



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



Efecto de las temperaturas 65, 73 y 89 °C durante 3 y 3,5 minutos en el control de diferentes concentraciones de *Listeria monocytogenes*.

TESIS

Para optar el título profesional de

**LICENCIADA EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

AUTORA

Br. Calderón Jiménez, Anghela Patricia

ASESORA

Dra. Albino Cornejo, Graciela Olga

LAMBAYEQUE – PERÚ

2023

Efecto de las temperaturas 65, 73 y 89 °C durante 3 y 3,5 minutos en el control de diferentes concentraciones de *Listeria monocytogenes*.

TESIS

Para optar el título profesional de

**LICENCIADA EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

APROBADO POR EL SIGUIENTE JURADO

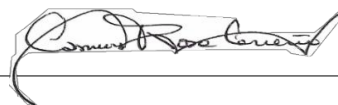
Dra. Gianina Llontop Barandiaran
PRESIDENTA



Dr. Alberto Díaz Zapata
SECRETARIO



Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán
VOCAL



Dra. Graciela Olga Albino Cornejo
ASESORA



LAMBAYEQUE, PERÚ

2023

DEDICATORIA

Este trabajo se lo quiero dedicar en primer lugar a mis padres que con tanto esfuerzo me han apoyado durante mi tiempo como integrante de esta casa de estudios universitarios, dándome valor, fuerza y motivándome para concluir con todo lo que refiere a mi vida profesional.

Dedicárselo también de manera especial a mi asesora, la Dra. Graciela Albino Cornejo, por lo enseñado durante mi tiempo como su estudiante y hasta el término de mi carrera.

Espero que mi desenvolvimiento como profesional sea de beneficio para la sociedad que siempre está necesitando de personas que hagan un mundo mejor con la ciencia como su eje principal.

Anghela Patricia Calderón Jiménez

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer al Laboratorio SINVIOL EIRL por darme la oportunidad de realizar la experimentación de mi proyecto en sus instalaciones y por financiar la investigación mediante la compra de medios de cultivo, reactivos, material de laboratorio y el uso de sus equipos. Además, agradecer al personal del laboratorio que me guiaron e impulsaron para mejorar y obtener buenos resultados durante mi trabajo.

Anghela Patricia Calderón Jiménez

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	13
II.	MARCO TEÓRICO.....	15
2.1.	Antecedentes.....	15
III.	MÉTODOS Y MATERIALES	19
3.1.	Tipo y Diseño de Investigación	19
3.2.	Población, muestra y criterios de investigación	19
3.2.1.	Población.....	19
3.2.2.	Muestra y muestreo	19
3.2.3.	Criterio de selección de la muestra	19
3.3.	Métodos, técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos	19
3.3.1.	Método	19
3.3.2.	Técnicas	20
3.3.3.	Instrumento	20
3.4.	Procedimientos de recolección de datos	20
3.4.1.	Preparación de los medios de cultivo (caldo Fraser, medio Aloa)	20
3.4.2.	Reactivación de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932	21
3.4.3.	Diluciones sucesivas	22
3.4.4.	Tratamiento de las diluciones a diferentes tiempos y temperaturas	24
3.4.5.	Recuento de microorganismos	25
3.4.6.	Procesamiento y análisis de datos	26
IV.	RESULTADOS.....	27
4.1.	Análisis Microbiológico.....	27
4.2.	Análisis Estadístico.....	32
4.2.1.	Contraste de hipótesis.....	32

4.2.1.1. Evaluación en la primera experimentación con los factores de estrés.....	32
4.2.1.2. Evaluación en la segunda experimentación con los factores de estrés	34
4.2.1.3. Evaluación en la tercera experimentación con los factores de estrés	36
 V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES.....	41
VII. RECOMENDACIONES	42
VIII. REFERENCIAS	43
IX. ANEXOS	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Medios de cultivo utilizados y sus suplementos	21
Figura 2: Siembra de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932 en medio Aloa	22
Figura 3. Preparación de la solución madre de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932.....	23
Figura 4. Preparación de diluciones sucesivas 10^{-1} a 10^{-6} de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932 en tubos con agua peptonada.....	23
Figura 5. Siembra de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932 en placas Petri.....	24
Figura 6. Exposición de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932 a diferentes temperaturas (65, 73 y 89°C) y tiempos (3 y 3,5 minutos) en baño maría	25
Figura 7. Crecimiento de colonias de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932 en medio Aloa	27
Figura 8. Pruebas bioquímicas realizadas a la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932.....	27
Figura 9. Crecimiento de colonias de las diluciones 10^{-1} a 10^{-6} de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932 expuestas a diferentes temperaturas (65, 73 y 89°C) y tiempos (3 y 3,5 minutos).....	28
Figura 10. Crecimiento de colonias en medio Aloa de las diluciones de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932 expuestas a las temperaturas de 65°, 73° y 89°C durante 3 y 3.5 minutos.....	30

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Numeración en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932 en diferentes diluciones en las 3 veces que se realizó el experimento.....	29
Tabla 2. Numeración en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932 a temperaturas y tiempos diferentes partiendo de inóculos conocidos obtenidos de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6}	31
Tabla 3. Numeración en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) crecidas a partir de la siembra de un inóculo, en agar Aloa, por cada dilución expuesta a factores de temperatura (65° , 73° y 89° C) y tiempo (3 y 3.5 minutos), en la segunda experimentación	31
Tabla 4. Numeración en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) crecidas a partir de la siembra de un inóculo, en agar Aloa, por cada dilución expuesta a factores de temperatura (65° , 73° y 89° C) y tiempo (3 y 3.5 minutos), en la tercera experimentación	32
Tabla 5. Análisis de las variables en la primera experimentación con los factores de estrés.....	33
Tabla 6. Determinación del modelo de regresión del control de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932	33
Tabla 7. Media de colonias (UFC/ml) presentes en la exposición de temperaturas en la primera experimentación.....	34
Tabla 8. Análisis de las variables en la segunda experimentación	35
Tabla 9. Determinación del modelo de regresión del control de crecimiento de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932	35
Tabla 10. Media de colonias (UFC/ml) presentes en la exposición de temperaturas en la segunda experimentación.....	36
Tabla 11. Análisis de las variables en la tercera experimentación	37

Tabla 12. <i>Determinación del modelo de regresión del control de crecimiento de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> (serotipo 4b) ATCC 13932</i>	37
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabla 13. <i>Media de colonias (UFC/ml) presentes en la exposición de temperaturas en la tercera experimentación</i>	38
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. <i>Matriz de operacionalización</i>	46
Anexo 2. <i>Instrumento de recolección de datos</i>	47

RESUMEN

La investigación se desarrolló en base a la necesidad de controlar el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. La metodología fue de tipo experimental factorial, con una población representada por la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932, en donde se tomó como muestra no probabilística las concentraciones de 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 , teniendo como variables de estudio el tiempo de 3 y 3,5 minutos y las temperaturas de 65, 73 y 89°C, haciéndose 3 repeticiones del experimento. Los medios de cultivo selectivo empleados fueron Caldo Fraser y Medio Aloa.

El método de estudio fue hipotético deductivo, con el empleo de la técnica de la observación, anotación y comparación de los resultados. Se observó el control de crecimiento que tienen estas variables al incidir sobre las concentraciones de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932. Una vez obtenidos estos resultados se procesaron los datos por medio del software estadístico SPSS V 26.00. Como resultado, se obtuvo una disminución del patógeno a una temperatura de 89°C durante un tiempo de exposición de 3 a 3,5 minutos, dando una posible solución con una alta temperatura a las industrias alimentarias.

Palabras clave: temperatura, crecimiento, concentraciones, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

The research was developed based on the need to control the proliferation of *Listeria monocytogenes*. The methodology was of a factorial experimental type, with a population represented by the strain *Listeria monocytogenes* (serotype 4b) ATCC 13932, where concentrations of 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 were taken as a non-probabilistic sample, having as study variables the time of 3 and 3.5 minutes and temperatures of 65, 73 and 89°C, making 3 repetitions of the experiment. The selective culture media used were Fraser Broth and Aloa Medium.

The study method was hypothetical deductive, with the use of the observation technique, annotation and comparison of the results. The growth control that these variables have when influencing the concentrations of the *Listeria monocytogenes* strain (serotype 4b) ATCC 13932 was observed. Once these results were obtained, the data was processed using the statistical software SPSS V 26.00. As a result, a decrease in the pathogen was obtained at a temperature of 89°C during an exposure time of 3 to 3.5 minutes, giving a possible solution with a high temperature to the food industries.

Keywords: temperature, growth, concentrations, *Listeria monocytogenes*.

I. INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es una bacteria bacilar Gram positiva anaerobio facultativa, de tipo intracelular y no esporulante, causante de la listeriosis, la cual puede ser contraída por la ingesta de alimentos con elevada carga bacteriana (Vásquez, Biminchumo, Villareal y Silva, 2020). Ésta es considerada como un patógeno de alto riesgo, debido a que cuenta con la característica de sobrevivir y multiplicarse en condiciones ambientales de alta restricción, en relación con otras especies bacterianas (Alonso, 2018).

La bacteria se ha logrado aislar de plantas de procesamiento de alimentos, heces de animales y suelo. Las buenas prácticas de fabricación y las leyes de seguridad alimentaria han ayudado a reducir la incidencia de listeriosis; sin embargo, aproximadamente 1500 infecciones y 255 muertes todavía ocurren anualmente. Exhibe una tasa de mortalidad particularmente alta en individuos con sistemas inmunológicos comprometidos y lo que resulta en un aumento de los abortos en mujeres embarazadas (Yao et al., 2018).

