

Universidad Pública de Navarra
ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE INGENIEROS
AGRÓNOMOS Y BIOCENCIAS

Nafarroako Unibertsitate Publikoa
NEKAZARITZAKO GOI MAILAKO
ESKOLA TEKNIKOA



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

Evaluación y Modelización del Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en Paté de Salmón Ahumado

Presentado por

CHAJIRA CAMILA GARROTE ACHOU

Dirigido por

Iosune Cantalejo Diez

Codirigido por

Fernando Pérez Rodríguez

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y SOSTENIBILIDAD EN LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA

Febrero, 2021

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GENERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE PRECULTIVO.....	11
3.2 INOCULACIÓN DEL PATÉ DE SALMÓN AHUMADO	12
3.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	13
3.4 MODELO PRIMARIO Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS	13
3.5 MODELO SECUNDARIO	14
3.6 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.....	14
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA	15
4.2 MODELO PRIMARIO Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS	15
4.3 MODELO SECUNDARIO	18
5. CONCLUSIONES.....	21
6. BIBLIOGRAFÍA.....	22

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>L. monocytogenes</i> empleadas en los ensayos experimentales de la investigación.....	11
Tabla 2. Parámetros cinéticos \pm error estándar (EE) e índices estadísticos obtenidos ajustando el modelo de Baranyi y Roberts a los datos de crecimiento de las 6 cepas de <i>L. monocytogenes</i> en paté de salmón ahumado a 2, 8, 14 y 20 °C. Para las 6 cepas de <i>L. monocytogenes</i> a la misma temperatura, los valores con letras mayúsculas diferentes indican que existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$).....	18

INDICE FIGURAS

Figura 1. Inoculación del paté de salmón ahumado y posterior almacenamiento a temperatura estática.....	12
Figura 2. Placa de agar selectivo con colonias de <i>L. monocytogenes</i>	13
Figura 3. Curvas de crecimiento de las 6 cepas de <i>L. monocytogenes</i> a 2 (A), 8 (B), 14 (C) Y 20 °C (D). Los símbolos corresponden a los datos experimentales (\circ , \square , \times , $*$, \diamond y Δ para LMG 23773, LMG 23774, LMG 26484, 12MOB101LM, 12MOB102LM y 12MOB107LM, respectivamente) y las líneas corresponden al ajuste del modelo de crecimiento de Baranyi y Roberts (1994) [\log UFC/g].	15
Figura 4. Representación del modelo de Raíz cuadrada de Ratkowsky desarrollado para el crecimiento de las 6 cepas de <i>L. monocytogenes</i> en paté de salmón ahumado.....	19

RESUMEN

Hasta el momento, no se ha estudiado en profundidad la cinética de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en patés elaborados con productos pesqueros. En el presente estudio se evaluó la capacidad de crecimiento de 6 cepas diferentes de *L. monocytogenes* en paté de salmón ahumado en el rango de temperatura de 2-20 °C. Se empleó el modelo de Baranyi y Roberts para estimar los parámetros cinéticos (λ , μ_{max} , N_{max}) de las curvas de crecimiento. El efecto de la temperatura de almacenamiento sobre μ_{max} se determinó utilizando el modelo de raíz cuadrada de Ratkowsky. Se encontraron diferencias significativas en μ_{max} entre las diferentes cepas ($P < 0,05$) a todas las temperaturas, excepto a 2 °C. Se obtuvo una temperatura mínima teórica de crecimiento para *L. monocytogenes* de -4,027 °C. El presente estudio proporciona modelos predictivos para el crecimiento de *L. monocytogenes* en patés de productos pesqueros que permiten apoyar la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano y los estudios de vida útil.

PALABRAS CLAVES

Microbiología predictiva, patógeno alimentario, cinética de crecimiento, productos pesqueros, alimentos listos para el consumo.

ABSTRACT

Up to date, the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in *patés* made from fish products has not been studied in depth. In the present study, the growth capacity of 6 different strains of *L. monocytogenes* in smoked salmon *paté* was evaluated in the temperature range of 2-20 °C. The Baranyi and Roberts model was used to estimate the kinetic parameters (λ , μ_{max} , N_{max}) of the growth curves. The effect of storage temperature on maximum growth rate was determined using Ratkowsky's square root model. Significant differences in growth characteristics were found among the different strains ($P < 0.05$) at all temperatures except at 2 °C. A theoretical minimum growth temperature for *L. monocytogenes* of -4.027 °C was obtained. The present study provides predictive models for the growth of *L. monocytogenes* in fish product *patés* to support Quantitative Microbial Risk Assessment and shelf-life studies.

KEYWORDS

Predictive microbiology, foodborne pathogen, growth kinetics, seafood products, ready-to-eat foods.

1. INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un patógeno de transmisión alimentaria causante de la listeriosis, infección que presenta graves consecuencias clínicas debido a su capacidad potencial para causar abortos, meningitis, septicemia e infecciones del sistema nervioso central (Allerberger & Wagner, 2010), siendo las mujeres embarazadas, los niños, las personas de edad avanzada e inmunodeprimidas la población de mayor riesgo (Walls, 2005). De acuerdo con el último informe de la Unión Europea (UE) sobre zoonosis, agentes zoonóticos y brotes transmitidos por alimentos, el número de casos confirmados por listeriosis aumentó en 2018 respecto al año anterior, con 2549 frente a 2480, respectivamente (EFSA, 2019). Además, la listeriosis fue reportada en 2018 como la zoonosis más grave con mayor proporción de casos hospitalizados (97%) y mayor letalidad (15.6%).

L. monocytogenes tiene capacidad de adaptarse y multiplicarse a temperaturas de refrigeración (4 °C) (Chan & Wiedmann, 2009), tolerar altas concentraciones de sal (12-14% p/vol) (Farber et al., 1992), crecer en un amplio rango de pH (Lado & Yousef, 2007) y formar biopelículas que protegen al microorganismo de factores físicos (fregado) y químicos (desinfectantes y detergentes) (Stoller et al., 2019; Takahashi et al., 2009). Estas propiedades hacen que este patógeno sea capaz de sobrevivir durante periodos de tiempo prolongados en entornos aparentemente hostiles, como pueden ser las instalaciones de procesamiento de alimentos (Hunt et al., 2018). Con frecuencia, *L. monocytogenes* se encuentra en los alimentos crudos tanto de origen animal como vegetal, pero también puede estar presente en alimentos que han sufrido alguna transformación como los productos listos para el consumo (RTE) debido a una contaminación durante la manipulación o procesamiento (Álvarez-Ordóñez et al., 2015). Dada la ausencia de un tratamiento de inactivación bacteriana previo al consumo, *L. monocytogenes* puede persistir en estos productos y crecer en cantidades lo suficientemente altas como para causar una infección (Hunt et al., 2018). Por todo ello, *L. monocytogenes* es, actualmente, una prioridad de seguridad alimentaria tanto para las industrias agroalimentarias como para las autoridades sanitarias (Eicher et al., 2020).

