UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Factores determinantes del crecimiento y/o estado fisiológico de *L. monocytogenes* en alimentos vegetales frescos y posibles estrategias de control

D.ª María Isabel Gómez Galindo

2024

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Factores determinantes del crecimiento y/o estado fisiológico de *L. monocytogenes* en alimentos vegetales frescos y posibles estrategias de control

Autor: D.ª María Isabel Gómez Galindo

Director/es: D.ª Ana Allende Prieto y D.ª María del Pilar Truchado Gambao

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR
Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. María Isabel Gómez Galindo

doctorando del Programa de Doctorado en

Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Factores determinantes del crecimiento y/o estado fisiológico de *L. monocytogenes* en alimentos vegetales frescos y posibles estrategias de control

y dirigida por,

D./Dña. Ana Allende Prieto

D./Dña. María del Pilar Truchado Gambao

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 24 de septiembre de 2024

Fdo.: GOMEZ GALINDO, MARIA ISABEL (FIRMA)

Firmado digitalmente por GOMEZ GALINDO, MARIA ISABEL (FIRMA)
Fecha: 2024.09.24 12:31:36 +02'00'

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Ana Allende Prieto, Doctora de Universidad del Área de Veterinaria en el Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Factores determinantes del crecimiento y/o estado fisiológico de L. monocytogenes en alimentos vegetales frescos y posibles estrategias de control", realizada por D. María Isabel Gómez Galindo , bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 6 de September de 2024

ALLENDE PRIETO ANA

Firmado digitalmente por ALLENDE PRIETO ANA - DNI 10885672W
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, o=CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, ou=CENTRO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA APLICADA DEL SEGURA, ou=10885672W, serialNumber=IDCES-10885672W, sn=ALLENDE PRIETO, givenName=ANA, cn=ALLENDE PRIETO ANA - DNI 10885672W
Fecha: 2024.09.06 10:24:32 +02'00'

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Pilar Truchado Gambao, Doctora de Universidad del Área de Veterinaria en el Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Factores determinantes del crecimiento y/o estado fisiológico de L. monocytogenes en alimentos vegetales frescos y posibles estrategias de control ", realizada por D. María Isabel Gómez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 9 de septiembre de 2024

TRUCHADO GAMBAO MARIA DEL PILAR -

Firmado digitalmente por TRUCHADO GAMBAO MARIA DEL PILAR - 23020083G
Fecha: 2024.09.09 15:24:41 +02'00'

La autora de la presente memoria ha disfrutado de un contrato predoctoral de "Formación de Personal Universitario" (FPU) (ayuda financiada por MCIN/AEI /10.13039/501100011033 y por FSE invierte en tu futuro. La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación:

- Produce surface treatments based on bacteriophages and bacteriocin-producing cultures to consistently reduce 2-log of *Listeria monocytogenes* on leafy greens and pre-cut fruit and vegetables. Investigadora principal: Ana Allende. Co-Investigadoras principales: M. I. Gil y Anne Elsser-Gravesen. 1 de enero de 2020 – 31 de diciembre 2021.
- Significance of sanitizers on induction of viable but non-cultivable (VBNC) foodborne bacteria and their survival and resuscitation in fresh produce Investigadora principal: Ana Allende. Co-Investigadoras principales: Pilar Truchado y M. I. Gil. 1 de enero de 2019 –31 de diciembre de 2020 (extendido al 28 de febrero de 2021).

Se agradece la colaboración del Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia por permitir la formación en competencias docentes y la colaboración en tareas docentes de la autora, requisito obligatorio del contrato predoctoral FPU. Agradecimiento especial a Sancho José Bañón Arias, catedrático de dicho departamento que ha ejercido como tutor de colaboración en prácticas docentes de la autora.

Se agradece la colaboración del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias de la Generalidad de Cataluña, especialmente a las investigadoras Sara Bover Cid y Cristina Serrá Castelló, con quienes la doctoranda realizó una colaboración en la elaboración de una publicación científica. Asimismo, se agradece a las investigadoras Anne Elsser-Gravesen y Marta Volpi de la empresa ISI Food Protection

(Dinamarca). por su colaboración en el primer proyecto mencionado que dio lugar a dos publicaciones científicas.

Además, se agradece la colaboración de las empresas Florette en España, y Flenstd en Dinamarca por su apoyo tecnológico en el desarrollo de los proyectos mencionados.

A mis padres,

que sin ellos no habría llegado hasta aquí.

A mi hermana,

que su persona siempre ha sido fuente de inspiración para mí.

A Ochy y Sacco,

que aparecieron en mi vida poco antes de esta andadura

y su presencia convierte todo en más liviano.

No sé cómo empezar a escribir una página de agradecimientos con los ojos empañados y sin creerme todavía haber llegado a este punto. En estas páginas quiero expresar mi gratitud y cariño a todas las personas que, de una forma u otra, me han acompañado en este viaje. Sin vosotras, nada de esto hubiera sido posible.

A lo largo de estos años, he tenido el inmenso privilegio de ampliar mi formación académica y poder conocer de cerca cómo se trabaja en investigación en el principal organismo de investigación de España. A nivel personal, puedo decir que he vivido una etapa llena de aprendizajes y momentos inolvidables que han marcado mi vida y mi forma de ser de manera significativa. He tenido la oportunidad de adentrarme en nuevos campos, explorar áreas de conocimiento que nunca imaginé, y desafiarme continuamente. Cada obstáculo superado ha sido una oportunidad para fortalecerme y descubrir nuevas facetas de mí mismo. No todo ha sido fácil, en algún momento pensé que no llegaría al final, porque hay obstáculos más grandes que no impiden ver la meta y que incluso te hacen dudar de tus propias fuerzas. Además, he compartido experiencias con personas maravillosas, cuyo apoyo y compañía han sido fundamentales en este recorrido.

Gracias en primer lugar a mis directoras, Ana y Pilar, por darme esta oportunidad de trabajar en proyectos internacionales que han supuesto un reto y a través de los cuales he aprendido mucho. Gracias por orientarme, resolver cada duda y enseñarme lo que estaba en vuestras manos. Gracias por la paciencia infinita. Gracias por confiar en mi incluso cuando yo no confiaba en poder continuar, porque, a pesar de mis tropiezos, me habéis animado y ayudado a llegar hasta el final. Gracias por permitirme que esta tesis sea muestra de que tengo más fuerzas de las que considero. Gracias también a Mabel que siempre ha estado ahí para resolver dudas, ayudarme con paciencia en procedimientos burocráticos de los que generan hastío y sacar adelante publicaciones. Gracias por la ternura con la que comunicas. A vosotras tres deciros, que admiro muchísimo vuestro recorrido profesional. Tener de ejemplo a tres mujeres fuertes es realmente inspirador.

Gracias a todo el grupo de Microbiología y Calidad de Frutas y Hortalizas. Gracias a Nathalie porque contigo comencé en el laboratorio y he aprendido mucho de ti, siempre tuviste paciencia para explicarme todos los protocolos y etapas del trabajo y fue un placer trabajar contigo. Siempre has sido muy dulce conmigo. Gracias a Silvia porque me has ayudado siempre que tenía alguna duda y tu forma de ser convierte el mundo en un lugar más amable. Gracias a Macarena porque eres una de esas personas inolvidables, porque además de

ayudar siempre de buena gana, tienes un corazón que no te cabe en el pecho y no hay persona que no sonría cerca tuyo. Gracias a Tudela por la paciencia y el apoyo en algunos de mis ensayos al principio, tu rigurosidad a la hora de seguir procedimientos es admirable e inspiradora. Gracias Gines por echarme una mano siempre que ha hecho falta y por las risas compartidas. Gracias María por prestarte siempre a escuchar cuando he tenido algún día feo. Gracias a los cachorros (Guille y Jesús) que habéis llegado hace poco, pero estáis ayudando a que esta última etapa tenga momentos muy bonitos. No solo sois ejemplo de buen trabajo, tenéis un corazón súper bello, que no os cambie nada. Gracias Diego porque eres un chico maravilloso, porque tus bromas me han cambiado la mañana muchas veces, pero tu apoyo en momentos duros también lo recordare siempre. Gracias Fran, que fuiste un compi de trabajo excepcional, un ejemplo a seguir y agradezco que ahora te hayas convertido en amigo. Gracias Virginia porque eres un terremoto y un ser especial, que, con tu sonrisa, tus consejos y tus ánimos, alegras el día con solo verte. Gracias a Sofía porque has sido apoyo y guía en esta etapa, siempre dándome animo a seguir adelante y quitándome los nubarrones de delante. También quiero dar las gracias a los que pasaron por el grupo, (Esperanza, Ferez…) y en algún momento fuisteis compis de confidencias, risas y apoyo emocional. En este sentido, gracias especiales a mi amigo Fran de Cieza, me gustó compartir contigo parte del camino. Gracias también a Jesús (JAE Intro) que es un chico hiper tierno que estuvo conmigo ayudando en los ensayos.

Porúltimo, me gustaría dar las gracias a otros compañeros del CEBAS con los que me he cruzado durante esta etapa y he compartido algún momento (Carlos Iglesias, Carlos, David, Lola, Pachi, Diego…). Gracias especiales a Alicia cuando compartimos despacho, tu apoyo y ternura fueron importantes en mi camino. Gracias Die por pasarte a saludar siempre que podías, por tus risas y por tu empatía, me alegras siempre que apareces y me ayudas a conectar con quien soy. Gracias a todos, porque a veces unos buenos días, una sonrisa o una simple muestra de preocupación sobre mi recorrido, me han cambiado un día gris y eso cobra especial importancia en algunos momentos.

Gracias a toda mi familia porque, cualquier paso que dé sé que están ahí, alegrándose y sosteniéndome. Infinitas gracias a mis padres que confían en mi a ciegas. Soy inmensamente afortunada de teneros, porque sin los valores que me habéis transmitido no sería la persona que soy. La fortaleza que tenéis ha sido ejemplo para mí, para llegar hasta este punto. Se que estáis orgullosos de mí, pero yo también de los padres que tengo. Gracias a mi hermana, que la distancia no enfría nunca nuestro vinculo. Que siempre eres allá dónde estés, que me entiendes como si fuéramos gemelas y sin tu apoyo en muchos momentos, esta etapa habría sido más dura. Que eres una persona brillante y tu recorrido es un faro para mí. Gracias a mis bebes, Ochy y Sacco, porque el amor que nos tenemos me hace seguir adelante. Familia, os quiero muchísimo.

Gracias atodos mis amigos, con los que he compartido quejas, cuidados, experiencias, pero especialmente he compartido risas para hacer los momentos difíciles, menos duros y la vida en general, menos fea. Gracias por quererme y por cuidarme. Os quiero a todos un montón. Gracias a mis amigos de Cieza. Gracias especiales a Ángel, Fran, Laura Mu., María, Mari, Marta, Mer, Joselu, Turpin y Marina. Aunque ahora la vida no nos tenga tan juntitos, gracias por escucharme siempre que lo he necesitado y dar apoyo, aunque a distancia, os tengo siempre en el corazón. Gracias porque algunos de vosotros me habéis ayudado este último año a solventar situaciones que nunca pensé que enfrentaría. Gracias a personas que ya no veo apenas, pero habéis sido y sois importantes para mí (Aranza, Esther, Antonio, Bea, Laura Mo., Navarro, David). Gracias a mi grupo faltoso que me hacéis reír de cualquier pataica de la vida (Maka, Melania, Juanjo, Susana y Manu). Gracias a Charlie por animarme siempre quitándole importancia a todo con tu pragmatismo de hierro y por cuidar de nuestros bebes. Gracias Laura Sa., Sandra, Amparo y Vic, porque os tengo muy presentes, gracias porque este último año ha sido muy duro y os agradezco por sostenerme, escucharme, y sacarme cuando lo necesitaba, os quiero mucho. Gracias a les compañeres con quienes comparto espacio y tiempo en la Ajuntaera y el Ateneo, porque este último año he podido

compartir con vosotres momentos que me han dado energía cuando mis fuerzas me flaqueaban, gracias por como tejéis una red de cuidados tan bonita.

Gracias a For. Tu llegada, justo al final, ha sido una suerte de serendipia. Estoy profundamente agradecida por el cuidado y el apoyo genuino que me has brindado en estos últimos meses. Has sido un pilar fundamental, ayudándome a recuperar la confianza en mí misma, lo cual ha sido clave para completar este proyecto. Te quiero muchísimo bicho.

La lista de nombres sería más larga, porque hay personas que, si bien con ellos ya no comparto vida, han estado conmigo en estos últimos años y me han ayudado con sus consejos, su apoyo o simplemente cambiándome el humor cuando no veía salida. Aunque no lleguéis a leer esto, a vosotras también os doy las gracias. Me siento muy afortunada por los cuidados y cariño que tengo a mi alrededor.

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC)

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Universidad de Murcia

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Memoria realizada para obtener el Título de Doctora por la Universidad de Murcia

María Isabel Gómez Galindo
2024

Dirigida por Ana Allende Prieto y María del Pilar Truchado Gambao

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

Resumen iii

Símbolos y abreviaturas x

Índice de tablas y figuras xviii

INTRODUCCIÓN **1**

1. *L. monocytogenes* 3

1.1. Ecología 6

1.2. Listeriosis: clínica, epidemiologia y patogenia 8

2. Métodos de detección e identificación de *L. monocytogenes* en alimentos 10

3. Marco legislativo de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo 15

4. Productos vegetales frescos listos para consumir 18

5. Microbiología predictiva 20

5.1. Modelo Gamma 25

6. Estados fisiológicos de *L. monocytogenes* e implicaciones para la seguridad alimentaria en la industria de productos vegetales frescos 29

7. Medidas de control de *L. monocytogenes* en industria 34

7.1. Bacteriófagos 36

7.2. Cultivos protectores 46

7.2. Ventajas, desventajas y desafíos de las técnicas de bioconservación 56

OBJETIVOS **59**

RESULTADOS **65**

CAPÍTULO I 67

CAPÍTULO II 71

CAPÍTULO III 75

CAPÍTULO IV 79

DISCUSIÓN GENERAL 83

1. Retos de la industria alimentaria y los alimentos listos para el consumo respecto al riesgo de listeriosis 85

2. Microbiología predictiva 89

3. Relevancia del estado fisiológico de la bacteria en su capacidad de contaminación a lo largo de la cadena de procesado 95

4. Tratamientos de bioconservación post-proceso: potencial de control del crecimiento de *L. monocytogenes* en productos vegetales frescos 99

CONCLUSIONES 107

REFERENCIAS 114

RESUMEN

El patógeno central de esta tesis, *Listeria monocytogenes*, es una bacteria patógena de relevancia crítica en la industria alimentaria, especialmente en el procesado de productos listos para el consumo, entre los que se encuentran gran variedad de productos vegetales frescos. Este microorganismo recibe su nombre en honor a Joseph Lister, cirujano británico del siglo XIX, cuyo trabajo fue fundamental para establecer la importancia de las prácticas de limpieza y desinfección en la prevención de enfermedades. *L. monocytogenes* puede sobrevivir y proliferar en condiciones adversas, como bajas temperaturas y ambientes húmedos, lo que facilita su persistencia en entornos de procesado de alimentos. Su potencial para contaminar productos hortofrutícolas durante las etapas de pre y postcosecha representa un riesgo significativo para la salud pública, dado que puede causar listeriosis, una enfermedad grave, especialmente en poblaciones vulnerables. En consecuencia, es imperativo implementar a nivel industrial medidas rigurosas de control y monitorización para garantizar la seguridad alimentaria.

Esta Tesis Doctoral tuvo como objetivo identificar los factores determinantes que influyen en el crecimiento y el estado fisiológico de *L. monocytogenes* en productos vegetales frescos, con el fin de integrarlos en los planes de seguridad alimentaria de la industria de procesado de frutas y hortalizas. Además, se evaluaron diversas estrategias de intervención post-proceso para reducir la proliferación de *L. monocytogenes* durante la vida útil de estos alimentos, analizando también el impacto de estos tratamientos en la calidad microbiológica y organoléptica de los productos. Para alcanzar este objetivo principal se realizaron cuatro trabajos experimentales que se reúnen en los capítulos I-IV.

En el capítulo I se presenta un modelo Gamma, que permite evaluar el comportamiento de *L. monocytogenes* en productos vegetales frescos, considerando factores intrínsecos y extrínsecos como el pH, la actividad de agua (aw) de los productos y la temperatura de conservación de estos. La capacidad predictiva del modelo, como

herramienta para identificar los productos que favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes*, fue evaluada mediante su comparación con datos experimentales obtenidos de la literatura. Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica que resultó en la selección de 105 artículos científicos para recopilar datos sobre el crecimiento o no crecimiento de *L. monocytogenes*. De estos estudios, se extrajeron hasta 808 valores relacionados con el comportamiento de *L. monocytogenes* y las características fisicoquímicas de diferentes productos vegetales. Este modelo demostró ser eficaz para hortalizas en general, con una concordancia del 83,2% entre las predicciones y los datos empíricos, y para hortalizas de hoja en particular, con una concordancia del 87,5%. En las hortalizas de hoja el modelo predijo crecimiento en todos los casos, con un 12,5% de predicciones erróneas clasificadas como *fail-safe* (es decir, el modelo predijo crecimiento, pero los datos empíricos mostraron lo contrario). Esta última categoría de productos vegetales fue identificada como la de mayor riesgo de crecimiento de *L. monocytogenes*. Por otra parte, el modelo mostró limitaciones en el grupo de frutas, con una concordancia del 71,8%, debido a la sobreestimación del impacto del pH en el crecimiento de *L. monocytogenes*. A pesar de estas limitaciones, el modelo se presenta como una herramienta complementaria valiosa a las pruebas de desafío. A continuación, habiendo identificado a las hortalizas de hoja como grupo de mayor riesgo en cuanto al crecimiento de *L. monocytogenes* y para mejorar la toma de decisiones sobre las estrategias de control a aplicar en este grupo, se realizó un estudio sobre los riesgos microbiológicos asociados a su procesado.

En el capítulo II, el objetivo fue la evaluación de la capacidad de las células en estado viable pero no cultivable (VBNC) de *L. monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 de causar la contaminación cruzada de las hortalizas de hoja durante las etapas de lavado y su capacidad de recuperación del estado cultivable, una vez adheridas al tejido

vegetal durante la conservación. El estudio se centró en estudiar la inducción de las células VBNC en agua de proceso como consecuencia del uso de tratamientos de desinfección de agua, comúnmente utilizados por la industria para mantener la calidad microbiológica del agua de lavado y su posible transferencia al tejido vegetal. Para la inducción de las células VBNC en el agua de proceso se utilizaron los siguientes tratamientos: 1) cloro a 5 mg/L para los ensayos con *E. coli* y, 2) dióxido de cloro (ClO_2) a 3 mg/L para los estudios con *L. monocytogenes*. El uso de estas concentraciones de desinfectantes eliminaba por completo las células cultivables e inducía la presencia de VBNC. Cuando se evaluó la capacidad de adhesión de las células VBNC al tejido vegetal durante la etapa de lavado de hortalizas de hoja se demostró que las células VBNC de *E. coli* O157:H7 no fueron capaces de causar la contaminación cruzada durante el lavado. Sin, embargo, las células VBNC de *L. monocytogenes* si fueron capaces de adherirse durante la etapa del lavado he incluso se detectaron células cultivables de *L. monocytogenes* en la lechuga tras su conservación en condiciones de refrigeración (15 días a 7ºC). Los hallazgos demostraron por primera vez que las células VBNC de *L. monocytogenes* pueden adherirse a las hortalizas de hoja, como es el caso de la lechuga, durante la etapa de lavado y de resucitar al estado cultivable durante la etapa de conservación. Aunque la capacidad de estas células para volver a un estado cultivable y proliferar en hortalizas de hoja fue relativamente baja, este hallazgo subraya la importancia de considerar este riesgo microbiológico en la industria de productos procesados en fresco y la idoneidad de aplicar tratamientos post-proceso para mitigarlo.

En el capítulo III, una vez demostrado el riesgo de contaminación cruzada de las hortalizas de hoja con *L. monocytogenes* durante la etapa de lavado, se exploraron posibles medidas de control que puedan ser aplicadas como tratamientos para controlar la proliferación de dicho patógeno. En este estudio, se evaluó la eficacia de cuatro

tratamientos comerciales de bioconservación como estrategias post-proceso. Se comparó la efectividad de dos tratamientos basados en bacteriófagos (Listex P100™ y ListShield™) y dos basados en bacterias ácido lácticas (BAL) (SafePro™ y HoldBAc™). Se seleccionaron diversos tipos de hortalizas de hoja, como lechuga romana, lechuga iceberg, espinaca baby y col, como modelos para la contaminación experimental con *L. monocytogenes*. Los resultados mostraron que Listex P100™ fue el tratamiento más efectivo, logrando un control significativo del crecimiento de *L. monocytogenes* en todas las hortalizas evaluadas, reduciendo la capacidad de crecimiento del patógeno hasta 2,0 Log_{10} UFC/g a lo largo de la conservación (15 días a 7ºC), cuando se comparaba con los controles no tratados. Los mejores resultados se observaron para la lechuga iceberg y romana, mientras que las diferencias entre el control y el tratado fueron menores en el caso de la espinaca baby. Con respecto al resto de tratamientos testados, todos fueron capaces de controlar el crecimiento de *L. monocytogenes*, sin embargo, las diferencias observadas entre los tratamientos y el control no tratado fue menor y con una gran variabilidad según el tipo de vegetal. Además de la eficacia antimicrobiana, se evaluó el impacto del tratamiento Listex P100™ en la calidad organoléptica de los productos vegetales, sin encontrar efectos adversos en comparación con los controles. En resumen, este estudio destacó a Listex P100™ como una opción prometedora para el control del crecimiento de *L. monocytogenes* en hortalizas de hoja.

El capítulo IV de esta tesis se centró en la validación industrial de la estrategia de intervención más eficaz identificada en el capítulo anterior, específicamente el uso de Listex P100™ en líneas de procesado de hortalizas de hoja frescas (lechuga) con el objetivo de controlar el crecimiento de *L. monocytogenes*. La validación se llevó a cabo en dos líneas de procesado ubicadas en España y Dinamarca.El tratamiento se aplicó mediante un dispositivo de nebulización con el objetivo de conseguir una distribución

homogénea de los bacteriófagos sobre la lechuga antes del envasado, asegurando la dosis recomendada (6,0-7,0 Log_{10} UFP/g). Se alcanzó la concentración objetivo de bacteriófagos en tres de las cuatro pruebas, tras un ajuste del diseño tras el primer ensayo. Se obtuvieron diferencias significativas entre las dosis alcanzadas de bacteriófagos en el producto entre las plantas de procesado en España y Dinamarca, atribuidas a diferencias en la escala de operaciones y el diseño de las líneas. Durante la conservación, los recuentos de bacteriófagos se mantuvieron sin diferencias significativas entre el inicio y el final del período de conservación en tres de los cuatro ensayos. A pesar de no poder evaluar directamente la eficacia contra *L. monocytogenes* debido a la ausencia de contaminación natural en los productos, el estudio confirmó la viabilidad del uso de Listex P100™ en un entorno industrial. Tampoco se registraron impactos negativos en la calidad organoléptica del producto tratado respecto al control. Este estudio evidencia que la integración de Listex P100™ en procesos industriales es viable para mejorar la seguridad alimentaria en hortalizas de hoja listas para el consumo.