Los problemas por presencia de *L. monocytogenes* en el sector alimentario se ha dado en diferentes regiones del mundo, como el brote en Austria y Alemania en quesos durante el 2009, Inglaterra en el 2011 por quesos también, en EE. UU por una variedad de melón en el 2011 (Orihuel, Bertó, Canet y Lorenzo, 2012).

En Ica se realizó un estudio de tipo descriptivo y transversal para determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en 74 muestras de quesos frescos, provenientes de 4 mercados diferentes, de las cuales tres resultaron positivas. Una muestra positiva correspondió al mercado Alejandro Toledo y las otras dos muestras, al mercado Modelo. Debido a que en éste el queso es almacenado junto con embutidos, puede ocasionar una contaminación cruzada (Espinoza, De La Torre, Salinas y Sánchez, 2004).

En Trujillo llevaron a cabo un estudio en el que analizaron 60 muestras de quesos y leche fresca de mercados y establos para la identificación de *Listeria monocytogenes*, a través de la identificación de la bacteria con pruebas bioquímicas, dando como resultado que el 3.34% de *Listeria monocytogenes* estuvo presente en las muestras de quesos, mientras que en la leche fresca no hubo identificación de este patógeno (Díaz, Chávez y Saucedo, 2012).

Las cepas aisladas pueden ser introducidas en las plantas industriales en algún punto de la cadena de producción de alimentos, formando en algunos casos biofilms, lo cual las vuelve resistentes a procesos de desinfección y de peligro en aquellos alimentos que no son cocinados (Orihuel et al., 2012). *Listeria monocytogenes*, puede sobrevivir a una amplia gama de temperaturas, incluida la refrigeración, se encuentra en carnes, cremas para untar y quesos, así como en leche cruda y productos lácteos. Se inactiva por cocción y pasteurización; sin embargo, si no se practican procedimientos de saneamiento adecuados, el riesgo de infección para el público a través del procesamiento de alimentos puede provocar enfermedades (Yao et al., 2018).

La pasteurización es un proceso térmico relativamente suave (temperaturas menores a 100°C) cuyo objetivo es el exterminio parcial de la flora acompañante y total de la flora patógena, además de inactivar enzimas perjudiciales y prolongar de esta manera la vida útil de los alimentos sin dañar su composición (Encina, Bernal y Rojas, 2013).

De ahí que, la presente investigación haga referencia a altas temperaturas que se usan para pasteurizar frutas y hortalizas, aplicando en condiciones de laboratorio 3 diferentes temperaturas a determinadas concentraciones de la cepa y en 2 diferentes tiempos, con la finalidad de determinar a qué temperatura y tiempo se logra controlar el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Por consiguiente, se ha planteado como objetivo principal determinar el efecto de las temperaturas 65, 73 y 89°C durante 3 y 3,5 minutos en el control de *Listeria monocytogenes* a concentraciones obtenidas de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} . Para ello, se confirmó la identificación de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932, aplicando la ISO 11290-1: 2017. Además, se determinó el crecimiento de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 en las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} . Asimismo, se expusieron las diferentes concentraciones de *L. monocytogenes* a las temperaturas de 65, 73 y 89°C durante 3 y 3,5 minutos en Baño maría.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Listeria monocytogenes se aisló inicialmente en Reino Unido en 1926. Primero se llamó *Bacterium monocytogenes* después de que ocurrieron muertes en muchos conejos debido al aumento de monocitos en la sangre. *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir a una amplia gama de temperaturas, incluida la refrigeración, y se encuentra en carnes, cremas para untar y quesos, así como en leche cruda y productos lácteos. La bacteria se ha aislado de plantas de procesamiento de alimentos, heces de animales y suelo (Yao et al., 2018).

La temperatura es un factor clave para ralentizar o aumentar el crecimiento de bacterias en las superficies de los productos frescos. El principal problema con el uso de la temperatura como control es que las bacterias no se reducen por la baja temperatura; simplemente se ven forzadas a un estado latente. Los patógenos como *Listeria monocytogenes* son capaces de crecer a temperaturas de refrigeración, esto junto con el proceso de maduración por la producción de etileno y también el daño tisular causado por las bajas temperaturas, hace que las contaminaciones sean más fáciles de ocurrir. Incluso a pesar de que algunas frutas y verduras poseen pH ácidos, el microorganismo es capaz de superar esa barrera (Ibarra, Van Tasell y Miller, 2017).

La tolerancia al calor en *L. monocytogenes* ocurre de una manera específica de la cepa. Además, la exposición a otros factores estresantes/condiciones antes del tratamiento con calor también puede contribuir a la tolerancia al calor. Por ejemplo, se analizó el impacto de la temperatura y la atmósfera en la cinética de crecimiento; las condiciones anaeróbicas promovieron mejores tasas de crecimiento. Otro estudio también indicó que la resistencia al calor era más alta en condiciones anaeróbicas. Estos datos indican que las condiciones anaeróbicas ayudan a mejorar la tolerancia al calor (Oliveira et al., 2018).

Listeria monocytogenes se encuentra fácilmente en la leche cruda y muchos otros productos refrigerados, es por ello importante considerar el proceso de pasteurización. En este proceso se aplica una temperatura alta que oscila entre 63 y 80°C durante 16 a 30 minutos, dependiendo del tipo de alimento, para destruir cualquier patógeno. Para soportar la pasteurización *Listeria* debería ser capaz de tolerar altas temperaturas, sin embargo, la Administración de Alimentos y Medicamentos y el Departamento de

Agricultura de los Estados Unidos han publicado que *Listeria* no puede soportar ni siquiera su pasteurización mínima a 63 °C durante 30 minutos. Entonces, ¿por qué se piensa que *L. monocytogenes* puede soportar la pasteurización? (Nol, Kleta y Al, 2018).

Roberts, Chakravarty, Gardner, Ricker y Donaldson (2020) indican que podría deberse al hecho de que la resistencia al calor puede verse alterada por varias circunstancias, incluyendo el tiempo, la temperatura, el choque térmico subletal, la falta de glucosa y el peróxido de hidrógeno. De los elementos enumerados anteriormente, la inanición de glucosa, el hidróxido en peróxido y el choque térmico subletal conducen a la expresión de proteínas de choque térmico, que se ha encontrado que son un factor importante en la termo-tolerancia bacteriana. El peróxido de hidrógeno y el superóxido también son críticos para la restauración de las bacterias dañadas por el calor.

En base a un estudio realizado por Knabel, Walker, Hartman y Mendonca, para determinar si un choque térmico subletal a 43 °C podría aumentar la resistencia térmica del patógeno, los resultados indicaron que *L. monocytogenes* podría sobrevivir a las altas temperaturas durante largos períodos requeridos para la pasteurización. La incubación en condiciones anaeróbicas aumentó la resistencia térmica cuando se selló en tubos, pero no en medios sólidos. El estudio indica que el O₂ molecular fue responsable de la recuperación de células gravemente lesionadas por calor (como se citó en Roberts et al., 2020).

Alonso (2018), en España, determinó los métodos de detección y control de *Listeria monocytogenes*, en la industria alimentaria. La metodología se caracteriza por ser de diseño no experimental, en donde se contó con la búsqueda de evaluación de las condiciones actuales en las que se ha desarrollado la bacteria expuesta, recolectando los datos por medio de fichas documentales sobre la detección y control del patógeno *Listeria monocytogenes* y a su vez lo divide en 3 dimensiones: física, química y biológica. En el control físico resalta el control con buenos resultados como la mezcla de azúcar y vinagre, además de la aplicación de dióxido de carbono en suspensiones bacterianas obtenidas de diferentes orígenes como corrales de algunos animales y de pacientes directamente. Por otro lado, en el control químico como el uso de nisina la cual está aprobada para ser inoculada en alimentos de acuerdo a la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), mientras que el control biológico se usa en diferentes investigaciones a bacteriófagos como medio para disminuir la población de colonias de bacterias de *Listeria monocytogenes*.

Garre (2018), en Cartagena, se planteó como objetivo general, el analizar la inactivación de *Listeria monocytogenes*, por medio de la exposición hacia condiciones isotérmicas dentro de un entorno de alta acidez. La metodología se caracterizó por haber sido de diseño experimental, en donde se evaluó al calor como elemento para reducir la proliferación de *Listeria monocytogenes*, recolectando los datos por medio de las fichas experimentales. Los resultados demostraron una reducción significativa ante la exposición de medios con alta acidez durante un tiempo de exposición prolongado. Se ha concluido que, la modelización de las curvas de supervivencia y termo destrucción, en base a modelos de Bigelow y Mafart, han permitido que se pueda establecer la construcción de una herramienta computacional de inactivación (Garre, 2018).

Ripollés (2018), en Barcelona, planteó como objetivo general analizar la supervivencia de *Listeria monocytogenes*, en cuanto a una superficie de contacto con alimentos, tomando como referencia el abordaje multidisciplinar de un problema de alta complejidad. La metodología se caracterizó por haber sido de tipo analítica, en donde la investigación fue longitudinal, a consecuencia de que se analizó una serie de indagaciones que han permitido exponer la evaluación de la mortalidad de la transmisión alimentaria. Así mismo, los resultados señalaron que, ha existido un alto nivel de importancia, en relación con el control de biofilms dentro de la industria alimentaria, evidenciando de esta forma que este medio de solución ha sido implementado principalmente por la industria cárnica, a consecuencia de que se ha basado en una serie de sensores, con la finalidad de poder demostrar el nivel bacteriológico encontrado. Se concluyó que, los métodos que se han encontrado basados en el recuento de placa y tiempo han alcanzado varianzas regulares y un valor de significancia de menor a 0.050, evidenciando de esta forma, la eficacia del mismo (Ripollés, 2018).