De acuerdo con la regulación alimentaria de la UE (Reglamento (CE) nº 2073, 2005), para aquellos alimentos RTE que puedan favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes*, la normativa tolera su presencia siempre que el fabricante pueda demostrar que el producto no supere el límite de 100 UFC/g al final de su vida útil, nivel equivalente al Objetivo de Seguridad Alimentaria (FSO) establecido internacionalmente para *L. monocytogenes* (ICMSF, 2018). En caso de que no se pueda demostrar este

requisito, se aplica la «tolerancia cero», ausencia en 5 muestras de 25 g por lote. En una encuesta de referencia realizada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) a nivel de la UE con el objetivo de conocer la prevalencia y concentración de *L. monocytogenes* en alimentos RTE en puntos finales de venta se encontró que *L. monocytogenes* fue más prevalente en la categoría de productos pesqueros (10,3%; 1,7% por encima de 100 UFC/g) que en productos cárnicos (2,07%; 0,43% por encima de 100 UFC/g) y lácteos (0,47%; 0,06% por encima de 100 UFC/g) (EFSA, 2013). Asimismo, dentro de la categoría de productos tratados térmicamente, las probabilidades de presencia de *L. monocytogenes* más altas se atribuyeron al paté (EFSA, 2013) y en las estimaciones de riesgo para la salud humana en la UE, el paté presentaba el mayor riesgo de listeriosis (EFSA BioHaz, 2018). Recientemente, la Autoridad de Seguridad Alimentaria de Irlanda, notificó una alerta de presencia de *L. monocytogenes* en un lote de paté de salmón ahumado fabricado por una empresa alimentaria (FSAI, 2020). Estos datos ponen de manifiesto los retos que implica el control de *L. monocytogenes* dentro de esta categoría de alimentos, teniendo en cuenta que factores intrínsecos ligados a su composición como valores elevados de a_w , pH ligeramente ácidos y alto contenido de nutrientes, favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes* (Eicher et al., 2020). Adicionalmente, debido a la naturaleza psicrotrofa de este patógeno, resulta necesario conocer su comportamiento en los alimentos RTE durante su almacenamiento a temperaturas de refrigeración (Bernardo et al., 2020).

Ante esta problemática, surge la necesidad de desarrollar instrumentos que permitan garantizar la seguridad y calidad de los alimentos, como es el caso de la microbiología predictiva, herramienta útil y de respuesta rápida para la toma de decisiones en el marco de la gestión de la seguridad alimentaria (Walls & Scott, 1997). La aplicación de este conocimiento puede integrarse en sistemas de autocontrol como el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), respaldar políticas nacionales e internacionales de seguridad alimentaria basadas en la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiano (ECRM), apoyar estudios de vida útil, así como asistir en la innovación y desarrollo de nuevos productos (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013). Por otro lado, el empleo de la microbiología predictiva conlleva un menor consumo de recursos y tiempo en comparación con las técnicas microbiológicas tradicionales. Con su implementación se puede mitigar el desperdicio alimentario y, a su vez, ofrecer al consumidor alimentos más eficientes (Bovill et al., 2000). Representa, por lo tanto, un enfoque sostenible que va en concordancia con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) aprobados por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en su Agenda 2030, especialmente el ODS 12, que busca contribuir a la generación de cambios estructurales en los patrones de producción y consumo, logrando que, tanto las industrias como los

consumidores, se orienten hacia productos con un menor impacto ambiental (ONU, 2015).

La microbiología predictiva se fundamenta en la aplicación de modelos matemáticos con el objetivo de estimar el comportamiento microbiano en sistemas alimentarios. Para evaluar la cinética microbiana en los alimentos bajo condiciones previsibles, es necesario llevar a cabo un control global de los factores fisicoquímicos que podrían influir en el crecimiento microbiano (e.g., temperatura, pH, a_w , etc.) así como un conocimiento detallado de las características biológicas de los microorganismos (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013). La base científica de la microbiología predictiva se fundamenta en que las respuestas microbianas en los alimentos son de cierta forma reproducibles frente a varios factores ambientales extrínsecos e intrínsecos (Ross et al., 2000). Este comportamiento se puede traducir en diversos modelos matemáticos que permitan estimar el crecimiento, inactivación, producción de toxinas o probabilidad de crecimiento microbiano, entre otros (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013). El número y la validez de los modelos predictivos se ha incrementado considerablemente en los últimos años, así como su aceptación y aplicación por parte de la industria, organismos internacionales y autoridades competentes (Carrasco et al., 2007). En este sentido, su uso se considera un procedimiento válido para determinar el cumplimiento de los criterios microbiológicos del Reglamento (CE) nº 2073 (2005) (anexo II).

Farber et al. (1995) modelaron el efecto de varios factores (temperatura, NaCl, nitrito de sodio, eritorbato de sodio y especia) sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en paté de hígado de cerdo y encontraron que la temperatura (4 y 10°C) fue el único factor que influyó en la fase de latencia y en la tasa de crecimiento del patógeno. Hudson & Mott (1993) inocularon individualmente dos cepas de cada bacteria: *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia enterocolitica* en paté de hígado de cerdo comercial y evaluaron su crecimiento a temperaturas de refrigeración (4 y 10 °C). Dichos autores observaron que cada cepa presentaba características de crecimiento significativamente diferentes, demostrando que los patrones de crecimiento pueden ser diferentes según el tipo de cepa. Por otra parte, Bovill et al. (2000) emplearon con éxito el modelo de Baranyi y Roberts (1994) y obtuvieron predicciones del crecimiento de *L. monocytogenes* y *Salmonella* en paté de hígado de pollo.

Como se puede apreciar, se han desarrollado modelos matemáticos para predecir el crecimiento y la supervivencia de microorganismos patógenos en RTE como el paté. La mayoría de estas investigaciones se han centrado en patés elaborados con productos de origen animal. Sin embargo, no existe en la literatura científica estudios sobre la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* en patés elaborados a partir de productos

pesqueros. Por lo tanto, el presente estudio busca conocer el efecto de la temperatura sobre la dinámica de crecimiento de *L. monocytogenes* en paté de salmón ahumado, así como la variabilidad entre cepas en los parámetros cinéticos de crecimiento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar y modelar la capacidad de crecimiento de 6 cepas de *L. monocytogenes* en paté de salmón ahumado en un amplio rango de temperaturas (2-20 °C). Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Basado en los datos de crecimiento obtenidos, ajustar un modelo primario de microbiología predictiva para la determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento del patógeno.
- b. Evaluar el efecto de la temperatura sobre la tasa máxima de crecimiento del patógeno mediante el ajuste de un modelo secundario de microbiología predictiva.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos experimentales que se llevaron a cabo en este trabajo fin de máster se realizaron entre septiembre de 2020 y enero de 2021 en el Laboratorio del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba (Andalucía, España).

