatura en la cual se produce la muerte bacteriana depende de la cepa, de su fase de crecimiento, de la composición del alimento o medio de prueba, de otros limitantes físicos como la  $a_w$  y de la presencia de flora competitiva (Garibaldi *et al.*, 1969). El incremento de sólidos, bajo pH y disminución de la humedad incrementan la resistencia térmica en los alimentos (Doyle y Mazzotta, 2000).

Ciertos serotipos de *Salmonella* son notoriamente resistentes a tratamientos térmicos, el más prominente que se ha reportado es *Salmonella* Senftenberg 775W. Si bien este organismo no es un importante patógeno alimentario, es usado como organismo control (Garibaldi *et al.*, 1969).

Se debe enfatizar, también, que hay estudios que refieren que *Salmonella* presente en huevos deshidratados son extremadamente resistentes a los efectos destructivos del calor con valores D comúnmente medidos en días más que en minutos (Doyle y Mazzotta, 2000). En la mayoría de los experimentos con huevos, *Salmonella Enteritidis* ha sido más resistente al calor que *Salmonella Typhimurium*, pero no se han obtenido los mismos resultados en medios de cultivo. Estos estudios también indican que las más resistentes han expresado mayor cantidad de proteínas de choque térmico (Shah *et al.*, 1991).

Estas proteínas denominadas con su acrónimo en inglés HSPs, en su mayoría chaperonas y proteasas (GroEL, DnaK, DnaJ, GrpE, recA, entre otras), cuya síntesis se encuentra regulada por el factor alternativo  $\sigma^S$  y otros reguladores transcripcionales, son sintetizadas por estas bacterias para colaborar en el plegamiento, ensamblaje y transporte proteico, así como en la degradación y eliminación de proteínas desnaturalizadas por calor. Sin embargo, el estrés térmico no es el único agente inductor de la síntesis de HSPs, sino que otras condiciones adversas, como bajas temperaturas, irradiación,

cambios en la presión osmótica, estrés ácido y estrés oxidativo, incrementan la expresión de varias HSPs, hecho que podría constituir la base de las respuestas bacterianas de protección frente al calor (Alvarez, 2009).

No se conocen estudios sobre la temperatura máxima de crecimiento de *Salmonella* en los alimentos, pero se ha informado que la exposición prolongada de cepas mesófilas de *S. Typhimurium* a condiciones de estrés térmico se traduce en mutantes capaces de crecer a 54°C. Aunque no se ha esclarecido el mecanismo de este fenómeno, los hallazgos preliminares indican que dos mutaciones independientes son las que permiten a esta bacteria crecer activamente a 48°C y a 54°C (Doyle *et al.*, 2001).

Las condiciones de crecimiento también afectan su resistencia al calor. Las células en fase de desarrollo exponencial son mucho más susceptibles al calor que en fase estacionaria (Humphrey *et al.*, 1993).

Es notable la capacidad de *Salmonella* para adquirir mayor termorresistencia en condiciones subletales. Este fenómeno resulta de una adaptación rápida de este organismo a las temperaturas que se elevan en el microambiente hasta un nivel de tolerancia aumentada muy diferente del descrito en las curvas convencionales de tiempo-temperatura. Esta respuesta adaptativa posiblemente tenga implicancias graves con respecto a la seguridad de los tratamientos térmicos que exponen o mantienen los productos alimenticios a temperaturas marginalmente letales (Doyle *et al.*, 2001). Esta situación podría ocurrir en el secado por atomización de la albúmina de huevo.

La tolerancia al calor de *Salmonella* se cree que está estrechamente relacionada con el contenido de agua dentro de la célula. Hiramatsu *et al.*, (2005) han planteado como hipótesis que en un organismo viable, el calor induce una vibración intensa de las moléculas de agua, provocando la rotura de puentes disulfuro e hidrógeno de las proteínas intracelulares. Sin embargo, en una bacteria deshidratada, este fenómeno puede ser limitado sustancialmente debido a la disponibilidad de agua. Estos autores han propuesto que la falta de agua impide la vibración, que a su vez protege a las proteínas celulares de la desnaturalización a temperaturas elevadas. Por otra parte, Gruzhev *et al.*, (2011) demostraron que la desecación de células de *Salmonella* induce mayor resistencia térmica y tolerancia a otros factores de estrés.

La combinación de falta de agua disponible y la aplicación de calor en la albúmina de huevo pueden proporcionar una óptima combinación de condiciones para producir *Salmonella* térmicamente resistentes.

Para verificar la termorresistencia, el Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (USDA-FSIS, 1999), recomienda el uso de un cóctel o una combinación de serotipos de *Salmonella* que exhiban resistencia al calor relativamente alta y hayan estado implicados en brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Smith *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2004).

Dada su alta resistencia térmica *Salmonella* es la bacteria tipo usada como organismo centinela para el establecimiento de los programas de pasteurización de productos de huevo procesados (Ponce *et al.*, 1999, Azanza y Rustia, 2005).

El objetivo de este trabajo fue estudiar, en seis cepas de *Salmonella* aisladas de huevo, la respuesta de tolerancia a ácido en medio de pH 3.5 con ácido acético y su termorresistencia en caldo nutritivo y albúmina de huevo deshidratada.

## **Materiales y métodos**

### **Cepas**

En este estudio se eligieron 6 cepas, de tres variantes séricas que presentaron mayor ocurrencia en las muestras de huevo estudiadas durante los años 1998-2008 en el Laboratorio de Microbiología de

la Facultad de Bromatología: 2 cepas de *S. Enteritidis*, 2 cepas de *S. Typhimurium* y 2 cepas de *S. Montevideo* que se seleccionaron utilizando los criterios de mayor ocurrencia en las muestras de huevo estudiadas, mayor incidencia en enfermedades transmitidas por los alimentos en Argentina y diferente resistencia a los antibióticos ensayados.

Todas las cepas fueron almacenadas a  $-30^{\circ}\text{C}$  en caldo tripteína soja con el agregado de un 50% (v/v) de glicerol. Para los estudios se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$  en agar tripteína de soja o se subcultivaron caldo en infusión cerebro corazón (BHI) Britania (Argentina) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, antes de utilizarlas en las experiencias.

## Métodos

### 1. Respuesta de tolerancia al ácido

Para realizar estas determinaciones se evaluó la respuesta de tolerancia al ácido acético pH 3,5. Estas condiciones se establecieron atendiendo lo reportado por Greenacre *et al.* (2003) quienes demostraron que este ácido fue más eficiente en la inducción de la respuesta de tolerancia al ácido en *S. Typhimurium*.

Las células bacterianas se utilizaron en fase estacionaria de crecimiento dado que se ha demostrado que tanto la respuesta adaptativa como la de tolerancia al ácido proporcionan mayor resistencia a la acidez en esta fase que en la logarítmica (Doyle *et al.*, 2001).

Para los estudios de adaptación a ácido, se trabajó con cada uno de los aislamientos puros de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Montevideo* por separado. Los cultivos se inocularon en caldo nutritivo suplementado con 10 g/l de glucosa (CNG). La concentración del inóculo se ajustó a aproximadamente  $8 \log_{10}$  (UFC/ml) utilizando un espectrofotómetro Biochrom Libra S22 UV-Vis, de simple haz (Inglaterra) a una densidad óptica entre 0,5 a 0,6 y a 600 nm.