Ovissipour, Shiroodi, Rasco, Tang y Sablani (2018) realizaron un estudio para controlar a *Listeria monocytogenes* a través de la aplicación de diferentes aguas electrolizadas: ácida y neutra junto a la exposición de diferentes temperaturas de 50°, 55°, 60° y 65 ° C con tiempos de exposición de 2, 6 y 10 minutos, además las muestras del patógeno se encontraban sobre filete de salmón. Los autores lograron mostrar la reducción bacteriana a través de las diferentes exposiciones de tiempo y temperatura, logrando obtener la máxima reducción de colonias bacterianas del patógeno con la temperatura de 65° en 10 minutos con el uso del agua electrolizada neutra, indicando que

estos factores aplicados no afectan a las características organolépticas del producto de salmón.

Ro et al. (2018) basaron su investigación en inocular $2,0 \pm 0,5$ log UFC/g de *Listeria monocytogenes* en raviolos de espinaca y alcachofa para observar si podría realizarse un control con la aplicación de una mezcla de vinagre con azúcar (CSV) con concentraciones de 0.1%, 0.3%, 0.5%, 1% y nisina con una concentración de 0.1%, 0.2%, 0.3 % con una temperatura de almacenamiento de 4°C, 10°C, 17°C y 24° C durante 60 días. Dando como resultado un control eficaz con una concentración de CSV al 1% o con nisina al 0.3% a una temperatura menor a 10°C, además se aplicó un análisis sensorial para determinar si las concentraciones de CSV y nisina afectaban las características organolépticas de los raviolos, sin embargo, no afectó ni cambio su sabor, ni olor, ni color, por lo que la aplicación de la mezcla de azúcar y vinagre (CSV) o de nisina hace que el control con un antimicrobiano natural sea adecuado para el control del patógeno *Listeria monocytogenes* sin que afecte al producto alimenticio.

Park y Kang (2018) indicaron en su estudio en el cual la temperatura influiría o no en el efecto antimicrobiano del dióxido de cloro como control en de *Listeria monocytogenes* en superficies de contacto con el patógeno inoculado como tomate y espinaca, fue así que fueron expuestos controlando las temperaturas de 15°C y 25°C en cámaras de tratamiento con una humedad de 11 a 12 g/m³. Como resultados obtuvieron una mejor inactividad de *Listeria monocytogenes* a una temperatura de 15° por 20 minutos ($p < 0.005$) dando así un nuevo método de control del patógeno.

III. MÉTODOS Y MATERIALES

3.1 Tipo y Diseño de Investigación

El tipo y diseño de investigación en el presente proyecto fue experimental factorial. Se incluyeron como variables en el estudio: tiempo, temperatura en °C, concentración y repeticiones del experimento, que tuvieron incidencia sobre el control de crecimiento de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 (Jiménez, Gómez, Puerta y Jiménez, 2019).

3.2. Población, muestra y criterios de investigación

3.2.1. Población:

Diferentes concentraciones de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932.

3.2.2. Muestra y muestreo:

La muestra tomada fue de tipo no probabilística, es decir, ha sido seleccionada de acuerdo a las características y objetivos de la investigación, más que por un criterio estadístico (Hernández, Fernández y Baptista, 2018).

3.2.3. Criterios de selección de la muestra:

Se tomó la muestra no probabilística de acuerdo a los criterios en la investigación y a la decisión del investigador, seleccionando las diluciones de 10^{-3} a 10^{-6} de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932. Debido a que se hacía más factible el estudio del control con menor concentración de microorganismos.

3.3. Métodos, técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos

3.3.1. Método:

Se contó con el empleo del método hipotético deductivo, en donde se estableció como hipotético debido a que se expusieron diferentes teorías relacionadas con las variables de estudio, en donde se realizaron supuestos acerca de estos mismos. Mientras que, se contó con el método deductivo debido a que se incurrirá en la reducción del nivel de complejidad de la problemática en estudio, en base a la exposición de objetivos específicos (Hernández, Fernández y Baptista, 2018).

3.3.2. Técnicas:

Se contó con el uso de la técnica de observación, la cual requirió el uso de un cuestionario, con la finalidad de establecer la oportuna recolección de información, en base a la consigna de fichas de observación o bien conocidas como fichas experimentales (Anexo 1) (Hernández, Fernández y Baptista, 2018). Además, se consideraron factores como: la obtención de la cepa *Listeria monocytogenes*, diluciones sucesivas, siembra en profundidad y la estimación del valor D de las bacterias sobrevivientes.

3.3.3. Instrumento:

Se consideró el uso del instrumento ficha de observación o ficha experimental, permitiendo de esta forma, el desarrollo de la experimentación y la recolección de los datos obtenidos en campo, con lo cual se pudo validar la hipótesis planteada y responder a los objetivos establecidos (Hernández, Fernández y Baptista, 2018).

3.4. Procedimientos de recolección de datos:

3.4.1. Preparación de los medios de cultivo (caldo Fraser, medio Aloa):

Se realizó en base a la ISO 11290-1: 2017, preparándose los medios selectivos Fraser y Aloa para trabajar con la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932. Los medios fueron pesados en balanza analítica y disueltos con agua destilada, una vez autoclavados y a temperatura de 45°, se procedió a agregar los respectivos suplementos en un ambiente estéril dentro de la cabina de bioseguridad.

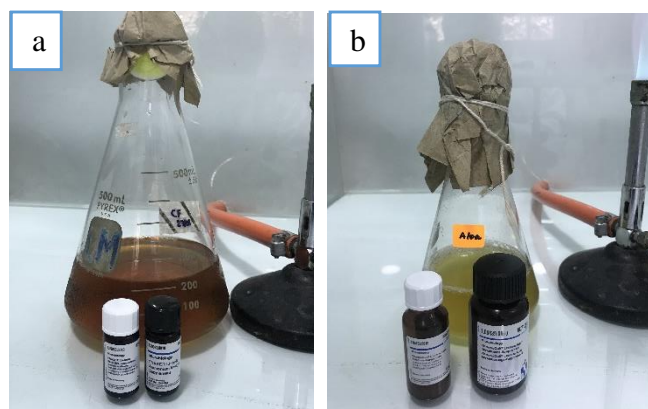
El caldo Fraser es considerado como un medio de enriquecimiento selectivo para *Listeria monocytogenes*, puesto que este medio inhibe microbiota gramnegativa, dado que contiene ácido nalidíxico, acriflavina y cloruro de litio (Giraldo, Aguilera, Urbano, Pedraza y Jaimes, 2020). El suplemento de enriquecimiento y el suplemento selectivo que se agregan al caldo Fraser tienen la finalidad de poder mantener nuestra solución madre durante más tiempo y nuestras diluciones libres de microflora acompañante (Figura 1).

El medio Aloa se basa en tres características bioquímicas, tales como: la expresión de una fosfolipasa, que es la responsable de un halo de opacidad que se forma alrededor de las colonias; así como, la expresión de la betaglucosidasa, mediante el uso del sustrato cromogénico, permite una coloración azul-verde de las colonias

características. Mientras la fermentación de la ramnosa, que, junto a un indicador de color, da una zona de viraje al amarillo alrededor de las colonias típicas (García, Gil y Botero, 2018). Estas características se basan en el suplemento de enriquecimiento y el suplemento selectivo que se le agregan al medio Aloa (Figura 1).

Figura 1

Medios de cultivo utilizados y sus suplementos



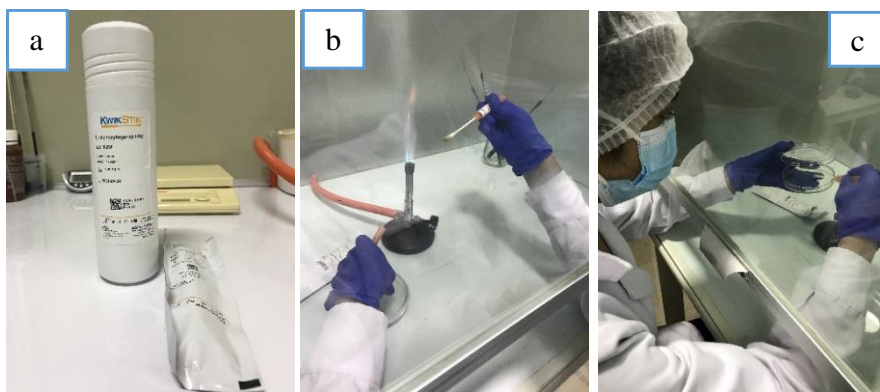
Nota. **a.** Caldo Fraser suplementado con Suplemento para enriquecimiento selectivo según 1/2 Fraser y Suplemento selectivo para Fraser, y **b.** Medio Aloa suplementado con Suplemento de enriquecimiento para Agar Listeria ChromoCult y Suplemento selectivo para Agar Listeria ChromoCult.

3.4.2. Reactivación de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932:

Se realizó una prueba de pureza sembrando la cepa madre en placa con medio Aloa, para observar las colonias características y el halo que forma *Listeria monocytogenes* (Figura 2). Además, una prueba de viabilidad considerando Catalasa (+), Ramnosa (+), Xilosa (-) y beta hemólisis (Figura 8).

