



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

**Study of the effectiveness and stress associated
with combined preservation treatments to
minimise bacterial recovery**

Engenharia Biológica e Alimentar
Relatório do Trabalho de Fim de Curso

Sérgio Marques Domingos

—◆—
CASTELO BRANCO

2007

Index

Figures list

Tables list

Annexes list

Abbreviations list

Abstract

1-Introduction	1
1.1- Incidence and importance of foodborne diseases	1
1.2- Characteristics of the studied foodborne pathogens	2
1.2.1- <i>Listeria monocytogenes</i>	2
1.2.1.1- Taxonomy	2
1.2.1.2- Distribution and epidemiology	3
1.2.1.3- Symptoms	3
1.2.2- <i>Salmonella</i> spp	4
1.2.2.1- Taxonomy	4
1.2.2.2- Distribution and epidemiology	4
1.2.2.3- Symptoms	5
1.2.3- <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.2.3.1- Taxonomy	5
1.2.3.2- Distribution and epidemiology	5
1.2.3.3- Symptoms	6
1.3- Bacterial stress	6
1.4- Stress responses to antimicrobials	6
1.4.1- NaCl	10
1.4.2- pH (hydrogenonic potential)	10
1.4.3- Potassium Lactate	10
1.4.4- Sodium nitrite	11
1.5- Use of combinations of antimicrobials	13
1.6- High hydrostatic Pressure Treatment	13
1.6.1- HHP Process	14
1.6.2- Effects of high pressure on bacterial cells	15

1.6.3- Factors that can modify the effect of high pressure	16
1.6.3.1- Food composition	16
1.6.3.2- Water activity (aw)	16
1.6.3.3- Acidity (pH)	17
1.6.3.4- Temperature	17
1.6.4- Inactivation of microorganisms by high pressure	17
1.7- Study of the bacterial physiology through Proteomics	19
1.7.1- Two-dimensional (2-D) electrophoresis	19
1.7.2- Study of high pressure stress through proteomics	20
1.8- Objective	20
2- Material and methods	21
2.1- Culture media	21
2.1.1- Brain heart infusion	21
2.1.2- Chromogènic <i>Listeria</i> agar	21
2.1.3- Brilliant green agar	21
2.1.4- Baird-Parker	21
2.1.5- Saline solution used for the decimal dilutions	21
2.1.6- PALCAM	21
2.1.7- Tryptic soy agar with yeast extracts	21
2.2-Evaluation of the ability of the strains to grow in the presence of different factors	21
2.2.1- Cultures	21
2.2.2- Used concentrations of the antimicrobials	22
2.2.3- Preparation of the antimicrobials concentration	22
2.2.4- Microtitter plates	22
2.2.5- Petri plates- confirmation of the inocula	23
2.3- Evaluation of the ability of the pressurized strains to grow in the presence of the different factors	23
2.3.1- Bacterial cultures and inoculums preparation	24
2.3.2- Combinations	24
2.4- Detection of <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella spp.</i> and <i>S. aureus</i>	24
2.5- Classic techniques of microbiology	24
2.6- Electrophoresis	25

2.6.1- HHP treatment of <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> and <i>S. aureus</i>	25
3- Results	26
3.1-Inhibitory effect of High Hydrostatic Pressure treatments and ability to recover of <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> and <i>S.aureus</i>	26
3.1.1- Inactivation after HHP treatments performed at 400 and 600 MPa for 10 min. at 15°C	26
3.1.2- Recovery after HHP treatments	27
3.2-Ability of <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> and <i>S. aureus</i> to grow in the presence of NaCl, acidity, nitrite and lactate applied alone, combined between them and with HHP	30
3.2.1-Determination of the inhibitory levels of each factor	30
3.2.2-Inhibitory effect of the factors when combined between them	31
3.2.3-Inhibitory effect of the factors when combined with HHP treatments at 400 and 600 MPa	36
3.3-Analysis of the response to high pressure of <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> and <i>S. aureus</i> by 2D- Electrophoresis	38
4- Discussion	39
5- Conclusion	51
6- References	53

Annexes

RESUMO

Este estudo teve como objectivo, investigar a acção antimicrobiana do cloreto de sódio, nitrato de sódio, lactato de potássio, acidez e alta pressão hidrostática (HHP). O efeito combinado dos antimicrobianos, como a combinação com a HHP, em vários microorganismos patogénicos naturalmente presentes nos alimentos, foi também analisado. O efeito fisiológico dos tratamentos de HHP foi estudado através de electroforese bidimensional.

Enquanto as estirpes de *L. monocytogenes* e *Salmonella*, demonstraram uma tolerância similar em relação aos diferentes factores, *S. aureus* sobressaiu pela sua capacidade de crescer na presença de 16% de NaCl. Quando os antimicrobianos foram combinados, foi observado um efeito sinérgico, Nitrato, acidez e lactato, demonstraram ser os antimicrobianos mais eficazes para inibir os patogénicos.

Depois dos tratamentos de HHP a 400 MPa, as estirpes de *L. monocytogenes* e *Salmonella*, foram altamente inibidas ($\geq 87\%$). As estirpes de *S. aureus* pouca inactivação sofreram ($\geq 25\%$). Uma futura recuperação foi registada para *L. monocytogenes* (89%), *Salmonella* (98%), e *S. aureus* (100%). Depois da HHP a 600 MPa, a inactivação foi mais importante que a 400 MPa, e durante a recuperação algumas estirpes de *L. monocytogenes* e *Salmonella* recuperaram, enquanto outras foram completamente inactivadas. Todas as estirpes de *S. aureus* recuperaram completamente. A recuperação foi sempre mais rápida a 22°C, excepto para bactérias psicotrópicas, como *L. monocytogenes* que recuperaram de igual forma, quando incubadas a 14 e 22°C. Quando a pressurização foi combinada com antimicrobianos o nível mais alto de inactivação bacteriana foi atingido. A nível fisiológico, a aplicação de tratamentos de HHP em patogénicos produziu alterações nos seus padrões proteicos, o que indicou que as células responderam ao stress produzido pela pressurização aplicada.

Palavras-chave:

Microorganismos patogénicos naturalmente presentes nos alimentos, Antimicrobianos, Alta Pressão Hidrostática, Electroforese bidimensional.