La incubación se realizó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas en condiciones estáticas. Luego se midió el pH del cultivo y se sembró en la superficie de placas de ATS con 0,6% de extracto de levadura (EL) Britania (Argentina) para evaluar su viabilidad (Gurtler y Kornacki, 2009).

Para los estudios de tolerancia a ácidos orgánicos, las cepas se incubaron en caldo nutritivo (CN) suplementado con ácido acético marca Merck (Argentina) en una concentración de 12,28 moles/l hasta alcanzar un pH de 3,5 por 6 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  (Da Silva *et al.*, 2009).

Para determinar la supervivencia de los cultivos en diferentes tiempos de tratamiento se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de muestra y se realizaron diluciones al décimo en agua peptonada 0,1%. Posteriormente se sembraron 100  $\mu\text{l}$  sobre la superficie de placas de agar ATS con 0,6% de EL por 24-48 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Una vez que el agar presentó desarrollo bacteriano se realizaron subcultivos en Agar verde brillante (AVB) Oxoid (Inglaterra) (Gurtler, 2009) y las colonias morfológicamente compatibles con *Salmonella* se identificaron en agar TSI y agar lisina hierro, Oxoid (Inglaterra).

Cuando la técnica de siembra directa no pudo detectar *Salmonella*, se realizó un enriquecimiento en caldo tripteína de soja adicionado de 0,6% de EL, seguido de un subcultivo en AVB y posterior confirmación de las colonias mediante las pruebas bioquímicas ya mencionadas (*vide supra*).

Cada experimento se llevó a cabo por duplicado.

### 2. Estudios de resistencia térmica

#### 2.1. En caldo nutritivo

Para estudiar la termoresistencia en CN de las 7 cepas seleccionadas, se comenzó con una sola colonia, de cada cepa, desarrollada en ATS que se inoculó, por separado, en CN a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas  $\pm 2$ . Posteriormente estos cultivos se centrifugaron, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron en CN pH 7,4 hasta obtener un valor de densidad óptica situado entre 0,5-0,6 a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Biochrom Libra S22 UV-Vis, de simple haz (Inglaterra).

Se determinó la densidad del inóculo en el caldo realizando diluciones seriadas (1:10) en 9 ml de agua peptonada al 0,1%, y sembrando, por duplicado, 100 µl en la superficie de placas de ATS con 0,6% de EL. Se incubaron a 37°C durante 24 horas y se realizaron los recuentos que se expresaron en UFC/ml.

Simultáneamente se cargaron 50 µl de CN inoculado mediante una jeringa, en tubos capilares estériles, con un extremo sellado (Oteiza *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2010, Gurtler *et al.*, 2013), se selló el otro extremo y se sumergieron totalmente en un termostato de inmersión marca Julabo (Alemania) con estabilidad de temperatura  $\pm 0,01^\circ\text{C}$  a 72-77 y 82°C. En estos estudios se consideró instantáneo el tiempo necesario para alcanzar la misma temperatura en todo el capilar.

A diferentes tiempos de tratamiento, se retiraron dos tubos capilares del baño térmico e inmediatamente se enfriaron con hielo. Los capilares se limpiaron con alcohol etílico 96°, se rompieron asépticamente en un solo extremo y el contenido se introdujo dentro de un tubo de ensayo con 450 µl de agua peptonada al 0,1% y se mezcló exhaustivamente mediante vortex. Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas (1:10) en 4,5 ml de agua peptonada al 0,1%. Se tomaron 100 µl de cada dilución y se sembraron, por duplicado, sobre la superficie de ATS con 0,6% de EL, pues fue el medio de cultivo que mejor recuperó las células bacterianas injuriadas por calor (ver Anexo 1). Se incubó a 37°C durante 24 horas. El crecimiento en ATS se subcultivó a placas de AVB y posteriormente se realizó una confirmación bioquímica utilizando agar TSI y agar lisina hierro.

Los recuentos se expresaron en UFC/ml. El límite de detección fue de  $2 \log_{10}$  UFC/ml. Cuando no se pudo detectar *Salmonella* utilizando la técnica de siembra directa se realizó un enriquecimiento en caldo tripteaína de soja adicionado con 0,6% de EL, seguido de un subcultivo en AVB y posterior confirmación de las colonias por pruebas bioquímicas.

## 2.2. En albúmina de huevo deshidratada

Para los estudios de resistencia térmica en albúmina de huevo deshidratada se utilizó como matriz albúmina con propiedades gelificantes a la que se midió su  $a_w$  con un higrómetro previamente calibrado marca Rotronic (Estados Unidos), modelo Hygrolab 3, con sonda de humedad y sensor de temperatura.

Los estudios de muerte térmica se llevaron a cabo para las 7 cepas seleccionadas. Se comenzó con una colonia, de cada cepa, desarrollada en ATS que se inoculó, por separado, en CN a 37°C por 24 horas  $\pm 2$  horas. Posteriormente estos cultivos se centrifugaron, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron en CN a pH 7,4 hasta obtener un valor de densidad óptica situado entre 0,5-0,6 a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Biochrom Libra S22 UV-Vis, simple haz (Inglaterra).

Se contaminó la albúmina inoculándola mediante dispersión por atomización con *circa* 1 ml de cultivo/g de albúmina de huevo deshidratada. Se secó en estufa a 30°C por 30 minutos, se colocó en bolsa de polietileno estéril y se homogeneizó. Se determinó la densidad del inóculo previa realización de diluciones decimales a partir de 1 g de muestra y sembrando 100 µl de cada dilución sobre la superficie de placas de ATS adicionado con 0,6% de EL. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas y, después de la incubación, se realizaron los recuentos.

Simultáneamente se cargaron, con 25 µg de albúmina contaminada en tubos capilares estériles (Oteiza *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2010), sellados en uno de sus extremos, se selló el otro extremo y se sumergieron totalmente en un termostato de inmersión marca Julabo (Alemania), como se observa en la Figura 23, con estabilidad de temperatura  $\pm 0,01^\circ\text{C}$ .

Este experimento, de tipo isotérmico, se llevó a cabo empleando tres temperaturas de trabajo: 72, 77 y 82°C y se consideró instantáneo el tiempo necesario en alcanzar la misma temperatura en todo el capilar.

A diferentes tiempos de tratamiento, se retiraron dos tubos capilares del baño térmico e inmediatamente se enfriaron con hielo para detener el proceso de calentamiento. Los capilares se limpiaron con alcohol etílico 96°, se rompieron asépticamente en un solo extremo y el contenido se introdujo dentro de

tubos conteniendo 225 µl de agua peptonada al 0,1% (dilución 1:10), realizando una mezcla exhaustiva mediante vortex (Oteiza *et al.*, 2003). Seguidamente, se efectuaron las siguientes diluciones decimales: la dilución 1:100 se realizó tomando 100 µl que se colocaron en 900 µl de agua peptonada al 0,1% y las restantes tomando 500 µl en 4,5 ml de agua peptonada al 0,1%. De cada dilución se tomaron 100 µl y se sembraron, por duplicado, en la superficie de placas conteniendo ATS adicionado de 0,6 % de EL. Se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Las colonias desarrolladas se subcultivaron en placas con AVB y fueron posteriormente identificadas en agar TSI y agar lisina hierro.