Para esta investigación se empleó un diseño factorial 6x4. El primer factor de tipo cualitativo fue la cepa de *L. monocytogenes* en 6 niveles (LMG 23773, LMG 23774 y LMG 26484, 12MOB101LM, 12MOB102LM y 12MOB107LM) y el segundo factor de tipo cuantitativo fue la temperatura de almacenamiento, en 4 niveles (2, 8, 14 y 20 °C).

A continuación, se describen los materiales y métodos empleados para alcanzar los objetivos propuestos en el presente estudio.

3.1 PATÉ DE SALMÓN AHUMADO

Las muestras de pate de salmón ahumado fueron adquiridas de una empresa alimentaria. El paté suministrado se recibió en formato de monodosis de aluminio de 23 g, el cual se almacenó a temperatura ambiente antes del inicio de los experimentos. Su composición fue: salmón ahumado (29 %), aceite de girasol, agua, leche, patata, espesante (carragenato), sal y extracto de pimentón.

3.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE PRECULTIVO

Se utilizaron 6 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de diferentes productos pesqueros. En la Tabla 1 se muestra el nombre de las diferentes cepas, su serotipo y el alimento del cual fueron aisladas. Las cepas LMG 23773, LMG 23774 y LMG 26484 se adquirieron de la colección de bacterias BCCM/LMG de la Universidad de Gante (Bélgica). Las cepas 12MOB101LM, 12MOB102LM y 12MOB107LM se adquirieron del Laboratorio de Referencia de la UE para *L. monocytogenes* (EURL-Lm, 2014).

Tabla 1. Cepas de *L. monocytogenes* empleadas en los ensayos experimentales de la investigación.

Cepa	Serotipo	Alimento
LMG 23773	4	Salmón ahumado
LMG 23774	1	Salmón ahumado
LMG 26484	-	Ensalada de atún
12MOB101LM	1/2b	Arenque
12MOB102LM	4b	Salmón
12MOB107LM	4b	Trucha

Los cultivos stock de las cepas estudiadas se mantuvieron en glicerol (20% v/v) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la reactivación individual de cada cepa, se transfirieron $10\text{ }\mu\text{L}$ del cultivo stock a un primer tubo de ensayo que contenía 9 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Reino Unido) y se incubó en condiciones estáticas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h . Posteriormente, se realizó un segundo subcultivo para cada cepa transfiriendo $100\text{ }\mu\text{L}$ del primer tubo a un nuevo tubo de BHI y se mantuvo en las mismas condiciones de incubación. Seguidamente, se realizó un tercer subcultivo transfiriendo $100\text{ }\mu\text{L}$ del segundo tubo a un nuevo tubo de BHI, esta vez incubado durante $16\text{-}18\text{ h}$ para obtener cultivos en fase estacionaria temprana, con una densidad celular de aprox. 10^9 UFC/mL . Este último tubo se utilizó para realizar tres lavados consecutivos de las células en solución salina (SS, $0,85\%$ p/v, Scharlau, España) mediante centrifugación a 4100 rpm durante 10 min (5810R, Eppendorf, Alemania). A continuación, se realizaron diluciones decimales en SS para obtener la concentración deseada de *L. monocytogenes* en el paté de salmón.

3.2 INOCULACIÓN DEL PATÉ DE SALMÓN AHUMADO

Se inocularon muestras de monodosis de paté de salmón ahumado de 23 g a una densidad celular de 10^2 UFC/g de *L. monocytogenes* (figura 1). Las muestras de paté se inocularon con alícuotas de $50\text{ }\mu\text{L}$ para cada cepa de *L. monocytogenes*. La inoculación se realizó bajo condiciones asépticas y material estéril. Se insertó una jeringa de 1 mL con aguja (BD Plastipak, España) a través de un septum adhesivo ($\varnothing 15\text{ mm}$, PBI Dansensor, Dinamarca) que previamente se colocó en la parte superior central del envase de aluminio. Posteriormente, el paté de salmón se almacenó a cuatro temperaturas relevantes para el almacenamiento de productos pesqueros: frío ($2\text{ }^{\circ}\text{C}$), refrigeración doméstica ($8\text{ }^{\circ}\text{C}$) y temperaturas abusivas (14 y $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 62 , 16 , 8 y 4 días respectivamente.

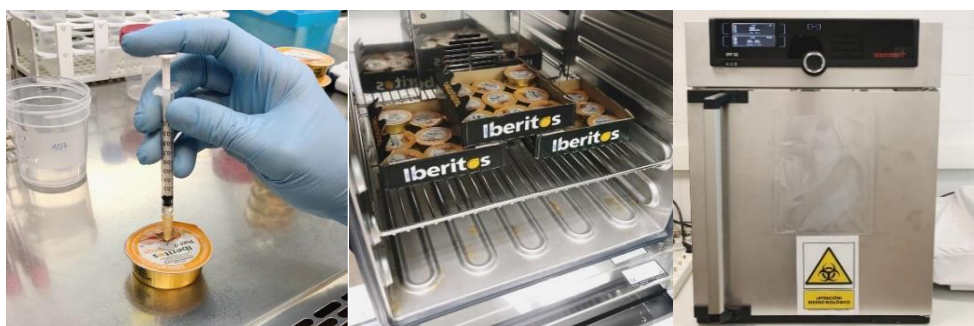


Figura 1. Inoculación del paté de salmón ahumado y posterior almacenamiento a temperatura estática.

3.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Para monitorizar el crecimiento de *L. monocytogenes* durante el tiempo de almacenamiento, se tomaron en cada punto de muestreo dos monodosis de paté de salmón. Cada muestra se mezcló con agua de peptona al 0,1% p/v (Oxoid) y se homogeneizaron durante 60 s utilizando un Stomacher (IUL Instruments, Barcelona, España).

La enumeración de *L. monocytogenes* se realizó siguiendo la norma ISO 11290-2, (2017). En resumen, se prepararon diluciones decimales de las muestras homogeneizadas. Seguidamente, las diluciones fueron sembradas en placas que contenían agar selectivo de Listeria Oxford (Oxoid) con suplemento selectivo Oxford (SR140E; Oxoid). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h y una vez transcurrido este periodo de tiempo, se procedió a realizar los recuentos por duplicado.