En conclusión, los resultados obtenidos en los capítulos I-IV han permitido un avance en la comprensión y control del riesgo que representa *L. monocytogenes* en la industria de hortalizas de hoja listas para el consumo. La adopción de estrategias de control eficaces permitirá asegurar que las prácticas de producción mejoren la seguridad microbiológica de estos alimentos y cumplan con los requisitos regulatorios y las expectativas del mercado.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ActA	Actin Assembly
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AE	Agua electrolizada
ALOA	Agar Listeria Ottaviani and Agosti
ARN	Ácido Ribonucleico
aw	Actividad de agua
BAM	Bacteriological Analytical Manual
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BHI	Brain Heart Infusion
BLEB	Buffered Listeria Enrichment Broth
BPW	Buffered Peptone Water
CAC	Comisión del *Codex Alimentarius*
CE	Comisión Europea
CFU	Colony-forming units
CIELAB	Commission Internationale d'Eclairage L*a*b*
ClO_2	Chlorine dioxide/dioxidode cloro
CO_2	Carbon dioxide
COD	Chemical oxygen demand
CVS	Computer Vision System
Ct	Cycle threshold
d	día
ddH_2O	Agua destilada doble
ddPCR	*Droplet digital* PCR
DNA	Deoxyribonucleic acid

DNAsa	Desoxirribonucleasa
EC	Electrical conductivity
ECDC	European Centre for Disease prevention and Control
E. coli	*Escherichia coli*
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	Ethidium Monoazide Bromide/ Bromuro de Etidio Monoazida
EEUU	Estados Unidos
EHEC	Enterohemorrágica
FAO	Food and Agriculture Organization
FB	Fraser Broth
FDA	Food and Drug Administration
g	gramo
GRAS	Generally Recognized As Safe
GR	Growth rate
h	hora
HFB	Half-Fraser Broth
ISO	International Organization for Standardization
inlA	Internalina A
JEMRA	Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment
km	kilómetro
Kow	Coeficiente de reparto n-octanol-agua
L	Litro
LAB	Lactic Acid Bacteria

LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LB	Listeria Broth
LED	Light Emitting Diode
LIPI-1	*Listeria* Pathogenicity Island 1
LIPI-2	*Listeria* Pathogenicity Island 2
LLO	Listeriolysin O
Lm	*Listeria monocytogenes*
L. monocytogenes	*Listeria monocytogenes*
LOD	Limito ff Detection
LOQ	Limit ff Quantification
LPM	Lithium Chloride–Phenylethanol–Moxalactam Medium
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight
MAP	Modified atmosphere packaging
MAPA	Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación
mFB	Modified Fraser Broth
mL	mililitro
MLST	Multilocus sequence typing
MLVA	Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis
MOPS-BLEB	Morpholine-Propanesulfonic Acid – Buffered Listeria Enrichment Broth
MOX	Modified Oxford Listeria Selective Agar
MRS	Man, Rogosa Sharpe agar
n	Constante para cda factor ambiental
N_2	Nitrógeno
NaCl	Cloruro sódico

NGS	Next Generation Sequencing
O_2	Oxygen
OCLA	Oxoid Chromogenic Listeria Agar
OPP	Oriented Polypropylene
ORP	Oxidation-reduction potential
OXA	Oxford Medium Agar
PALCAM	Polymyxin Acriflavin Lithium-chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol
PAA	Peracetic Acid/Ácido peracetico
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PMA-Lite	Photolysis device for PMA treatment
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PI-PLC	Phosphatidylinositol -Specific Phospolipase C/Fosfatidilinositol Fosfolipasa Especifica C
PC-PLC	Phosphatidylcholine - Specific Phospholipase C/Fosfatdilcolina Fosfolipasa Especifica C
PFU	Plaque-forming unit
PMA/PMAxx	Propidium Monoazide/ Bromuro de Propidio Monoazida
PV	Presión de vapor
PW	Process Water
s	segundo
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QL	Cualitativo
QN	Cuantitativo
QPS	Qualified Presumption of Safety
RBP	Receptor-Binding Protein/Proteína de Unión al Receptor

RGB	Red Green Blue
RNA	Ribonucleic Acid
RNAsa	Ribonucleasa
RTE	Ready-To-Eat
R&F LMCPM	R&F *L. monocytogenes* Chromogenic Plating Medium
sd	Standard Devitaiton
T	Temperature/Temperatura
TCD	Thermal conductivity detector
TOMA	Thiazole Orange Monoazide
TSB	Tryptic Soy Broth
UE	Unión Europea
UFC	Unidad formadora de colonias
UFP	Unidad formadora de placas
USA	United States of America
USDA	United States Department of Agriculture
UVM	University of Vermont Medium
VBNC	Viable But Not Culturable/Viable Pero No Cultivable
v-qPCR	viability Quantitative Polymerase Chain Reaction
WGS	Whole Genome Sequencing/Secuenciación del genoma complete
WHO/OMS	World Health Organization/ Organizacion mundial de la Salud
μ	velocidad específica de crecimiento
μM	Micrómetro
μ_{opt}	Velocidad óptima de crecimiento
γ_i	Factor Gamma Individual (Efecto individual de cada factor Ambiental)

X_i	Factor ambiental que afecta al crecimiento microbiano
Xm_{in}	Valor mínimo del factor Ambiental
X_{max}	Valor máximo del factor abiental
X_{op}	Valor optimo del factor Ambiental
ψ	Contribucion de los factores ambientales
ξ	Interacción entre los factores ambientales
ºC	Grados centígrados
%	Porcentaje
=	igual
≈	aproximada

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Esquema de la historia filogenética del género actual *Listeria*. 4

Figura 2. Escenarios de transmisión de *Listeria monocytogenes* entre rumiantes, humanos, productos alimentarios y el medio ambiente. 7

Figura 3. Ciclo de infección intracelular de *Listeria monocytogenes* 8

Figura 4. Diagrama esquemático del ciclo de infección de *Listeria monocytogenes* en humanos 9

Figura 5. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa utilizada para evaluar la viabilidad de microorganismos. 33

Figura 6. Esquema general de la estructura de un bacteriófago 37

Figura 7. Esquema del ciclo lítico de un bacteriófago 38

Figura 8. Esquema del ciclo lisogénico de un bacteriófago 38

Figura 9. Esquema del mecanismo de acción de algunas bacteriocinas 49

Tablas

Tabla 1. Propiedades bioquímicas generales de *Listeria monocytogenes*..... 5

Tabla 2 Clasificación de las serovariedades de *Listeria monocytogenes* por linajes y genoserogrupos. 5

Tabla 3. Condiciones generales de crecimiento de *Listeria monocytogenes* 6

Tabla 4. Métodos de cultivo para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp 14

Tabla 5. Enfoques legislativos aplicados al control de *Listeria monocytogenes* en diferentes países en alimentos listos para el consumo 16

Tabla 6. Criterios de Seguridad Alimentaria para *Listeria monocytogenes* en alimentos Ready-to-Eat en la Unión Europea 17

Tabla 7. Aplicaciones de la microbiología predictiva 21

Tabla 8. Principales funciones de los modelos primarios, secundarios y terciarios en microbiología predictiva 23-24

Tabla 9. Modelos secundarios basado en la hipótesis Gamma, matrices y factores de entrada utilizados en estudios de seguridad alimentaria 28

Tabla 10. Estudios sobre el estado Viable pero No Cultivable (VBNC)de patógenos alimentarios relacionados con la industria de productos vegetales frescos 31

Tabla 11. Definiciones de aditivo y coadyuvante tecnológico recogidas en el Reglamento (CE) No 1333/2008..... 36

Tabla 12. Estudios sobre la aplicación de bacteriófagos para el control de *Listeria monocytogenes* en productos vegetales frescos..... 43-45

Tabla 13. Principales compuestos antimicrobianos de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) 48

Tabla 14. Clasificación general de las bacteriocinas en base a su estructura 50

Tabla 15. Estudios sobre la aplicación de cultivos protectores para el control de *Listeria monocytogenes* en productos vegetales frescos 54-55

Tabla 16. Principales beneficios y limitaciones de la a aplicación de bacteriófagos y cultivos protectores para el control de patógenos alimentarios 57-58

Tabla 17. Brotes de listeriosis asociados a productos vegetales frescos en Estados Unidos 86

Tabla 18. Ejemplos de retiradas de productos por detección de *Listeria monocytogenes* en Estados Unidos y países miembros de la Unión Europea en 2024 88

INTRODUCCIÓN

1. *Listeria monocytogenes*

La bacteria patógena *Listeria monocytogenes* fue identificada por primera vez en la década de 1920 por Murray et al. (1926), y Pirie (1927), quien propuso su denominación definitiva en 1940 (Rocourt y Buchrieser, 2007). Originalmente nombrada como *Bacterium monocytogenes* debido a su aislamiento en conejos y cobayas con monocitosis, el género al que pertenece, *Listeria*, fue denominado en honor al cirujano Lord Joseph Lister, reconocido por sus contribuciones a la antisepsia (Fsihi et al., 2001). Desde entonces, se han descubierto otras especies dentro de este género (**Figura 1**), y su clasificación taxonómica ha evolucionado, especialmente con los avances en biología molecular (Ludwig et al., 2009; Nwaiwu, 2020).

A nivel microscópico, *L. monocytogenes* es un bacilo grampositivo de tamaño reducido, con dimensiones aproximadas de 0,5 a 2,0 µm de longitud y 0,5 µm de anchura, y no formador de esporas. Metabólicamente, exhibe características de una bacteria anaerobia y aerobia facultativa (Bergis et al., 2021), aunque su crecimiento se ve favorecido en condiciones de microaerofilia (Bover-Cid y Garriga, 2014). Las propiedades bioquímicas generales se resumen en la **Tabla 1** (World Organisation for Animal Health [WOAH], 2021), aunque hay que tener en cuenta que existen cepas que pueden no cumplir con todas estas características (Szymczak, 2023).

En la clasificación intraespecífica de *L. monocytogenes*, se reconocen varios subtipos (**Tabla 2**). A mediados de la década de 2000, se desarrolló un método basado en PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para el serotipado de esta bacteria, sustituyendo la metodología tradicional basada en antígenos flagelares y somáticos (Doumith et al., 2004; Seeliger y Höhne, 1979). Originalmente, las especies de este género se clasificaban en cuatro linajes que incluían 13 serotipos. Entre los serotipos mencionados, los tipos 1/2a,

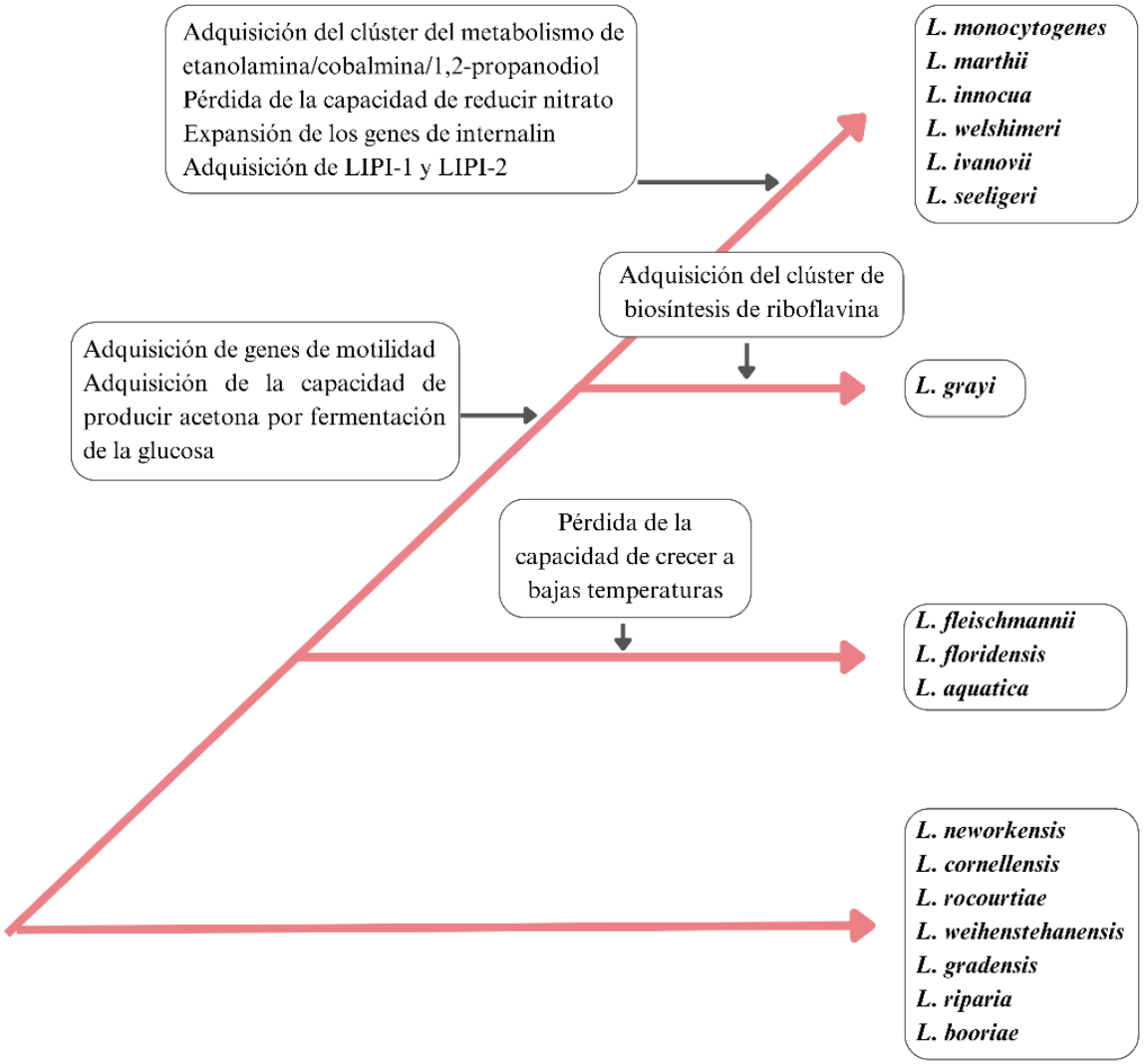


Figura 1. *Esquema de la historia filogenética del género actual* Listeria spp.

Los rectángulos equivalen a taxones monofiléticos propuestos por Orsi y Wiedmann, (2016). El texto explica los eventos evolutivos de adquisición o pérdida de características genéticas que ayudan a definir los taxones actuales.

Nota. Adaptado de Characteristics and distribution of Listeria *spp., including* Listeria *species newly described since 2009 (p. 5282), por Orsi y Wiedmann, (2016), Foods*

***Tabla 1. Propiedades bioquímicas generales de* Listeria monocytogenes.**

Test			Reacción
Características comunes entre *Listeria* spp.	Catalasa		+
	Oxidasa		-
	Indol		-
	Hidrólisis de Aesculina		+
	Ureasa		-
Características diferenciadoras de *L. monocytogenes*	ß-hemolisis		+
	Producción de acido	L-Rhamnosa	+
		D-Xilosa	-
		D-Manitol	-
	Reacción CAMP	*S. aureus*	+
		R. equi	-

1/2b y 4b son los principales agentes causantes de enfermedades en humanos y animales. Con los avances en las técnicas de PCR, estos 13 serotipos se han reorganizado en seis genoserogrupos: IIa, IIb, IIc, IVb, IVb-v1 y L. Entre estos, IVb, IIa y IIb son los más relevantes en términos de patogenicidad humana (EFSA Panel on Biological Hazards [EFSA BIOHAZ Panel], 2018; Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO] y World Health Organization [WHO], 2022; Leclercq et al., 2011)

Tabla 2. Clasificación de las serovariedades de* Listeria monocytogenes *por linajes y genoserogrupos.

Linajes	Serovariedades	Genoserogrupos	Serovariedades
I	1/2b; 3b; 4b; 4b(V), 4d; 4e	IIa	1/2a; 3a
		IIb	1/2b; 3b; 7
II	1/2a; 1/2c; 3a; 3c, 4h	IIc	1/2c; 3c
		IVb	4b; 4d; 4e
III	4a; 4b; 4c; 4ab	IVb-v1	4ab; 4c; 7
IV	4a; 4b; 4c; 4ab	L	4bZ

1.1. Ecología

L. monocytogenes es una bacteria con amplia tolerancia ambiental. A rasgos generales, se puede describir como un microorganismo psicrotrofo que muestra resistencia a la congelación (Bucur et al., 2018). Además, esta bacteria tiene una alta tolerancia al pH, la salinidad y el estrés osmótico y ácido. Las principales características de crecimiento se reúnen en la **Tabla 3** (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L'alimentation, de L'environnement et du Travail [ANSES], 2020; Bover-Cid y Garriga, 2014). Hay que tener en cuenta que éstas se refieren a condiciones óptimas de crecimiento en laboratorio, siendo más restrictivas en matrices alimentarias (FAO y WHO, 2022).

***Tabla 3. Condiciones generales de crecimiento de* Listeria monocytogenes.**

Condiciones de crecimiento	Mínimo	Máximo	Óptimo
Temperatura (ºC)	-2-4	45	30-37
pH (HCl como acidulante)	4,2-4,3	9,4-9,5	7,0
aw (NaCL como humectante)	0,9-0,93	> 0,99	0,97
NaCl (%en fase acuosa)	< 0,5	12-16	-

aw: actividad de agua; HCl: ácido clorhídrico; NaCl: cloruro sódico.

L. monocytogenes es una bacteria ubicua que se encuentra comúnmente en suelos, intestinos de animales y humanos asintomáticos, aguas y ambientes agrícolas, lo que favorece su transmisión a los cultivos y su entrada en la cadena alimentaria (Luque-Sastre et al., 2018; Schoder et al., 2022; Truong et al., 2021) (**Figura 2)**. Este hecho, sumado a su resistencia ambiental, la convierten en un agente problemático en entornos industriales, donde puede volverse endémico y desencadenar problemas de contaminación en los productos finales (Center for Food Security and Public Health [CFSPH], 2017).

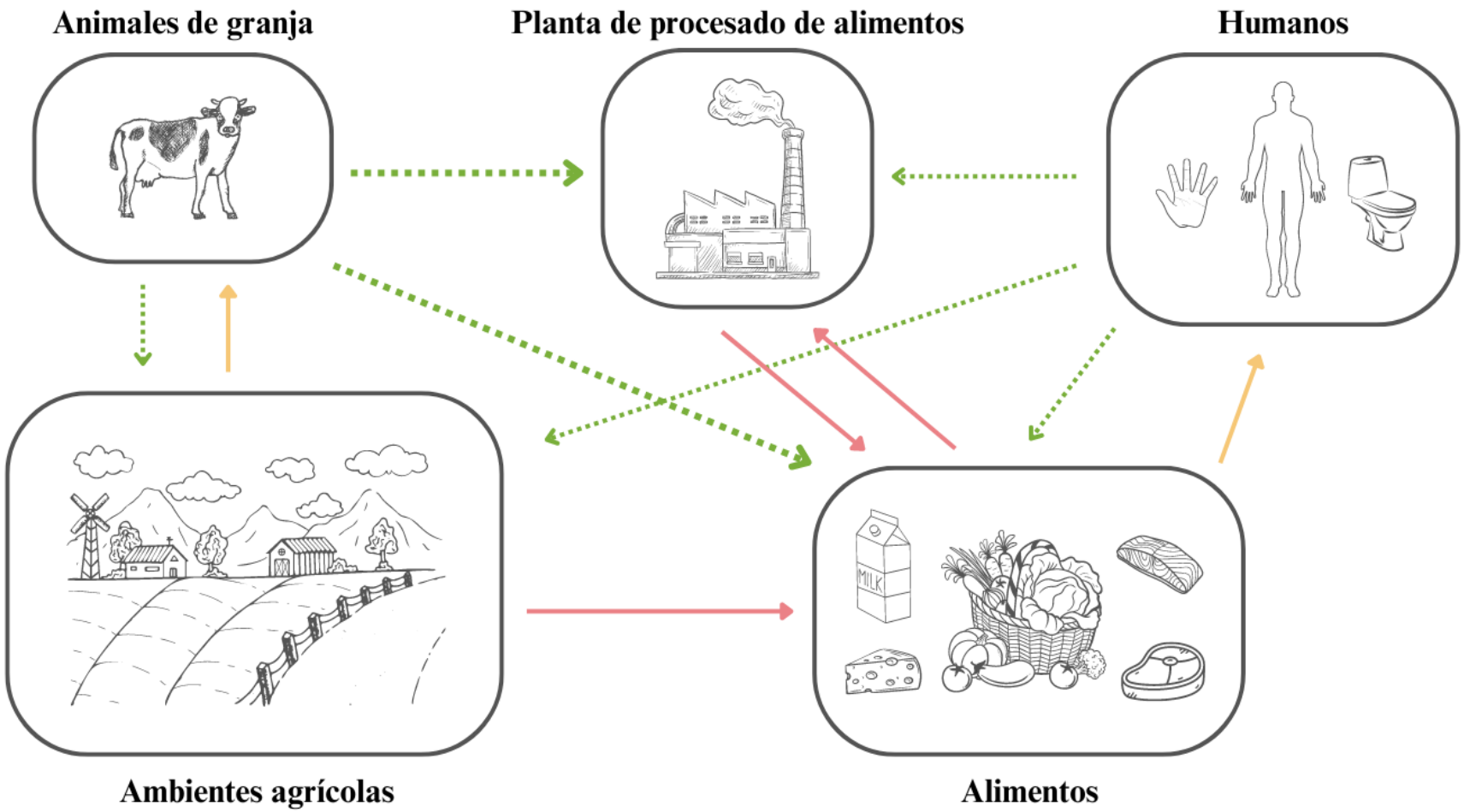


Figura 2. *Escenarios de transmisión de* Listeria monocytogenes *entre rumiantes, humanos, productos alimentarios y el medio ambiente.*

Las flechas en rojo señalan las vías de contaminación más relevantes en las cadenas de transmisión de alimentos más importantes en Europa actualmente; las flechas en verde señalan el papel de la excreción fecal asintomática y las flechas en naranja indican las fuentes de infección.

Nota. Adaptado de Asymptomatic Carriage of Listeria monocytogenes *by Animals and Humans and Its Impact on the Food Chain (p. 2), por Schoder et al., 2022, Foods.*

1.2. Listeriosis: clínica, epidemiologia y patogenia

L. monocytogenes se caracteriza por ser un patógeno oportunista, intracelular facultativo (**Figura 3**), capaz de invadir las células eucariotas y utilizar sus procesos para multiplicarse y propagarse pudiendo evadir la respuesta inmune sin causar un daño significativo a la célula huésped (Luque-Sastre et al., 2018). Este mecanismo le permite sobrevivir en una amplia variedad de células, pudiendo invadir y colonizar varios órganos en el cuerpo del hospedador (Radoshevich y Cossart, 2018).

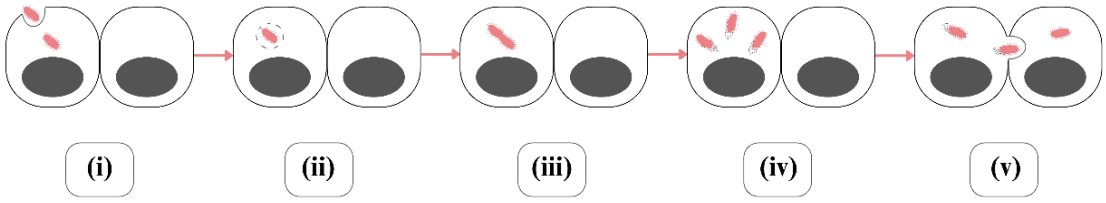


***Figura 3**. Ciclo de infección intracelular de* Listeria monocytogenes. *(Luque-Sastre et al., 2018; Vila, 2013).*

(i)invasión de la célula huésped eucariota. ***Internalina*** *(inlA); (ii) escape de la vacuola intracelular.* ***LLO*** *(hly)* ***PI-PLC*** *(plcA); (iii) proliferación intracelular en el citosol; (iv) propagación intracelular basada en filamentos de actina* ***ActA*** *(acta); (v) diseminación a células adyacentes* ***ActA*** *(acta)* ***PC-PLC*** *(plcB)*

En negrita se resalta la enzima o proteína involucradas en cada proceso y entre paréntesis el gen o genes involucrados. LLO=listeriolisina O; PI-PLC: fosfatidilinositol-específica fosfolipasa C (Phosphatidylinositol - Specific Phospolipase C); ActA; ensamblaje de actina; PC-PLC: fosfatidilicolina-específica fosfolipasa C (Phosphatidylcholine - Specific Phospholipase C).