Los recuentos se expresaron en  $\log_{10}$  UFC/g. El límite de detección fue de 2  $\log_{10}$  UFC/g. Cuando la técnica de siembra directa no pudo detectar *Salmonella*, se realizó un enriquecimiento en caldo triptéina de soja adicionado con 0,6% de EL, seguido de un repique en placas de AVB y posterior confirmación de las colonias por pruebas bioquímicas.

### 2.3. Evaluación de la cinética de muerte

Las curvas de supervivencia se generaron a partir de la información experimental para cada condición ensayada, por medio de la representación gráfica del logaritmo decimal de la razón entre el número de microorganismos sobrevivientes, N y el número inicial de microorganismos,  $N_0$  ( $\log_{10} (N/N_0)$ ) en función del tiempo de tratamiento (t).

Se utilizó la inversa de la pendiente de la curva de supervivencia para determinar el tiempo de reducción decimal "D", tiempo necesario para destruir el 90% de la población bacteriana.

### 2.4. Gráficas de supervivencia

El ajuste de las curvas de supervivencia a la regresión lineal fue realizado con el Software Origin Pro 8.5 (OriginLab Software Inc. 2009) con un intervalo de confianza del 95%.

### 2.5. Análisis estadístico

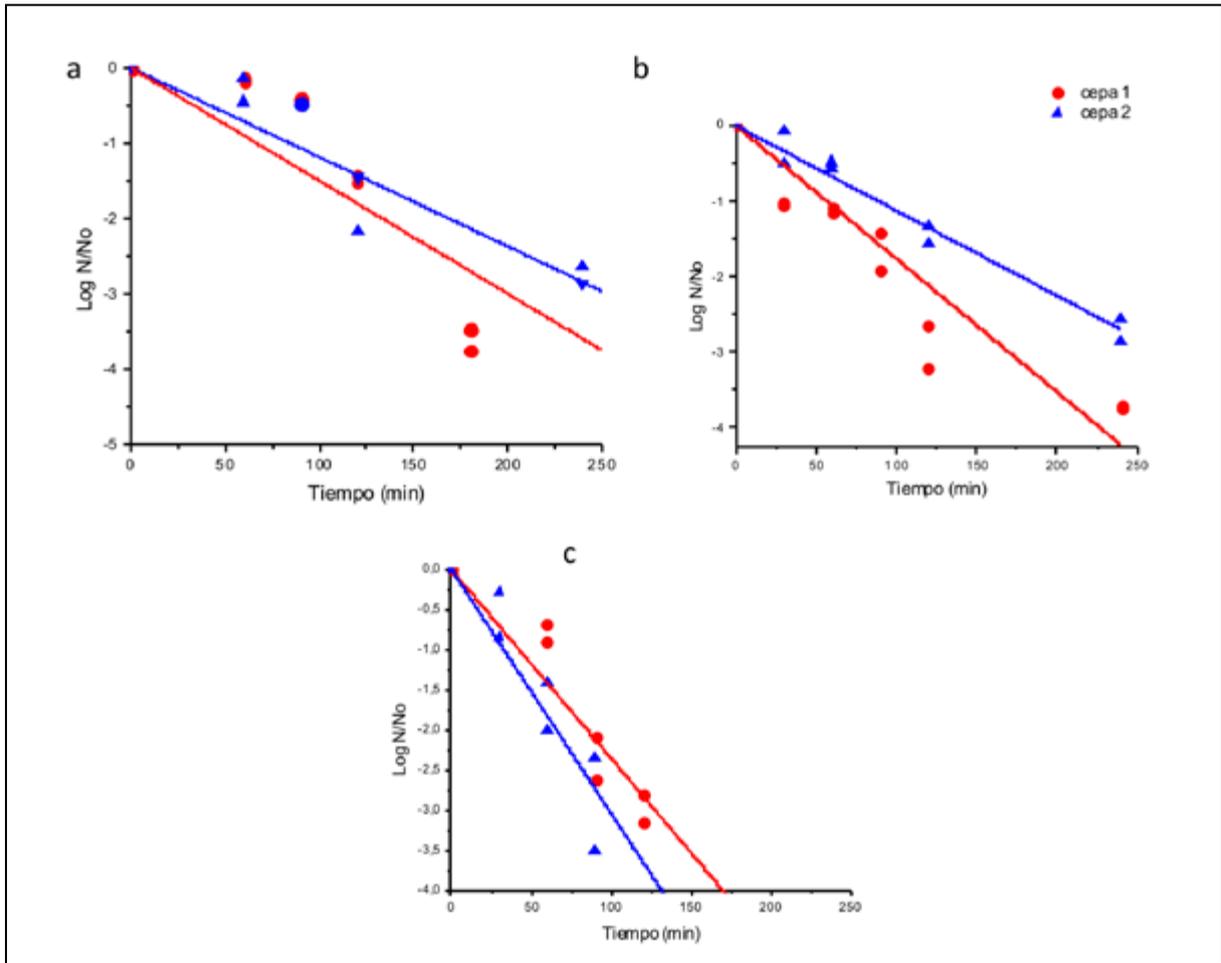
Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) para determinar si las medias de los valores D y z diferían significativamente entre las temperaturas elegidas. Cuando se encontraron diferencias significativas entre las medias se realizó la prueba de Tukey para comparar los efectos del tratamiento (temperatura) por pares. El nivel de significación utilizado para determinar la diferencia entre medias de tratamientos fue de 5%. Se utilizó el programa SYSTAT 12 (SYSTAT Inc., Everston, Illinois).

## Resultados y discusión

### 1. Evaluación de la adaptación a ácido en caldo nutritivo con glucosa y respuesta de tolerancia a ácido a pH 3,5 en ácido acético

La fermentación de la glucosa por el crecimiento de *Salmonella* en caldo nutritivo adicionado con 10 g/l de glucosa resultó en una disminución del pH. Las cepas de *S. Enteritidis* generaron pH promedio de 3,93, las cepas de *S. Typhimurium* un pH promedio de 3,99 y las de *S. Montevideo* un pH promedio de 4,15. Esta disminución gradual del pH se utilizó para lograr la adaptación de las bacterias a la acidez.

La población inicial de células adaptadas que se inocularon en CN suplementado con ácido acético a pH 3,5 fue de aproximadamente 7  $\log_{10}$  (UFC/ml). Después de la adaptación al ácido los cultivos bacterianos mostraron diferentes grados de supervivencia en CN como se muestra en la Figura 1.



**FIGURA 1.** Supervivencia de los inóculos simples de Salmonella en caldo nutritivo acidificado a pH 3,5 con ácido acético, a) *S. Enteritidis*, b) *S. Typhimurium*, c) *S. Montevideo*.

Como consecuencia de lo observado en la Figura 1 (a, b y c), donde las gráficas de supervivencia semilogarítmicas siguen una cinética de inactivación de primer orden que supone que la acción del ácido acético a un pH de 3,5 provoca la inactivación irreversible de una fracción constante de la población sobreviviente en cada momento, los valores D (tiempo en minutos para una reducción de 10 veces en el recuento de supervivencia) se consideraron parámetros útiles para propósitos de comparación de la resistencia. En la Tabla 1 se presentan los tiempos de reducción decimal con las desviaciones estándares respectivas de cada uno de los serotipos estudiados, con la adaptación a un pH 3,5 en ácido acético. Los valores de D surgen de la inversa de la regresión lineal de cada una de las rectas presentadas en la Figura 1.