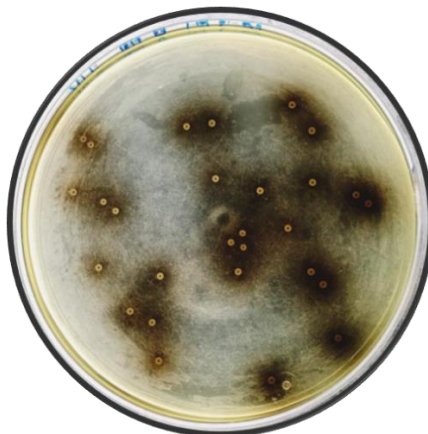


Figura 2. Placa de agar selectivo con colonias de *L. monocytogenes*.

3.4 MODELO PRIMARIO Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

El modelo primario de crecimiento de Baranyi & Roberts (1994), representado por las Ecs. (1), y (2), se ajustó a los datos experimentales obtenidos utilizando el complemento de Microsoft Excel® DMFit versión 3.5 (IFR, Norwich, Reino Unido).

$$y(t) = y_0 + \mu_{max}A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{max}A(t)} - 1}{e^{y_{max} - y_0}}\right) \quad (1)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\mu_{max}t} + e^{-\mu_{max}\lambda} - e^{-\mu_{max}(t+\lambda)}) \quad (2)$$

Siendo $y(t)$ [log UFC/g] la densidad celular en el tiempo t [h]; y_0 [log UFC/g] la densidad celular inicial en $t = 0$; y_{max} [log UFC/g] la densidad celular máxima; μ_{max} [log

UFC/h] la tasa máxima de crecimiento; λ [h] el tiempo de latencia de las células; $A(t)$ es una función de ajuste que describe el estado fisiológico de las células.

3.5 MODELO SECUNDARIO

Los valores de la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) estimados por el modelo primario se utilizaron para desarrollar el modelo de tipo raíz cuadrada representado en la Ec. (3) (Ratkowsky et al., 1982) con el fin de describir el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre μ_{max} . El ajuste del modelo se realizó mediante una regresión lineal utilizando Microsoft Excel® (Redmond, EE. UU.).

$$\sqrt{\mu_{max}} = b \cdot (T - T_{min}) \quad (3)$$

Siendo b , una constante; T [°C], la temperatura de almacenamiento y T_{min} [°C], la temperatura mínima teórica de crecimiento.

3.6 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA

Las muestras de paté de salmón ahumado se caracterizaron fisicoquímicamente mediante la determinación del pH y actividad de agua (a_w) antes de realizar los ensayos de inoculación. El pH se midió empleando un pH-metro (Edge HI2020, Hanna Instruments, EE. UU.) conectado a un electrodo apropiado para sistemas sólidos (HI10530, Hanna Instruments). La determinación de a_w se realizó con un medidor de a_w (AquaLab 4 TE, Decagon Devices Inc., WA, EE. UU.). Los valores de pH y a_w se determinaron por triplicado.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA, varianza simple) para cada temperatura de almacenamiento a un nivel de confianza del 95,0% ($\alpha = 0,05$) con el fin de determinar si existían diferencias significativas en los parámetros cinéticos del modelo primario μ_{max} , entre las distintas cepas. Se utilizó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para distinguir que medias eran significativamente diferentes de las demás. Para las pruebas estadísticas se empleó el software Origin Pro-2020 (OriginLab, USA) y se consideraron significativas cuando $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

Los valores de pH y a_w de paté de salmón ahumado bajo estudio fueron de $6,05 \pm 0,01$ y $0,986 \pm 0,003$, respectivamente. Estos valores confirman que el producto de paté de pescado puede favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* durante su vida útil según lo establecido en el Reglamento CE 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

4.2 MODELO PRIMARIO Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Las curvas de crecimiento de las 6 cepas de *L. monocytogenes* estudiadas en paté de salmón se muestran en la Figura 3. Como puede observarse, todas las cepas fueron capaces de crecer a las 4 temperaturas de almacenamiento (2, 8, 14 y 20 °C). Las curvas de crecimiento obtenidas del ajuste del modelo de Baranyi y Roberts mostraron una buena descripción de los datos experimentales. Se puede distinguir tres fases: una fase de latencia o adaptación (sólo para 2 y 8 °C), una fase de crecimiento exponencial y una fase estacionaria. La fase estacionaria se alcanzó después de aproximadamente 1000, 300, 100 y 50 h de crecimiento a 2, 8, 14 y 20 °C respectivamente.

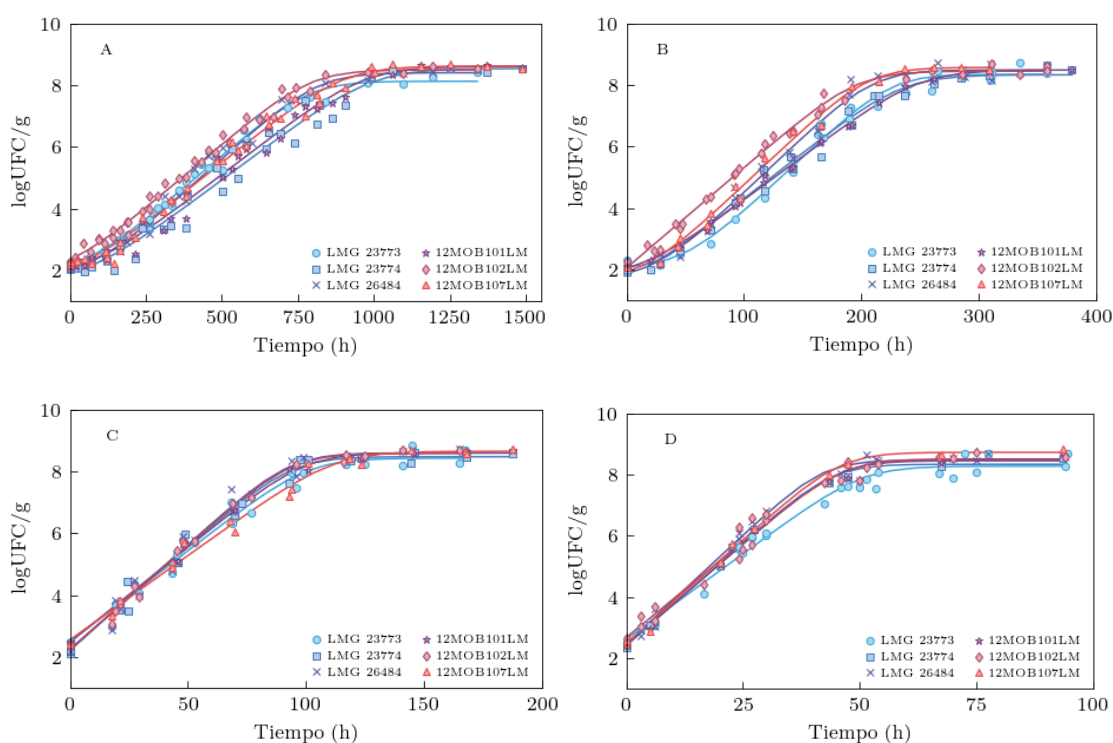


Figura 3. Curvas de crecimiento de las 6 cepas de *L. monocytogenes* a 2 (A), 8 (B), 14 (C) Y 20 °C (D). Los símbolos corresponden a los datos experimentales (○, □, ×, *, ◇ y △ para LMG 23773, LMG 23774, LMG 26484, 12MOB101LM, 12MOB102LM y 12MOB107LM, respectivamente) y las líneas corresponden al ajuste del modelo de crecimiento de Baranyi y Roberts (1994) [log UFC/g].