Nota. Adaptado de Antimicrobial Resistance in Listeria Species (p.42), por Luque-Sastre et al., 2018, Microbiology spectrum y de Vila, 2013, Listeria monocytogenes en comidas preparadas (Comunicación a Congreso. Workshop MRAMA. Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Núm. XII (2013)

L. monocytogenes es el agente etiológico de la enfermedad conocida como listeriosis, reconocida por primera vez en animales de laboratorio en 1924, pero no se hizo evidente que afectaba a los seres humanos hasta finales de siglo (Mclauchlin, 1996; Murray et al., 1926). Se han descrito diferentes formas clínicas y vías de transmisión (listeriosis cutánea, neonatal y transmitida por alimentos) (Schlech, 2019). Por el tema principal de la presente tesis, resulta de interés la transmisión vía alimentaria, siendo esta la principal vía de propagación al humano (Koopmans et al., 2023; Osek et al., 2022) (**Figura 4).**

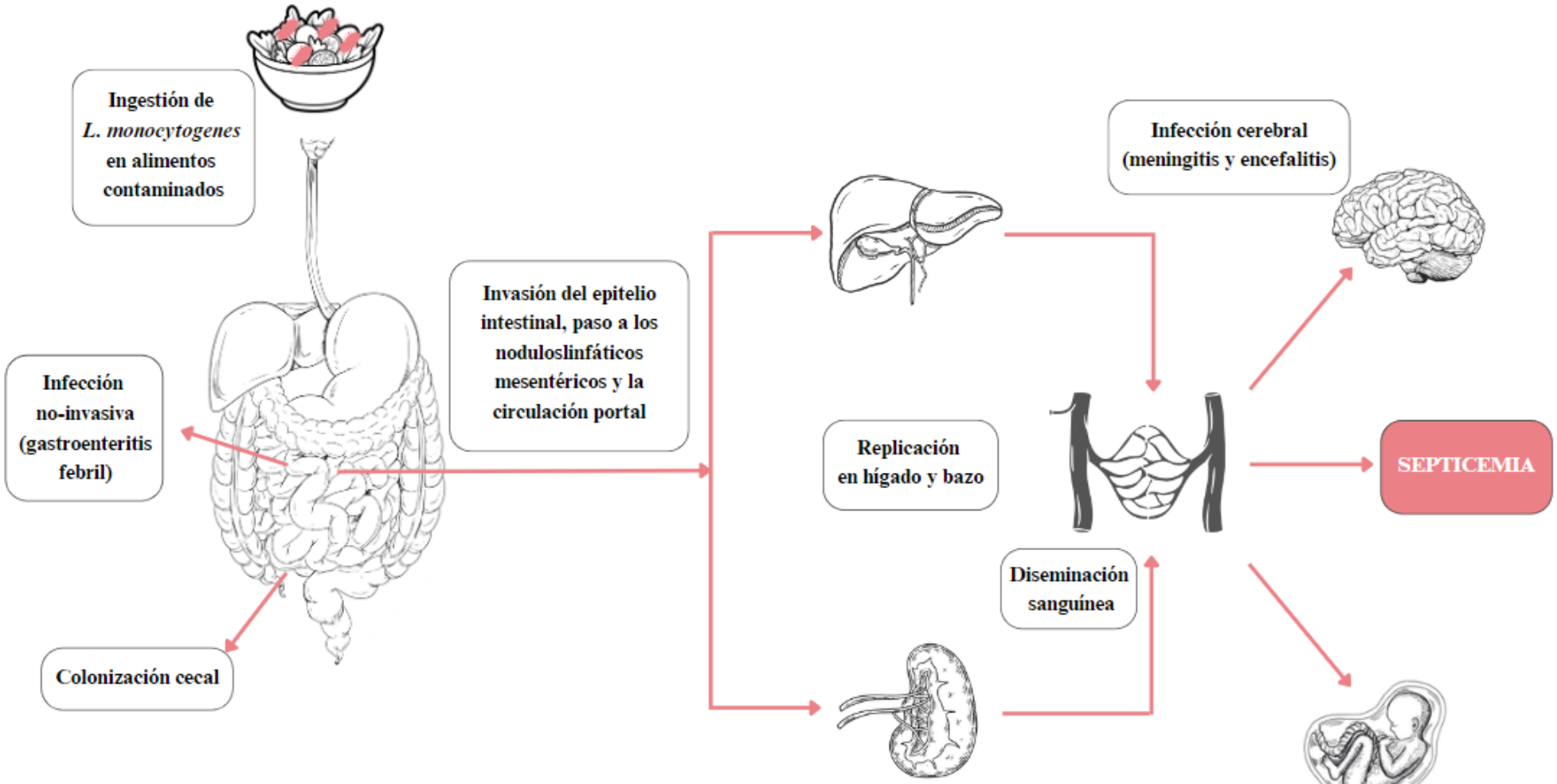


Figura 4. *Diagrama esquemático del ciclo de infección de* Listeria monocytogenes *en humanos.*

Tras la ingestión de alimentos contaminados, las bacterias atraviesan la barrera intestinal hacia el torrente sanguíneo. A través de la circulación portal, el microorganismo es transportado al hígado y al bazo, donde se multiplica antes de diseminarse nuevamente en el torrente sanguíneo. Posteriormente, el patógeno puede infectar el cerebro y la placenta o feto en mujeres embarazadas

Nota. Adaptado de Listeria monocytogenes *Pathogenesis: The Role of Stress Adaptation, (p.3) por Sibanda y Buys, 2022, Microorganisms.*

Se desconoce la dosis infecciosa necesaria para la transmisión oral de la infección, pero se cree que depende de la cepa bacteriana, la matriz alimentaria y la susceptibilidad de la persona (Nayak et al., 2015; CFSPH, 2017). La infección puede manifestarse de dos formas clínicas diferentes, dependiendo de su severidad. Una forma no invasiva de la infección se presenta en forma de gastroenteritis, generalmente en personas sanas, sin factores de riesgo, cuando consumen alimentos con una concentración alta de la bacteria, Esta forma suele remitir sin complicaciones (Ng et al., 2023; Sim et al., 2002). Por otro lado, la forma invasiva de la infección resulta significativamente más grave, afectando principalmente a grupos poblacionales de riesgo, como mujeres embarazadas, personas de edad avanzada e individuos inmunocomprometidos. En estos grupos, la dosis infectiva requerida para desencadenar la enfermedad es considerablemente menor y la tasa de mortalidad es elevada 20-30% (Buchanan et al., 2017; Wilking et al., 2021).

2. Métodos de detección e identificación de *L. monocytogenes* en alimentos

La industria alimentaria utiliza predominantemente métodos microbiológicos dependientes de cultivo para la detección de patógenos transmitidos por alimentos, debido a su bajo coste, alta sensibilidad y capacidad para determinar cualitativa o cuantitativamente la presencia de microorganismos (Aladhadh, 2023). En general, estas técnicas son económicas, sensibles, y continúan siendo estándares para la comparación y validación de otros métodos (Food and Drug Administration [FDA], 2019). Sin embargo, presentan varias limitaciones, como la duración prolongada de los procedimientos y el riesgo de contaminación microbiológica (Quintela et al., 2022). Además, estas técnicas solo detectan células en un estado fisiológico que les permite crecer en cultivo (células

cultivables), omitiendo células dañadas o estresadas que pueden seguir manteniendo patogenicidad y representar un riesgo para la salud pública (Zhang et al., 2023).

Para la detección y recuento de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp, existen numerosos métodos que requieren del uso de diferentes tipos de medios de cultivo (**Tabla 4**) (FAO y WHO, 2022). Muchos países, como los pertenecientes a la UE, utilizan o han adaptado los métodos de la Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés) para la detección cualitativa (ISO 11290-1:2017) y cuantitativa (ISO 11290-2:2017) de *L. monocytogenes* en alimentos (International Organization for Standarization [ISO], 2017). Estos métodos de referencia han sido validados, con marcadas tasas de sensibilidad y especificidad, para cinco matrices entre las cuales se encuentran los productos vegetales (Gnanou-Besse et al., 2019). El método ISO 11290 implica el uso de medios de enriquecimiento selectivo primarios y secundarios para aumentar el número de células de *L. monocytogenes* en la muestra, diluyendo posibles inhibidores y facilitando la recuperación del patógeno cuando su estado fisiológico no es óptimo (FAO y WHO, 2022). Estos pasos son especialmente relevantes cuando las muestras contienen niveles bajos del patógeno o una alta carga de microorganismos competidores (Augustin et al., 2016). Tras el enriquecimiento, se procede con la siembra en medios selectivos que promueven el crecimiento de *L. monocytogenes* mientras suprimen la comunidad bacteriana no deseada, facilitando así su detección y aislamiento (Lourenco et al., 2022). Las muestras presuntivamente positivas pueden ser confirmadas mediante pruebas adicionales, tales como análisis fisiológicos, bioquímicos, morfológicos, serológicos o moleculares (Wagner et al., 2021).

Aunque estos métodos de referencia para la detección y cuantificación de *L. monocytogenes* son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, es necesaria la implementación de metodologías más fiables y rápidas que faciliten el análisis de un

número elevado de muestras, agilizando así la gestión de incidencias para evitar que productos contaminados alcancen a los consumidores (Aladhadh, 2023; Fresh Produce Safety Center [FPSC], 2021; Ripolles-Avila et al., 2020).

Los métodos rápidos para la detección de patógenos alimentarios suelen combinar una etapa de enriquecimiento previo con diversas técnicas, como baterías bioquímicas (Naveen Kumar et al., 2022), inmunoensayos basados en anticuerpos como la técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Paramithiotis, 2023), espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight) (Alegría et al., 2024) y técnicas moleculares como PCR y qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*), que destacan por su alta sensibilidad y especificidad (Carlin et al., 2024; Hodzic et al., 2023). Este campo de investigación está en constante evolución con nuevas metodologías emergentes. La técnica basada en fluorescencia PoreGlow (Guk et al., 2024), kits colorimétricos basados en LAMP (*Loop-mediated isothermal Amplification*) (Fiore et al., 2023) o el uso de biosensores nanofotónicos (Fernández-Blanco et al., 2023), son solo algunas de las recientes contribuciones a la detección de este microorganismo en alimentos.

Sin embargo, las técnicas enumeradas anteriormente no permiten la subtipificación de *L. monocytogenes*, paso importante para rastrear el origen de una contaminación y la identificación exacta de la fuente de posibles brotes. Entre los métodos comunes utilizados para la subtipificación se encuentran la PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) o métodos basados en PCR convencional como por ejemplo, las técnicas MLST (*Multilocus Sequence Typing*) (Yoshikawa et al., 2016) o MLVA (*Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis*) (Andrews et al., 2023). En los últimos años, el avance en técnicas moleculares como la secuenciación del genoma completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS), la metagenómica o la cuasimetagenómica, están

permitiendo un gran avance en la subtipificación de microorganismos patógenos en alimentos debido a su mayor poder discriminatorio (Lucchini et al., 2023; WHO, 2018).

La WGS ofrece el nivel más alto de distinción entre cepas bacterianas, siendo de especial utilidad en seguridad alimentaria para investigar brotes transmitidos por alimentos e identificar el origen de la infección, ya que facilita la conexión entre muestras clínicas y fuentes contaminadas (European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC] y European Food Safety Authority [EFSA], 2023; EFSA BIOHAZ Panel, 2019; Fagerlund et al., 2022). Por otro lado, la metagenómica, mediante el uso de técnicas de secuenciación avanzadas como es el caso de la NGS (*Next Generation Sequencing*), permite analizar la composición y función de comunidades microbianas complejas en muestras de alimentos y entornos relacionados, lo que posibilita el estudio de microorganismos que pueden no ser detectados con métodos tradicionales y el seguimiento de genes específicos de patógenos alimentarios (Billington et al., 2022; Hong et al., 2023). La cuasimetagenómica, utilizando la metodología de la metagenómica, permite al concentrar o enriquecer el material genético de ciertos microorganismos, un análisis más dirigido y eficiente de los patógenos alimentarios en muestras de alimentos o ambientales (Hyeon et al., 2018; Ottesen et al., 2020). Estas técnicas están siendo adoptadas progresivamente como herramientas clave en la vigilancia epidemiológica dentro de programas nacionales, investigaciones de brotes y programas de monitorización ambiental en instalaciones de procesado de alimentos (Lakicevic et al., 2023; Lee et al., 2023). El avance hacia métodos rápidos está transformando la vigilancia de la salud pública y la detección de patógenos alimentarios, aunque persisten desafíos como la reducción de costes, la consecución de altas tasas de especificidad y la necesidad de personal especializado, que influyen en su reproducibilidad y armonización internacional (EFSA, 2022; FAO y WHO, 2022; Valderrama et al., 2016).

Tabla 4. Métodos de cultivo para la detección y recuento de* Listeria monocytogenes *y* Listeria *spp.

Método	Tipo	CE	Medio diferencial/selectivo	t (días)	Detección	Referencia
ISO 11290:2017	QL	HFB FB	ALOA PALCAM o OXA	4-7	Lm *Listeria* spp.	ISO, 2017
	QN[a]	BP	ALOA	3-5		
FDA/BAM	QL	BLEB	Uno de: OXA, PALCAM, MOX, LPM Uno de: R&F LMCPM, RAPID'L.mono, ALOA, OCLA, CHROMagar *Listeria*	4-7	Lm	Hitchins et al., 2022
	QN[b]			3-5		
Health Canada MFLP-01	QL	UVM mFB	RAPID' L.Mono PALCAM	4-7	Lm	Health Canada, 2015
GB 4789.30 – 2016	QL	LB	PALCAM, CHROMagar *Listeria*	4-6	Lm	Ministry of Health of People's Republic of China, 2016
MFLP-74	QN[a]	BP	OXA y uno de los siguientes: ALOA, A.L. agar, BBL Chromagar *Listeria*, Brilliance *Listeria* Agar, LPM, MOX, PALCAM, Rapid L'Mono	1-2	Lm	Health Canada, 2015

[a]: se realiza cultivo directo para la cuantificación; [b]: Enumeración se lleva a cabo usando una combinación de MPN y cultivo directo; ALOA: Agar Listeria Ottaviani and Agosti; BAM: Bacteriological Analytical Manual; BLEB: Buffered Listeria Enrichment Broth ; FB: Fraser Broth; HFB: Half-Fraser Broth; FDA: Food and Drug Administration; LB: Listeria Broth; Lm: *Listeria monocytogenes;* LPM: Lithium Chloride–Phenylethanol–Moxalactam Medium; mFB: modified Fraser Broth; MOPS-BLEB: Morpholine-Propanesulfonic Acid–Buffered Listeria Enrichment Broth; MOX: Modified Oxford Listeria Selective Agar; OCLA: Oxoid Chromogenic Listeria agar; OXA: Oxford Medium; PALCAM Listeria Selective Agar; QL: cualitativo; QN: cuantitativo; R&F LMCPM: R&F *L. monocytogenes* Chromogenic Plating Medium; ; t: tiempo; UVM: Modified University of Vermont Broth.

3. Marco legislativo de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo

El marco legal relacionado con *L. monocytogenes* y su presencia en alimentos varía según el país o conjunto de países que se contemplen. En este sentido, juegan un papel fundamental las instituciones de seguridad alimentaria y salud pública. Agencias gubernamentales como la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration,* FDA) (Hitchins et al., 2022) en Estados Unidos (EEUU) o la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority,* EFSA) (EFSA, 2023) de la Unión Europea (UE), juegan un papel crucial en el asesoramiento para la creación y aplicación de normativas relacionadas con *L. monocytogenes* en alimentos por las autoridades competentes. Estas normas pueden abordar aspectos como los límites máximos permitidos, los procedimientos de control y muestreo, así como los requisitos de etiquetado (Bergis et al., 2021).

En el informe nº38 de la última JEMRA (*Joint Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment*) del Comité Mixto FAO (*Food and Agriculture Organization*)/OMS (Organización Mundial de la Salud, en inglés, *World Health Organization,* WHO) se estableció, dentro de la sección sobre límites regulatorios de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (en inglés, *Ready-To-Eat*, RTE), la distinción de dos grandes grupos de países con diferentes enfoques en su legislación (**Tabla 5**) (FAO y WHO, 2022).

En la UE, la regulación de *L. monocytogenes* se rige principalmente por el Reglamento (CE) n.º 2073/2005, que establece criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (15 de noviembre, 2005). Para los alimentos listos para el consumo que no son los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales, entre

Tabla 5. Enfoques legislativos aplicados al control de* Listeria monocytogenes *en diferentes países en alimentos listos para el consumo.

Enfoque	Significado	Países	Legislaciones de referencia
Producto final, usos y ensayos de desafío	Legislación diferente en función de si alimento RTE permite o no crecimiento de *L. monocytogenes*	Países miembros UE, Canadá, Australia	(i) UE: Reglamento (CE) n.º 2073/2005 (ii) Australia y Nueva Zelanda: Food Standards Australia New Zealand Code [FSANZ], 2024
Tolerancia cero	No detección de *L. monocytogenes* en una determinada proporción de producto	EEUU,Turquía	(i) EEUU: Food and Drugs, 2016 (ii) Turquía: Law nº5996 on Veterinary Services Plant Health Food and Feed, 2010

los que se incluyen productos vegetales frescos, se establecen diferentes regulaciones en función de si pueden o no permitir el desarrollo de *L. monocytogenes* durante la conservación (**Tabla 6)**. Asimismo, se especifican los límites de las propiedades que reúnen los productos que no permiten ese crecimiento:

(i) pH ≤ 4,4 o aw ≤ 0,92.

(ii) productos con pH ≤ 5,0 y aw ≤ 0,94.

(iii) productos con una vida útil inferior a 5 días.

(iv) Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.

Es importante tener en consideración que el marco legislativo internacional expuesto en relación con *L. monocytogenes*, centrado en la prevención y control de la contaminación alimentaria para proteger la salud pública, se aplica principalmente en países con economías desarrolladas. Por este motivo, se considera que los casos de

listeriosis están ampliamente subestimados, sobre todo en ciertas regiones geográficas debido a las limitaciones de los sistemas de vigilancia implementados. En este contexto, hay una brecha en la estimación del número real de casos de listeriosis en América Latina, África y algunas zonas de Asia que reducen la posibilidad de implementar medidas de prevención y avanzar en la protección de la salud pública global (FAO y WHO, 2022).

Tabla 6. Criterios de Seguridad Alimentaria para* Listeria monocytogenes *en alimentos Ready-to-Eat (RTE) en la Unión Europea.

Categoría de alimento	Toma de muestras[a]		Límites[b]	Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
	n	c			
Alimentos RTE que pueden favorecer el desarrollo de Lm	5	0	100 UFC/g[b]	EN ISO 11290-2[c]	Productos comercializados durante su vida útil
	5	0	No detectado en 25 g[d]	EN ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido
Alimentos RTE que no pueden favorecer el desarrollo de Lm[a]	5	0	100 UFC/g	EN ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil

[a] En circunstancias normales, no se exige realizar pruebas regulares con respecto a este criterio para frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas; [b]Este criterio se aplica si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 UFC/g durante su vida útil; [c] Sobre una placa de Petri de 140 mm de diámetro o tres placas de Petri de 90 mm de diámetro se siembra 1 ml de inóculo.; [d]Este criterio se aplica a los productos antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando este no pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 UFC/g durante su vida útil; c: número de unidades de la muestra que pueden superar el límite; g:gramo; Lm: *L. monocytogenes*; n: número de unidades que componen la muestra; UFC: unidad formadora de colonia.

4. Productos vegetales frescos listos para consumir

El concepto de productos vegetales frescos listos para consumir en español es equiparable a términos anglosajones como “fresh-cut”, “ready-to-use”, “minimally processed” o “slightly processed (De Corato, 2019; Firdous et al., 2023). El término se refiere a cualquier producto vegetal fresco, o combinación de varios, que ha sido alterado físicamente de su estado original después de la cosecha (por ejemplo, mediante operaciones como el picado, troceado u otras que alteren su estructura física) sin someterse a un procesado adicional como escaldado o cocción, pudiendo o no someterse a un lavado u otro tratamiento antes de ser envasados para su uso por el consumidor (FDA, 2009). También se puede encontrar al respecto, el concepto "productos de IV gama", en algunos artículos o informes de autoridades gubernamentales (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación[MAPA]), el cual, aunque es equiparable, está cayendo en desuso actualmente. Los productos vegetales frescos se engloban dentro de la categoría general de alimentos listos para consumir (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición [AESAN], 2019), para la cual se ha resumido en el apartado anterior la legislación específica en materia de seguridad alimentaria en lo que se refiere a *L. monocytogenes*.

El último Informe de Consumo Alimentario en España de 2023 (MAPA, 2024) informó de un aumento en la ingesta de frutas y hortalizas frescas listas para consumir (4,9 % más de miles de kilogramos para consumo doméstico respecto a 2022). Este sector se ha visto afectado los últimos años por la alta inflación, la sequía, el aumento de los costos de producción y la aplicación de nuevas leyes sobre residuos y envases (García, 2023). No obstante, este sigue siendo un sector de vital importancia para la población cuya calidad y seguridad hay que preservar, especialmente al considerar los cambios en

los hábitos de vida y los beneficios de estos productos en la salud y el bienestar general (Ansah et al., 2018; Ziso et al., 2022).

La calidad de los productos vegetales frescos puede ser evaluada a través de diversos parámetros como la composición de los gases del espacio de cabeza de los envases para detectar posibles signos de deterioro (Alam et al., 2021; Gil y Garrido, 2020), la evaluación subjetiva de atributos como sabor, textura, aroma y apariencia (Abe et al., 2024; Baviera-Puig et al., 2021) o el análisis objetivo de los cambios en el color de los productos (Goisser et al., 2020; Martinez-Velasco et al., 2023). En los últimos años, la incorporación de sensores de gas, junto con la integración de la inteligencia artificial y el análisis de *big data*, han revolucionado el campo del análisis de la calidad de productos vegetales. Estas tecnologías han demostrado ser especialmente valiosas debido a su capacidad para detectar de manera rápida y sensible los gases asociados al deterioro de estos productos, lo que se traduce en una herramientas eficaz para reducir pérdidas económicas (Ma et al., 2023). A pesar de los avances tecnológicos, el uso de paneles de catadores entrenados sigue siendo una práctica ampliamente reconocida y validada por su eficiencia, siempre que se implemente una formación adecuada (Lozano et al., 2023). Además, su uso se ve complementado por la integración de *softwares* de análisis, que mejora la precisión de las evaluaciones sensoriales, introduciendo parámetros objetivos (Orden et al., 2019). Con el fin de lograr una evaluación más objetiva de algunos atributos como los cambios en el color, algunos autores emplean sistemas digitales como el Sistema de Visión Computarizada (*Computer Vision System*, CVS) (Modzelewska-Kapituła y Jun, 2022; Palumbo et al., 2022). Estos sistemas utilizan cámaras digitales, para la captura de imágenes con iluminación controlada y un software especializado para el procesado de las mismas (Iqbal et al., 2016; Segura et al., 2017). Un paso clave de esta metodología es la conversión de los valores capturados a un sistema de coordenadas que permita una

evaluación precisa de la evolución del color de los alimentos, lo que puede indicar tanto el estado de madurez como el posible deterioro de los mismos (Mohi-Alden et al., 2021; Nguyen et al., 2022; Ratprakhon et al., 2020; Rothwell et al., 2023).

5. Microbiología predictiva

La microbiología predictiva es un área de investigación dentro de la microbiología alimentaria que tiene como objetivo proporcionar modelos matemáticos para predecir el comportamiento microbiano en entornos alimentarios (Pérez-Rodríguez y Valero, 2013). Algunos procedimientos que se siguen en el área de seguridad alimentaria para determinar la vida útil de un producto o desarrollar nuevos tipos de productos pueden implicar una gran inversión económica y de tiempo, este es el caso de los ensayos de desafío (Haouet et al., 2018). En este sentido, los modelos predictivos son una herramienta potencial para una mejor planificación del proceso y reducción de costes, y su utilización por la industria es altamente recomendable (Tarlak, 2023). En la **Tabla 7** se resumen algunas aplicaciones de la microbiología predictiva en el campo de la seguridad alimentaria (Fakruddin et al., 2012; Tarlak, 2023).