**TABLA 2.** Tiempos de reducción decimal obtenidos para cada una de las cepas en caldo de cultivo a pH 3,5

<b>S. Enteritidis</b>		<b>S. Typhimurium</b>		<b>S. Montevideo</b>	
Cepa	D (minutos)	Cepa	D (minutos)	Cepa	D (minutos)
1	66,64±3,89 a r <sup>2</sup> = 0,83	1	56,84±2,90 a r <sup>2</sup> =0,95	1	38,78±1,11d r <sup>2</sup> = 0,96
2	84,53±3,53 b r <sup>2</sup> =0,95	2	88,98±4,25 b r <sup>2</sup> =0,99	2	30,54±4,95 d r <sup>2</sup> = 0,94

Valores D (media de dos experimentos ± DS) con diferente letra indican diferencia significativa (p<0,05).

De estos resultados se infiere que la resistencia al ácido acético de *Salmonella* depende de las cepas y los serotipos. En todos los casos, los valores D fueron más bajos para *S. Montevideo*. La cepa 2 de *S. Typhimurium* fue la que presentó mayor tolerancia a la acidez, con un valor D tres veces mayor que el menor valor obtenido para *S. Montevideo*.

Resultados similares fueron obtenidos por Da Silva *et al.*, (2007) quienes informaron, en las mismas condiciones y para serotipos aislados de brotes alimentarios ocurridos en el sur de Brasil, un valor D de 96,36 minutos para *S. Enteritidis*. Estos autores presentan valores menores que los informados en este estudio para *S. Typhimurium* ya que reportan un D de 36,57 minutos. Sin embargo Alvarez (2009) reporta un valor D de 56,37 minutos a pH 3 en caldo infusión cerebro corazón.

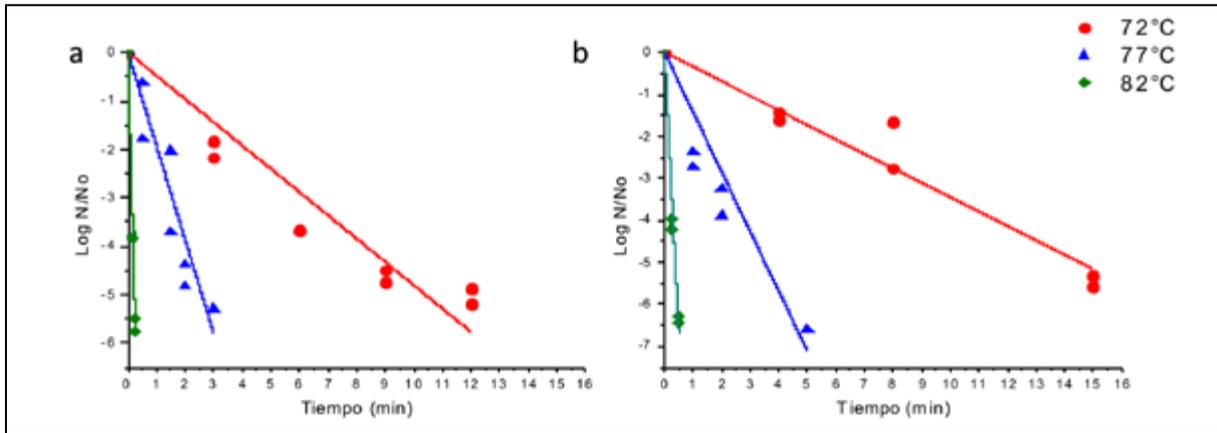
Es un hecho generalmente aceptado que la resistencia a la acidez de *Salmonella* varía entre serovariedades (Arvizu-Medrano y Escartín, 2005) e, incluso, entre cepas de la misma serovariedad (Bacon *et al.*, 2003; Samelis *et al.*, 2003; Berk *et al.*, 2005; Yuk y Schneider, 2006).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden deberse a que tanto *S. Enteritidis* como *S. Typhimurium* son bacterias con mayor prevalencia en las gallinas donde estas características adaptativas se seleccionan en la alimentación de las aves cuando se agregan ácidos grasos de cadena corta con la finalidad de inhibir bacterias Gram-negativas y mohos. La adaptación lograda permite que estos serotipos estén presentes en el tracto intestinal, en materia fecal y en el ambiente de las gallinas ponedoras (Ricke, 2003, Koyuncu *et al.*, 2013).

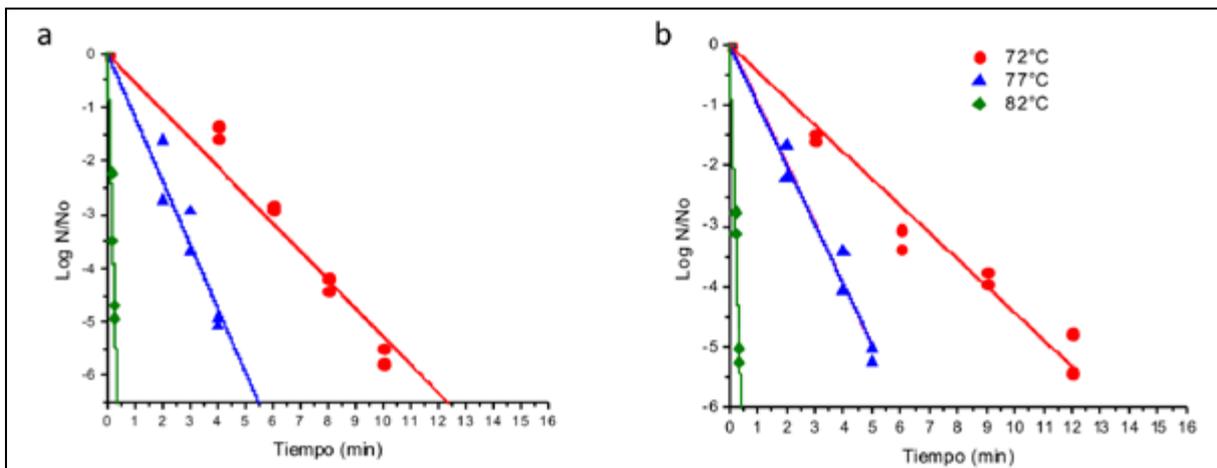
## 2. Estudios de resistencia térmica

### 2.1. Resistencia térmica en caldo nutritivo

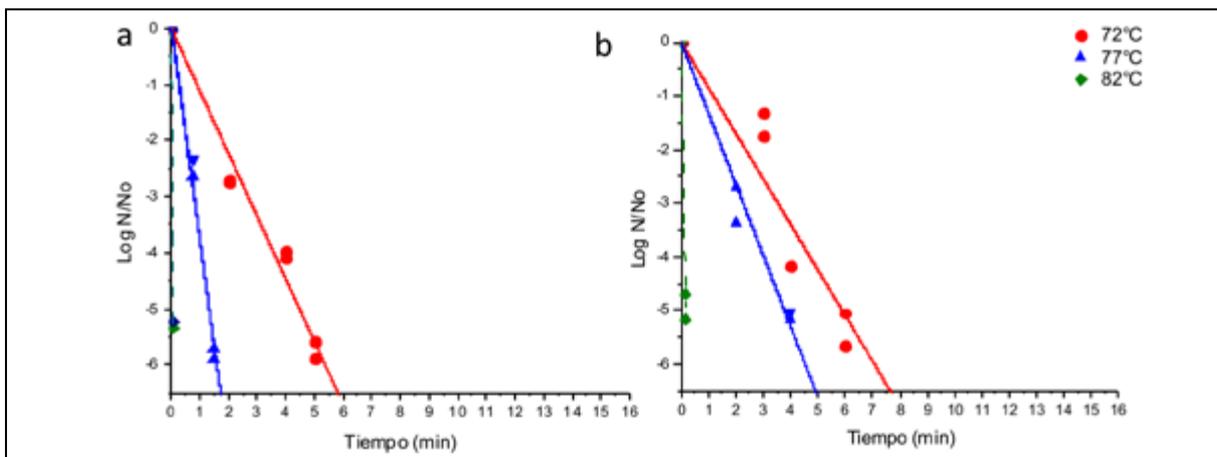
Estos estudios se realizaron a cada una de las cepas de los tres serotipos en fase estacionaria de crecimiento y a las temperaturas de 72, 77 y 82°C. Se comenzó con inóculos entre 7,7 y 8,7 log<sub>10</sub> UFC/g. Las gráficas de muerte obtenidas para cada una de las cepas estudiadas de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Montevideo* se muestran en las Figuras 2, 3 y 4.