Los parámetros cinéticos (λ , μ_{max} y N_{max}) que se presentan en la tabla 2, se estimaron ajustando el modelo de Baranyi y Roberts a los datos experimentales. Como era de esperarse, un incremento de temperatura de 2 a 20°C provocó un aumento en la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) de las 6 cepas de *L. monocytogenes*. Este efecto de la temperatura sobre la cinética de crecimiento fue analizado en profundidad por Ratkowsky et al. (1982). Se comprobó una fase de latencia (λ) para las temperaturas más bajas (2 y 8 °C), mientras que para las temperaturas más altas (14 y 20 °C) esta fase no fue evidente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por De Silvestri et al. (2018) quien reportó que la fase de latencia disminuía a medida que la temperatura aumentaba de 4 a 30 °C, ocurriendo lo contrario para la tasa de crecimiento de tres bacterias patógenas psicotróficas, entre ellas, *L. monocytogenes*. Investigaciones realizadas por diversos autores concluyeron que la fase de latencia fue inversamente proporcional a la tasa máxima de crecimiento (Baranyi & Roberts, 1994; McMeekin et al., 1993, 2002). En el caso de la densidad máxima (N_{max}), no se observó un efecto reseñable, ya que los datos estuvieron en un rango estrecho de 8,13-8,74 log UFC/g, sin reflejar ninguna tendencia.

El análisis estadístico reveló que no existían diferencias significativas en μ_{max} entre las diferentes cepas de *L. monocytogenes* ($P < 0,05$) a 2 °C. En cambio, a 8, 14 y 20 °C se obtuvieron diferencias significativas entre las tasas máximas de crecimiento de las diferentes cepas. La cepa LMG 26484 presentó el valor medio más alto de μ_{max} a todas las temperaturas de almacenamiento. Sin embargo, no mostró diferencias significativas con respecto a todas las cepas, sólo con las cepas LMG 23774 y 12MOB101LM a 8 °C ($P < 0,05$); LMG 23773, 12MOB101LM y 12MOB107LM a 14 °C ($P < 0,05$) y LMG 23773, 12MOB101LM y 12MOB102LM a 20 °C ($P < 0,05$). Diversos autores han reportado diferencias significativas en las características de crecimiento entre diferentes tipos de cepas de *L. monocytogenes*, respaldando la importancia de utilizar un "cóctel" de cepas en los experimentos de crecimiento microbianos (Aryani et al., 2015; Hudson & Mott, 1993; Nufer et al., 2007). Los valores obtenidos en esta investigación para la tasa máxima de crecimiento de *L. monocytogenes* oscilaron entre 0,00742 - 0,00886; 0,0286 - 0,0364; 0,0547 - 0,0687 y 0,112 - 0,143 log UFC/h a 2, 8, 14 y 20 °C, respectivamente. Verheyen et al. (2020) reportaron una tasa máxima de crecimiento para *L. monocytogenes* de 0,0251 log UFC/h en una emulsión gelificada a base de pescado con un 20% de grasa almacenada a 7 °C, valor similar al obtenido a 8 °C en el paté de salmón ahumado. Baka et al. (2017) realizaron predicciones de μ_{max} por medio de Combase Predictor en base al pH, a_w y temperatura de almacenamiento de diferentes sistemas modelos basados en proteína de pescado e informaron una tasa máxima de crecimiento de 0,027 y 0,055 log UFC/h a 8 y 12 °C en emulsión gelificada con pH y a_w similar a la del paté estudiado, velocidades muy cercanas a las obtenidos en esta investigación para

8 y 14 °C. La tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) estimada para *L. monocytogenes* en jugo a base de pescado a 2, 8 y 20 °C fue reportada por Bolívar et al. (2018) a niveles de 0,009, 0,050 y 0,204 log UFC/h, respectivamente. En términos generales, los valores encontrados en la bibliografía para μ_{max} son comparables con los hallados en el presente estudio y las pequeñas variaciones pueden deberse principalmente a las diferencias en las cepas utilizadas, las matrices alimentarias y las temperaturas de almacenamiento.

Para el parámetro λ , no fue posible encontrar diferencias claras entre los periodos de latencias de las diferentes cepas de *L. monocytogenes* a 2°C ya que, teniendo en cuenta el error estándar, la fase lag fue muy parecida entre las cepas. No obstante, a una temperatura de almacenamiento más alta, como 8 °C, se observó que la cepa LMG 23773 presentó una duración más larga de la fase lag con respecto a las demás cepas, a excepción de la cepa 12MOB102LM que fue la única que no presentó fase de latencia a 8 °C de almacenamiento. Esta primera fase de la curva de crecimiento bacteriano depende de la historia del cultivo inoculado, por lo tanto, el estado fisiológico y genético del microorganismo influye directamente en la duración del periodo de latencia (Bovill et al., 2000). El avance de las investigaciones ha demostrado que la fase lag es una respuesta adaptativa al estrés y las lesiones, que las bacterias pueden preadaptarse para tener periodos de latencia más cortos y que las células individuales varían en su fase lag y en la tolerancia al estrés (Bertranda, 2019). Los valores obtenidos en esta investigación para el periodo de latencia de *L. monocytogenes* oscilaron entre 48,11 – 99,46 y 16,91 h – 50,19 a 2 y 8 °C, respectivamente. Es importante mencionar que las predicciones que se realizaron de la fase lag fueron menos precisas que las predicciones de la tasa máxima de crecimiento ya que, mientras que la tasa máxima de crecimiento es un parámetro independiente, que caracteriza sólo a las bacterias y el entorno real, el periodo de latencia, como se explicaba anteriormente, es un parámetro dependiente de la historia de las células (Baranyi & Roberts, 1994). Así mismo, el período de latencia promedio se hace más largo cuando las células son sometidas a ambientes de estrés, como pueden ser las bajas temperaturas, y los tiempos en los que las células individuales comienzan a dividirse exhiben una mayor dispersión (Bertranda, 2019). En consecuencia, los datos que se encuentran en la literatura sobre los periodos de latencia de *L. monocytogenes* en matrices alimentarias basadas en productos pesqueros son muy diversos y exhiben un error estándar considerablemente amplio; Verheyen et al. (2020) publicaron una fase lag de 25,13 h con un error estándar de 4,19 h para una emulsión gelificada a base de pescado a 7 °C; Baka et al. (2017) reportaron un periodo de latencia de 1 h con un error estándar de 20 h para emulsión gelificada a base de pescado almacenada a 8 °C y Costa et al., (2019) determinaron un λ de 15,1 h con un error estándar de 6,26 h para jugo a base de pescado a 8,1 °C.