La microbiología predictiva se basa en la hipótesis de que las respuestas de las poblaciones microbianas a los factores ambientales son reproducibles. Esto significa que, si entendemos cómo ciertas características del entorno afectan a los microorganismos en un tipo de alimento y condiciones de conservación, podemos hacer predicciones sobre su comportamiento en otros alimentos y entornos similares (Ross et al., 1999). Este conocimiento se traduce en modelos matemáticos que posibilitan la predicción del comportamiento de los microorganismos en los alimentos a lo largo del tiempo cuando

se ven sometidos a factores específicos como el pH, la aw o la temperatura (Mullan, 2019).

Tabla 7. Aplicaciones de la microbiología predictiva

Área de aplicación	Ejemplos de aplicaciones
Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC)	(i) Análisis preliminar de peligros (ii) Identificación y establecimiento de punto(s) crítico(s) de control (iii) Acciones correctivas (iv) Evaluación de la importancia de la interacción entre variables
Diseño de experimentos	(i) Determinar número de muestras a preparar (ii) Definición del intervalo entre muestreos
Evaluación de riesgos	(i) Evaluar riesgos potenciales de contaminación microbiana en productos alimenticios. (ii) Permiten simular diferentes escenarios relacionados con factores clave que influyen en la contaminación microbiana: - Condiciones ambientales específicas. - Parámetros intrínsecos y extrínsecos de los alimentos. - Técnicas de procesado. - Condiciones de conservación.
Estudios de vida útil	(i) Predicción del crecimiento de microorganismos específicos que deterioran alimentos (ii) Predicción del crecimiento de patógenos específicos en alimentos
Investigación y desarrollo de productos	(i) Efecto de la modificación de la composición del producto o del procesado en la seguridad alimentaria y el deterioro

Muchos modelos existentes pueden clasificarse según criterios específicos. Podemos distinguir entre modelos cinéticos y modelos de probabilidad basándonos en los eventos microbiológicos que ocurren en determinadas condiciones. Los modelos cinéticos miden las tasas de respuesta, como el crecimiento o la inactivación, mientras

que los modelos de probabilidad predicen la probabilidad de crecimiento de organismos, actividades metabólicas o producción de toxinas en un período determinado (Stavropoulou y Bezirtzoglou, 2019). También se pueden clasificar los modelos según su enfoque, en empíricos y mecanísticos (McMeekin y Ross, 2002). Los modelos empíricos describen matemáticamente un comportamiento específico observado, mediante ecuaciones polinómicas de primer o segundo orden y describen los datos en una relación matemática conveniente, es decir, son modelos de ajuste de curvas (Ferrer et al., 2009). En contraste, los modelos mecanísticos se centran en proporcionar comprensión de la dinámica de las poblaciones microbianas (Dillard et al., 2021). Otra clasificación importante es la que divide los modelos en primarios, secundarios y terciarios. Las principales funciones de estos modelos y algunos ejemplos de los mismos y referencias se incluyen en la **Tabla 8** (Rodriguez, 2003; Whiting y Buchanan, 1992).

Para las industrias de alimentos, resulta de gran interés el desarrollo de modelos terciarios ya que la combinación de representación visual, análisis estadístico y modelado matemático permiten obtener información para elaborar recomendaciones y directrices a los operadores de las mismas (Baranyi et al., 2024). En este sentido, también cabe resaltar que, aunque los parámetros de las ecuaciones que conforman los modelos se determinan inicialmente a partir de pruebas realizadas en el laboratorio, los modelos deben validarse preferiblemente bajo condiciones industriales, ya que se ajustan mejor a la realidad del comportamiento de los microorganismos en la matriz alimentaria de interés y el entorno de procesado estudiado (Bolívar-Carrillo, 2021; Fakruddin et al., 2012; Martino et al., 2005).

Tabla 8. Principales funciones de los modelos primarios, secundarios y terciarios en microbiología predictiva.

Modelo	Función	Ejemplos	Referencias
PRIMARIOS	(i) Describir la evolución microbiana (crecimiento, inactivación, supervivencia) como una función del tiempo. (ii) Estimar parámetros cinéticos.	1. Función de Gompertz 2. Función de Gompertz modificada 3. Modelo logístico 4. Modelo de Baranyi 5. Modelo de Monod de primer orden 6. Modelo de Monod modificado 7. Valores D de inactivación térmica 8. Modelo de Whiting y Cygnarowicz 9. Modelo lineal tres fases	Yoon et al., 2014 Xiong et al., 1999 Schvartzman et al., 2014 Girbal et al., 2021 Diez-Gonzalez et al., 2007 Houtsma et al., 1996 Engstrom et al., 2021 Whiting y Cygnarowicz-Provost, 1999 Garthright et al., 1996
SECUNDARIOS	(i) Controlar factores de los modelos primarios al cambiar los parámetros cinéticos. (ii) Caracterizar parámetros bióticos y abióticos capaces de modificar la cinética microbiana (T, pH, aw etc).	1. Modelo Gamma 2. Modelo de raíz cuadrada Ratkowsky 3. Arrhenius 4. Polinomiales 5. Rosso 6. Weibull	Gangsei et al., 2024 Feng et al., 2024 Fang et al., 2013 Hashemi et al., 2019 Baranyi et al., 2017 Poimenidou et al., 2016

Tabla 8. Principales funciones de los modelos primarios, secundarios y terciarios en microbiología predictiva.

Modelo	Función	Ejemplos	Referencias
TERCIARIOS	(iii) Integrar modelos primarios y secundarios en herramientas informáticas	1. ComBase Predictor 2. PMP (pathogen modeling program) 3. FDA-RISK 4. FILTREX 5. Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP) 6. GInaFiT 7. GroPIN 8. MicroHibro 9. MRV, Microbial Responses Viewer 10. PMM-Lab 11. Sym'Previus	https://www.combase.cc/ https://pmp.errc.ars.usda.gov/ https://www.combase.cc/index.php/en/ https://pmp.errc.ars.usda.gov/ https://www.fda.gov/food/cfsan-risk-safety-assessments https://cit.kuleuven.be/biotec/software/GinaFit https://www.aua.gr/psomas/gropin/ https://www.microhibro.com/ http://mrviewer.info/ https://pmm-lab.com/ https://symprevius.eu/en/

5.1. Modelo Gamma

En el ámbito de la microbiología alimentaria, existen numerosos estudios que investigan las interacciones entre diferentes factores ambientales y el crecimiento microbiano, específicamente bajo condiciones de estrés (Gutiérrez-Chocoza et al., 2023; Martinez-Rios et al., 2019). Un enfoque para el estudio de estas interacciones es el modelo Gamma basado en la hipótesis propuesta por Zwietering et al., (1992; 1996) y alineada con la teoría de obstáculos (Leistner y Gorris, 1995). Este modelo se basa en el supuesto de que los efectos sobre el crecimiento microbiano de los factores ambientales son independientes (cada uno de ellos constituye por sí mismo un "obstáculo") y pueden combinarse mediante multiplicación para la obtención del efecto inhibitorio global (McMeekin et al., 1987).

En base a la premisa descrita, el modelo Gamma permite la cuantificación del efecto inhibitorio de los factores ambientales en el crecimiento microbiano (velocidad de crecimiento u otra tasa representativa) a través de un factor Gamma adimensional (Γ) (Peleg et al., 2022; Serra-Castelló et al., 2022). Este modelo se representa de forma general por la relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) en la combinación de factores ambientales dada, y la velocidad de crecimiento en condiciones óptimas (μ_{opt}) y sería igual al producto de los efectos de los factores ambientales (**1**) (factores Gamma individuales) (Bolívar Carrillo, 2021; Te Giffel y Zwietering, 1999).

$$(\mathbf{1})\ \Gamma = \frac{\mu}{\mu_{opt}} = \prod_{i=1}^{n} \gamma(Xi)$$

En la ecuación (1) *Xi* es el factor ambiental que afecta al crecimiento microbiano y *γ(Xi)* es el factor Gamma individual atribuido a cada factor ambiental. Los efectos de los factores Gamma individuales pueden ser descritos mediante modelos como el cardinal (Couvert el al., 2010; Ross y Dalgaard, 2003; Rosso y Robinson, 2001). Estos efectos

están vinculados a los valores mínimos, óptimos y máximos que permiten el crecimiento bacteriano para cada factor (Peleg, 2022).

Aunque generalmente en los modelos Gamma se introducen como factores pH, temperatura y aw, el efecto de otros factores ambientales adicionales puede integrarse (Akkerman y Van Impe, 2018). Además, también puede incluirse la interacción entre los factores ambientales (ξ) como un término independiente que no requiere ningún parámetro adicional en el modelo (**2**) (Austrich-Comas et al., 2022; Le Marc et al., 2002; Te Giffel y Zwietering, 1999).

$$(\mathbf{2})\ \Gamma = \prod_{i=1}^{k} \gamma(Xi) \cdot \xi$$

Los valores de $\gamma(Xi)$ y ξ varían de 0 (cuando el crecimiento está completamente inhibido por el factor ambiental) a 1 (cuando el factor o la interacción no afectan la tasa de crecimiento, indicando un crecimiento óptimo para el factor). Tras la aplicación del modelo si Γ=0, el modelo predice no crecimiento y si $1 \geq \Gamma > 0$, el modelo predice crecimiento.

En el ámbito que nos compete, este modelo es de gran interés para entender cómo diversos factores ambientales, como la temperatura, el pH y la aw influyen en el crecimiento microbiano en alimentos y otros entornos, como pueden ser las superficies de la línea de procesado. En este sentido, este tipo de modelos han destacado como útiles para realizar simulaciones basadas en los datos obtenidos de pruebas de desafío pudiendo reducir en algunos casos el número de pruebas necesarias, con la consiguiente reducción de los costes que ello implica (Bidlas y Lambert, 2008).

Algunos estudios que aplican modelos Gamma para determinar el efecto de distintos factores ambientales en el crecimiento de patógenos en distintas matrices alimentarias se incluyen en la **Tabla 9**. Aunque este tipo de modelos ha sido descrito por

algunos de estos autores como útil para evaluar los efectos inhibitorios de distintos factores en matrices alimentarias sin necesidad de generar una gran cantidad de datos, resulta necesario su validación en cada producto particular, sin ser fácilmente extrapolables los resultados a otras categorías de alimentos (Pinon et al., 2004). En este sentido, cabe destacar que hasta hace muy poco, eran muy escasos o casi nulos, los estudios sobre productos vegetales frescos basados en el concepto Gamma.

Tabla 9. Modelos secundarios basado en la hipótesis Gamma, matrices y factores de entrada utilizados en estudios de seguridad alimentaria.

Matriz alimentaria	Factores de entrada	Referencia
Productos cárnicos, lácteos, huevos y productos del mar[a]	(i) Temperatura (ii) pH (iii) aw	Pinon et al., 2004
Leche, productos lácteos, ovoproductos y postres preparados	(i) Temperatura (ii) pH (iii) aw (iv) ácidos orgánicos	Pujol et al., 2012
Pitina	(i) Temperatura (ii) pH (iii) aw	Polese et al., 2014
Salsa bearnesa comercial y puré de calabacín comercial	(i) Temperatura (ii) pH (iii) aw (iv) ácidos orgánicos	Nyhan et al., 2018
Ensalada de pasta	(i) Temperatura (ii) pH	De Cesare et al., 2018
Zumo de naranja, piña y sandía	(i) Temperatura (ii) pH (iii) ºBrix (iv) Coeficientes del carvacrol - Coeficiente de reparto n-octanol-agua (Kow) - Presion de vapor (PV))	Tchuenchieu et al., 2022
Jamón	(i) Temperatura (ii) pH (iii) aw (iv) ácido lactico	Serra-Castelló et al., 2022
Salchichas fermentadas en seco	(i) Temperatura (ii) pH (iii) aw (iv) Concentración de ácido láctico no disociado	Austrich-Comas et al., 2022

[a]Salmón, yogur, carne de ave cruda, carne de ave cocida, carne de cerdo salada cruda, palitos de cangrejo, crema de chocolat, paté, salchicha para untar cruda, carne enlatada, lengua de cerdo en gelatina.

6. Estados fisiológicos de *L. monocytogenes* e implicaciones para la seguridad alimentaria en la industria de productos vegetales frescos

En condiciones de estrés, las bacterias, incluidas las patógenas transmitidas por alimentos, pueden activar mecanismos de resistencia que las inducen a un estado de actividad metabólica reducida en el que son capaces de sobrevivir durante largos períodos sin replicarse, lo que les permite persistir en ciertos entornos a pesar de las condiciones adversas. Este estado, denominado viable pero no cultivable (VBNC), fue descubierto por Xu et al. (1982) y ha sido asociado con diferentes bacterias patógenas de transmisión alimentaria, incluida *L. monocytogenes* (Besnard et al., 2000). Las bacterias en estado VBNC pueden eventualmente volver a ser cultivables si se revierten las condiciones adversas, proceso conocido como "resucitación" (Pérez y Rivas, 2022). Además, en este estado, aunque las bacterias no se dividen, a diferencia de las células muertas, conservan la integridad de sus membranas y son capaces de llevar a cabo la expresión génica y realizar actividades metabólicas a un nivel basal (Oliver, 2010; Su et al., 2019; Zhao et al., 2017).

Teniendo en cuenta las implicaciones del estado VBNC, la presencia de estas bacterias en los alimentos o en los entornos de producción, puede representar un problema significativo para la seguridad alimentaria y la salud pública debido a la posible reversión de este estado y la expresión de genes patogénicos (Pan y Ren, 2023; Wideman et al., 2021). Sin embargo, existe controversia en la literatura científica sobre si las bacterias en estado VBNC pueden mantener su virulencia y sobre su capacidad para “resucitar”. Algunos estudios sugieren que los microorganismos en estado VBNC son avirulentos (Cappelier et al., 2007; Habimana et al., 2014; Zhang et al., 2021). Sin embargo, algunos autores han demostrado que ciertas bacterias patógenas (*E. coli O157:H7, L. monocytogenes* y *Salmonella)* en este estado pueden seguir produciendo factores de

virulencia y que además, pueden recuperar su capacidad de infección al volver al estado cultivable (Dinu y Bach, 2011; Dong et al., 2019; Highmore et al., 2018; Jayeola et al., 2022; Van der Linden et al., 2014).

En el contexto de la producción y procesado de productos vegetales frescos, factores como bajas temperaturas, uso de biocidas, estrés osmótico y variaciones de pH, pueden inducir el estado VBNC en *L. monocytogenes* (Ding et al., 2022; Zhao et al., 2017). Algunos autores han centrado sus investigaciones en evaluar si las condiciones de estrés y desinfectantes utilizados en la industria hortofrutícola pueden inducir a los patógenos alimentarios al estado VBNC (**Tabla 10**). Truchado et al. (2020b; 2021) y Gu et al. (2020) demostraron que algunos desinfectantes, comúnmente usados en la industria de vegetales para mantener la calidad microbiológica del agua de lavado como es el caso del cloro y el ácido peracético (PAA), pueden inducir este estado en bacterias patógenas como *E. coli* y *L. monocytogenes*. Highmore et al. (2018) también comprobaron que el cloro inducía el estado VBNC en *L. monocytogenes*, pero también observaron que las células VBNC mantenían su patogenicidad, como se comprobó en los estudios de toxicidad realizados con el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Por otra parte, Brauge et al. (2020) observaron que los desinfectantes habitualmente usados para limpiar superficies en la industria alimentaria (p.ej., desinfectantes de amonio cuaternario), también pueden inducir el estado VBNC en *L. monocytogenes*, incluso cuando se encuentra formando parte de biofilms.

Tabla 10. Estudios sobre el estado Viable pero No Cultivable (VBNC) de patógenos alimentarios relacionados con la industria de productos vegetales frescos.

Especie	Producto	inducción	Referencia
L. monocytogenes	Perejil	HR (47-69%)	Dreux et al., 2007
E. coli O157:H7	Lechuga romana	Baja T (8ºC)	Dinu y Bach, 2011
L. monocytogenes	Espinaca	Cloro	Highmore et al., 2018
S. entérica serovar Thompson	Espinaca	Cloro	Highmore et al., 2018
L. monocytogenes	Agua de lavado[a]	AE	Afari et al., 2019
E. coli O157:H7	Agua de lavado[a]	AE	Afari et al., 2019
E. coli O157:H7	Agua de lavado[b]	PAA	Gu et al., 2020
L. monocytogenes	Agua de lavado[b]	PAA	Gu et al., 2020
S. enterica	Agua de lavado[b]	PAA	Gu et al., 2020
E. coli O157:H7	Espinaca	Cloro	Chhetri et al., 2020
E. coli O157:H7	Agua de proceso[c]	ClO_2	Truchado et al., 2021
L. monocytogenes	Agua de proceso[c]	PAA	Truchado et al., 2021
E. coli O26:H11, O121:H19 y O157:H7	Brotes de guisante	Cloro	Wang et al., 2023

[a]Los resultados fueron hallados en agua de proceso obtenida del lavado de lechuga romana a dos ratios 20g/200 ml o 10 g/200 mL; [b]Los resultados fueron hallados en dos tipos de agua de proceso obtenidos del lavado de diferentes productos vegetales frescos (espinaca y lechuga) con un ratio de 640 g/1400 mL; Los resultados fueron hallados en cuatro tipos de agua de proceso obtenida del lavado de diferentes productos vegetales frescos (lechuga, cebolla, col y espinaca baby) con un ratio de 1500g/1000mL; AE: agua electrolizada; HR: Humedad Relativa; T: temperatura

Considerando lo expuesto sobre las bacterias en estado VBNC, es evidente que este fenómeno representa un reto significativo para la industria de vegetales frescos. Las bacterias en estado VBNC, al no poder ser detectadas por los métodos de cultivo tradicionales, son subestimadas por la industria, y pueden suponer un riesgo potencial para el consumidor final (Dong et al., 2020; Zhao et al., 2017). No obstante, todavía se

necesita más información sobre los riesgos asociados a la transmisión de bacterias patógenas en estado VBNC en el entorno de producción de los productos vegetales frescos. Para abordar este desafío, también es esencial desarrollar y aplicar métodos que permitan detectar y evaluar de manera precisa la presencia y viabilidad de las bacterias en estado VBNC (Wideman et al., 2021). Mientras que el recuento en placa permite determinar el número de bacterias cultivables, la evaluación de la viabilidad requiere técnicas más avanzadas basadas en biología molecular, citometría de flujo o microscopia electrónica (Dong et al., 2020).

En la literatura científica, la qPCR es utilizada habitualmente para evaluar la viabilidad de microorganismos, recibiendo el nombre de viability-qPCR (*Viability Quantitative Polymerase Chain Reaction*) e implica el uso de colorantes fotoreactivos, como el bromuro de etidio monoazida (EMA) y el bromuro de propidio monoazida (PMA o PMAxx). Estos colorantes, utilizados de manera individual o combinada (PEMAX™), junto con la técnica de qPCR, permiten la identificación y cuantificación precisa de células viables (Daranas et al., 2018; Nocker y Camper, 2009; Truchado et al., 2016). Los colorantes fotointercalantes se adhieren al ADN de las células muertas con membranas dañadas o comprometidas, cuando se exponen a luz visible o luz LED (*Light Emitting Diode*) de una longitud de onda específica. Esta unión impide que el ADN marcado sea amplificado durante la PCR posterior, lo que permite diferenciar las células muertas de las células viables (Fleischmann et al., 2021; Trinh y Lee, 2022). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el PMA o PMAxx solo se introduce en el interior de las células bacterianas, cuando están muertas, y con la pared celular comprometida. Esto implica que, si en la muestra a analizar existen células muertas que aún mantienen su membrana intacta, el PMA o PMAxx no puede penetrar, lo que da lugar a una sobreestimación de la concentración de bacterias viables (Truchado et al., 2020). Por ese motivo, se sugiere la

combinación del PMA o PMAxx con otros colorantes (p. ej. EMA) capaces de introducirse en la célula bacteriana cuando la pared celular no está muy dañada.

Algunos estudios han demostrado que la combinación de los colorantes EMA y PMA reduce la señal obtenida por amplificación del ADN de células muertas (con membrana intacta y dañada) y células vivas con membranas inactivas (Agustí et al., 2017; Codony, 2014; 2015). Este método se basa en las propiedades del colorante EMA, que se acumula en células inactivas que carecen de la capacidad metabólica para contrarrestar su absorción mediante mecanismos activos como las bombas de eflujo (**Figura 5**) (Codony et al., 2015).

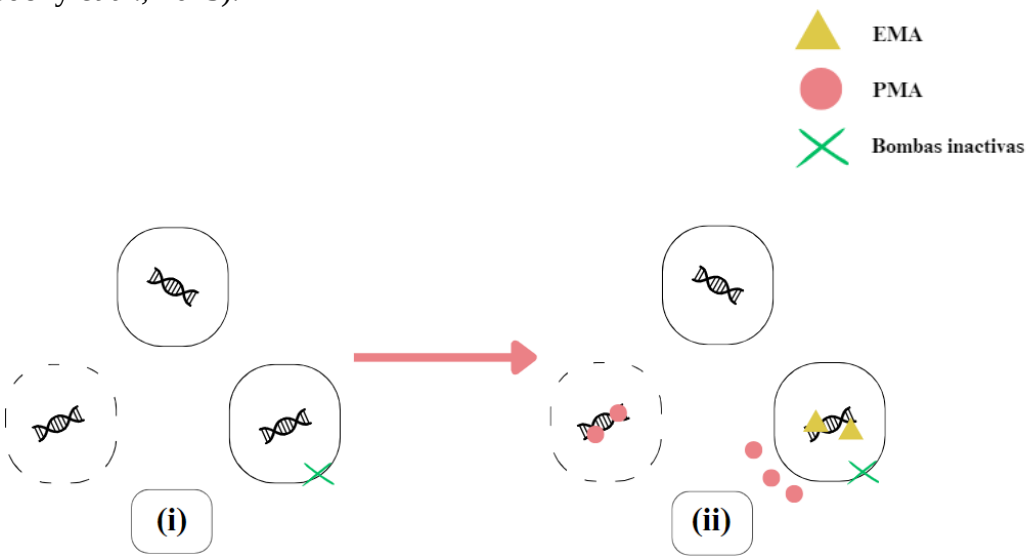


***Figura 5**. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa utilizada para evaluar la viabilidad de microorganismos.*

(i) *Células de izquierda a derecha: célula muerta con membrana dañada, célula viable con membrana intacta y célula muerta o viva inactiva con membrana intacta, pero sin actividad.*

(ii) *Penetración de PMA en células muertas con membrana dañada y unión al material genético. Penetración de EMA en células muertas e inactivas con membranas intactas, pero sin actividad metabólica, y unión del mismo al material genético.*

Actualmente se están investigando otros tintes fotoreactivos con potenciales mejoras en la penetración celular y especificidad de unión al ADN para reducir la presencia de posibles falsos positivos, tales como thiazole orange monoazide (TOMA) y

Green C-2 Azide (DyeTox13) (Cao et al., 2019; Lee y Bae, 2018). Aunque la disponibilidad comercial de EMA, PMA, PMAxx los ha convertido en los tintes más utilizados y evaluados para la detección de bacterias viables en muestras de alimentos en combinación con la qPCR, la combinación de estos tintes con otras técnicas de amplificación de ADN más sensibles y específicas, como LAMP y ddPCR digital (*droplet digital* PCR), también está siendo investigada para la detección de bacterias patógenas viables en muestras de alimentos (Hu et al., 2022; Lv et al., 2021). La implementación de los métodos de detección descritos en la industria hortofrutícola permitiría validar con más precisión la eficacia de las prácticas de desinfección y manejo aplicadas.