**FIGURA 3.** Supervivencia de *S. Enteritidis* en caldo nutritivo de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72, 77 y 82°C.



**FIGURA 3.** Supervivencia de *S. Typhimurium* en caldo nutritivo de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72, 77 y 82°C.



**FIGURA 4.** Supervivencia de *S. Montevideo* en caldo nutritivo de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72, 77 y 82°C. Línea de puntos para 82°C indican gráfica estimada.

Las gráficas de muerte obtenidas para cada una de las cepas, siguen una cinética de inactivación de primer orden, lo que supone que la acción del calor que se transmite en el medio líquido provoca la muerte de una fracción constante de la población sobreviviente. Debido al corto tiempo de vida de *S. Montevideo* a 82°C solo se pudo obtener un solo recuento de células supervivientes por lo que la gráfica se ha considerado como “estimada”.

En la Tabla 2 se muestran los tiempos de reducción decimal obtenidos, expresados como el valor medio de dos experimentos independientes y las desviaciones estándares respectivas.

**TABLA 2.** Tiempos de reducción decimal obtenidos para cada una de las cepas en caldo nutritivo a las temperaturas de 72,77 y 82°C

Temp. (°C)	Cepa	S. Enteritidis	S. Typhimurium	S. Montevideo
		D (minutos)	D (minutos)	D (minutos)
72	1	2,08±0,05a r <sup>2</sup> =0,97	1,90±0,07a r <sup>2</sup> =0,98	0,89±0,01c r <sup>2</sup> =0,99
	2	2,90±0,23b r <sup>2</sup> =0,97	2,25±0,05a r <sup>2</sup> =0,98	1,19±0,01c r <sup>2</sup> =0,95
77	1	0,52±0,01a r <sup>2</sup> =0,96	0,840±0,009a r <sup>2</sup> =0,98	0,265±0,009a r <sup>2</sup> =0,95
	2	0,70±0,02a r <sup>2</sup> =0,98	1,01±1,02a r <sup>2</sup> =0,99	0,75±0,03a r <sup>2</sup> =0,98
82	1	0,040±0,001a r <sup>2</sup> =0,99	0,053±0,006a r <sup>2</sup> =0,98	-5,293log <sub>10</sub> /5seg b
	2	0,074±0,007a r <sup>2</sup> =0,98	0,07±0,07a r <sup>2</sup> =0,98	-4,937log <sub>10</sub> /10seg b

Valores D (media de dos experimentos ± DS) con diferente letra para cada temperatura indican diferencia significativa (p<0,05).

La resistencia a temperatura en caldo nutritivo depende de los serotipos y de la temperatura. En todos los casos las células de esta bacteria se mostraron sensibles a la temperatura con valores D menores a 3 minutos. Los D más bajos lo presentaron las células de *S. Montevideo* mientras que *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, con valores más altos, no presentaron diferencia significativa (p<0,05).

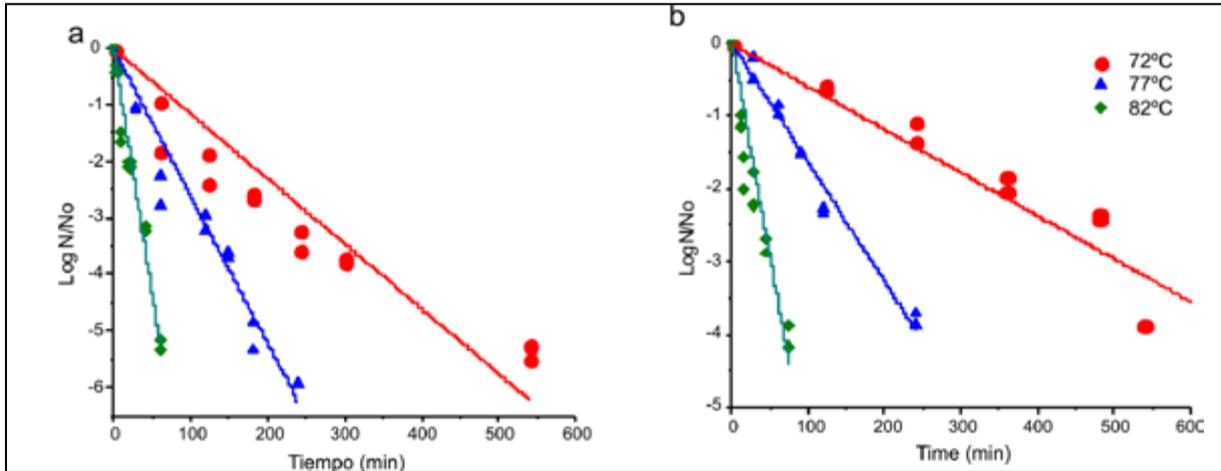
Varios autores han reportado resultados que pueden considerarse análogos a los obtenidos en la presente tesis. Para *S. Enteritidis*, Doyle y Mazzotta (2000) han informado un D de 3,51 minutos en caldo nutritivo a 57°C y Shah *et al.* (1991) de 3,2 minutos a 62,6°C en el mismo medio de cultivo. También estos autores, utilizando los datos de las publicaciones de otros investigadores, calcularon que en un proceso de calentamiento a 71°C se requiere 1,2 segundos para desactivar un ciclo logarítmico de células/ml de *Salmonella* (valor z igual a 5,3°C).

Para *S. Typhimurium* se han informado valores D a 62°C en caldo tripteína de soja de 0,3 minutos y en caldo infusión cerebro-corazón de 0,4 minutos mientras que a 65°C en buffer fosfato se ha informado un valor D de 0,056 minutos. Para *S. Montevideo* se ha publicado un valor D de 1,2 minutos a 57,2°C en caldo nutritivo (Goepfert y Biggie, 1968).