Figura 2

Siembra de la cepa Listeria monocytogenes (serotipo 4b) ATCC 13932 en medio Aloa



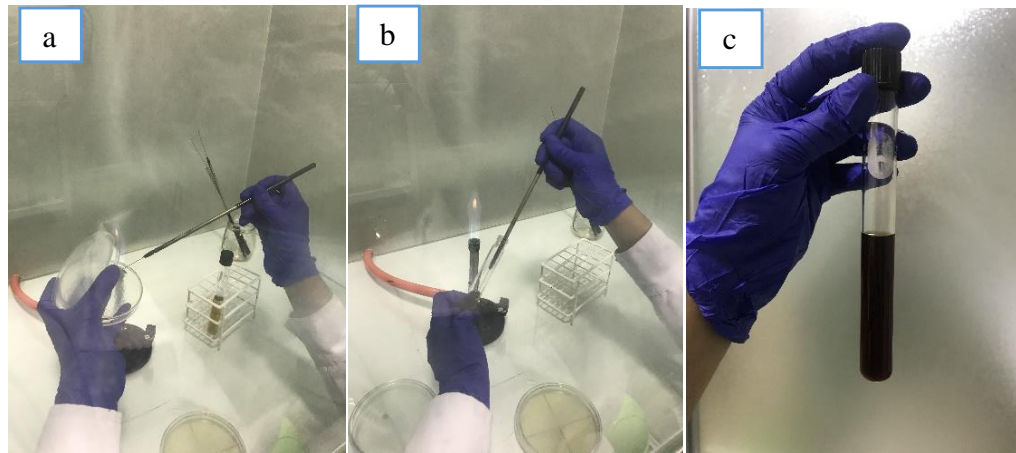
Nota. a. Cepa liofilizada en una ampolla de fluido hidratante e hisopo de inoculación. *b, c.* Siembra de la cepa en una placa con medio Aloa.

3.4.3. Diluciones sucesivas:

- Se tomó una colonia con el asa microbiológica y homogeneizó en 10ml de caldo Fraser en un Tubo de dilución. Se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h. De este modo se obtuvo la solución madre (Figura 3).
- Se transfirió 1ml de la solución madre a otro Tubo de dilución con 9ml de agua peptonada y obtuvimos la dilución 10^{-1} . Así se pasó 1ml de tubo en tubo hasta obtener la dilución 10^{-6} . Y se llevaron los tubos al vórtex para homogeneizar por completo las diluciones (Figura 4).
- Se transfirió 1ml por cada dilución de los tubos a placas Petri, se les agregó medio Aloa y se llevaron a incubación a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Con el objetivo de saber cuántos microorganismos hay en cada dilución, se contaron las colonias crecidas después de la incubación (Figura 5).

Figura 3

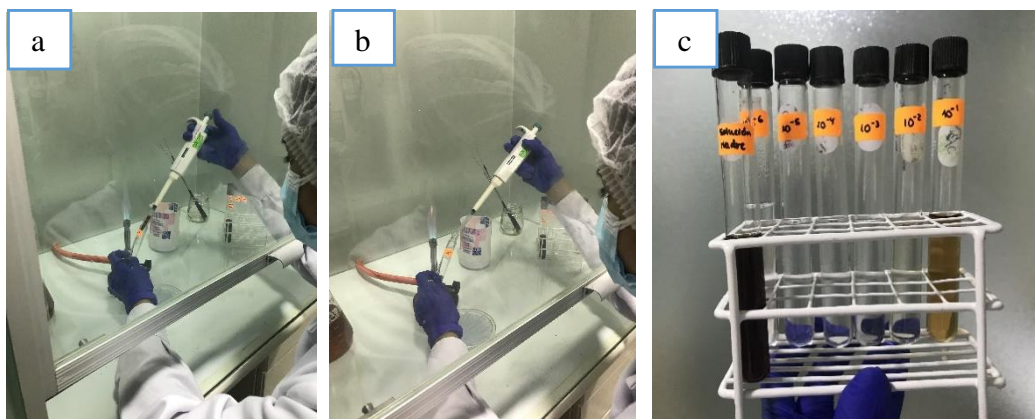
Preparación de la solución madre de la cepa Listeria monocytogenes (serotipo 4b) ATCC 13932



Nota. a, b. Siembra de una colonia de la placa con la cepa a un tubo con 10 ml de caldo Fraser. c. Crecimiento de la cepa en el caldo Fraser tornándose de un color oscuro.

Figura 4

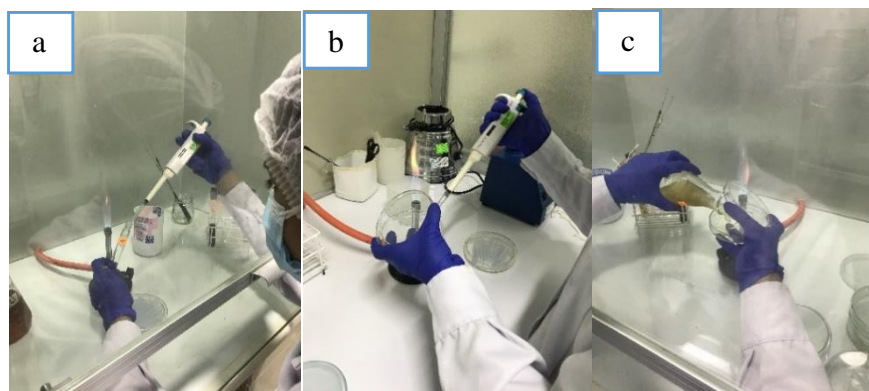
Preparación de diluciones sucesivas 10^{-1} a 10^{-6} de la cepa Listeria monocytogenes (serotipo 4b) ATCC 13932 en tubos con agua peptonada



Nota. a, b. Transferencia de 1ml de la solución madre a 9 ml de agua peptonada para obtener la primera dilución. c. Diluciones de la cepa desde 10^{-1} a 10^{-6} .

Figura 5

*Siembra de las diluciones 10^{-1} a 10^{-6} de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 en placas Petri*



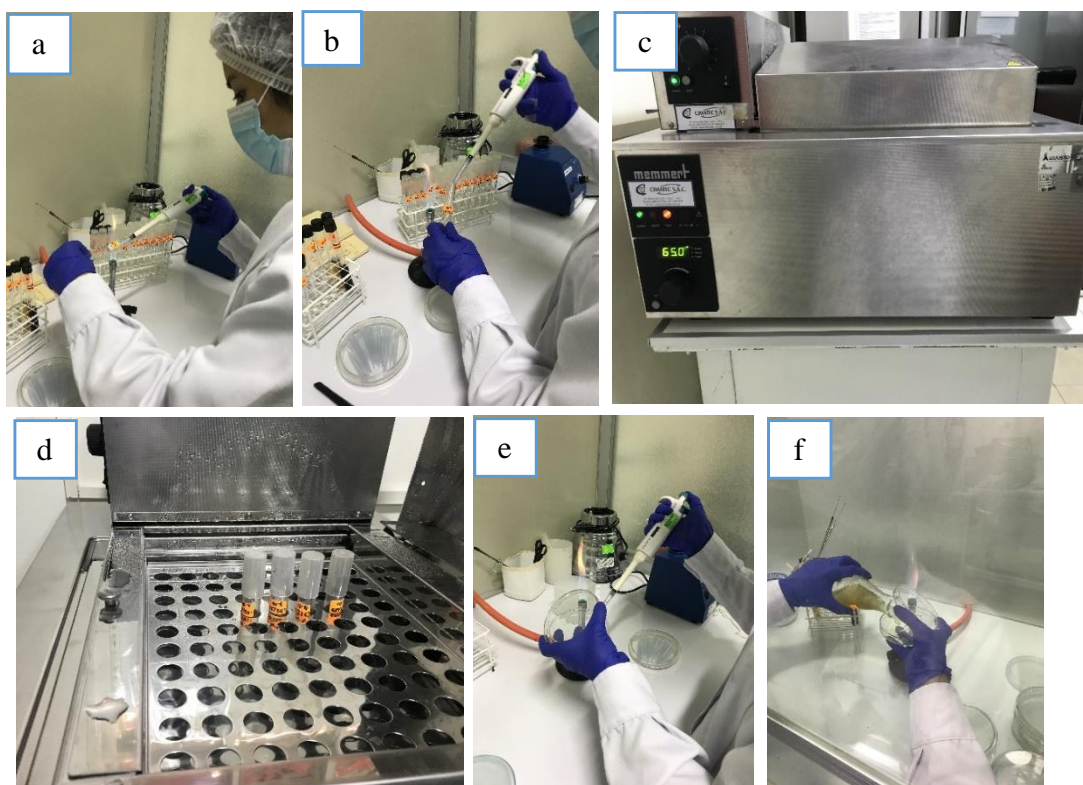
Nota. a, b. Transferencia de 1ml por cada dilución 10^{-1} a 10^{-6} a placas Petri. *c.* Medio Aloa servido en placas Petri por cada dilución para ser llevado a incubación a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

3.4.4. Tratamiento de las diluciones a diferentes tiempos y temperaturas:

- De las diluciones realizadas se tomaron como muestra a las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} y se transfirió 1ml de cada dilución a seis tubos, rotulándolos de acuerdo a la temperatura y tiempo a los que fueron expuestos.
- Se llevaron a baño maría la primera serie de tubos a una temperatura de 65°C por 3 minutos y pasado el tiempo se colocaron otra serie de tubos a la misma temperatura por 3,5 minutos.
- Luego se colocaron otra serie de tubos a una temperatura de 73°C por 3 minutos y pasado el tiempo se colocaron otra serie de tubos a la misma temperatura por 3,5 minutos.
- Finalmente se colocó la última serie de tubos a una temperatura de 89°C por 3 minutos y pasado el tiempo colocaron otra serie de tubos a la misma temperatura por 3,5 minutos.
- Se transfirió el inóculo sobre placas Petri con medio Aloa y luego se llevaron las placas a incubación a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h (Figura 6).
- La experimentación se llevó a cabo tres veces, teniendo tres lotes de diluciones que serán expuestas a los parámetros de estudio: temperatura (65 , 73 y 89°C) y tiempo (3 y 3,5 minutos).