7. Medidas de control de *L. monocytogenes* en industria

En la industria alimentaria, *L. monocytogenes* genera problemas de persistencia en los entornos de procesado debido a su ubicuidad, su capacidad para resistir condiciones ambientales adversas y a prácticas de manejo inadecuadas, como la limpieza y desinfección deficientes, lo que aumenta significativamente el riesgo de contaminación alimentaria (Belias et al., 2022; Gil et al., 2024; Nogueira et al., 2023; Tuytschaever et al., 2023). La contaminación cruzada, que ocurre cuando microorganismos patógenos se transfieren de una superficie o alimento a otro, comprometiendo productos previamente libres de estos agentes, representa un desafío crucial para la seguridad alimentaria. Este problema es especialmente preocupante en los productos vegetales frescos ya que se consumen sin procesos de cocinado que puedan eliminar patógenos que puedan estar presentes, incrementándose el riesgo de brotes de toxiinfecciones alimentarias (Carstens et al., 2019; Jones et al., 2020; Possas y Pérez-Rodríguez, 2023).

Las etapas de lavado y aclarado en la industria de frutas y hortalizas frescas son puntos críticos donde puede ocurrir esta contaminación cruzada, particularmente si la calidad microbiológica del agua de lavado no se gestiona adecuadamente (EFSA BIOHAZ Panel, 2023; Gil et al., 2015; Gombas et al., 2017; López-Gálvez et al., 2020, 2021). Para una correcta gestión y mantenimiento de la calidad del agua, se utilizan desinfectantes como el cloro y sus derivados o el ácido peracético (Petri et al., 2021). Sin embargo, la efectividad de estos tratamientos es limitada cuando se emplean en concentraciones recomendadas, pudiendo no eliminar completamente los patógenos e inducir el estado VBNC en los mismos, tal y como se ha sido descrito en la sección anterior (Truchado et al., 2021; Tudela et al., 2019). Además, en los productos vegetales, existe el riesgo de que la contaminación también se produzca en otras etapas del procesado, posteriorES al lavado, debido a la contaminación presente en el ambiente de procesado o del personal de la planta (Huang et al., 2020).

Para mitigar estos riesgos, se han desarrollado estrategias de bioconservación, que utilizan organismos vivos o sus metabolitos, como es el caso de los bacteriófagos o los cultivos protectores, para el control de patógenos tanto en superficies como en alimentos durante las etapas de procesado y conservación (García et al., 2023; Meireles et al., 2016; Ölmez y Kretzschmar, 2009). En EEUU, la FDA ha aprobado estos tratamientos bajo la categoría GRAS (*Generally Recognized as Safe)*, mientras que en la UE, su uso depende de su clasificación como aditivos o coadyuvantes tecnológicos, regulados por el Reglamento (CE) Nº 1333/2008 de 16 de diciembre de 2008, (Estorninho y Teixeira, 2023, **Tabla 11**). En los siguientes subapartados relativos a cada grupo de estrategias de bioconservación en la industria alimentaria, se comentará brevemente el marco legal aplicable.

Tabla 11. Definiciones de aditivo y coadyuvante tecnológico recogidas en el Reglamento (CE) No 1333/2008 de 16 de diciembre de 2008.

Clasificación	Definición
Aditivo	(i) Sustancias que normalmente no se consumen como alimento en sí mismas, ni se usan como ingredientes característicos de los alimentos. (ii) Se añaden intencionadamente a los alimentos para un propósito tecnológico en cualquiera de las fases de su elaboración. (iii) La adición de estas sustancias tiene como resultado que el propio aditivo o sus subproductos se conviertan en un componente de dicho producto alimenticio.
Coadyuvante tecnológico	(i) No se consume como alimento por sí mismo. (ii) Se utiliza intencionadamente en el procesado de materias primas, alimentos o ingredientes para cumplir un propósito tecnológico durante el tratamiento o procesado. (iii) Puede resultar en la presencia no intencionada pero técnicamente inevitable de residuos de la sustancia o sus derivados en el producto final, siempre que estos residuos no representen ningún riesgo para la salud y no tengan ningún efecto tecnológico sobre el producto final.

7.1. Bacteriófagos

Los bacteriófagos fueron descubiertos de manera independiente por Frederick W. Twort en Gran Bretaña en 1915 y por Félix d'Hérelle en Francia en 1917 (Summers, 2012; 2016). El término "bacteriófago" fue adoptado inicialmente por d'Herelle, quién observó que un agente no identificado en muestras de heces humanas tenía la capacidad de

eliminar bacterias (Imran et al., 2023). Los bacteriófagos son virus que infectan y se replican dentro de las bacterias (Singh et al., 2024) y al igual que cualquier virus, tienen una estructura simple y están compuestos principalmente por material genético (ADN o ARN) envuelto en una cápside proteica (Wagh et al., 2023) (**Figura 6)**. Estos virus son omnipresentes en la naturaleza y desempeñan un papel importante a nivel ecosistémico, regulando las poblaciones bacterianas y contribuyendo a la diversidad genética (Clokie et al., 2011; Puxty y Millard, 2023). Los ambientes con alta concentración de bacterias, como suelos, aguas residuales, cuerpos de agua y el tracto gastrointestinal de animales y humanos, son las principales fuentes de bacteriófagos (Elahi et al., 2021; Lin y Lin, 2019; Valente et al., 2021).

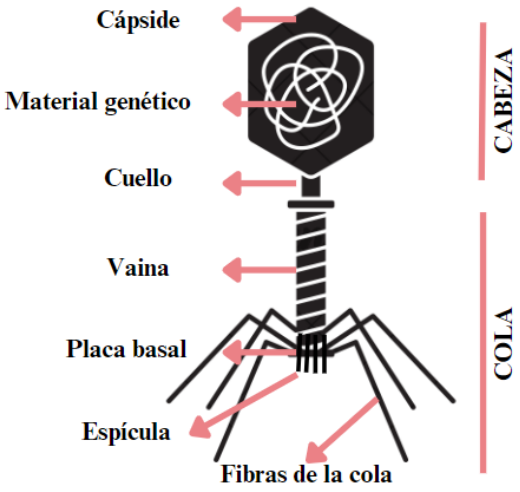


Figura 6*. Estructura de un bacteriófago*

Nota. Adaptado de Novel bacteriophage-based food packaging: An innovative food safety approach, (p.3) por Wagh et al., 2023, Coatings

Respecto al mecanismo de acción de los bacteriófagos se pueden distinguir dos tipos principales de ciclos (Makky et al., 2021) **(Figuras 7 y 8).** El desarrollo de los diferentes tipos de lisis depende de factores como las condiciones ambientales o la interacción específica entre el bacteriófago y la bacteria huésped (Campbell, 2003).

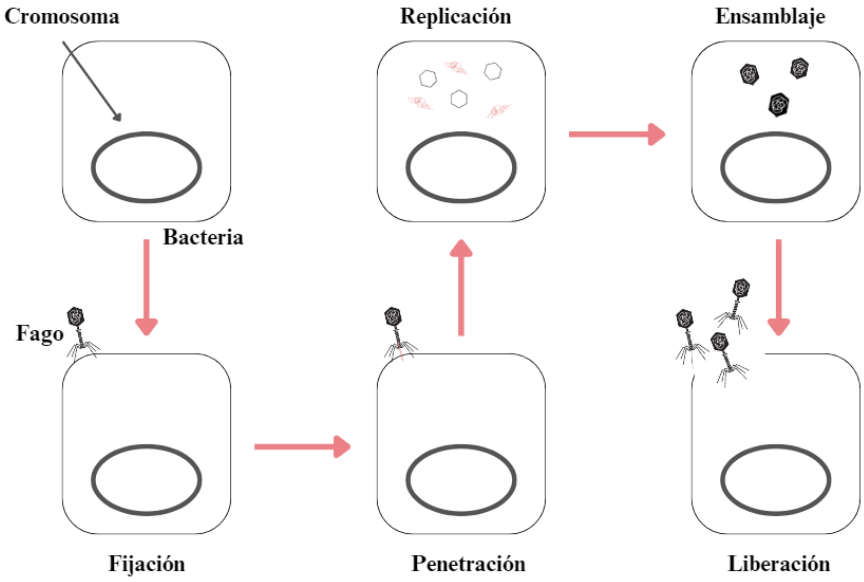


***Figura 7**. Esquema del ciclo lítico de un bacteriófago*

En el ciclo lítico, el bacteriófago se adhiere a la superficie de la bacteria huésped mediante receptores específicos (adsorción) e inyecta su material genético en el interior de la célula (penetración). Utilizando la maquinaria celular de la bacteria, el material genético del bacteriófago se expresa y se replica (replicación), seguido del ensamblaje de nuevas partículas virales dentro de la célula bacteriana (ensamblaje). Este proceso puede causar la muerte de la bacteria huésped, ya que el bacteriófago libera enzimas que degradan la pared celular bacteriana, provocando la ruptura de la célula y liberando los nuevos bacteriófagos al medio ambiente (Luong et al., 2020)

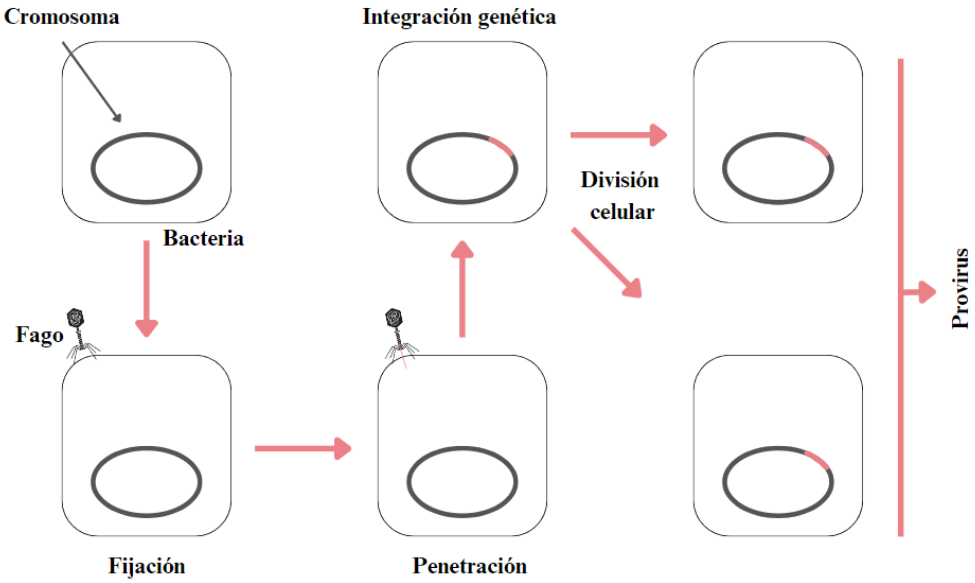


***Figura 8**. Esquema del ciclo lisogénico de un bacteriófago.*

El material genético del bacteriófago se integra en el cromosoma bacteriano y permanece latente durante varias generaciones hasta que se reactiva, entra en la fase lítica y produce nuevas partículas virales, causando la lisis celular. Cabe resaltar que existen casos de ciclos líticos sin producción de nuevos bacteriófagos, en los cuales los bacteriófagos causan la ruptura de la célula bacteriana sin generar nuevas partículas virales (Zhang et al., 2021).

Los bacteriófagos, debido a su actividad antimicrobiana y alta especificidad, son una herramienta tecnológica prometedora en aplicaciones médicas e industriales (Cristobal-Cueto et al., 2021; Elois et al., 2023). Su investigación y aplicación en el campo de la medicina humana, quedaron restringidas desde la década de 1940 a Europa del Este, debido principalmente a la llegada de los antibióticos (Estorninho y Teixeira, 2023; Myelnikov, 2018). Sin embargo, en los últimos años han resurgido como opciones terapéuticas para infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos (Kushwaha et al., 2024). El interés en su uso en la industria alimentaria también ha ganado relevancia (Endersen y Coffey, 2020; Mahony et al., 2011), aplicándose en el control de patógenos en alimentos frescos, procesados y en la agricultura (Grath y Van Sinderen, 2007; Summers, 2012; Villalpando-Aguilar et al., 2023). En estos contextos se emplean bacteriófagos de ciclo lítico y no lisogénico para su aplicación médica e industrial, evitando así el riesgo de transferencia a las bacterias de genes que codifiquen para factores de virulencia o resistencia a antibióticos (EFSA, 2009; Jorquera et al., 2015).

En cuanto a su aplicación para reducir el riesgo asociado a la presencia de *L. monocytogenes* en productos vegetales frescos, algunos estudios han demostrado que estos agentes pueden reducir significativamente las células viables de este patógeno en productos contaminados artificialmente (**Tabla 12**). Algunos autores como Guenther et al. (2009) evaluaron la eficacia (por separado) de dos bacteriófagos por separado (A511 y P100) (Carlton et al., 2005; Loessner y Busse, 1990) con resultados satisfactorios en hortalizas de hoja (lechuga y col). Ambas especies de bacteriófagos exhiben un rango de hospedadores amplio (aunque diferente) dentro del género *Listeria* (Almatar et al., 2024; Kawacka et al., 2020). En este sentido, la FDA recomienda el uso de agentes como los bacteriófagos, que tienen un espectro de acción dirigido al género *Listeria*, incluso en ausencia de detección de *L. monocytogenes*. Esto se debe a que la presencia de especies

no patógenas ya es un indicativo de prácticas de higiene deficientes y de condiciones que podrían favorecer el crecimiento *de L. monocytogenes* (Stambach et al., 2015). Otros autores (Byun et al., 2022; Lone et al., 2016) también encontraron resultados prometedores en el control de *L. monocytogenes* en distintas matrices vegetales como son el melón (Lone et al., 2016) y el apio (Byun et al., 2022), utilizando un cocktail de bacteriófagos. El empleo de un cocktail de bacteriófagos en lugar de la aplicación de un único agente, es una estrategia recomendada por Byun et al. (2022) principalmente para reducir la aparición de resistencias bacteriana y la frecuencia de mutaciones.

Actualmente existen formulaciones comerciales a base de bacteriófagos frente a diversos microorganismos patógenos para su aplicación en alimentos e incluso entornos de procesado (Bumunang et al., 2023). Por ejemplo, en el caso de *L. monocytogenes*, existen formulaciones disponibles en el mercado tales como Listex P100, y ListShield (LMP-102) para su aplicación en alimentos destinados a consumo humano (Hyla et al., 2022). Listex P100 es un producto de la empresa holandesa Micreos Food Safety, que contiene el bacteriófago P100 (EFSA BIOHAZ Panel, 2016). Por su parte, el preparado comercial ListShield, es producido por la empresa Intralytix, y consiste en un cocktail de seis bacteriófagos, diseñado específicamente para controlar *L. monocytogenes* en alimentos listos para consumir (Bren, 2007). Cada uno de estos bacteriófagos es efectivo contra un serotipo específico de *L. monocytogenes* (Sadekuzzaman et al., 2017).

La eficacia de estas formulaciones comerciales en productos vegetales frescos ha sido evaluada en diversos estudios con resultados variables como puede observarse en la **Tabla 12**. Esta variabilidad de resultados es atribuida a que la eficiencia de los bacteriófagos depende de varios factores intrínsecos y extrínsecos como la concentración de bacteriófagos, la matriz alimentaria y las condiciones de conservación (Ranveer et al., 2024).

En la mayoría de los estudios presentados en la **Tabla 12**, en los que se emplearon tanto bacteriófagos experimentales como formulaciones comerciales, las dosis de aplicación suelen estar comprendidas entre 6,0-8,0 Log_{10} UFP/ml. Según Guenther et al., (2009), es crucial usar concentraciones suficientemente elevadas de estos agentes en las matrices alimentarias para destruir las bacterias a través de la infección primaria, sin depender de la autoamplificación. Además, una alta densidad de bacteriófagos aumenta la probabilidad de que éstos alcancen las células objetivo (EFSA, 2009). Cuando se trata de formulaciones comerciales, las dosis vienen recomendadas por el fabricante y han sido probadas en matrices específicas, pero pueden requerir ajustes si se cambian las condiciones o el producto. La variabilidad observada en resultados de la literatura científica pone de manifiesto la necesidad de realizar más investigaciones para evaluar la eficacia de estas formulaciones en diferentes matrices y bajo condiciones que no sean las óptimas para el patógeno, sino las reales de manejo y producción de alimentos (Mahony et al., 2011).

A nivel legislativo, el uso de bacteriófagos en alimentos ha sido aprobado en varias jurisdicciones. En 2006, la FDA aprobó ListShield y Listex (Food and Drugs, 2011b) como aditivos para alimentos listos para consumir, siendo Listex™ el primer producto aprobado como GRAS recibiendo esta calificación ListShield™ años después (Office of Food Additive Safety, 2006, 2014). En el ámbito europeo, no existe una regulación específica para bacteriófagos, aunque algunos países los permiten bajo leyes nacionales (Costa et al., 2023). Listex P100 cuenta en la UE con una evaluación satisfactoria en cuanto eficacia y seguridad, realizada por el Panel de Peligros Biológicos (BIOHAZ) de la EFSA, en productos listos para consumir de origen animal (EFSA BIOHAZ Panel, 2016). En ausencia de regulaciones específicas, el uso al que se destine la aplicación de los bacteriófagos determina la clasificación y la legislación aplicable

(Estorninho y Teixeira, 2023). En España, tampoco existe una regulación específica vigente que aborde el uso de bacteriófagos en alimentos para prevenir la contaminación por patógenos y actualmente se consideran de forma general coadyuvantes de proceso (Bertó y Ortihuel, 2020).

A pesar de la falta de uniformidad legal sobre la aplicación de bacteriófagos en alimentos, numerosas investigaciones demuestran que las preparaciones a base de estos microorganismos son estrategias de control de patógeno naturales, seguras y prácticamente libres de riesgos, siendo una opción a considerar en el ámbito de la seguridad alimentaria (Zia y Alkheraije, 2023).

Tabla 12. Estudios sobre aplicación de bacteriófagos para el control de Listeria monocytogenes en productos vegetales frescos.

Producto	Agente/ Formulación	Dosis[a]	Principales hallazgos	Referencias
Manzana	ListShield (LMP-102) y LM-103	7,7	Reducción > 0,4 Log_{10} UFC/muestra 7d, 10ºC	Leverentz et al., 2003
Melón	ListShield (LMP-102) y LM-103	7,7	Reducción: 2,0-4,6 Log_{10} UFC/muestra 7d, 10ºC	Leverentz et al., 2003
Melón	ListShield (LMP-102)	8,0	Reducción: hasta 6,8 Log_{10} UFC/muestra 7d, 10ºC	Leverentz et al, 2004
Lechuga	A511 y P100	8,5	Prevención del crecimiento hasta en 2,0 Log_{10} UFC/g 6d, 6ºC	Guenther et al., 2009
Col	A511 y P100	8,5	Prevención del crecimiento hasta 3,0-4,00 Log_{10} UFC/g 6d, 6ºC	Guenther et al., 2009
Manzana	Listex P100	8,0	Ningún efecto tras 8d, 10ºC	Oliveira et al., 2014
Pera	Listex P100	8,0	Reducción: 0,6 Log_{10} UFC/plug 8d, 10ºC	Oliveira et al., 2014
Melón	Listex P100	8,0	Reducción: 1,5 Log_{10} UFC/plug 8d, 10ºC	Oliveira et al., 2014
Lechuga	ListShield™	8,0 UFP/g	Reducción: 1,1 Log_{10} UFC/g en 5´	Perera et al., 2015

[a] Dosis: Log_{10} UFP/ml, a no ser que se especifique otra medida; d: día; Log:logaritmo; h: hora; UFC/g o ml: unidad formadora de colonia por gramo o por ml; UFP/ml: unidad formadora de placas por ml; LOD: límite de detección(por sus siglas en ingles.

Tabla 12. Estudios sobre aplicación de bacteriófagos para el control de Listeria monocytogenes en productos vegetales frescos.

Producto	Agente/ Formulación	Dosis[a]	Principales hallazgos	Referencias
Manzana	ListShield™	6,0 UFP/g	Reducción: 1,1 Log_{10} UFC/g 24h, 4ºC	Perera et al., 2015
Melón	ListShield™	6,0	Reducción: 1,0 Log_{10} UFC/g 7d, 10ºC	Hong, 2015
Aguacate	Listex P100	6,0	Sin reducción significativa	Strydom et al., 2015
Melón	LinM-AG8, LmoM AG13, y LmoM-AG20	8,0	Reducción < LOD 5d, 4°C y 12 °C Reducción: 1,6 y 2,5 UFC/g tras 12 y 24h, 25ºC	Lone et al., 2016
Espinaca	ListShiel	7,0	Reducción de 1,5-3,2 UFC/cm2 14 d, 4 y 10ºC	Boyacioglu et al. 2016
Tomate	Listex™ P100	8,0	Reducción: 0,5 UFC/ml 6d, 4, 10 y 25ºC	Oladunjoye et al., 2017
Zanahoria	Listex™ P100	8,0	Reducción: 2,0-2,9 UFC/ml 6d, 4, 10 y 25ºC	Oladunjoye et al., 2017
Lechuga romana	ListShield™	6,0-8,0	Reducción: 0,7 Log_{10} UFC/cm^2 24h, 10ºC	Sadekuzzaman et al., 2017

[a] Dosis: Log_{10} UFP/ml, a no ser que se especifique otra medida;; d: día; Log: logaritmo; h: hora; UFC/g o ml: unidad formadora de colonia por gramo o por ml; UFP/ml: unidad formadora de placas por ml; LOD: límite de detección(por sus siglas en ingles)

Tabla 12. Estudios sobre aplicación de bacteriófagos para el control de Listeria monocytogenes en productos vegetales frescos.

Producto	Agente/ Formulación	Dosis[a]	Principales hallazgos	Referencias
Escarola rizada cortada	Listex P100	9,3	Reducción: 2,5 UFC/g 8d (3 a 5º C + 5 a 8ºC)	Truchado et al., 2020b
Apio	LMPC01, LMPC02, LMPC03	7,0	Reducción: 2,2 Log_{10} UFC/g 7d, 4°C	Byun et al., 2022
Champiñon enoki	LMPC01, LMPC02, LMPC03	7,0	Reducción: 1,8 Log_{10} UFC/g 7d, 4°C	Byun et al., 2022

[a] Dosis: log_{10} UFP/ml, a no ser que se especifique otra medida; d: día; Log: logaritmo; h: hora; UFC/g o ml: unidad formadora de colonia por gramo o por ml; UFP/ml: unidad formadora de placas por ml; LOD: límite de detección(por sus siglas en ingles.

7.2. Cultivos Protectores

La primera definición de cultivos protectores fue propuesta por Lücke (1994), quien los describió como cultivos bacterianos añadidos a los alimentos con el fin de inhibir microorganismos patógenos o alterantes, prolongar la vida útil del alimento y mejorar su calidad sensorial. Posteriormente, el concepto de bioconservación, amplió la definición anterior para incluir no solo la adición de cultivos microbianos a los alimentos, sino también los metabolitos que producen y que tienen actividad antimicrobiana (Holzapfel et al., 1995; Stiles, 1996). Más recientemente, Vignolo et al. (2008), ofrecieron una definición que unifica los conceptos anteriores, describiendo la bioconservación como el uso de microorganismos antagonistas y/o sus metabolitos para inhibir microorganismos indeseables, con el fin de aumentar la vida útil de los alimentos sin alterar significativamente sus propiedades sensoriales.

Una cepa bacteriana es considerada cultivo protector cuando reúne una serie de condiciones (Fischer y Titgemeyer, 2023; Souza et al., 2022):

(v) Capacidad para inhibir microorganismos patógenos y/o causantes de deterioro.

(vi) Estabilidad durante el proceso de fabricación del alimento (se debe garantizar la supervivencia durante dicho procesado).

(vii) Actividad bajo condiciones de procesado y conservación del producto alimenticio.

(viii) Seguridad en términos de salud pública (ausencia de citotoxicidad o de genes de resistencias a antibióticos).