Tabla 2. Parámetros cinéticos \pm error estándar (EE) e índices estadísticos obtenidos ajustando el modelo de Baranyi y Roberts a los datos de crecimiento de las 6 cepas de *L. monocytogenes* en paté de salmón ahumado a 2, 8, 14 y 20 °C. Para las 6 cepas de *L. monocytogenes* a la misma temperatura, los valores con letras mayúsculas diferentes indican que existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Temp. (°C)	Cepa	λ (h)	μ_{max} (log UFC/h)	N_{max} (log UFC/g)	EE ^b	R ²
2	LMG 23773	75,67 \pm 31,73 ^a	0,00841 \pm 0.0005 ^A	8.13 \pm 0.10	0.206	0.989
	LMG 23774	89,62 \pm 54,56	0,00742 \pm 0.0006 ^A	8.55 \pm 0.21	0.373	0.975
	LMG 26484	91,20 \pm 43,78	0,00886 \pm 0.0007 ^A	8.41 \pm 0.15	0.290	0.984
	12MOB101LM	99,46 \pm 41,13	0,00757 \pm 0.0005 ^A	8.62 \pm 0.14	0.277	0.986
	12MOB102LM	48,11 \pm 26,72	0,00833 \pm 0.0004 ^A	8.51 \pm 0.10	0.206	0.990
	12MOB107LM	65,40 \pm 32,85	0,00791 \pm 0.0004 ^A	8.63 \pm 0.10	0.234	0.991
8	LMG 23773	50,19 \pm 13,17	0,0359 \pm 0.003 ^{AC}	8.35 \pm 0.10	0.281	0.985
	LMG 23774	16,91 \pm 12,78	0,0302 \pm 0.002 ^{BD}	8.34 \pm 0.16	0.272	0.986
	LMG 26484	27,39 \pm 12,81	0,0364 \pm 0.003 ^{AC}	8.50 \pm 0.10	0.295	0.983
	12MOB101LM	22,13 \pm 5,14 ²	0,0286 \pm 0.0008 ^{BD}	8.50 \pm 0.06	0.102	0.998
	12MOB102LM	-	0,0327 \pm 0.0009 ^{CD}	8.46 \pm 0.07	0.186	0.993
	12MOB107LM	21,65 \pm 10,07	0,0362 \pm 0.002 ^{AC}	8.58 \pm 0.12	0.214	0.993
14	LMG 23773	-	0,0591 \pm 0.003 ^{CD}	8.44 \pm 0.13	0.301	0.978
	LMG 23774	-	0,0665 \pm 0.003 ^{AB}	8.48 \pm 0.09	0.266	0.986
	LMG 26484	-	0,0687 \pm 0.003 ^A	8.61 \pm 0.13	0.297	0.983
	12MOB101LM	-	0,0616 \pm 0.002 ^{BC}	8.60 \pm 0.13	0.133	0.996
	12MOB102LM	-	0,0675 \pm 0.003 ^A	8.60 \pm 0.09	0.189	0.993
	12MOB107LM	-	0,0547 \pm 0.003 ^D	8.66 \pm 0.12	0.249	0.986
20	LMG 23773	-	0,112 \pm 0.005 ^D	8.28 \pm 0.10	0.269	0.982
	LMG 23774	-	0,135 \pm 0.006 ^{AB}	8.35 \pm 0.11	0.164	0.995
	LMG 26484	-	0,143 \pm 0.005 ^B	8.48 \pm 0.08	0.211	0.991
	12MOB101LM	-	0,133 \pm 0.007 ^{AC}	8.46 \pm 0.13	0.194	0.993
	12MOB102LM	-	0,125 \pm 0.006 ^C	8.52 \pm 0.13	0.298	0.982
	12MOB107LM	-	0,137 \pm 0.005 ^{AB}	8.74 \pm 0.10	0.154	0.996

^a Media \pm Error Estándar (EE).

^b Error Estándar del ajuste global (EE^b)

^c Coeficiente de correlación del ajuste global (R²)

4.3 MODELO SECUNDARIO

Los valores de μ_{max} obtenidos del modelo de Baranyi y Roberts en paté de salmón ahumado se utilizaron para desarrollar un modelo secundario integrado por las 6 cepas de *L. monocytogenes*. Se decidió ajustar el modelo secundario con todos los datos de las diferentes cepas, en primer lugar con el objetivo de tener un modelo global que

considerara, de manera conjunta, las características de crecimiento de varios tipos de cepa que podrían encontrarse en la contaminación de un alimento y en segundo lugar, porque el análisis estadístico mostró que a 2°C no existían diferencias significativas entre las cepas y aunque para las temperaturas de 8, 14 y 20 °C existieron diferencias significativas, no se pudo establecer una tendencia clara entre las cepas.

El efecto de la temperatura sobre la tasa máxima de crecimiento de *L. monocytogenes* se determinó utilizando el modelo de tipo raíz cuadrada. En la figura 4 se muestra la ilustración gráfica del modelo ajustado. En ella se observa que la relación entre $\sqrt{\mu_{max}}$ y la temperatura siguió una línea recta. El coeficiente de correlación (R^2) obtenido para el ajuste lineal fue alto (0,983), por lo cual el modelo secundario permite describir adecuadamente la influencia de la temperatura sobre el parámetro cinético (μ_{max}).

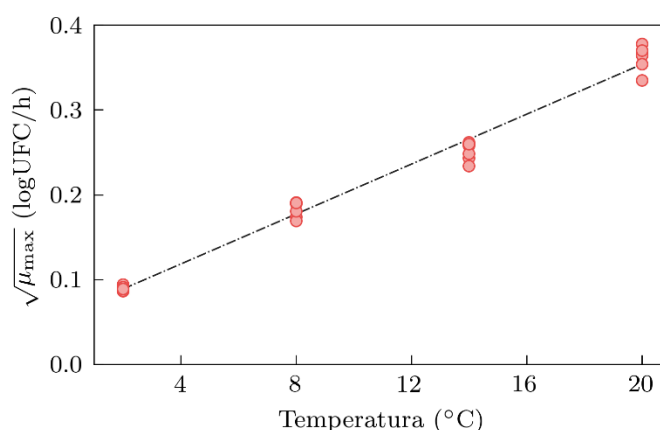


Figura 4. Representación del modelo de Raíz cuadrada de Ratkowsky desarrollado para el crecimiento de las 6 cepas de *L. monocytogenes* en paté de salmón ahumado.