Figura 6

*Exposición de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 a diferentes temperaturas (65, 73 y 89°C) y tiempos (3 y 3,5 minutos) en baño maría*



Nota. a, b. Transferencia de 1 ml de cada dilución en seis tubos, que fueron expuestos a los parámetros de temperatura y tiempo. *c, d.* Exposición de los tubos con las diluciones a los parámetros de temperatura y tiempo en baño maría. *e, f.* Transferencia de 1 ml de cada dilución expuesta a los parámetros de temperatura y tiempo a placas Petri estériles, agregándoseles medio Aloa.

3.4.5. Recuento de microorganismos

Se contaron las colonias de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 crecidas en los medios, sobrevivientes a los parámetros expuestos. Y se apuntaron los resultados en UFC (Unidades Formadoras de Colonias) /ml (mililitros del caldo Fraser) (Anexo 2).

3.4.6. Procesamiento y análisis de datos

En cuanto al procesamiento y análisis de datos estadístico, se contó con el empleo de la estadística descriptiva e inferencial, entendiendo con que el primero de los mencionados tendrá garantías de caracterizar a las variables de estudio, en concordancia con la exposición de información por medio de tablas de frecuencia y gráficos de barras. Mientras que, se contó con el empleo de la estadística inferencial con la intención de determinar el coeficiente de correlación de Chi cuadrado, en donde se podrá validar la existencia de la hipótesis alternativa (H_a), con un valor de sigma inferior a 0.050, procesando los datos por medio del software estadístico SPSS V 26.00.

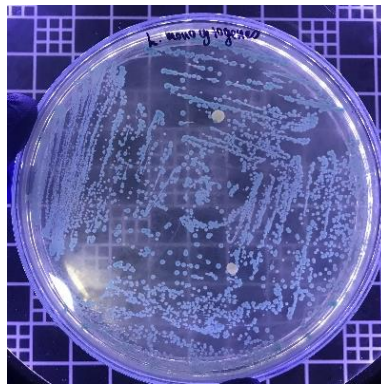
IV. RESULTADOS

4.1. Análisis Microbiológico

En la primera parte de esta investigación, se confirmó la pureza y viabilidad de la cepa a través de su siembra en medio Aloa, pruebas bioquímicas de Ramnosa (+) y Xilosa (-), y la formación de una hemólisis total rodeada de un halo transparente característicos de la beta hemólisis que produce la bacteria en agar sangre. Lo cual puede ser apreciado en las Figuras 7 y 8.

Figura 7

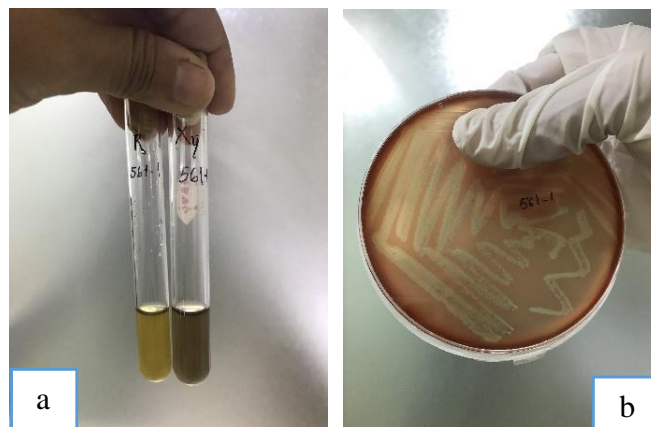
Crecimiento de colonias de la cepa Listeria monocytogenes (serotipo 4b) ATCC 13932 en medio Aloa para la confirmación de su identificación



Nota. Se puede observar las colonias verde-azuladas rodeadas de un halo opaco.

Figura 8

Pruebas bioquímicas realizadas a la cepa Listeria monocytogenes (serotipo 4b) ATCC 13932

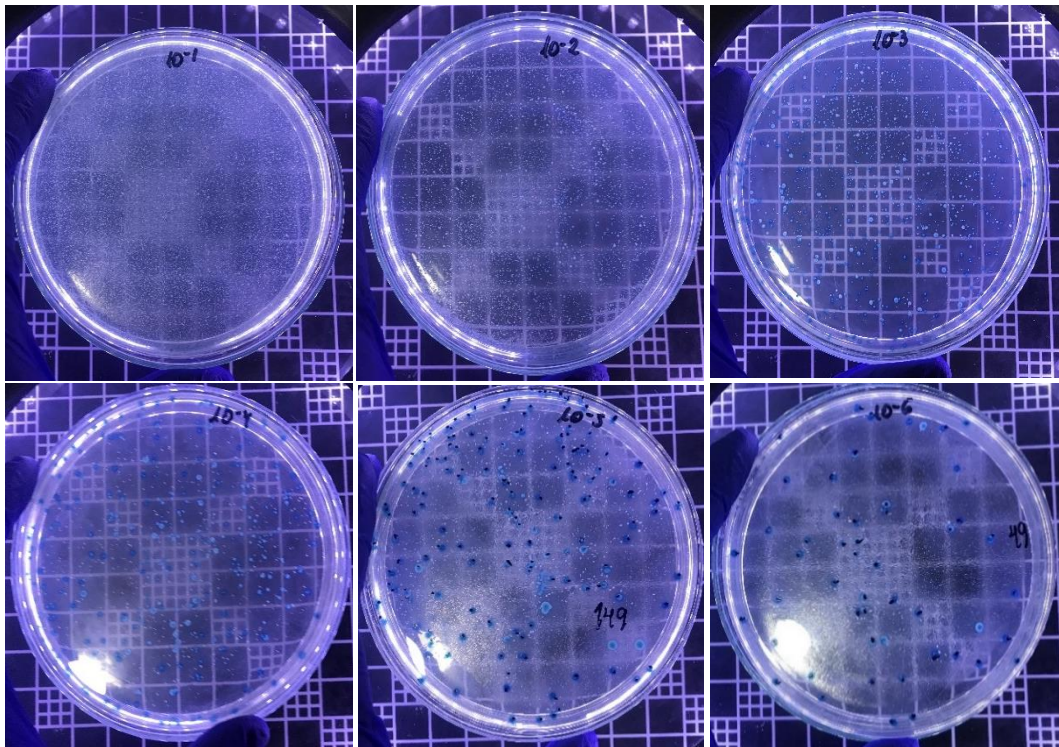


Nota. **a.** Ramnosa (+), Xilosa (-) y **b.** Beta hemólisis en una placa con agar sangre.

Posteriormente, se obtuvo la concentración de las diluciones 10^{-1} a 10^{-6} de la cepa mediante el crecimiento y cuantificación de las colonias crecidas en incubación a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h en el medio Aloa, antes de cada experimentación de las diluciones con los parámetros de temperatura y tiempo. Lo cual se ilustra en la Figura 9 y con los datos obtenidos, se analizan en la Tabla 1.

Figura 9

*Crecimiento de colonias de las diluciones 10^{-1} a 10^{-6} de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC*



Nota. Se puede observar que a mayor dilución, menos crecimiento de colonias en el medio.

Tabla 1

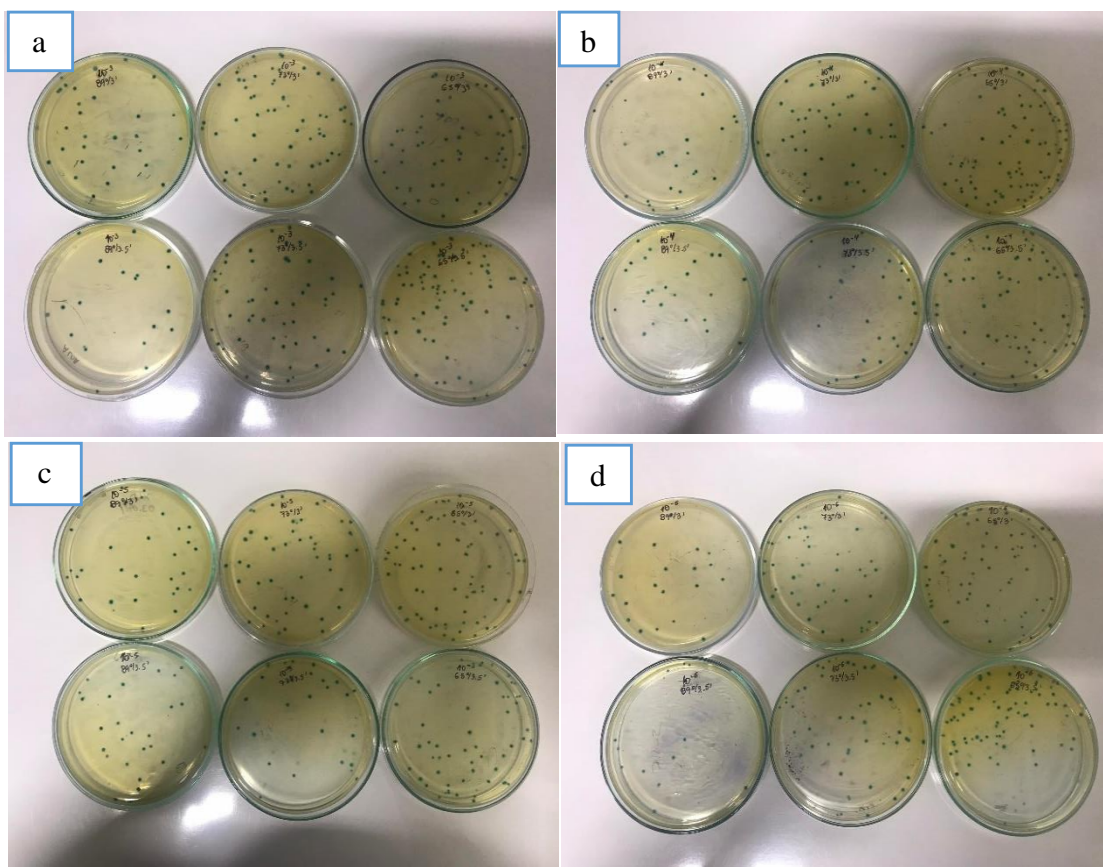
Numeración en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de la cepa Listeria monocytogenes (serotipo 4b) ATCC 13932 en diferentes diluciones 10^{-1} a 10^{-6} en las 3 veces que se realizó el experimento