Las cepas bacterianas que generalmente se clasifican como cultivos protectores pertenecen en su mayoría a géneros que forman parte del grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), aunque no todas las BAL son cultivos protectores (Engstrom et al., 2021; Souza et al., 2022). Las BAL pueden definirse como un grupo de bacterias grampositivas que producen ácido láctico como uno de los principales productos finales de su

metabolismo (Batt y Tortorello, 2014). Estas bacterias han sido utilizadas desde hace siglos en la producción de diferentes alimentos (Sharma, 2018). No obstante, el reconocimiento e identificación formal de estas bacterias se atribuyen a los trabajos de Louis Pasteur y Ferdinand Cohn, en el siglo XIX (Berche, 2012; Drews, 2000). Cabe mencionar que Joseph Lister, fue el primero que, en 1878, consiguió aislar con éxito una cepa pura de BAL, responsable de la acidificación de la leche (Santivarangkna et al., 2007; Sheng y Zhu, 2021). A partir del siglo XX, se promovió la producción de cultivos de BAL para diferentes aplicaciones industriales (Bintsis, 2018; Hansen, 2002), particularmente en la producción de alimentos fermentados (Abedi y Hashemi, 2020; Wang et al., 2021). En el contexto de la seguridad alimentaria, resulta relevante señalar que ciertas cepas de BAL son de gran interés por producir diferentes compuestos antimicrobianos. Su clasificación y mecanismos de acción se resumen en la **Tabla 13** (Fischer y Titgemeyer, 2023; Punia Bangar et al., 2022; Zhang et al., 2019).

Las bacteriocinas constituyen las moléculas más interesantes en la acción de las BAL (Chen et al., 2022). Estas moléculas son pequeños péptidos, que actúan como un sistema de defensa de las BAL para competir por el nicho ecológico en el que residen (Benítez-Chao et al., 2021; Zacharof y Lovitt, 2012) mediante diferentes mecanismos (Darbandi et al., 2022; Rooney et al., 2020) (**Figura 9).** Una de las primeras bacteriocinas en ser descubierta y de la existe documentación de su actividad antimicrobiana es la nisina, en la década de 1920 (Rogers y Whittier, 1928; Whitehead, 1933). Con el tiempo, se han identificado y caracterizado diferentes bacteriocinas con diferentes estructuras y espectros de actividad. Un resumen de los principales grupos se encuentra en la **Tabla 14** (Khorshidian et al., 2021; Souza et al., 2022; Zimina et al., 2020). La clase IIa incluye bacteriocinas tipo pediocina con marcada actividad frente al género *Listeria spp.* (Darbandi et al., 2022; Yang et al., 2014). Este grupo es el más grande y debido a su

efectividad, estas bacteriocinas son de interés como conservantes alimentarios naturales y no tóxicos (Ibrahim, 2019; Yi et al., 2022).

Tabla 13. Resumen de principales compuestos antimicrobianos de las Bacterias Acido Lácticas (BAL)

Compuestos	Acción Antibacteriana

Ácidos orgánicos	• Reducción del pH interno de la célula.
	  o Desnaturalización de enzimas, ADN y ARN.
	• Gradiente de protones
	  o Inhibición de la ATP sintasa, simportadores de protones y motor flagelar impulsado por protones.

Peróxido de hidrógeno	• Oxidación de componentes celulares
	  o Grupos tiol dentro de las enzimas
	  o Oxidación proteica
	  o Daño ADN
	  o Desacoplamiento de cadena de transferencia de electrones.

Dióxido de carbono	• Acidificación del medio • Producción de metabolitos • Creación de un ambiente anaeróbico
Diacetilo	• Efecto Mutagénico • Estrés oxidativo • Daño proteico
Aldehídos	• Estrés oxidativo • Interacción con grupos tiol
Bacteriocinas	• Despolarización de la membrana • Efectos en la señalización y biosíntesis celular • Efectos en la replicación y transcripción

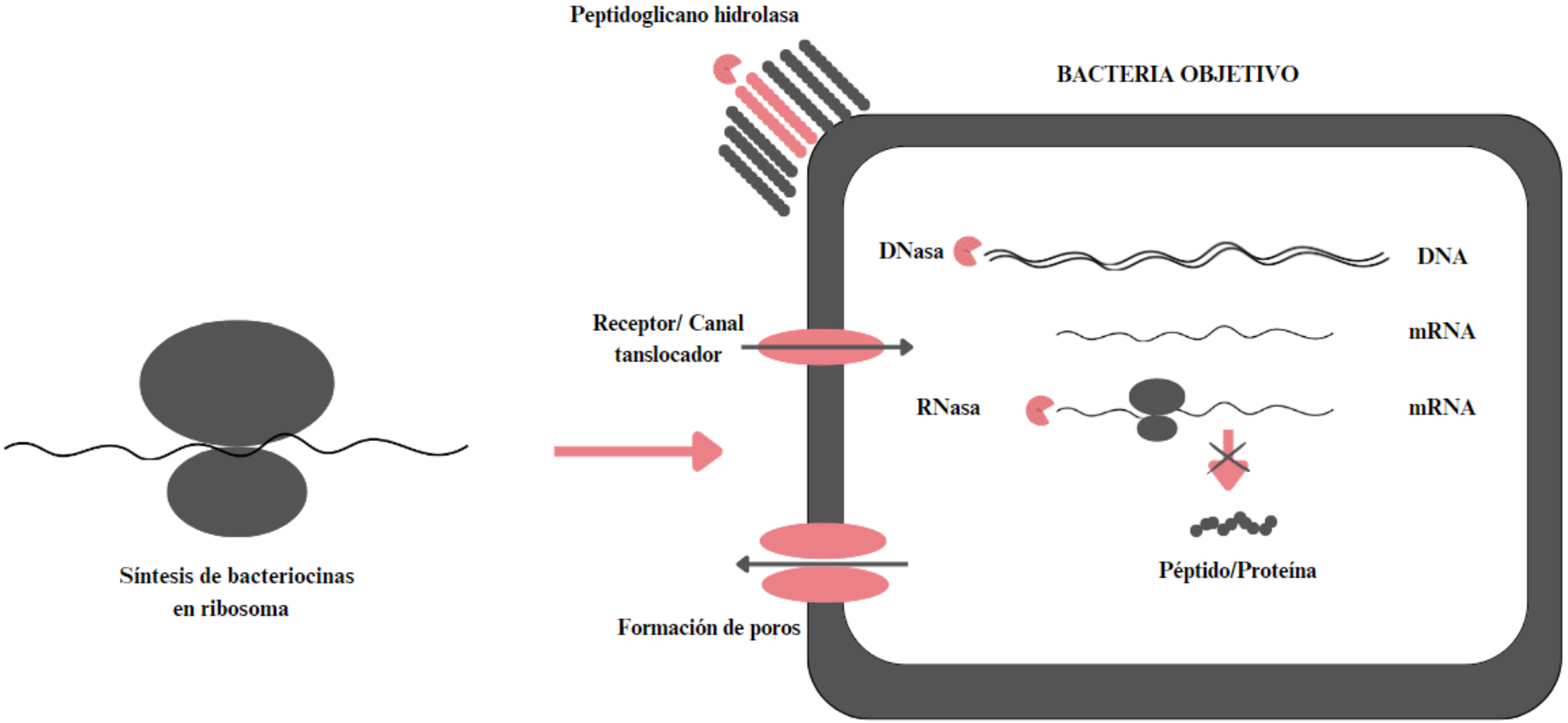


***Figura 9**. Esquema del mecanismo de acción de algunas bacteriocinas.*

Formación de poros o canales en la membrana de la bacteria, lo que provoca la salida de compuestos citoplasmáticos, destruyendo el gradiente electroquímico, y causando la pérdida de iones lo que conduce a la muerte celular del tipo nucleasas, como las funciones DNasa y RNasa(Desoxirribonucleasa y Ribonucleasa), actuando como inhibidores de la síntesis de proteínas o la replicación del ADN o del tipo e tipo peptidoglucano hidrolasa: estas proteínas pueden digerir el precursor del peptidoglicano, lo que provoca la incapacidad de sintetizar peptidoglicano y la muerte bacteriana (Wang et al., 2021; Yang et al).

Nota. Adaptado de Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals (p.2), por Yang et al., (2014) Frontiers in Microbiology

Tabla 14. Clasificación general de las bacteriocinas según estructura.

Clase	Características y subclases		
Clase I	Péptidos lineales o globulares, modificados postraduccionalmente, que contienen lantionina, β-metil lantionina y aminoácidos deshidratados.		
Clase II	Bacteriocinas termoestables, no modificadas, que no contienen lantionina; se trata de una clase heterogénea de pequeños péptidos.	Clase IIa	Bacteriocinas tipo pediocina PA-1
		Clase IIb	Compuesta por dos péptidos
		Clase IIc	Péptido circular
		Clase IId	Péptido lineal, similar a pediocina, de un solo péptido
Clase III	Proteínas grandes, inestables al calor		
Clase IV	Bacteriocinas complejas que llevan componentes lipídicos o carbohidratos.		

Aunque las bacteriocinas se pueden añadir directamente a los alimentos a nivel industrial, existen varios motivos que hacen preferible la adición directa del cultivo protector que las produce (Todorov et al., 2022). En primer lugar, la aplicación de la bacteriocina por sí sola, no es siempre suficiente para proporcionar protección eficaz contra la contaminación microbiana de los alimentos, y en algunos casos, estos péptidos son absorbidos por las matrices alimentarias, lo que favorece su degradación, resultando en una pérdida de actividad antibacteriana (Amin et al., 2023; Silva et al., 2018). Además, algunos autores señalan el alto coste del aislamiento, purificación y producción a escala industrial de estos metabolitos, lo que también limita su uso y la investigación con fines comerciales de nuevas bacteriocinas (Garsa et al., 2014). A esto se le debe añadir que la legislación alimentaria de algunas autoridades regulatorias de salud limita la aprobación

de nuevas bacteriocinas como conservantes alimentarios (Silva et al., 2018; Soltani et al., 2021).

En la literatura, todavía son muy escasos los estudios disponibles sobre el uso de cultivos protectores en los productos vegetales frescos, siendo más abundantes los estudios realizados en productos de origen animal (Bintsis y Papademas, 2024; Cifuentes-Bachmann y Leroy, 2015). Aunque algunos cultivos protectores han demostrado mejorar la seguridad y prolongar la vida útil de los productos vegetales frescos sin afectar sus propiedades sensoriales (Ben Said et al., 2019), su actividad frente a *L. monocytogenes* en matrices vegetales no ha sido ampliamente estudiada. En la **Tabla 15** se resumen los resultados obtenidos en algunos estudios sobre cultivos protectores aplicados a frutas y hortalizas frescas frente a *L. monocytogenes*, mostrando una notable variabilidad en los diseños experimentales. En la mayoría de los casos se observa una reducción en la población microbiana diana. Sin embargo, al igual que ocurre con los bacteriófagos, en algunos casos se utiliza una única cepa de BAL (Alegre et al., 2011; Iglesias et al., 2018), mientras que en otros estudios se utiliza un cocktail de cepas (Siroli et al., 2015; Trias et al., 2008). En este sentido, algunos autores como Coelho et al. (2022), demostraron que el uso de dos o más cepas proporciona mejores resultados en la prevención del crecimiento de *Listeria* spp. en productos de origen animal (queso fresco) que una única cepa, ya que aumenta la probabilidad de producción de metabolitos con acción frente a este patógeno.

Al igual que en el caso de los bacteriófagos, también existen preparaciones comerciales a base de cultivos protectores diseñadas para combatir *Listeria spp.*, especialmente *L. monocytogenes*, aunque no todos ellos se han desarrollado para ser utilizados específicamente en matrices de origen vegetal. Entre ellos cabe destacar el producto Safepro, de la empresa Christian Hansen, que incluye preparaciones contra este

patógeno como son F-LC SafePro-F-Lc (Chr Hansen, 2024). Este producto contiene cepas de BAL como *Lactolactibacillus curvatus* capaces de inhibir *L. monocytogenes* (Ben Said et al., 2019). Otro producto a mencionar es Holdbac Listeria dairy 10D de la empresa DuPont, que contiene una cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* (Aljasir y D'Amico, 2021). Autores como Truchado et al. (2020b) probaron la eficacia de SafePro para el control del crecimiento de *L. monocytogenes* en escarola rizada, con resultados prometedores. No obstante, la eficacia de estos productos varía debido a distintos factores como es el tipo de cepa, el género, la dosis de aplicación, la matriz alimentaria y las condiciones de conservación (Strupar et al., 2021).

En los alimentos, los efectos antimicrobianos de los cultivos protectores y sus bacteriocinas que han sido probados a escala de laboratorio pueden verse comprometidos por factores como la inhibición por bacteriófagos, el antagonismo de otros microorganismos, la pérdida de la capacidad de producción de bacteriocinas o la desestabilización de su actividad biológica (Webb et al., 2023). Por lo tanto, es muy importante poder validar la eficacia de las cepas seleccionadas con alta actividad antilisteria en condiciones reales de utilización y en las matrices alimentarias específicas.

En EEUU, los cultivos protectores y sus metabolitos pueden comercializarse como aditivos alimentarios reconocidos por la FDA (FDA, 2024), o al obtener el estatus GRAS. Este estatus se otorga a un microorganismo a nivel de cepa y para una aplicación determinada, y su aprobación es realizada por un panel de expertos (Fischer y Titgemeyer, 2023). En la UE el uso de cultivos protectores no está regulado de forma general como ingredientes, aditivos o coadyuvantes tecnológicos. Al igual que ha sido mencionado anteriormente, la regulación depende del uso específico para el que estén destinados (Fischer y Titgemeyer, 2023). En 2006, el Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y la Sanidad Animal (*Standing Committee on the Food Chain and Animal Health*,

SCoFCAH), propuso que los cultivos microbianos con fines tecnológico, como la conservación de alimentos, deberían considerarse aditivos, lo que requeriría una evaluación de seguridad por parte de la EFSA (DG Health and Food Safety [DG SANTE], 2006) y la posterior autorización por la CE. La EFSA ha otorgado el estatus de QPS (*Qualified Presumption of Safety*) a muchas especies de BAL (EFSA BIOHAZ Panel, 2024; Zheng et al., 2020) lo que facilita su aprobación por la CE y su comercialización.

Tabla 15. Estudios sobre aplicación de cultivos protectores para el control de Listeria monocytogenes en productos vegetales frescos.

Producto	Agente/Formulación	Dosis[b]	Principales hallazgos	Referencias
Manzana	*Leuconostoc mesenteroides* (*CM135, CM160, PM249)* *Weisella cibaria TM128 Lactococcus lactis ATCC11545*	5,0-9,0	Inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* (<LOD) 2d, 25ºC.	Trias et al., 2008
Iceberg	*L. mesenteroides* (*CM135, CM160, PM249, TM128, ATCC11545)* *W. cibaria TM128 L. lactis ATCC11545*	5,0-9,0	Inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* (<LOD) 2d, 25ºC.	Trias et al., 2008
Manzana	*Lacticaseibacillus rhamnosus GG*	8,0	Reducción: 1,0 Log_{10} UFC/g, 30d 5 y 10ºC	Alegre et al., 2011
Melón	*L. plantarum* B2 CECT 8328, *Lactobacillus fermentum* PBCC11.5 CECT 8448	8,5 UFC/g	Reducción: 2,0-3,0 Log_{10} UFC/g 9d, 4ºC (con ambas cepas de BAL)	Russo et al., 2014
Canónigos	*L. plantarum* V7B3, *Lacticaseibacillus casei* V4B4	7,0	Reducción ≈ 0,5 Log_{10} UFC/g con V7B3, pero no efecto con V4B4 tras 9d a 6ºC.	Siroli et al., 2015
Manzana	*Lactobacillus paracasei* M3B6; *L. plantarum* CIT3	7,0	Reducción de ≈ 0,5 Log_{10} UFC/g con CIT3 y ≈ 0,2 9d, 6ºC	Siroli et al., 2015

[a] Dosis: log_{10} UFC/ml, a no ser que se especifique otra medida; d: día; Log: logaritmo; h: hora; UFC/g o ml: unidad formadora de colonia por gramo o por ml; LOD: límite de detección(por sus siglas en ingles)

Tabla 15. Estudios sobre aplicación de cultivos protectores para el control de Listeria monocytogenes en productos vegetales frescos.

Producto	Agente/Formulación	Dosis[a]	Principales hallazgos	Referencias
Pera	*L. rhamnosus GG*	7,0-8,0	Reducción: 3,5 Log_{10} UFC/g 2d, 20ºC Reducción: 3,0 Log_{10} UFC/g 10d, 10ºC	Iglesias et al., 2017
Pera	*Pseudomonas graminis*	10,0	Reducción: 2,4 Log_{10} UFC/g 10d, 5ºC Reducción: 4,0 Log_{10} UFC/g 10d, 10ºC Reducción: ≈3,0 Log_{10} UFC/g 2d, 20ºC	Iglesias et al., 2018
Escarola	*L. curvatus* (SafePro)	9,0	Reducción: 0,2 – 0,4 Log_{10} UFC/g a 3ºC 5d+ 5ºC 8 días	Truchado, et al., 2020b

[a] Dosis: log_{10} UFC/ml, a no ser que se especifique otra medida; d: día; Log: logaritmo; h: hora; UFC/g o ml: unidad formadora de colonia por gramo o por ml; LOD: límite de detección(por sus siglas en ingles); ≈: aproximada

7.3. Ventajas, desventajas y desafíos de las técnicas de bioconservación

El principal beneficio de los métodos de bioconservación, entre los que se incluyen los bacteriófagos y los cultivos protectores, es la mejora de la seguridad microbiológica del producto final. La protección que proporcionan en el producto final es más sostenible en comparación con los conservantes químicos, lo que reduce la huella ambiental asociada con la conservación de alimentos (Rameez et al., 2024; Garvey, 2022; Possas et al., 2023). Además, la sostenibilidad de estos métodos favorece su introducción en el mercado, alineándose con los objetivos de desarrollo sostenible establecidos por numerosos países (Gymah et al., 2023).

Estas estrategias presentan desafíos importantes en el desarrollo de nuevos agentes y su comercialización para su aplicación en la industria alimentaria (**Tabla 16**). Como se mencionó en los apartados 7.1 y 7.2, la eficacia y estabilidad de estos agentes dependen de factores ambientales, por lo que es necesario ampliar la información sobre su seguridad y eficacia en diferentes matrices alimentarias y condiciones de conservación (Lewis y Hill, 2020; Martín et al., 2022; Xiang et al., 2022; Zapaśnik et al., 2022). Además, la mayoría de los estudios se han realizado a nivel de laboratorio, lo que destaca la necesidad de investigaciones en condiciones industriales (Todorov et al., 2022). La validación industrial permitiría evaluar la inversión necesaria y su viabilidad en el sector hortofrutícola (Lewis y Hill, 2020; Mahillon, 2017; Xu et al., 2023).

Tabla 16. Principales beneficios y limitaciones de la aplicación de cultivos protectores y bacteriófagos como estrategias de bioconservación.

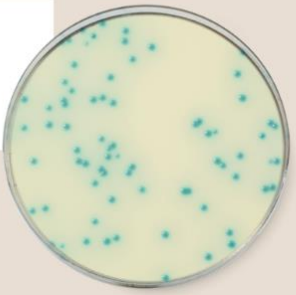
METODOS DE BIOCONSERVACION			
Bacteriófagos	BENEFICIOS	• Organismos más abundantes en la Tierra • Aislables de ambientes naturales • Agentes autorreplicantes • Infectan exclusivamente bacterias y tienen alta especificidad. • No presentan citotoxicidad en células eucariotas. • No afectan la microbiota natural de los alimentos. • No alteran las características sensoriales de los alimentos. • Producibles a escala industrial.	Cristobal-Cueto et al., 2021; Garvey, 2022; Naureen et al., 2020.
	LIMITACIONES	• Inestabilidad evolutiva. • Riesgo de transferencia de genes de resistencia a antibióticos. • Riesgo de aparición de resistencia a bacteriófagos. • Ausencia de directrices y regulaciones definitivas en algunos países, lo que afecta su atractivo para las compañías.	
Cultivos protectores	BENEFICIOS	• Producibles a escala industrial. • Muchos géneros son reconocidos como GRAS y cuentan con el estatus QPS, con mínimo impacto en la calidad sensorial. • Algunas cepas mejoran el valor nutricional siendo beneficiosas para la salud del consumidor. • Algunas cepas prolongan la vida útil del producto reduciendo las pérdidas económicas por deterioro	Ben Said et al., 2019 Gravesen et al., 2000 Saarela et al., 2000 Souza et al., 2022 Todorov et al., 2022 Zapaśnik et al., 2022 Wang et al., 2024

Tabla 16. Principales beneficios y limitaciones de la aplicación de cultivos protectores y bacteriófagos como estrategias de bioconservación.

Cultivos protectores	LIMITACIONES	• Producción a gran escala es económicamente costosa. • El espectro de actividad inhibitoria es limitado. • Efecto variable según la matriz alimentaria y las condiciones de uso. • Posible inhibición de otros cultivos beneficiosos en los alimentos. • Riesgo de citotoxicidad. • Riesgo de diseminación y transferencia de genes de resistencia a antibióticos a patógenos. • Potencial desarrollo de resistencia a las bacteriocinas por parte de los microorganismos patógenos.	Ben Said et al., 2019 Gravesen et al., 2000 Saarela et al., 2000 Souza et al., 2022 Todorov et al., 2022 Zapaśnik et al., 2022 Wang et al., 2024

OBJETIVOS

OBJETIVOS



1

¿Puede *L. monocytogenes* crecer en todos los tipos de frutas y hortalizas?
¿Cuáles son los principales factores que afectan el crecimiento del patógeno?

2

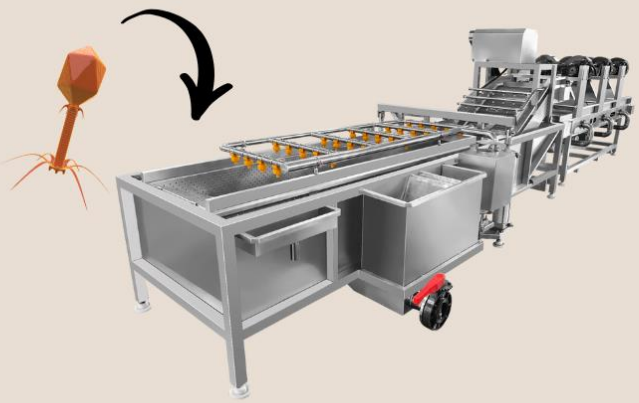
¿Es *L. monocytogenes* capaz de contaminar los productos vegetales frescos durante las etapas de procesado independientemente de su estado fisiológico?

3

¿Son los tratamientos de bioconservación un tratamiento post-proceso eficaz para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en hortalizas de hoja durante su vida útil?

4

¿Pueden aplicarse los tratamientos de bioconservación en la industria de forma eficiente?



El objetivo general de la Tesis Doctoral es identificar factores determinantes del crecimiento y/o estado fisiológico de *L. monocytogenes* en alimentos vegetales frescos que deben ser considerados en los planes de seguridad alimentaria desarrollados en la industria de procesado de frutas y hortalizas frescas. Asimismo, se pretende evaluar la capacidad de distintas estrategias de intervención aplicables a estos productos tras el procesado, con el fin de controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* a lo largo de su vida útil y analizar el posible impacto de dichos tratamientos en la calidad organoléptica de los productos. La consecución del objetivo principal se ha logrado mediante los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Estudiar la susceptibilidad de diferentes tipos de productos vegetales frescos frente al crecimiento de *L. monocytogenes* y los factores críticos implicados. La cinética de crecimiento de este patógeno es altamente dependiente de la matriz alimentaria, así como de otra serie de factores extrínsecos e intrínsecos (pH, aw, temperatura, etc). En consecuencia, se planteó como objetivo primero evaluar la capacidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en distintos alimentos vegetales durante su conservación, basándonos en datos obtenidos de la literatura científica. Además, se evaluó la capacidad de un modelo cinético secundario basado en la hipótesis Gamma para predecir el crecimiento/no crecimiento de *L. monocytogenes* en los productos estudiados. Los productos vegetales que presentaron mayor susceptibilidad al crecimiento de *L. monocytogenes* en las condiciones habituales de conservación se incluyeron en las etapas de trabajo posteriores, teniendo en cuenta el interés comercial y asesoramiento de los colaboradores industriales implicados en el proyecto.