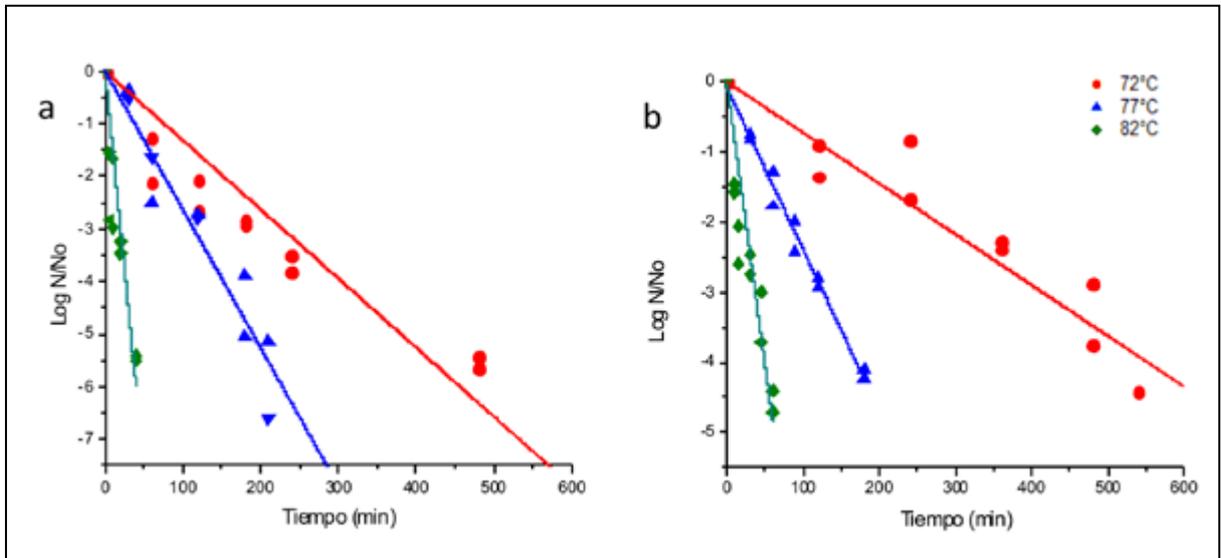
**2.2. Resistencia térmica en albúmina de huevo deshidratada**

Las gráficas de supervivencia de cada una de las cepas estudiadas en albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes ( $a_w=0,338$ ) también siguen una cinética de inactivación de primer orden y se muestran en las Figuras 5,6 y 7 para *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Montevideo* respectivamente.

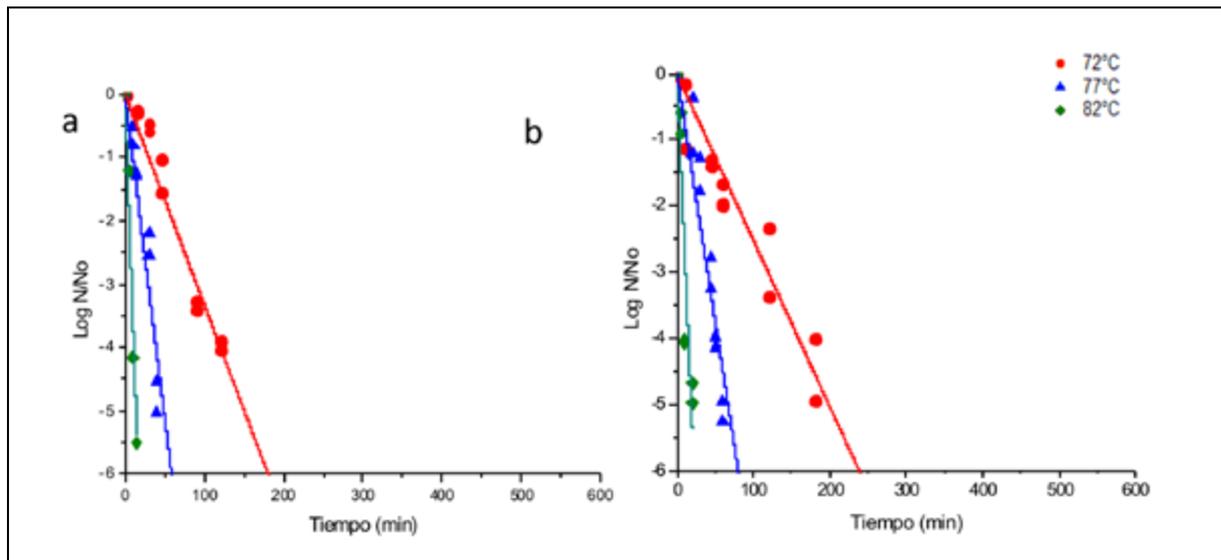
Se comenzó con una concentración de inóculos de aproximadamente  $7 \log_{10}$  UFC/g.



**FIGURA 5.** Supervivencia de *S. Enteritidis* en albúmina de huevo deshidratada ( $a_w=0,338$ ): a) cepa 1, b) cepa 2, c) cepa 3, a 72,77 y 82°C.



**FIGURA 6.** Supervivencia de *S. Typhimurium* en albúmina de huevo deshidratada de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72,77 y 82°C.



**FIGURA 7.** Supervivencia de *S. Montevideo* en albúmina de huevo deshidratada, de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72,77 y 82°C.

La Tabla 2 muestra los valores D obtenidos para cada cepa.

**TABLA 2.** Tiempos de reducción decimal D (minutos), para cada una de las cepas de *Salmonella* en albúmina de huevo deshidratada ( $a_w = 0,338$ ) en los estudios de muerte térmica a 72, 77 y 82°C.

Temp. (°C)	Cepa	S. Enteritidis	S. Typhimurium	S. Montevideo
		D (minutos)	D (minutos)	D (minutos)
72	1	86,75±3,35a $r^2 = 0,95$	76,22±3,89a $r^2 = 0,97$	30,11±1,38d $r^2 = 0,98$
	2	169,13±5,05b $r^2 = 0,96$	138,62± 11,91c $r^2 = 0,97$	39,73±1,67d $r^2 = 0,96$
77	1	36,91±3,12a $r^2 = 0,93$	38,39±5,24a $r^2 = 0,97$	9,81±0,76c $r^2 = 0,95$
	2	61,05±1,71b $r^2 = 0,99$	42,22±1,55a $r^2 = 0,97$	13,33±0,36c $r^2 = 0,96$
82	1	11,32±0,04a $r^2 = 0,98$	6,66±0,29c $r^2 = 0,97$	2,77±0,13c $r^2 = 0,97$
	2	16,66±0,69a $r^2 = 0,96$	12,44±1,05a $r^2 = 0,97$	3,72±0,13d $r^2 = 0,93$

Valores D (media de dos experimentos ± DS) con diferente letra, para cada serotipo diferencia significativa ( $p < 0,05$ )

La resistencia a temperatura en albúmina de huevo deshidratada depende de los serotipos y de la temperatura. *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* se mostraron resistentes, con valores D a 72°C que pueden expresarse en horas. Los tres serotipos presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los tiempos de reducción decimal de las cepas estudiadas a 82°C.

Varios investigadores han informado sobre la naturaleza resistente de *Salmonella* en productos de baja actividad de agua: Goepfert y Biggie (1968) informaron un valor D a 66°C de 816 minutos para *S. Typhimurium* en chocolate fundido; Barrile y Cone (1970) informan un valor D a 71°C en chocolate de 20 horas; Dega *et al.*, (1972) reportan que el incremento en la concentración de sólidos de leche en caldo tripteína de soja aumentó el valor D y el valor z en *S. Typhimurium* y *S. Alachua*; Corry (1975) citado por Laroche *et al.*, (2004) señaló que la resistencia térmica de las formas vegetativas bacterianas, en particular *Salmonella Typhimurium*, es máxima para actividad de agua en el rango 0-0,2 a temperaturas de 125-160°C, por encima del cual la resistencia térmica disminuye con el aumento de la actividad de agua; Shachar y Yaron (2006) en mantequilla de maní, encontraron que *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* no mostraron diferencia significativa en su resistencia al calor y determinaron que a 90°C es necesario una hora para reducir 7 log<sub>10</sub> UFC/g la población de células.