N° de veces	Inóculo	Diluciones ufc/ml					
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Primera	49×10^6	Incontables	Incontables	608	294	149	49
Segunda	154×10^6	Incontables	Incontables	703	315	254	154
Tercera	244×10^6	Incontables	Incontables	834	455	412	244

Teniendo los datos de las concentraciones se eligieron las cuatro diluciones contables 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , y a partir de ellas se obtuvieron los resultados de las tres experimentaciones con los parámetros de las temperaturas 65, 73 y 89°C durante 3 y 3,5 min. Estos resultados los observamos en la Figura 10 y se analizan en las Tablas 2, 3 y 4.

Figura 10

Crecimiento de colonias en medio Aloa de las diluciones de la cepa Listeria monocytogenes (serotipo 4b) ATCC 13932 expuestas a las temperaturas de 65°, 73° y 89°C durante 3 y 3.5 minutos



Nota. **a.** dilución 10^{-3} , **b.** dilución 10^{-4} , **c.** dilución 10^{-5} y **d.** dilución 10^{-6} .

Tabla 2

Numeración en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de la cepa Listeria monocytogenes (serotipo 4b) ATCC 13932 a temperaturas y tiempos diferentes partiendo de inóculos conocidos obtenidos de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6}

Temperatura y Tiempo Inóculos (UFC/ml)	65°C		73°C		89°C	
	3min.	3,5min	3min	3,5min	3min	3,5
608	83	75	58	52	45	33
294	76	69	52	45	30	19
149	71	63	49	42	28	18
49	65	60	43	39	21	15

Tabla 3

Numeración en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) crecidas a partir de la siembra de un inóculo, en agar Aloa, por cada dilución expuesta a factores de temperatura (65°, 73° y 89° C) y tiempo (3 y 3.5 minutos), en la segunda experimentación

Temperatura y Tiempo Inóculos (UFC/ml)	65°C		73°C		89°C	
	3	3,5	3	3,5	3	3,5
703	173	165	159	155	143	136
315	167	156	143	132	122	109
254	160	147	139	125	105	94
154	138	114	96	90	85	74

Tabla 4

Numeración en unidades formadoras de colonias (UFC/ml) crecidas a partir de la siembra de un inóculo, en agar Aloa, por cada dilución expuesta a factores de temperatura (65°, 73° y 89° C) y tiempo (3 y 3.5 minutos), en la tercera experimentación

Temperatura y Tiempo Inóculos (UFC/ml)	65°C		73°C		89°C	
	3	3,5	3	3,5	3	3,5
834	263	252	241	234	226	213
455	256	243	233	221	215	197
412	250	245	229	221	215	208
244	239	224	213	204	193	171

4.2. Análisis estadístico

4.2.1. Contraste de hipótesis

H₁: La incidencia de las temperaturas 65, 73 y 89°C durante 3 y 3,5 minutos controlará el crecimiento de las diferentes concentraciones de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932.

4.2.1.1. Evaluación en la primera experimentación con los factores de estrés

Con la tabla 5 de ANOVA mediante el uso de experimentos factoriales, los datos nos dan evidencia que los factores: temperatura, tiempo y concentraciones) influyen significativamente en el control de *Listeria monocytogenes* siendo sus p valor menores a 0.05, además, la interacción entre temperatura y concentraciones influyen significativamente, sin embargo la interacción tiempo y concentraciones no influyen, por lo tanto, no se rechaza la hipótesis planteada, es decir, si existe efecto entre la temperatura que permitirá controlar el crecimiento respecto a las diferentes concentraciones de *Listeria monocytogenes*, además se analizan los coeficientes de determinación que se describe en la Tabla 6.

Tabla 5

Análisis de las variables en la primera experimentación con los factores de estrés

Fuente de variabilidad	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	364086,679	19	19162,457	8516,647	,000
Intersección	310567,367	1	310567,367	138029,941	,000
Temperatura	7790,583	2	3895,292	1731,241	,000
Tiempo	345,042	1	345,042	153,352	,000
Concentraciones	104315,449	3	34771,816	15454,141	,000
Temperatura * Concentraciones	52,083	6	8,681	3,858	,041
Tiempo * Concentraciones	13,458	3	4,486	1,994	,194
Error	18,000	8	2,250		
Total	545069,000	28			
Total corregido	364104,679	27			

Nota: Evaluado con ANOVA.

De la tabla 6 se observó que, las temperaturas, tiempo y las concentraciones explican el control de crecimiento de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 en 100.0%, es decir, el ajuste es muy bueno.

Tabla 6

Determinación del modelo de regresión del control de crecimiento de Listeria monocytogenes (serotipo 4b) ATCC 13932

Coeficiente de determinación (R^2)	Coeficiente de determinación ajustado (R_{aj}^2)
100,0%	100,0%

De la tabla 7 se observó que, mediante la prueba Tukey los datos nos dan evidencia con un nivel de significancia al 5% que, existe diferencias entre las cuatro temperaturas respecto al crecimiento de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932, además visualizando que la temperatura a 89°C tiene un control promedio mejor que las temperaturas a 73°C, 65°C y temperatura control 37°C.

Tabla 7

Media de colonias (UFC/ml) presentes en la exposición de temperaturas en la primera experimentación

Temperaturas	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
89°C	8	26,1250			
73°C	8		47,5000		
65°C	8			70,2500	
37°C	4				275,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Nota: Evaluado con Tukey

4.2.1.2.Evaluación en la segunda experimentación con los factores de estrés

Con la tabla 8 de ANOVA mediante el uso de experimentos factoriales, los datos nos dan evidencia que los factores (temperatura, tiempo y concentraciones) influyen significativamente en el control de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 siendo sus p valor menores a 0.05, además, la interacción entre temperatura y concentraciones influyen significativamente, sin embargo la interacción tiempo y concentraciones no influyen, por lo tanto, no se rechaza la hipótesis planteada, es decir, si existe efecto entre la temperatura que permitirá controlar el crecimiento respecto a las diferentes concentraciones de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932, además se analizan los coeficientes de determinación que se describe en la Tabla 9.

Tabla 8*Análisis de las variables en la segunda experimentación*

Fuente de variabilidad	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	365767,000	19	19250,895	2701,880	,000
Intersección	888844,903	1	888844,903	124750,162	,000
Temperatura	8842,750	2	4421,375	620,544	,000
Tiempo	715,042	1	715,042	100,357	,000
Concentraciones	140244,056	3	46748,019	6561,125	,000
Temperatura * Concentraciones	717,583	6	119,597	16,786	,000
Tiempo * Concentraciones	43,458	3	14,486	2,033	,188
Error	57,000	8	7,125		
Total	1109756,000	28			
Total corregido	365824,000	27			

Nota: Evaluado con ANOVA.

De la tabla 9 se observó que, las temperaturas, tiempo y las concentraciones explican el control de crecimiento de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 en 100.0%, es decir, el ajuste es muy bueno.

Tabla 9

Determinación del modelo de regresión del control de crecimiento de la cepa Listeria monocytogenes (serotipo 4b) ATCC 13932

Coeficiente de determinación (R^2)	Coeficiente de determinación ajustado (R_{aj}^2)
100,0%	99,9%

De la tabla 10 se observó que, mediante la prueba Tukey los datos nos dan evidencia con un nivel de significancia al 5% que, existe diferencias entre las cuatro temperaturas respecto al crecimiento de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932, además visualizando que la temperatura a 89°C tiene un control promedio mejor que las temperaturas a 73°C, 65°C y temperatura control 37°C.

Tabla 10

Media de colonias (UFC/ml) presentes en la exposición de temperaturas en la segunda experimentación

Temperaturas	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
89°C	8	108,5000			
73°C	8		129,8750		
65°C	8			152,5000	
37°C	4				356,500
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Nota: Evaluado con Tukey.

4.2.1.3. Evaluación en la tercera experimentación con los factores de estrés

Con la tabla 11 de ANOVA mediante el uso de experimentos factoriales, los datos nos dan evidencia que los factores (temperatura, tiempo y concentraciones) influyen significativamente en el control de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 siendo sus p valor menores a 0.05, sin embargo, la interacción entre temperatura y concentraciones además de la interacción tiempo y concentraciones no influyen, por lo tanto, no se rechaza la hipótesis planteada, es decir, si existe efecto entre la temperatura que permitirá controlar el crecimiento respecto a las diferentes concentraciones de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932, además se analizan los coeficientes de determinación que se describe en la Tabla 12.