Objetivo 2. Evaluar la contaminación bacteriana teniendo en cuenta el estado fisiológico de los microorganismos patógenos, durante el lavado de productos vegetales frescos. El lavado es una etapa clave en el procesado de frutas y hortalizas frescas, utilizada para eliminar restos de suciedad del material vegetal. Sin embargo, mantener la calidad microbiológica del agua de lavado es crítico para evitar la contaminación cruzada entre el agua y el producto. Los tratamientos de desinfección utilizados para evitar la contaminación del agua de proceso no siempre son capaces de inhibir completamente las bacterias, pudiendo inducir estados de latencia como el estado VBNC. Se analizó la capacidad de los tratamientos de desinfección comúnmente utilizados en la industria para inducir al estado VBNC en diferentes patógenos alimentarios y el riesgo de contaminación cruzada durante la etapa de lavado, así como la capacidad de resucitación de las células VBNC durante la vida útil de los productos vegetales frescos listos para el consumo.

Objetivo 3. Evaluar la capacidad de diferentes tratamientos post-proceso para inhibir y/o controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en los alimentos vegetales seleccionados y su impacto en la calidad organoléptica y vida útil del producto. Se seleccionaron cuatro tratamientos disponibles comercialmente formulados a base de bacteriófagos y cultivos bacterianos productores de bacteriocinas, para su aplicación en los alimentos vegetales seleccionados en el objetivo 1. Se determinó su capacidad para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la vida útil del producto, comparándola con las prácticas habituales de procesado en la industria post-proceso. Una vez seleccionados los tratamientos post-proceso más eficaces frente a *L. monocytogenes*, se evaluó su impacto en la calidad organoléptica de los productos vegetales seleccionados a lo largo de su vida útil.

Objetivo 4. Validación a escala industrial de las estrategias de intervención seleccionadas. El tratamiento post-proceso más eficaz obtenido del objetivo anterior (Objetivo 3), se utilizó en una validación industrial, con el fin de determinar su potencial implementación en las industrias del sector. Este objetivo se llevó a cabo parcialmente en las instalaciones comerciales de empresas de procesado de productos vegetales frescos de los colaboradores industriales (España y Dinamarca). La validación también fue necesaria para determinar la viabilidad de la aplicación de los tratamientos post-proceso en el ambiente industrial. Asimismo, se evaluaron las diferencias en los niveles de *Listeria* spp. entre el producto tratado y el control sin tratar, así como en la calidad organoléptica del producto vegetal también será investigado

RESULTADOS

CAPÍTULO I

“The Gamma concept approach as a tool to predict fresh produce supporting or not the growth of *L. monocytogenes*”

Autores:

Marisa Gómez-Galindo[a], Cristina Serra-Castelló [b 1], Sara Bover-Cid b, Pilar Truchado [a], Maria I. Gil [a], Ana Allende [a]

Revista:

Food Microbiology, Volumen 122, septiembre 2024.

DOI:

https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104554

[a] Research Group on Microbiology and Quality of Fruit and Vegetables, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain

[b] IRTA, Food Safety and Functionality Program, Finca Camps i Armet s/n, 17121, Monells, Spain

[1] Present address: Cristina Serra-Castello, Laboratory of Food Microbiology, Wageningen University, PO Box 17, 6700 AA Wageningen, The Netherlands.

Aplicación de un modelo Gamma como herramienta para identificar productos vegetales frescos que permiten el crecimiento de *L. monocytogenes*

1 Contexto

- ***L. monocytogenes*** **no es capaz de crecer igual en todos los productos vegetales.**
- **Los ensayos de desafío son un gran reto para la industria.**
- **Existen numerosos estudios sobre la capacidad de crecimiento del patógeno en distintas matrices.**

2 Objetivo

Identificar los productos vegetales que supongan un mayor riesgo por permitir el crecimiento *L. monocytogenes* de crecer y los factores críticos que afecten dicho crecimiento.

3 Metodología

- **Revisión bibliográfica.**
- **Aplicación modelo hipótesis gamma.**
- **Priorización del riego.**

$$\Gamma = \frac{\mu}{\mu_{opt}} = \prod_{i=1}^{k} \gamma(Xi)$$

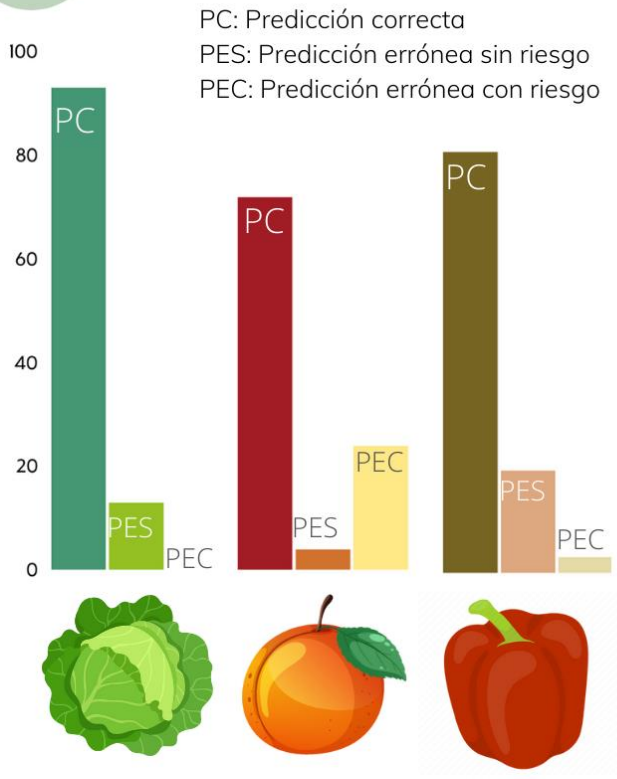
Γ = 0
No crecimiento

78,6 % casos
Predicciones correctas

1 ≥ Γ >0
Crecimiento

21,4% casos
Predicciones incorrectas

4 Resultados



5 Conclusiones

- **El modelo basado en la hipótesis Gamma es una herramienta útil para predecir el crecimiento de *L. monocytogenes* en hortalizas de hoja.**
- **Su utilización puede ayudar a reducir la necesidad de realizar ensayos de desafío por la industria.**

CAPÍTULO II

“Cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in the viable but non-culturable (VBNC) state during washing of leafy greens and the revival during shelf-life”

Autores:

Pilar Truchado[a], Marisa Gómez-Galindo[a], M I Gil[a], Ana Allende[a]

Revista:

Food Microbiology, Volumen 109, febrero 2023.

DOI:

https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104155

[a] Research Group on Microbiology and Quality of Fruit and Vegetables, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain

Contaminación cruzada de *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* en estado viable no cultivable (VBNC) durante el lavado de hortalizas de hoja y su reactivación durante la vida útil

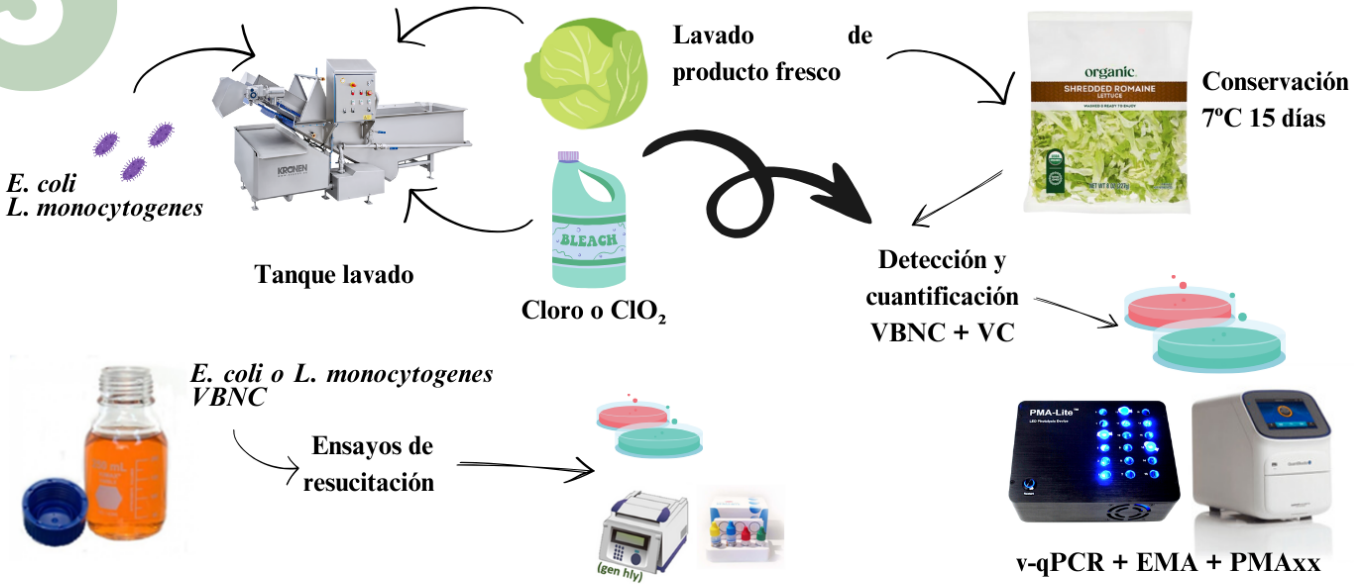
1 Contexto

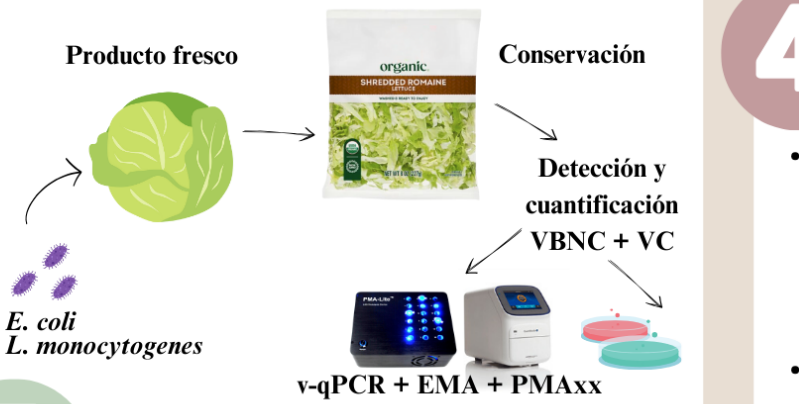
El uso de tratamientos de desinfección de agua para mantener la calidad microbiológica del agua de proceso en las líneas de procesado de frutas y hortalizas puede inducir el estado VBNC en bacterias patógenas.

2 Objetivos

- Estudiar la capacidad de adhesión de las células bacterianas en estado VBNC presentes en el agua de proceso al tejido vegetal.
- Estudiar si las células VBNC adheridas pueden resucitar durante la vida útil del producto.

3 Metodología





4 Resultados

- Las células VBNC de *L. monocytogenes* son capaces de contaminar la lechuga durante la etapa de lavado.
- Una vez en el tejido vegetal, pueden resucitar durante la vida útil.

5 Conclusión

Las células VBNC de *L. monocytogenes* presentes en el agua de lavado son capaces de adherirse al tejido vegetal y a lo largo de la conservación demostraron su capacidad de resucitación, aunque en un porcentaje bajo.

CAPÍTULO III

“Inactivation efficacy of four commercial post-process treatments against *Listeria monocytogenes* and impact on the commercial quality of leafy greens”

Autores:

Marisa Gómez-Galindo[a], Pilar Truchado[a], Marta Volpi[b], Anne Elsser-Gravesen[b], María I. Gil[a], Ana Allende[a]

Revista:

Food Microbiology, Volumen 164, octubre 2024.

DOI:

https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110549

[a] Research Group on Microbiology and Quality of Fruit and Vegetables, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain

b ISI FOOD PROTECTION ApS, Agro Food Park 13, DK-8200, Aarhus N, VAT no. DK-3266664, Denmark

Evaluación de la eficacia de cuatro tratamientos comerciales de post-proceso como estrategias para el control del crecimiento de *L. monocytogenes* durante la vida útil de hortalizas de hoja

1 Contexto

- Persistencia de *L. monocytogenes* en la industria de productos vegetales frescos (riesgo de contaminación cruzada).
- Riesgo de contaminación cruzada por *L. monocytogenes* durante las etapas de procesado de hortalizas de hoja.

2 Objetivo

Estudiar la eficacia de cuatro tratamientos de bioconservación como tratamientos post-proceso para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en hortalizas de hoja durante su vida útil.

3 Metodología

- Aplicación de cuatro tratamientos después del procesado y antes del envasado simulando condiciones industriales en cuatro hortalizas de hoja (lechugas iceberg y romana, col y espinaca baby).

- Evaluación de la eficacia mediante recuento en placa.
- Evaluación del impacto de los tratamientos en la calidad organoléptica del producto.

Tratamientos comerciales

Bacteriófagos: intralytix (SAFETY BY NATURE®), PhageGuard (FOOD SAFETY POWERED BY NATURE)

BAL: DUPONT™, CHR. HANSEN

4 Resultados

- PhageGuard fue el tratamiento más eficaz controlando el crecimiento de *L. monocytognes* durante la vida útil de las distintas hortalizas de hoja.
- La calidad organoléptica del producto no se vio afectada por el tratamiento.

5 Conclusión

PhageGuard Listex es una herramienta eficaz para el control del crecimiento de *L. monocytogenes* durante la vida útil de distintas hortalizas de hoja.

CAPÍTULO IV

"Optimization of the Use of a Commercial Phage-Based Product as a Control Strategy of *Listeria monocytogenes* in the Fresh-Cut Industry"

Autores:

Marisa Gómez-Galindo[a], Pilar Truchado[a], Ana Allende[a], Maria I. Gil[a].

Revista:

Foods. Volumen 12.

DOI:

https://doi.org/10.3390/foods12173171

[a] Research Group on Microbiology and Quality of Fruit and Vegetables, Food Science and Technology Department, CEBAS-CSIC, PO Box 164, E-30_{10}0, Espinardo, Spain

Aplicación industrial de PhageGuard Listex, como tratamiento post-proceso, para el control del crecimiento de Lm en hortalizas de hoja listas para consumir

1 Contexto

A escala de planta piloto, se demostró la eficacia de PhageGuard Listex como tratamiento post-proceso, pero no es posible extrapolar los resultados obtenidos directamente a la industria.

Para recomendar su aplicación a escala industrial existen factores críticos que se deben evaluar:

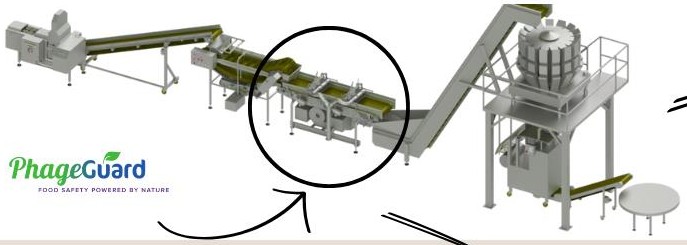
- ¿Es factible alcanzar la concentración mínima recomendada de bacteriófagos en el producto final?
- ¿La cantidad de agua añadida a través de la solución de bacteriófagos afecta negativamente la calidad del producto?
- ¿Cómo se debe aplicar la solución de bacteriófagos para garantizar su distribución homogénea en el producto?

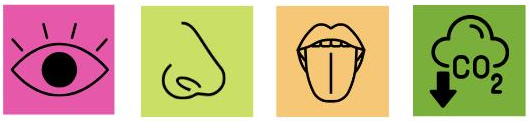
2 Objetivo

Validar la aplicación del tratamiento post-proceso PhageGuard Listex a escala industrial.

3 Metodología

- Aplicación del tratamiento en la planta de procesado en una industria del sector.
- Transporte del producto tratado y envasado al laboratorio.
- Conservación del producto tratado y sin tratar (9-12 días a 7ºC).
- Evaluación de la eficacia mediante recuento en placa.
- Evaluación del impacto de los tratamientos en la calidad organoléptica del producto.





4 Resultados

- La aplicación del tratamiento en la línea de procesado de la industria se realizó con éxito alcanzándose los niveles de bacteriófagos necesario en el producto final (6-7 log UFP/g).
- La concentración de bacteriófagos fue estable durante la conservación del producto.
- No se pudo demostrar la eficacia del tratamiento frente a *L. monocytogenes*, ya que no se detectó en el producto comercial, pero se observó que el tratamiento no causaba ningún efecto perjucidial al producto.

Flujo: 3.33 mL/s

Concentración objetivo: 10^6–10^7 pfu/g

5 Conclusión

Las condiciones de aplicación utilizadas en la validación a escala industrial fuer óptimas para garantizar la eficacia del tratamiento post-proceso.

DISCUSIÓN GENERAL

1. Retos de la industria alimentaria y los alimentos listos para el consumo respecto al riesgo de listeriosis.

Desde finales de la década de 1960, los cambios demográficos en los hábitos de consumo y de producción, el cambio climático y la globalización de la cadena de suministro, así como la mejora de la vigilancia epidemiológica y los métodos de detección han incrementado el número de toxiinfecciones alimentarias (Awad et al., 2023; ECDC, 2024; Lopez-Valladares et al., 2018; Waltner-Toews, 2019). *L. monocytogenes* representa una preocupación significativa en el sector de alimentos listos para el consumo a nivel global debido principalmente a su gran ubicuidad, especialmente en entornos relacionados con la producción primaria, y a sus características ecológicas, destacando su tolerancia al frio y su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración (Butler et al., 2023).

En el ámbito de los alimentos listos para el consumo, las frutas y hortalizas frescas son valoradas por su contribución a una dieta equilibrada, pero también pueden ser vehículos de microorganismos patógenos para el ser humano (Carstens et al., 2019). Para entender el rol que pueden ejercer estos alimentos como transmisores de enfermedades, cabe recordar el brote de *E. coli* O104 que ocurrió en Europa en 2011. Este brote estuvo asociado con brotes germinados y causó 3.más de 3.800 casos de enfermedad declarados, incluyendo 53 muertes en Alemania (Beutin y Martin, 2012; EFSA, 2011; Hu et al., 2024).

En relación con *L. monocytogenes,* los brotes de listeriosis asociados a productos vegetales son relativamente escasos en comparación con los vinculados a productos de origen animal. No obstante, en los últimos años se han reportado varias toxiinfecciones alimentarias causadas por *L. monocytogenes* relacionadas con frutas y hortalizas en Europa y especialmente en EEUU **(Tabla 17).**

Tabla 17. Brotes de listeriosis asociados a productos vegetales frescos en Estados Unidos.

Alimento	Gravedad					Año
	Enf	Hosp	Mts	Estd	Ret	
Melocotones, ciruelas y nectarinas	11	10	1	7	Sí	2023
Hortalizas de hoja	19	18	0	16	No[a]	2023
Champiñón enoki	5	5	0	4	Sí	2022
Ensaladas RTE	18	16	3	13	Sí	2021
Ensaladas RTE	10	10	1	8	Sí	2021
Champiñón enoki	36	31	4	17	Sí	2020
Ensaladas RTE	19	19	1	9	Sí	2016
Brotes de soja	5	5	2	2	Sí	2014
Melón Cantalupo	147	143	33	28	Sí	2011

Enf: Enfermos; Hosp: Hospitalizaciones; Mts: Muertos; Estd: Estados implicados; Ret: Retirada de productos
[a]No se pudo identificar la fuente origen del brote.

En Europa, no se han notificado numerosos brotes asociados a este grupo de alimentos en los últimos 10 años. Sin embargo, hay que destacar el brote asociado a ensaladas que ocurrió en Suiza entre 2013 y 2014 (Stephan et al., 2015). En este brote se registraron 32 casos de listeriosis, vinculados a una cepa de *L. monocytogenes* del serotipo 4b. Las investigaciones revelaron que el origen del brote fue causado por las ensaladas listas para consumir de una empresa, la cual había detectado un problema higiénico en la cinta transportadora de su línea de producción. Además, aunque no está directamente relacionado con productos vegetales frescos, resulta relevante mencionar el brote asociado al maíz congelado que tuvo lugar entre 2015 y 2018, afectando a seis países europeos (Austria, Dinamarca, Finlandia, Hungría, Suecia y Reino Unido) (EFSA BIOHAZ Panel, 2020). A lo largo de los años, el brote afectó a un total de 53 personas y provocó 10 muertes. El patógeno fue rastreado hasta el túnel de congelación de una planta de alimentos congelados en Hungría. A través de la técnica de WGS, se identificó que la cepa de *L. monocytogenes* responsable pertenecía al serogrupo IVb y a la secuencia tipo

6. Este brote también generó grandes pérdidas económicas, ya que se retiraron todos los productos producidos y distribuidos por la empresa involucrada en toda Europa (EFSA BIOHAZ Panel, 2020; EFSA y ECDC, 2018; Fay et al., 2024).

En el último informe sobre zoonosis en la UE, se reportó una incidencia de *L. monocytogenes* del 2,6% (n=1435) en muestras de productos vegetales listos para el consumo. Es importante destacar que aproximadamente el 83,3% de estos datos provinieron únicamente de seis de los veintisiete Estados Miembros de la UE (Bulgaria, Hungría, Italia, Rumanía, Eslovenia y España) (ECDC y EFSA, 2023). A lo largo del año 2024, también se registraron numerosas retiradas de productos debido al riesgo de contaminación por esta bacteria. En la **Tabla 18 (**FDA, 2024; RASFF, 2024) se presenta un resumen de los registros de retiradas de productos debido a la detección de *L. monocytogenes* en productos vegetales frescos producidos tanto en EEUU como en la UE, cuando no se han cumplido las normativas específicas de cada país o región. Desde el inicio de 2024, se han llevado a cabo más de una decena de retiradas de productos vegetales frescos, excluyendo aquellos alimentos listos para el consumo que combinan ingredientes de origen animal y vegetal. Esta situación no solo representa un riesgo para la salud pública, sino que también genera importantes pérdidas económicas y el desperdicio de toneladas de alimentos, lo que pone en evidencia la urgencia de implementar medidas de control más efectivas en la cadena de suministro alimentario. Los brotes registrados y las retiradas de productos por detecciones positivas demuestran que los productos vegetales listos para el consumo constituyen un grupo de riesgo considerable en términos de seguridad alimentaria.

En este contexto, la Comisión Europea (CE) ha presentado una propuesta para alinear las normas de la UE sobre el nivel aceptable de contaminación por *L. monocytogenes* en ciertas categorías de alimentos listos para el consumo con el "*Codex*

Alimentarius". La propuesta contempla la modificación del Anexo I, Capítulo 1 (Criterios de seguridad alimentaria) del Reglamento (CE) nº 2073/2005, mencionado previamente (European Commission, 2024).

Tabla 18. Ejemplos de retiradas de productos por detección de* Listeria monocytogenes *en EEUU y UE durante 2024

Alimentos	País	Fecha
Espinaca	Irlanda (origen Suecia)	05/08/2024
Diversos productos vegetales para preparados y listos para el consumo	EEUU	26/07/2024
Jalapeños, pimientos y guisantes verdes	EEUU	26/07/2024
Gran variedad de productos vegetales y ensaladas envasadas	EEUU	23/07/2024
Pepinos y ensaladas envasadas	EEUU	16/07/2024
Espinaca y ensaladas mixtas	EEUU	27/06/2024
Lechuga	Francia	25/06/2024
Ensaladas envasadas	Bélgica, Francia, Alemania	19/06/2024
Ensaladas envasadas	Francia	07/05/2024
Brotes de soja	EEUU	01/02/2024
Espinaca y ensaladas envasadas	EEUU	17/01/2024

A partir del 1 de enero de 2026, se exigirá que, en los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el crecimiento de *L. monocytogenes*, si el productor no puede demostrar que el crecimiento del patógeno no superará el límite de 100 UFC/g durante toda la vida útil del producto, se aplicará un criterio de no detección en 25 gramos a lo largo de toda la vida útil, y no solo mientras el alimento esté bajo el control del productor. Este cambio busca garantizar un alto nivel de protección de la salud pública desde la producción hasta la distribución de los alimentos.