Por otra parte hay autores que reportan mayor resistencia térmica en *Salmonella* pero expuestas a menores temperaturas: Doyle y Mazzotta (2000) informan que en huevo deshidratado los valores D a 50°C para *Salmonella spp.* se expresan en días y Prost y Reimann (1967) reportan que sometieron albúmina de huevo en polvo a temperaturas de 49-50°C y comprobaron que era necesario una semana para eliminar esta bacteria.

En albúmina de huevo deshidratada se observó un incremento en los valores D, de manera independiente a las temperaturas de calentamiento. En promedio aproximado, *S. Enteritidis* aumentó la termorresistencia 60 veces más en albúmina de huevo deshidratada que en caldo nutritivo a 72°C y 300 veces a 82°C, *S. Typhimurium* 50 veces más a 72°C y 216 a 82°C y *S. Montevideo* 25 veces más a 72°C. Estos resultados son diferentes a los reportados en 1996 por Garibaldi quien informó que *Salmonella spp.* resultó 600 a 700 veces más termorresistente en albúmina de huevo en polvo que en estado líquido, probablemente porque la albúmina en este estado físico conservaba inalterables los componentes antimicrobianos que ejercían un efecto sinérgico.

Este autor señaló que la resistencia al calor observada en un sistema acuoso no es aplicable a un producto de baja humedad, situación que también se comprobó en este trabajo de tesis probablemente debido a que a medida que la célula adquiere temperatura las moléculas de agua comienzan a vibrar y estos movimientos producen la ruptura de enlaces disulfuro y puentes de hidrógeno en las proteínas celulares modificando las configuraciones tridimensionales y por lo tanto la funcionalidad. Cuando hay menos agua, como en la albúmina de huevo deshidratada se reducen estas vibraciones disminuyendo la desnaturalización proteica por este mecanismo (Kim *et al.*, 2012).

Por otra parte, también se ha reportado que la actividad de agua reducida puede inducir una serie de mecanismos de “respuesta al estrés” como son los mecanismos de osmoregulación, factores sigma alternativos, estado viable no cultivable, degradación del ARN ribosomal, formación de formas filamentosas y de biopelículas que, en consecuencia mejoran la resistencia al calor y prolongan su supervivencia en el producto. Sin embargo, la fisiología de *Salmonella* bajo estrés por desecación y los mecanismos moleculares específicos de su supervivencia y resistencia térmica en alimentos bajos en actividad de agua no se han explorado completamente (He *et al.*, 2013).

## Conclusiones

Este estudio aportó información cuantitativa relevante sobre la termorresistencia de tres serotipos de *Salmonella* de interés sanitario y tecnológico en albúmina de huevo deshidratada. También proveyó información acerca de la supervivencia de estas cepas en un medio ácido de pH 3.5. En particular permitió arribar a las siguientes conclusiones:

En este estudio también se comprobó que las curvas de supervivencia obtenidas para *Salmonella spp.* en caldo nutritivo y en albúmina de huevo deshidratada a 72, 77 y 82°C se ajustaron a una cinética

de inactivación de primer orden. Los valores del tiempo necesario para reducir a la décima parte la población microbiana en minutos (D) resultaron parámetros adecuados para comparar la resistencia que exhibieron las células sometidas en las distintas matrices y a las diferentes temperaturas.

La resistencia térmica de las cepas de *Salmonella entérica*: Enteritidis, Typhimurium y Montevideo fue dependiente de la actividad de agua, de tal manera que, los valores D obtenidos en caldo nutritivo fueron claramente inferiores a los encontrados en albúmina de huevo deshidratada. Aproximadamente *S. Enteritidis* aumentó la termoresistencia 60 veces más que en caldo nutritivo a 72°C y 300 veces a 82°C, *S. Typhimurium* 50 veces más a 72°C y 216 veces mayor a 82°C y *S. Montevideo* 25 veces más a 72°C.

La resistencia térmica de los inóculos simples en albúmina de huevo deshidratada depende de los serotipos y de la temperatura. Cuando se compararon los valores D según el serotipo, se observó que la relación entre ellos fue: *S. Enteritidis* > *S. Typhimurium* > *S. Montevideo*, con valores D a 72°C aproximados de 3 horas, 2 horas y 30 minutos y a 82°C, de 17 minutos, 9 minutos y 3 minutos respectivamente. En los dos medios de calentamiento se comprobó que *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* desarrollaron una respuesta de protección frente al calor de mucha mayor intensidad que *S. Montevideo*.

Las cepas que presentaron mayor resistencia térmica también mostraron mayor tolerancia a ácido acético a pH 3,5. Es indudable que los factores ambientales previos al tratamiento térmico han influido en la termoresistencia adquirida por las células de *Salmonella*.

## Bibliografía

- ALVAREZ, A., FERNANDEZ, A., BERNARDO, A., LOPEZ, M. 2009. Comparison of acids on the induction of an Acid Tolerance Response in *Salmonella* Typhimurium, consequences for food safety. *Meat Science* 81: 65-70.
- ARVIZU-MEDRANO, S.M., ESCARTÍN, E.F. 2005. Effect of acid shock with hydrochloric, citric, and lactic acids on the survival and growth of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* in acidified media. *Journal of Food Protection* 68(10):2047-53
- AZANZA, M., RUSTIA, A. 2005. Heat resistance characteristics of *Salmonella* Enteritidis in liquid quail egg. *Journal of Food Science and Technology Research* 11(2):151-156.
- BACON, R.T., SOFOS, J.N., KENDALL, P.A., BELK, K.E., SMITH, G.C. 2003. Comparative analysis of acid resistance between susceptible and multi-antimicrobial-resistant *Salmonella* strains cultured under stationary-phase acid tolerance-inducing and non-inducing conditions. *Journal of Food Protection* 66: 732-740.
- BARRILE, J.C., CONE, J.F. 1970. Effect of added moisture on the heat resistance of *Salmonella anatum* in milk chocolate. *Journal of Applied Microbiology* 19: 177-178
- BERK, PA, JONGE, R, ZWIETERING, MH, ABEE, T, KIEBOOM, J. 2005. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Journal of Applied Microbiology* 99(4):859-866.
- DA SILVA, M. P. 2007. Avaliação da cinética de crescimento, resistência ácida e resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul e comparação com outros sorovares. Dirección URL: <http://hdl.handle.net/10183/11142> [Consulta: 16 mar, 2011]
- DA SILVA, M.P., BRANDELLI, A., NOREÑA, C.P.Z., TONDO, E.C. 2009. Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. *Journal of Food Safety* 29: 302-317.
- DEGA, C., GOEPFERT, J., AMUNDSON, C. 1972. Heat resistance of *Salmonellae* in concentrated milk. *Applied Microbiology* 23:415-420.
- DENG, X., LI, Z., ZHANG, W. 2012. Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiology*. 30, 311-315.