El parámetro T_{min} del modelo secundario consiste en la intersección de la función con el eje de temperatura cuando el parámetro $\sqrt{\mu_{max}}$ es igual a cero y representa la temperatura mínima teórica de crecimiento bacteriano. En esta investigación se obtuvo que la temperatura mínima teórica de crecimiento para *L. monocytogenes* en paté de salmón ahumado fue de -4,027 °C con un error estándar de $\pm 0,019$ y el coeficiente de regresión (b) fue de 0,0147 con un error estándar de $\pm 0,0004$. El Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para *L. monocytogenes* (EURL-Lm, 2014) señala que la temperatura mínima de crecimiento para *L. monocytogenes* es de -1.5 °C. Esta diferencia puede deberse al hecho de que el valor reportado por EURL fue obtenido de investigaciones realizadas en caldos de cultivo artificiales bajo condiciones óptimas y con otras cepas diferentes a las utilizadas en este trabajo (Bernardo et al., 2020). En efecto, los valores de T_{min} reportados para el patógeno en matrices de productos pesqueros están en línea con el obtenido en este trabajo, como los publicados por Bolívar et al. (2018) y

Costa et al. (2019) en jugo de pescado, que correspondieron a un valor de $-4,16\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-3,40\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Por el contrario, los valores de T_{min} reportados en otros alimentos para el patógeno difieren de la obtenida en este estudio. Por ejemplo, $-2,54\text{ }^{\circ}\text{C}$ en pudín de crema de vainilla (Lianou et al., 2018), $-2,02\text{ }^{\circ}\text{C}$ en repollo blanco (Wang et al., 2013), $-1,96\text{ }^{\circ}\text{C}$ en lechuga RTE (Sant'Ana et al., 2012) y $-11,75\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ensalada de pollo RTE (Bernardo et al., 2020). Se encontraron otras investigaciones en las que se reportaron valores de T_{min} , en productos pesqueros, ligeramente más altos al estimado en el presente estudio, entre ellos, $-2,86\text{ }^{\circ}\text{C}$ en salmón ahumado en frío (Delignette-Muller et al., 2006) y $-2,83\text{ }^{\circ}\text{C}$ en camarones en conservas (Mejlholm & Dalgaard, 2009). Las diferencias pueden deberse principalmente a las cepas utilizadas en los estudios y, a la complejidad composicional y las propiedades fisicoquímicas que presentan los alimentos de interés, es decir, el número de obstáculos que el alimento en sí pueda generar para el crecimiento del patógeno (e.g., concentración de sal, porcentaje de grasa, propiedades microestructurales y reológicas, etc.) (Baka et al., 2017; Mejlholm et al., 2010; Verheyen et al., 2020).

5. CONCLUSIONES

En relación con el objetivo general propuesto en esta investigación, se puede confirmar que este trabajo es uno de los primeros en aportar información sobre la cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* en paté elaborado a partir de pescado en un amplio rango de temperaturas de almacenamiento.

Con respecto a los objetivos específicos que se abordaron durante el desarrollo de este estudio se obtuvieron las siguientes conclusiones:

a.1) Se corroboró que el incremento de la temperatura de almacenamiento aumentó gradualmente la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) y disminuyó el tiempo de latencia (λ), lo que confirma la influencia de la temperatura sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en patés RTE y destaca la importancia del control de la temperatura durante toda la vida útil del producto.

a.2) El modelo de Branyi y Robert generó curvas de crecimiento que se ajustaron adecuadamente a los datos experimentales de las 6 cepas de *L. monocytogenes* teniendo en cuenta que el error estándar del ajuste global fue bajo (cercano a 0) y el coeficiente de correlación del ajuste global (cercano a 1).

a.3) Se comprobó que la dinámica de crecimiento del patógeno puede ser diferente según el tipo de cepa y la temperatura. Por lo tanto, la incorporación de este factor al momento de desarrollar modelos predictivos permitiría estimar con mayor exactitud la seguridad microbiológica de este tipo de alimentos de origen pesquero.

b.1) El Modelo de Ratkowsky describió adecuadamente el efecto de la temperatura sobre el parámetro cinético μ_{max} al obtenerse un coeficiente de correlación R^2 cercano a 1 y permite predecir la tasa máxima de crecimiento específico considerando la variación de temperatura.

b.2) La temperatura mínima teórica obtenida para *L. monocytogenes* en paté de salmón ahumado indica que es un patógeno que puede seguir creciendo a temperaturas muy bajas, lo que ratifica la necesidad de implementar y desarrollar herramientas de respuesta rápida a la hora de gestionar la seguridad y calidad de los alimentos.

b.3) Los modelos desarrollados en esta investigación podrían incorporarse en un software informático de manera que se pueda estimar el tiempo en alcanzar el nivel máximo del patógeno basado en el objetivo de seguridad alimentaria establecido internacionalmente y, por lo tanto, poder aplicarlo en la determinación de la vida útil de alimentos con matrices alimentarias similares a las del paté de salmón ahumado.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Allerberger, F., & Wagner, M. (2010). Listeriosis: A resurgent foodborne infection. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 16, Issue 1, pp. 16–23). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x>
- Álvarez-Ordóñez, A., Leong, D., Hickey, B., Beaufort, A., & Jordan, K. (2015). The challenge of challenge testing to monitor *Listeria monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission (2014) Technical Guidance document. In *Food Research International* (Vol. 75, pp. 233–243). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.004>
- Aryani, D. C., den Besten, H. M. W., Hazeleger, W. C., & Zwietering, M. H. (2015). Quantifying strain variability in modeling growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 208, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.006>
- Baka, M., Verduyssen, S., Cornette, N., & Van Impe, J. F. (2017). Dynamics of *Listeria monocytogenes* at suboptimal temperatures in/on fish-protein based model systems: Effect of (micro)structure and microbial distribution. *Food Control*, 73, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.031>
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 277–294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Bernardo, R., Barreto, A. S., Nunes, T., & Henriques, A. R. (2020). Estimating *Listeria monocytogenes* Growth in Ready-to-Eat Chicken Salad Using a Challenge Test for Quantitative Microbial Risk Assessment. *Risk Analysis*, 40(11), 2427–2441. <https://doi.org/10.1111/risa.13546>
- Bertranda, R. L. (2019). Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 201, Issue 7). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/JB.00697-18>
- Bolívar, A., Costa, J. C. C. P., Posada-Izquierdo, G. D., Valero, A., Zurera, G., & Pérez-Rodríguez, F. (2018). Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in Mediterranean fish species from aquaculture production. *International Journal of Food Microbiology*, 270, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.005>
- Bovill, R., Bew, J., Cook, N., D'Agostino, M., Wilkinson, N., & Baranyi, J. (2000).

- Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00292-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00292-0)
- Carrasco, E., Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2007). Management of microbiological safety of ready-to-eat meat products by mathematical modelling: *Listeria monocytogenes* as an example. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.013>
- Chan, Y. C., & Wiedmann, M. (2009). Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), 237–253. <https://doi.org/10.1080/10408390701856272>
- Costa, J. C. C. P., Bover-Cid, S., Bolívar, A., Zurera, G., & Pérez-Rodríguez, F. (2019). Modelling the interaction of the sakacin-producing *Lactobacillus sakei* CTC494 and *Listeria monocytogenes* in filleted gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under modified atmosphere packaging at isothermal and non-isothermal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 297, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.002>
- De Silvestri, A., Ferrari, E., Gozzi, S., Marchi, F., & Foschino, R. (2018). Determination of Temperature Dependent Growth Parameters in Psychrotrophic Pathogen Bacteria and Tentative Use of Mean Kinetic Temperature for the Microbiological Control of Food. *Frontiers in Microbiology*, 9(DEC), 3023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03023>
- Delignette-Muller, M. L., Cornu, M., Pouillot, R., & Denis, J. B. (2006). Use of Bayesian modelling in risk assessment: Application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.021>
- EFSA. (2013). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010–2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA Journal*, 11(6), 2010–2011. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3241>
- EFSA. (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 17(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- EFSA BioHaz. (2018). Scientific Opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*, 16(1).

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>

- Eicher, C., Ruiz Subira, A., Corti, S., Meusburger, A., Stephan, R., & Guldemann, C. (2020). Growth Potential of *Listeria monocytogenes* in Three Different Salmon Products. *Foods*, 9(8), 1048. <https://doi.org/10.3390/foods9081048>
- EUR-LM. (2014). Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *EUR-LM-ANSES*, 1–47.
- Farber, J. M., Coates, F., & Daley, E. (1992). Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 15(3), 103–105. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1992.tb00737.x>
- Farber, J. M., McKellar, R. C., & Ross, W. H. (1995). Modelling the effects of various parameters on the growth of *Listeria monocytogenes* on liver pâté. *Food Microbiology*, 12(C), 447–453. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80129-4](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80129-4)
- FSAI. (2020). *Recall of Union Hall Smoked Salmon Pate due to the Presence of Listeria monocytogenes*. https://www.fsai.ie/news_centre/food_alerts/union_hall_smoked_salmon_pate.html
- Hudson, J. A., & Mott, S. J. (1993). Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in pâté and a comparison with predictive models. *International Journal of Food Microbiology*, 20(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90055-L](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90055-L)
- Hunt, K., Blanc, M., Álvarez-Ordóñez, A., & Jordan, K. (2018). Challenge studies to determine the ability of foods to support the growth of *Listeria monocytogenes*. *Pathogens*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens7040080>
- ICMSF. (2018). *Microorganisms in food 7: Microbial testing in food safety management* (Springer).
- ISO 11290-2. (2017). *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. - Part 2: Enumeration method*. Asociación Española de Normalización. Madrid, España.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. *E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.), Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 157-214 CRC Press.
- Lianou, A., Moschonas, G., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2018). Growth of *Listeria*

- monocytogenes* in pasteurized vanilla cream pudding as affected by storage temperature and the presence of cinnamon extract. *Food Research International*, 106, 1114–1122. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.027>
- McMeekin, T. A., Olley, J., Ratkowsky, D. A., & Ross, T. (2002). Predictive microbiology: Towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2–3), 395–407. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00663-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00663-8)
- McMeekin, T. A., Olley, J., Ross, T., & Ratkowsky, D. (1993). *Predictive Microbiology: Theory and Application* (Research Studies Press Limited (ed.)). https://books.google.es/books/about/Predictive_Microbiology.html?id=bZ1FAQAAIAAJ&redir_esc=y
- Mejlholm, O., & Dalgaard, P. (2009). Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for *Listeria monocytogenes* in lightly preserved and ready-to-eat shrimp. *Journal of Food Protection*, 72(10), 2132–2143. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.10.2132>
- Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hansen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D., & Dalgaard, P. (2010). Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* - An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 141(3), 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.026>
- Nufer, U., Stephan, R., & Tasara, T. (2007). Growth characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 and 7 °C. *Food Microbiology*, 24(5), 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.10.004>
- ONU. (2015). *Consumo y producción sostenibles – Desarrollo Sostenible*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-consumption-production/>
- Pérez-Rodríguez, F., & Valero, A. (2013). *Predictive Microbiology in Foods*. Springer-Verlag, New York.
- Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A., & Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149(1), 1–5. <https://doi.org/10.1128/jb.149.1.1-5.1982>
- Reglamento (CE) nº 2073. (2005). *DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios*.

(DOUE L 338 de 22.12.2005)

- Ross, T., Dalgaard, P., & Tienungoon, S. (2000). Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology*, 62(3), 231–245. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00340-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00340-8)
- Sant'Ana, A. S., Franco, B. D. G. M., & Schaffner, D. W. (2012). Modeling the growth rate and lag time of different strains of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce. *Food Microbiology*, 30(1), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.11.003>
- Stoller, A., Stevens, M. J. A., Stephan, R., & Guldimann, C. (2019). Characteristics of *listeria monocytogenes* strains persisting in a meat processing facility over a 4-year period. *Pathogens*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens8010032>
- Takahashi, H., Miya, S., Igarashi, K., Suda, T., Kuramoto, S., & Kimura, B. (2009). Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolates from raw ready-to-eat seafood. *Journal of Food Protection*, 72(7), 1476–1480. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.7.1476>
- Verheyen, D., Bolívar, A., Pérez-Rodríguez, F., Baka, M., Skåra, T., & Van Impe, J. F. (2020). Isolating the effect of fat content on *Listeria monocytogenes* growth dynamics in fish-based emulsion and gelled emulsion systems. *Food Control*, 108, 106874. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106874>
- Walls, I. (2005). Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis - A risk-based approach. In *Journal of Food Protection* (Vol. 68, Issue 9, pp. 1932–1994). IAMFES. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.9.1932>
- Walls, I., & Scott, V. N. (1997). Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 36(2–3), 97–102. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)01260-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)01260-9)
- Wang, J., Rahman, S. M. E., Zhao, X.-H., Forghani, F., Park, M.-S., & Oh, D.-H. (2013). Predictive Models for the Growth Kinetics of *Listeria monocytogenes* on White Cabbage. *Journal of Food Safety*, 33(1), 50–58. <https://doi.org/10.1111/jfs.12022>