Tabla 11*Análisis de las variables en la tercera experimentación*

Fuente de variabilidad	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	449853,429	19	23676,496	5570,940	,000
Intersección	2029200,250	1	2029200,250	477458,882	,000
Temperatura	6460,083	2	3230,042	760,010	,000
Tiempo	610,042	1	610,042	143,539	,000
Concentraciones	157359,362	3	52453,121	12341,911	,000
Temperatura * Concentraciones	53,250	6	8,875	2,088	,165
Tiempo * Concentraciones	46,458	3	15,486	3,644	,064
Error	34,000	8	4,250		
Total	2340608,000	28			
Total corregido	449887,429	27			

Nota: Evaluado con ANOVA.

De la tabla 12 se observó que, las temperaturas, tiempo y las concentraciones explican el control de crecimiento de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 en 100.0%, es decir, el ajuste es muy bueno.

Tabla 12*Determinación del modelo de regresión del control de crecimiento de Listeria monocytogenes (serotipo 4b) ATCC 13932*

Coeficiente de determinación (R^2)	Coeficiente de determinación ajustado (R_{aj}^2)
100,0%	100,0%

De la tabla 13 se observó que, mediante la prueba Tukey los datos nos dan evidencia con un nivel de significancia al 5% que, existe diferencias entre las cuatro temperaturas respecto al crecimiento de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932, además visualizando que la temperatura a 89°C tiene un control promedio mejor que las temperaturas a 73°C, 65°C y temperatura control 37°C.

Tabla 13

Media de colonias (UFC/ml) presentes en la exposición de temperaturas en la tercera experimentación

Temperaturas	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
89°C	8	204,7500			
73°C	8		224,5000		
65°C	8			249,0000	
37°C	4				446,2500
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Nota: Evaluado con Tukey.

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los evaluados por Roberts et al. (2020), Alonso (2018), Garre (2018), Ovissipour et al. (2018), Ro et al. (2018), Park & Kang (2018), debido a que en estas investigaciones se incluyeron como un método de control de *Listeria monocytogenes* la temperatura para disminuir al patógeno alimentario, algunos autores combinaron a la temperatura y otros factores, no obstante, todos los autores mencionados lograron disminuir a las colonias bacterianas con la exposición a las respectivas temperaturas aplicadas.

Siendo así que el control de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 se da con la temperatura de 89°C con un tiempo aproximado de 3 a 3.5 minutos, en comparación al trabajo de Park y Kang (2018) en el que realizan un control de *Listeria monocytogenes* con la exposición de 20 rpm del gas dióxido de cloro a las muestras de vegetales por treinta minutos con dos temperaturas de 15° y 25° C, dando como resultado óptimo la temperatura de 15°C en 30 minutos ($p < 0.05$). En este trabajo de investigación como en el de Park y Kang se utilizaron como variables independientes a la temperatura, el tiempo y el gas, sin embargo, en el presente estudio se maximizó la temperatura hasta 89°C, pero en un tiempo de exposición más corto.

En la investigación de Flores (2015) en el que evaluó el control de *Listeria monocytogenes* inoculada en leche Gloria con concentraciones desde 10^{-1} a 10^{-6} a bajas temperaturas como: -10, -5, 0, 5 y 10 °C con un tiempo de exposición de 24, 48, 72 y 96 horas, logró reportar que las temperaturas ideales para la disminución del patógeno fueron -10 y -5 con un crecimiento de 120 a 300 UFC/ml durante los 4 días evaluados en Lambayeque, en comparación con la presente investigación que la temperatura de 89° durante una exposición de 3 minutos da un crecimiento de 26 a 200 UFC/ml del patógeno, mostrando así un mejor control con una temperatura alta con un corto período de exposición que con bajas temperaturas y un tiempo más prologando.

Por otro lado, en el trabajo de Ro et al. (2018) realizaron la aplicación de antimicrobianos naturales como método de control de *Listeria monocytogenes* dando resultados significativos la mezcla de azúcar y vinagre cultivado (CSV) al 1 % y de nisina al 0,3 % con una temperatura inferior a 10°C ($p < 0,05$), además, de que la calidad organoléptica no se vio afectada debido a la adición de los componentes mencionados, en

paralelo a este trabajo de investigación que se realizó en condiciones en que las concentraciones de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 disminuía, sin embargo, la máxima temperatura (89° C) influyó significativamente en cada una de ellas.

En otro trabajo de investigación de Ovissipour et al. (2018) en el cual también aplicaron ciertas temperaturas para el control de *Listeria monocytogenes* que fue extraída de muestras de salmón, además de los factores como la temperatura, incluyeron factores como aguas electrolizadas acidas y neutras, los iones de cloro. Dando como resultado óptimo a la temperatura de 65° C con una exposición de 10 minutos con presencia de ácido hipocloroso, cabe resaltar que fue la temperatura máxima que aplicaron en su estudio con el agua electrolizada neutra que mostro gran significancia al reducir al patógeno en un 5,6 log CFU/g. En compaginación el presente trabajo de investigación ejecutado se logró también disminuir al patógeno con una exposición de temperatura de 65°, 73° y 89° C, se logró coincidir con la temperatura de 65°C con el trabajo de Ovissipour et al, con diferencias en el tiempo que fue de 3 y 3.5 minutos logra disminuir a las colonias presentes en placas, sin embargo, a pesar del menor tiempo de exposición se logró aumentar a la temperatura dando así un resultado positivo con una temperatura de 89° C con una media de 26 UFC/ml, 110 UFC/ ml y 208 UFC/ ml de las 3 experimentaciones que se llevaron a cabo respectivamente.

VI. CONCLUSIONES

Se confirmó la identificación de la cepa de *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932 mediante la aplicación de la ISO 11290-1: 2017 con la preparación de los medios de cultivo selectivos para el patógeno como Fraser y Aloa. Realizando pruebas de pureza y viabilidad para observar el halo que suele formar *Listeria monocytogenes* y pruebas bioquímicas para una confirmación exacta y precisa como: Catalasa (+), Hemólisis (β hemólisis), Ramnosa (+), Xilosa (-).

Se determinó las unidades formadoras de colonias para las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} de la cepa *Listeria monocytogenes* (serotipo 4b) ATCC 13932, criterio de la investigación.

De la exposición de las unidades formadoras de colonias (ufc/ml) de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} a las temperaturas de 65°, 73° y 89° C durante 3 y 3.5 minutos, la temperatura de 89°C fue la óptima para el control de crecimiento. En ninguna de las temperaturas se obtuvo recuento cero.

VII. RECOMENDACIONES

Aplicar buenas prácticas de higiene y manufactura en la manipulación y procesamiento de alimentos como lácteos, verduras, frutas y carnes.

Realizar controles de *Listeria monocytogenes* en la línea de producción para evitar la propagación, contaminación y transmisión a través de los alimentos.

Evitar el consumo de alimentos crudos y de productos lácteos que no han sido previamente pasteurizados, asimismo frutas y verduras cortadas y envasadas para el consumo. Cabe resaltar que *Listeria monocytogenes* resiste a las bajas temperaturas por largos periodos de tiempo por lo que se debe evitar la ingesta de alimentos refrigerados sin pasar por un proceso térmico.

Combinar la temperatura con conservadores químicos orgánicos en el control de la *Listeria monocytogenes*.

VIII. REFERENCIAS

- Alonso, A. (2018). *Métodos de detección y control de Listeria monocytogenes en la industria alimentaria* [Tesis de Máster, Universidad de Oviedo]. http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/47625/3/TFM_AnaAlonsoMuñiz.pdf
- Díaz, M., Chávez, M. y Saucedo, E. (2012). *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la Provincia de Trujillo, Perú. *Revista "Ciencia y Tecnología", Escuela de Postgrado – UNT*, 23-38. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/268#:~:text=monocytogenes%20no%20estuvo%20presente%20en,alimentos%20act%C3%BAen%20como%20veh%C3%ADculos%20de>
- Encina, C., Bernal, A. y Rojas, D. (2013). Efecto de la temperatura de pasteurización y proporción de mezclas binarias de pulpa de carambola y mango sobre su capacidad antioxidante lipofílica. *Ingeniería Industrial*, (31), 197-219. <https://www.redalyc.org/pdf/3374/337430545009.pdf>
- Espinoza, A., De La Torre, M., Salinas, M. y Sánchez, V. (2004). Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero - marzo 2003. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 21(2), 71-75. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342004000200003
- Flores, M. (2015). *Efecto de bajas temperaturas y tiempo en el control de Listeria monocytogenes Inoculada en leche pasteurizada*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque]. <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/22>
- García, J., Gil Iral, J., y Botero, S. (2018). Control de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en co- cultivo con *Lactobacillus plantarum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 68–77. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77064>
- Garre, A. (2018). *Inactivación de Listeria monocytogenes por calor en condiciones isotérmicas en un entorno ácido* [Proyecto de fin de carrera, Universidad