- DOYLE, M. E., MAZZOTTA, A. S. 2000. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*. Journal of Food Protection, 63(6): 779–795.
- DOYLE, M., BEUCHAT L., MONTVILLE T. 2001. Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. Editorial Acribia: 13-30 y 133-163
- FINN, S., CONDELL, O., McCLURE, P., AMÉZQUITA A., FANNING S. 2013. Mechanisms of survival, responses, and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. Frontiers in Microbiology. Food Microbiology: 4 (331)1-15
- GARIBALDI, J., STRAKA, R., IJICHI, K. 1969. Heat Resistance of *Salmonella* in Various Egg Products. Applied Environmental Microbiology 17(4):491-496
- GOEFFERT, J., BIGGIE, R. 1968. Heat resistance of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg 775W in milk chocolate. Applied Microbiology 16: 1939-1940
- GREENACRE, E., BROCKLEHURST, T., WASPE, C., WILSON, D., WILSON, P. 2003. *Salmonella* enterica serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20°C: optimization and modeling. Applied and Environmental Microbiology 69: 3945-3951
- GRUZDEV N.; PINTO R., SELA S. 2011. Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage. Food Microbiology 32:415-422
- GURTLE, J. 2009. Evaluation of plating media for recovering *Salmonella* from thermally treated egg albumen. Journal of Applied Poultry Research 18 (2):297-309
- GURTLE, J., KORNACKI J. 2009. Comparison of supplements to enhance recovery of heat-injured *Salmonella* from Egg Albumen. Applied Microbiology 49:503-509.
- HE, Y., LI, Y., SALAZAR, J.K., YANG, J, TORTORELLO, M.L., ZHANG, W. 2013. Increased water activity reduces the thermal resistance of *Salmonella enterica* in peanut butter. Applied Environmental Microbiology 79(15):4763-4767.
- HIRAMATSU, R., M. MATSUMOTO, K. SAKAE, MIYAZAKI Y. 2005. Ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods. Applied Environmental Microbiology. 71:6657-6663.
- HUMPHREY, T., RICHARDSON, K., STATTON, M., ROWBURY, M. 1993. Effects of temperature shift on acid and heat tolerance in *Salmonella* enteritidis phage type 4. Applied Environmental Microbiology 59: 3120-3120.
- HUMPHREY, T., SLATER, E., McALPINE, K., ROWBURY, R., GILBERT, R. 1995. *Salmonella* enteritidis phage type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. Applied Environmental Microbiology 61: 3161-3164.
- JORDAN, J., GURTLE, J., MARKS, H., JONES, D. 2009 Thermal Inactivation of *Salmonella* in Commercially-Processed Liquid Egg Yolk. American Society of Microbiology 109th General Meeting. Philadelphia, PA p.1. Dirección URL: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2012.1366?journalCode=fpd> [Consulta 10 de octubre de 2012].
- KIEBOOM, J., HARSHI K., TEMPELAARS, M., HAZELEGER, W., ABEE, T., BEUMER, R. (2006). Survival, elongation, and elevated tolerance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis at reduced water activity. Journal of Food Protection 69:2681-2686.
- KIM, J., DIAO, J., MARION, W. SHEPHERD, JR., SINGH, R., HERINGA, S., GONG, C., JIANG, X. 2012. Applied Environmental Microbiology. 78 (4): 1302–1307.
- KOYUNCU, S., ANDERSSON, M., LÖFSTRÖM, C., PANAGIOTIS, N. SKANDAMIS, P., GOUNADAKI, A., JÜRGEN ZENTEK, J., HÄGGBLUM, P. 2013. Organic acids for control of *Salmonella* in different feed materials. Veterinary Research 9:81. Dirección URL: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/81> [Consulta: 12 ago. 2013].
- LAROCHE, C., FINE, F., GERVAIS, P. 2004. Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. International Journal of Food Microbiology 97(3):307– 315.

- LESNE, J., BERTHET, S., BINARD, S., ROUXEL, A., HUMBERT, F. 2000. Changes in culturability and virulence of *Salmonella* Typhimurium during long-term starvation under desiccating conditions. *Journal of Food Microbiology* 60 (2-3):195-203.
- LI, H., BHASKARA, A., MEGALIS, C., TORTORELLO, M. 2012. Transcriptomic analysis of *Salmonella* desiccation resistance. *Foodborne Pathogen and Diseases* 9, 1143–1151.
- MC MEECHAN, A., ROBERTS, M., COGAN, T., JORGENSEN, F., STEVENSON, A., LEWIS, C., ROWLEY, G., HUMPHREY, T. 2007. Role of the alternative sigma factors  $\sigma E$  and  $\sigma S$  in survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during starvation, refrigeration and osmotic shock. *Food Microbiology* 153(1):263-269.
- MURPHY, R., OSAILI T., DUNCAN L., MARCY J. 2004. Thermal Inactivation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in Ground Chicken Thigh/Leg Meat and Skin. *Poultry Science* 83:1218–1225.
- OTEIZA, J.M., GIANNUZZI, L., CALIFANO, A. 2003. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* isolated from morcilla as affected by composition of the product. *Food Research International* 36: 703–712
- PODOLAK, R., ENACHE, E., STONE, W., BLACK, D.G., ELLIOTT, P.H., 2010. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of Food Protection* 73: 1919–1936.
- PONCE, E., PLA, R., SENDRA, E., GUAMIS, B., MOR-MUR, M. 1999. Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media. *Food Microbiology* 16(4): 357-365.
- PROST, E., RIEMANN, H. 1967. Food-Borne Salmonellosis. *Annual Review of Microbiology* 21: 495-528
- RICKE, S. C. 2003. The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella* Enteritidis colonization in molting hens. *Poultry Science*.82:1003–1007.
- SAMELIS, J., IKEDA, J., SOFOS, J. 2003. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: A comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 95, 563–575.
- SHACHAR, D., YARON, S. 2006. Heat tolerance of *Salmonella enterica* serovars Agona, Enteritidis and Typhimurium in peanut butter. *Journal of food Protection* 69 (11):2687-2691
- SHAH, D., BRADSHAW, J., PEELER, J. 1991. Thermal resistance of egg-associated epidemic strains of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Food Science*, 56: 391–393
- SHAH, D., BRADSHAW, J., PEELER, J. 1991. Thermal resistance of egg-associated epidemic strains of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Food Science*, 56: 391–393
- SMITH, E., MAURER J., ORTA-RAMIREZ, A., RYSER, E., SMITH, D. 2001. Thermal Inactivation of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef. *Journal of Food Science* 66 (8): 1164–1168
- USDA-FSIS 1999. Performance standards for the production of certain meat and poultry products. Food Safety and Inspection Service, US Department of Agriculture, 9 CFR, Part 30. Fed. Regist. 64.3:732–749.
- WATERMAN, S.R. AND SMALL, P.L.C., 1998. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3882-3886.
- YUK, H.G., SCHNEIDER, K.R. 2006. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. *Food Microbiology* 23: 694-700.

**PID 9065 Denominación del Proyecto**

Termorresistencia de cepas de salmonella en albúmina de huevo alto gel y alto batido y productos derivados

**Director del proyecto**

LOUND, Liliana

**Co-Director/es**

ALEU, Horacio

**Unidad Ejecutora**

Facultad de Bromatología

**Dependencia**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Contacto**

[lilianalound@fb.uner.edu.ar](mailto:lilianalound@fb.uner.edu.ar)

**Integrantes del Proyecto**

BROGGI, Leticia; GENARO, María V.; TESOURO, Ramiro

**Fechas de iniciación y finalización efectivas**

10/05/2012 y 10/09/2014

Aprobación del Informe Final por Resolución CS N° 145/16 (08/06/2016)

«« VOLVER AL INICIO