- Giraldo, A., Aguilera, A., Urbano, E., Pedraza, A. y Jaimes, C. (2020). Comparación teórica entre técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la identificación de *Listeria monocytogenes*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 16(2), 7-19. <https://doi.org/10.18359/rfcb.5012>
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, M. (2018). *Metodología de la Investigación*. Mc Graw Hill. <https://www.casadellibro.com/libro-metodologia-de-la-investigacion-5-ed-incluye-cd-rom/9786071502919/1960006>
- Ibarra, L., Van, M., & Miller, M. (2017). Invited review: Hispanic-style cheeses and their association with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 2421–2432. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12116>
- Jiménez, A., Gómez, J., Puerta, J. y Jiménez, Y. (2019). Diseño de experimento virtual para enfriamiento de tuberías plásticas de cloruro de polivinilo. *Ingeniería energética*, 40(3), 257-263. <http://scielo.sld.cu/pdf/rie/v40n3/1815-5901-rie-40-03-257.pdf>
- Oliveira, T. S., Varjão, L. M., da Silva, L. N. N., de Castro Lisboa Pereira, R., Hofer, E., Vallim, D. C., & Almeida, R. C. de C. (2018). *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: Occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. *Food Control*, 88, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.015>
- Orihuel, E., Bertó, R., Canet, J., y Lorenzo F. (2012). *El control de listeria monocytogenes persistente en industrias alimentarias* [Archivo en pdf] https://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/AET_-_Articulo_Tecnico_L_Monocytogenes_Persistente.pdf
- Ovissipour, M., Shiroodi, S. G., Rasco, B., Tang, J., & Sablani, S. S. (2018). Electrolyzed water and mild-thermal processing of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Reduction of *Listeria monocytogenes* and changes in protein structure. *International journal of food microbiology*, 276, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.005>

- Park, S. H., & Kang, D. H. (2018). Effect of temperature on chlorine dioxide inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on spinach, tomatoes, stainless steel, and glass surfaces. *International journal of food microbiology*, 275, 39–45. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29627661/>
- Ripollés, C. (2018). *Supervivencia de Listeria monocytogenes sobre superficies de contacto con alimentos: un abordaje multidisciplinar de un problema complejo* [Tesis de pregrado, Universidad Autónoma de Barcelona]. <http://hdl.handle.net/10803/664171>
- Ro, E. Y., Kim, G. S., Kwon, D. Y., Park, Y. M., Cho, S. W., Lee, S. Y., Yeo, I. H., & Yoon, K. S. (2018). Effects of natural antimicrobials with modified atmosphere packaging on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in ravioli at various temperatures. *Journal of food safety*, 38(1), 1-8. <https://doi.org/10.1111/jfs.12392>
- Roberts, B., Chakravarty, D., Gardner, J.C., Ricke, S. & Donaldson, J. (2020). *Listeria monocytogenes* Response to Anaerobic environments. *Pathogens* 2020, 9(3), 210-219. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030210>
- Vásquez Alva, R., Biminchumo-Sagastegui, C., Villarreal-Hifume, C. Y., & Silva-Meza, C. N. (2020). *Listeria monocytogenes* meningitis in elderly patient. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 20(3), 503–507. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v20i3.3039>
- Yao, H., Kang, M., Wang, Y., Feng, Y., Kong, S., Cai, X., Ling, Z., Chen, S., Jiao, X., & Yin, Y. (2018). An essential role for *haft* involved in biofilm formation and virulence in serotype 4b *Listeria monocytogenes*. *Microbiological Research*, 215, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.07.001>

IX. ANEXOS

Anexo 1

Matriz de operacionalización

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Escala de medición	Instrumento
Variable independiente: Las temperaturas de 65, 73 y 89°C y los tiempos de 3 y 3,5 minutos aplicados a las concentraciones de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> .	La temperatura es un factor clave para ralentizar o aumentar el crecimiento de bacterias en las superficies de los productos frescos.	La variable de estudio buscará evaluar la temperatura y tiempo incidentes sobre el control de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> , recolectando los datos por medio de las fichas de observación.	Temperatura	65 °C 73 °C 89 °C	Nominal	Ficha de observación
			Tiempo	3 minutos 3,5 minutos		
Variable dependiente: Concentraciones de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> .	La <i>Listeria monocytogenes</i> es considerada como un bacilo de tipo grampositivo intracelular, el cual se encuentra distribuido en el ambiente.	La variable de estudio se centrará en la evaluación de la preparación y la concentración de <i>Listeria monocytogenes</i> , en concordancia con el control de estos, recolectando los datos por medio de la ficha de observación.	Preparación	Preparación de medios de cultivo Reactivación de cepa de reserva Dilución de cepa Sembrar en placas Petri	Nominal	Ficha de observación
			Diluciones	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵ y 10 ⁻⁶ de la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> .		

Anexo 2

Instrumento de recolección de datos



Efecto de las temperaturas 65, 73 y 89 °C durante 3 y 3,5 minutos en el control de diferentes concentraciones de *Listeria monocytogenes*.

Instrucciones: La finalidad de esta encuesta es Determinar el efecto de las temperaturas 65, 73 y 89°C durante 3 y 3,5 minutos en el control de *Listeria monocytogenes* a concentraciones de 10^{-3} a 10^{-6} .

Concentración de cepa	65°C		73°C		89°C	
	3 min	3,5 min	3 min	3,5 min	3 min	3,5 min
10^{-3}						
10^{-4}						
10^{-5}						
10^{-6}						



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUÍZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



ACTA DE SUSTENTACIÓN

ACTA DE SUSTENTACION VIRTUAL N° 003-2023-FCCBB-UI

Siendo las 10:00 horas del día 18 de enero de 2023, se reunieron vía plataforma virtual, meet.google.com/qgm-rtkg-iot los Miembros del Jurado evaluador de la tesis titulada “**Efecto de las temperaturas 65, 73 y 89°C durante 3 y 3,5 minutos en el control de diferentes concentraciones de Listeria monocytogenes**” designados por Resolución N° 171-2021-ACP-FCCBB/D de fecha 14 de octubre de 2021, con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes:

Dra. Gianina Llontop Barandiaran	Presidenta
Dr. Alberto Díaz Zapata	Secretario
Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán	Vocal
Dra. Graciela Olga Albino Cornejo	Asesora

Acto de sustentación fue autorizado por Resolución N° 009-2023-VIRTUAL-FCCBB/D, de fecha 16 de enero de 2023.

La Tesis presentada y sustentada por la **Bachiller ANGHELA PATRICIA CALDERÓN JIMÉNEZ** tuvo una duración de 30 minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurado; se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de (MUY BUENO) (18.2) en la escala vigesimal.

Por lo que la Bachiller **ANGHELA PATRICIA CALDERÓN JIMÉNEZ** queda **APTA** para obtener el título profesional de Licenciada en Biología - Microbiología - Parasitología, de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las 12.00 m se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.

Firman

Dra. Gianina Llontop Barandiaran,
Presidenta

Dr. Alberto Díaz Zapata
Secretario

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán
Vocal

Dra. Graciela Olga Albino Cornejo
Asesora

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, **Graciela Olga Albino Cornejo**, Asesora de Tesis de la Br. Calderón Jiménez, Anghela Patricia, Titulada: **Efecto de las temperaturas 65, 73 y 89 °C durante 3 y 3,5 minutos en el control de diferentes concentraciones de *Listeria monocytogenes*.**, luego de la revisión exhaustiva del documento en mención, dejo constancia que la misma tiene un índice de similitud de **10%** verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

La suscrita analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 14 de diciembre de 2022

Dra. Graciela Olga Albino Cornejo

Asesora

Adj.

1. Recibo digital
2. Informe de originalidad (Tesis)

Efecto de las temperaturas 65, 73 y 89 °C durante 3 y 3,5 minutos en el control de diferentes concentraciones de *Listeria monocytogenes*.

por Anghela Patricia Calderón Jiménez

Fecha de entrega: 10-dic-2022 11:27p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1977721316

Nombre del archivo: tesis_corregida_4_16783.docx (2.54M)

Total de palabras: 7246

Total de caracteres: 38262

Efecto de las temperaturas 65, 73 y 89 °C durante 3 y 3,5 minutos en el control de diferentes concentraciones de Listeria monocytogenes.

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%	8%	0%	6%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.ucv.edu.pe	3%
	Fuente de Internet	
2	zagan.unizar.es	1%
	Fuente de Internet	
3	hdl.handle.net	1%
	Fuente de Internet	
4	Submitted to Consorcio CIXUG	1%
	Trabajo del estudiante	
5	pinnacle.allenpress.com	1%
	Fuente de Internet	
6	repositorio.unheval.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
7	Submitted to Universidad Nacional Jose Faustino Sanchez Carrion	<1%
	Trabajo del estudiante	
8	Submitted to Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurimac	<1%

9

repositorio.espe.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

10

Submitted to Universidad Cesar Vallejo

Trabajo del estudiante

<1 %

11

pasteurizacionyesterilizacion.blogspot.com

Fuente de Internet

<1 %

12

repositorio.unprg.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo



Dra. Graciela Olga Albino Cornejo
Asesora




Recibo digital


Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Anghela Patricia Calderón Jiménez
Título del ejercicio: Tesis de posgrado
Título de la entrega: Efecto de las temperaturas 65, 73 y 89 °C durante 3 y 3,5 mi...
Nombre del archivo: tesis_corregida_4_16783.docx
Tamaño del archivo: 2.54M
Total páginas: 31
Total de palabras: 7,246
Total de caracteres: 38,262
Fecha de entrega: 10-dic.-2022 11:27p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre... 1977721316



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Efecto de las temperaturas 65, 73 y 89 °C durante 3 y 3,5 minutos en el control de diferentes concentraciones de *Listeria monocytogenes*.

TESIS

Para optar al título profesional de:
LICENCIADA EN
BIOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

PRESENTADO POR:
Br. Calderón Jiménez, Anghela Patricia

ASESORA:
Dra. Albino Cornejo, Graciela Olga

LAMBAYEQUE – PERÚ
2022

Dra. Graciela Olga Albino Cornejo
Asesora