Para desarrollar protocolos estandarizados eficaces que garanticen la seguridad alimentaria, es fundamental fomentar la colaboración entre científicos, la industria alimentaria y los organismos reguladores. Aunque los estudios sobre el comportamiento

y control de *L. monocytogenes* se han centrado mayormente en productos de origen animal, la preocupación por su presencia en alimentos vegetales está aumentando. Esto se debe a que los brotes recientes de listeriosis han involucrado cada vez más a estos productos, lo que subraya la necesidad de investigar y controlar este patógeno en una variedad más amplia de alimentos (Garner y Kathariou, 2016).

Con el fin de poder comprender los factores que favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes* en productos vegetales a lo largo de las distintas etapas de producción, transporte y conservación, se necesita profundizar en los conocimientos existentes que sirvan a las industrias en la toma de decisiones sobre las medidas de control más adecuadas. Los estudios expuestos en esta tesis, que serán discutidos a continuación, han incrementado la información disponible sobre el tema, lo que puede contribuir a la toma de decisiones en el ámbito industrial para la protección de la salud pública.

2. Microbiología predictiva

Estudios previos han demostrado que no todas las matrices alimentarias permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* en la misma medida y que las condiciones de conservación son factores críticos para su proliferación (Alegbeleye et al., 2022; Moreira et al., 2023; Van Paepeghem et al., 2024; Ziegler et al., 2019). Para determinar si un alimento favorece el crecimiento de un patógeno bajo determinadas circunstancias, existen varias metodologías. Una de las pruebas estándar más importantes para garantizar la seguridad alimentaria son los ensayos de desafío. Sin embargo, a pesar de su importancia, los ensayos de desafío requieren una considerable inversión en tiempo y dinero, lo que puede representar una barrera para su implementación en la industria alimentaria (Bergis et al., 2021; Lanni et al., 2022; Tucci et al., 2019). Como se mencionó

en la introducción, la microbiología predictiva ofrece herramientas eficaces que complementan los métodos tradicionales. Estas herramientas permiten generar predicciones sobre el comportamiento de los microorganismos bajo diferentes condiciones, sin la necesidad de realizar ensayos para cada situación específica. Esto no solo facilita una reducción significativa de los costos, sino que también mejora la gestión de riesgos microbiológicos. Al anticipar posibles problemas de seguridad alimentaria, la microbiología predictiva ayuda a prevenir brotes y minimizar pérdidas económicas derivadas de la retirada de productos a nivel industrial (Odeyemi y Bamidele, 2016).

En el Capítulo I se presentó la aplicación del modelo Gamma para evaluar el comportamiento de *L. monocytogenes* en productos vegetales frescos. Este modelo ha sido utilizado por diversos autores para identificar los factores que determinan el crecimiento de *L. monocytogenes* en diferentes matrices alimentarias. Por ejemplo, Pujol et al. (2012) aplicaron el modelo Gamma en diversos productos de origen animal, como leche, productos lácteos, ovoproductos y postres preparados, utilizando 605 datos sobre el comportamiento del patógeno obtenidos de la literatura científica. Concluyeron que la estructura del modelo era adecuada para analizar datos existentes, aunque estos presentaran una alta variabilidad. De manera similar, en el Capítulo I se utilizaron 808 datos de crecimiento/no crecimientos extraídos de 105 estudios sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* en productos vegetales. Los factores de entrada considerados fueron el pH y la aw de los productos vegetales y la temperatura de conservación. La cantidad de estudios seleccionados y los datos sobre el comportamiento extraídos de la literatura, supera el promedio de trabajos sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* en productos vegetales previamente publicados (Hoelzer et al., 2012; Marik et al., 2020).

Las predicciones obtenidas mediante el modelo Gamma se compararon con datos empíricos descritos en la bibliografía científica, logrando un porcentaje de concordancia

cercano al 90,0% en algunas categorías de productos, como las hortalizas de hoja. La utilidad del modelo Gamma ha sido corroborada en otros estudios. De Cesare et al. (2018) aplicaron el modelo teniendo en cuenta como factores inhibidores temperatura de conservación y pH y aw de una matriz compleja (ensalada de pasta), y hallaron que el modelo predecía adecuadamente la cinética de crecimiento de este patógeno a diferentes temperaturas y condiciones de envasado, pudiendo ser aplicable a matrices similares en diferentes condiciones de conservación. Más recientemente, Austrich-Comas et al. (2022) emplearon el modelo Gamma con el fin de identificar los factores críticos que afectan el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la producción de salchichas de pollo listas para el consumo. Los autores encontraron que, por un lado, la temperatura durante las etapas iniciales del proceso de maduración y también la aw al final de este período, eran determinantes en el control del crecimiento de este patógeno. Por otro lado, Serra-Castelló et al. (2022), utilizando el mismo modelo, pudieron identificar que la aw era el principal factor limitante del crecimiento de *L. monocytogenes* en jamón curado. Estos autores también pudieron identificar el valor umbral de la aw necesario para inhibir el crecimiento de este patógeno en el producto final, y que se puede utilizar para clasificar este producto como alimento listo para el consumo que no permite el crecimiento de este patógeno.

Los resultados obtenidos en el capítulo I mostraron que, como era de preveer, la precisión del modelo aplicado variaba según el tipo de producto. Los diferentes porcentajes de concordancia obtenidos (87,5% en las hortalizas de hoja frente a 78,5 % en frutas), según las categorías de productos en estudio, reflejan la necesidad de ajustar los modelos matemáticos existentes para las diferentes matrices alimentarias, y poder conseguir así que las predicciones sean fiables y aplicables en los diversos contextos industriales (Pinon et al., 2014). En este sentido, puede ser necesario integrar otros factores en los modelos con el fin de que se adapten a los distintos tipos de productos.

Pujol et al. (2012) consideraron como factores de entrada en el modelo la temperatura, pH y aw, en distintos productos de origen animal pero también ácidos orgánicos como ácidos sórbico, acético y láctico. Por otra parte, Tchuenchieu et al. (2022), aplicaron el modelo Gamma para predecir la inactivación de *L. monocytogenes* en zumos de frutas a los que se añadía carvacrol. En este estudio, los factores incluidos en el modelo fueron la temperatura, pH, ºBrix y otros parámetros del carvacrol añadido (PV y Kow). Estos autores no encontraron diferencias significativas entre los valores de inactivación predichos y los valores reales obtenidos. Con el fin de mejorar la capacidad de predecir el comportamiento de *L. monocytogenes* en las frutas ácidas por parte del modelo utilizado en el Capítulo I de esta Tesis, se podrían introducir factores adicionales de entrada. Uno de esos factores relevantes podría ser el contenido de azúcares en las frutas, ya que este factor puede influir significativamente en el crecimiento microbiano (Mizzi et al., 2020).

Los modelos de simulación siempre representan una simplificación de las condiciones reales, ya que suelen considerar un número limitado de factores en comparación con las numerosas variables que influyen en el crecimiento de patógenos en los productos alimenticios (Taiwo et al., 2024; McMeekin y Ross, 2002). No obstante, teniendo en cuenta la concordancia obtenida entre valores reales y predichos por el modelo Gamma utilizado en el Capítulo I, se puede concluir que el modelo es útil para asistir en el proceso de toma de decisiones relativo a la contaminación por *L. monocytogenes* en productos vegetales frescos. Aunque el modelo requiere de algunos ajustes para mejorar su confianza y evaluar de manera integral los factores que determinan el riesgo de listeriosis asociado con el consumo de estos productos, sí que fue eficaz identificando a las hortalizas de hoja como el grupo en el que existe un mayor riesgo de crecimiento de *L. monocytogenes.* Las investigaciones previas centradas en determinar la

capacidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en frutas y hortalizas coinciden con los resultados presentados en esta Tesis. Silva et al. (2017) realizaron una revisión sistemática y un meta-análisis sobre un gran número de datos de prevalencia de patógenos en productos vegetales en tiendas minoristas de Europa. En este estudio, *L. monocytogenes* fue el patógeno con mayor prevalencia en los distintos tipos de productos vegetales. Cabe destacar que las hortalizas de hoja presentaron la mayor incidencia de este microorganismo entre todos los productos vegetales estudiados (2,2%; IC del 95,0%: 1,0-4,7%).

Utilizando aproximaciones diferentes, Lee et al., (2012) elaboraron una clasificación del riesgo entre distintos patógenos y productos vegetales frescos. En este estudio se utilizaron datos de la Comisión del *Codex Alimentarius* (CAC), así cmo de diferentes países desarrollados (frecuencia y gravedad de las enfermedades, frecuencia de consumo y probabilidad de contaminación cruzada). Si bien estos autores no estudiaron el riesgo por categorías de productos, si identificaron en el primer grupo de patógenos asociados a productos vegetales a *L. monocytogenes*. Por otro lado, Anderson et al., (2011) realizaron una evaluación de riesgos para clasificar combinaciones de patógenos y productos hortofrutícolas mediante información obtenida de brotes asociados a productos vegetales en EEUU. Aunque en este caso *L. monocytogenes* no se identificó com el principal agente, las hortalizas de hoja sí que se identificaron como un alimento de riesgo, concretamente, la combinación de hortalizas de hoja y *E. coli* O157 enterohemorrágica (EHEC) ocupó el primer lugar en todas las interacciones del modelo y, en segundo lugar, *S. enterica* en tomates y hortalizas de hoja. Otros autores como Yang y Scharff (2024), desarrollaron estimaciones con el fin de conocer el impacto de la contaminación por distintos patógenos de las hortalizas de hoja y sus subcategorías en la salud pública en los EEUU. Estos autores, señalaron que hasta un 9,2% de las

enfermedades transmitidas por alimentos causadas por patógenos conocidos se atribuyen a hortalizas de hoja y que las lechugas están vinculadas a más del 75,7% de las enfermedades transmitidas por alimentos incluidos en este grupo.

La utilización del modelo Gamma permitió determinar qué productos vegetales frescos eran más susceptibles de permitir el crecimiento de *L. monocytogenes* y así alcanzar el primer objetivo de la tesis doctoral. Cabe destacar que, para nuestro conocimiento, era la primera vez que se aplicaba un modelo Gamma para predecir el comportamiento de este patógeno en productos vegetales frescos y se comparaba con datos obtenidos de la literatura científica. El modelo indica claramente que las hortalizas de hoja son capaces de permitir el crecimiento de *L. monocytogenes*, pudiendo representar un riesgo para la población. Con el fin de determinar el riesgo real de contaminación de hortalizas de hoja por *L. monocytogenes*, también es importante determinar si existen operaciones en la línea de procesado de estos productos, capaces de inactivar o favorecer el crecimiento del patógeno. En este sentido, no solo es importante conocer los puntos críticos en los que la contaminación cruzada del producto puede ocurrir, sino también el impacto que el estado fisiológico de la bacteria puede tener en su capacidad de contaminar el producto vegetal. En el Capítulo II se aborda la capacidad de contaminación cruzada de *L. monocytogenes* al producto vegetal durante la etapa de lavado y si el estado fisiológico de la bacteria afecta su capacidad de contaminación. Si estos factores son relevantes, se deben tener en cuenta y, por lo tanto, incluirse en los modelos predictivos desarrollados para este grupo de alimentos.

3. Relevancia del estado fisiológico de la bacteria en su capacidad de contaminación a lo largo de la cadena de procesado.

El estado VBNC representa un desafío significativo en la seguridad alimentaria de los vegetales listos para el consumo, ya que las células en este estado no pueden ser detectadas por métodos de cultivos tradicionales, pero podrían potencialmente resucitar durante su conservación y ser un riesgo para el consumidor (Truchado y Allende, 2020c; Wideman et al., 2021;Zhang et al., 2023). El estado VBNC de algunos patógenos alimentarios (*E. coli* O157*; S. enterica* serovar Oranienburg) podría ser el responsable de algunos brotes de toxiinfecciones alimentarias, sobre todo en aquellos casos en los que no es posible identificar el vector alimentario de la contaminación (Asakura et al., 2002; Makino et al., 2000; Zhao et al., 2017).

Estudios previos han demostrado que los desinfectantes habitualmente usados en la industria hortofrutícola, tales como Cloro, ClO_2 o PAA, pueden inducir a los patógenos alimentarios al estado VBNC (Gu et al., 2020; Noll et al., 2020, Highmore et al., 2018, Truchado et al., 2020c). Highmore et al. (2018) encontraron que 12,0 mg/L y 3,0 mg/L de cloro libre, inducia respectivamente, al 100% de las células de *L. monocytogenes* y *Salmonella Thompson* presentes en el agua, al estado VBNC. Posteriormente, Truchado et al. (2020c) evaluaron si algunos de los principales desinfectantes utilizados en la industria alimentaria y a las dosis operacionales recomendadas para mantener la calidad microbiológica del agua de lavado, inactivaban o inducían a los patógenos alimentarios (*L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7) al estado VBNC en diferentes tipos de agua de proceso de productos vegetales. Los desinfectantes y las dosis ensayadas por estas autoras fueron los limites previamente recomendados en guias y publicaciones cienttificas para cada desinfectante, cloro a 20,0-25,0 mg/L (Tudela et al., 2019), ClO_2 2,0-3,0 mg/L (Food and Drugs, 2011a) y PAA a 80,0 mg/L (Food and Drugs, 2012) . Truchado et al. (2020c)

hallaron que las dosis recomendadas de PAA y ClO_2, inactivaban una parte del inoculo, pero inducían al resto de células a un estado VBNC. Este estudio demostraba que la actividad antimicrobiana real de los desinfectantes a dosis recomendadas puede estar sobreestimada. Teniendo en cuenta estos hallazgos, se fijó como objetivo del Capítulo II, evaluar si las bacterias en estado VBNC presentes en el agua de lavado pueden ser capaces de adherirse al producto vegetal y, si una vez adheridas al producto vegetal, son capaces de sobrevivir y multiplicarse, representando un riesgo microbiológico para el consumidor de estos productos.

Los resultados del Capítulo II indican que las células VBNC de *E. coli* O157:H7 no fueron capaces de adherirse a la lechuga rallada durante el lavado o, si lo hicieron, sus niveles estaban por debajo del límite de detección después del lavado y durante la conservación (LOD: 0,7 Log_{10} UFC/g). Por el contrario, otros autores han observado que células estresadas de este patógeno conseguían adherirse a la superficie de hojas de lechuga (Van der Linden et al., 2014). Cabe destacar que estos autores estudiaron la adhesión de células estresadas, pero cultivables, y emplearon un método de inoculación diferente (inoculación directa *"spot"* en vez de lavado). Dinu y Bach (2011) detectaron la presencia de la verotoxina en las muestras de producto vegetal inoculado (lechuga), demostrando que las células en estado VBNC de *E. coli* O157:H7 se encontraban metabólicamente activas. Las diferencias observadas entre los distintos estudios publicados en la literatura científica pueden deberse a variaciones en las cepas bacterianas y los tipos de superficies de los productos, además de la dificultad para distinguir entre resucitación de células VBNC, células lesionadas subletalmente y el crecimiento de células cultivables residuales (Li et al., 2014).

En el caso de *L. monocytogenes*, si se detectaron células cultivables y VBNC en la lechuga rallada tras 15 días de conservación a 7ºC. Estos resultados indican que las

células VBNC presentes en el agua de proceso pudieron contaminar el producto durante el lavado (Capitulo II) y que una porción de células en estado VBNC fueron capaces de recuperarse durante la conservación (7°C 15 días). En la misma línea, otros autores han encontrado que el estado VBNC de las células de *L. monocytogenes* es reversible. Highmore et al. (2018) demostraron que *L. monocytogenes* en estado VBNC era capaz de resucitar en el hospedador utilizando el modelo *Caenorhabditis elegans*. Asimismo, Han et al. (2002) observaron que las células VBNC de *L. monocytogenes*, inducidas tras un tratamiento con gas ClO_2 en pimientos verdes, pudieron recuperarse. En contraste, Dreux et al. (2007) observaron que las células VBNC de *L. monocytogenes* inducidas en hojas de perejil bajo condiciones secas (HR 47–69%) no lograron recuperar su capacidad de cultivo, incluso después de ser expuestas a condiciones húmedas (HR 100%).

Los resultados del Capítulo II demuestran por primera vez que las células en estado VBNC de *L. monocytogenes* en agua de proceso pueden adherirse al producto vegetal y resucitar durante su vida útil. Pese a que los recuentos de células cultivables detectados tras 15 días de conservación fueron bajos y próximos al límite de detección (0,7 Log_{10} UFC/g), estos resultados indican que la presencia de estas VBNC no debe de ser subestimada ya que, en condiciones favorables, las bacterias pueden revertir su estado y potencialmente constituir un riesgo para el consumidor. Como señalan Lotoux et al. (2022), en la industria alimentaria, los estándares de seguridad respecto a la contaminación por *L. monocytogenes* se basan principalmente en la detección y recuento de células de este patógeno que se encuentran en estado cultivable. Tanto en EEUU, con su política de tolerancia cero, como en Europa, con criterios menos estrictos para ciertos alimentos listos para el consumo, estos estándares no contemplan el riesgo potencial asociado con las formas VBNC del patógeno. Dado que la detección de bacterias VBNC

es compleja, su presencia debería ser considerada en las evaluaciones de riesgo industrial y en la regulación sanitaria.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los estudios sobre la patogenicidad de las células de *L. monocytogenes* en estado VBNC tienen resultados contradictorios. Highmore et al. (2018) además de demostrar la capacidad de resucitación de *L. monocytogenes* en estado de VBNC en el hospedador, mediante el modelo *C. elegans*, observaron que la esperanza de vida en los nematodos inoculados se veía reducida, sugiriendo un mantenimiento de la virulencia por parte de estas células. Otros autores han detectado la expresión de factores de virulencia (*hly* e *inlA*) en células VBNC de *L. monocytogenes* inducidas por déficit nutricional (Tamburro et al., 2015; Zolfaghari et al., 2019). Sin embargo, como destacan Wideman et al. (2021) en una revisión reciente sobre el estado VBNC en *L. monocytogenes*, todavía no se ha comprobado de manera concluyente que la expresión de genes de virulencia en este patógeno se traduzca efectivamente en patogenicidad en células en estado VBNC. Además, resultados contrarios han sido publicados por diversos autores que señalan que las células de *L. monocytogenes* en estado VBNC son avirulentas (Cappelier et al., 2005; Lindbäck et al., 2010). No obstante, hay que tener en cuenta por ejemplo que pese a que Cappelier et al. (2007) indicaron que las células de este patógeno en este estado VBNC eran avirulentas, también demostraron que, al revertir al estado cultivable, estas bacterias recuperaban la virulencia. También hay que tener en cuenta otros aspectos vinculados a las bacterias en estado VBNC. En el caso de Noll et al. (2020) observaron que el cloruro de benzalconio no solo inducía el estado VBNC en *L. monocytogenes*, sino que también disminuía la susceptibilidad del mismo a los antibióticos.

El hecho de que algunos estudios han demostrado que ciertas células en estado VBNC pueden mantener su virulencia y resucitar, subraya la necesidad de profundizar en

la investigación para comprender mejor bajo qué condiciones las células de *L. monocytogenes* en este estado pueden representar un mayor riesgo para la salud pública y la seguridad alimentaria (Osek et al., 2022; Wideman et al., 2021).

Los resultados de los Capítulos I y II han permitido comprender que las hortalizas de hoja permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* y que existe un riesgo real de que estos productos vegetales puedan contaminarse con bacterias patógenas durante el procesado, incluso cuando están en estado VBNC. La capacidad de las bacterias en estado VBNC de resucitar y multiplicarse durante la conservación, demuestra que pueden ser un posible riesgo para el consumidor final. Estas evidencias refuerzan la importancia de implementar estrategias adicionales como son los tratamientos post-proceso, que puedan controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* a lo largo de la conservación de hortalizas de hoja listas para el consumo.

4. Tratamientos de bioconservación post-proceso: potencial de control del crecimiento de *L. monocytogenes* en productos vegetales frescos y potencial aplicación industrial

Muchos autores han recomendado la aplicación de distintos tratamientos barrera, que sean complementarios, y que consigan un nivel de protección mayor a la hora de reducir los riesgos microbiológicos en los alimentos (Mogren et al., 2018). El concepto multi-barrera o *multi-hurdle* en inglés, también se aplica en los productos vegetales frescos listos para consumir, utilizando múltiples métodos o tratamientos combinados para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. En este sentido, la aplicación de tratamientos de bioconservación post-proceso, como el uso de cultivos protectores y bacteriófagos, se presenta como una barrera adicional a las medidas preventivas y de

control, ayudando a controlar el crecimiento de patógenos humanos como *L. monocytogenes* durante la vida útil de los alimentos (Imran et al., 2023; Webb et al., 2022; Barache et al., 2024).

La aplicación de estos tratamientos post-proceso puede ser necesaria en productos como las hortalizas de hoja, ya que tal y como se ha demostrado, permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* y las etapas de procesado pueden contribuir a la contaminación del producto final. Asimismo, *L. monocytogenes* puede multiplicarse durante la vida útil de estos productos que se transportan y conservan a temperaturas de refrigeración y que se consumen crudos. Además, el riesgo de multiplicación se incrementa considerablemente en condiciones de abuso de temperatura, situación que puede darse por errores en el mantenimiento de la cadena de frío, ya sea por los manipuladores o los consumidores, de ahí la importancia de controlar la contaminación y el crecimiento de este patógeno teniendo en cuenta todos los escenarios posibles (Kroft et al., 2022).

Los Capítulos III y IV de esta tesis se centran en el uso de tratamientos de bioconservación post-proceso para controlar la contaminación por *L. monocytogenes* en diversos productos vegetales frescos. Tal y como se mencionó en la introducción, el número de investigaciones disponibles sobre el uso de bioconservantes post-proceso en alimentos vegetales es menor en comparación con los existentes en productos de origen animal, lo que convierte este campo de estudio en un área de investigación de interés (Amjad et al., 2024; Ranveer et al., 2024).

En el Capítulo III se evaluó la eficacia de diferentes formulaciones comerciales frente a *L. monocytogenes* en diversas hortalizas de hoja, incluyendo lechuga romana e iceberg, espinaca baby y col. Se emplearon dos formulaciones comerciales a base de bacteriófagos (Listex P100™ y ListShield™) y dos basadas en cultivos protectores productores de bacteriocinas (SafePro™ y HoldBAC™). Los resultados mostraron que

Listex P100™ fue el tratamiento más efectivo, logrando reducciones significativas en los recuentos de *L. monocytogenes* en todas las hortalizas de hoja durante su conservación (reducción de hasta 2,0 Log_{10} UFC/g en algunos casos) en comparación con los controles no tratados. Aunque el resto de los tratamientos también mostraron cierta capacidad de control, esta fue menor y más variable según la matriz vegetal.

En los estudios previos en los que se ha evaluado la actividad de los bacteriófagos contra *L. monocytogenes*, se han observado, en la mayoría de los casos, reducciones significativas del patógeno cuando se inoculaba en productos frescos. Como se señala en la discusión del Capítulo III, los bacteriófagos pueden ofrecer una alta especificidad para el género *Listeria* spp., *L. monocytogenes* o incluso serotipos o cepas especificas sin afectar otros microorganismos presentes en los alimentos (Ranveer et al., 2024).Sin embargo, esta especificidad puede resultar incluso desfavorable en algunos casos ya que la heterogeneidad genética entre las cepas de *Listeria* spp. o *L. monocytogenes* podría ser responsable de la variabilidad en la eficacia de los tratamientos con bacteriófagos (Kawacka et al., 2020). En este sentido, cabe recordar que la adsorción de un bacteriófago a la célula huésped requiere del reconocimiento de un receptor asociado a la pared celular bacteriana por una proteína de unión al receptor (*Receptor Binding Protein*, RBP) (Leprince y Mahillon, 2023). Este reconocimiento es específico y debe ser de alta afinidad, aunque los detalles moleculares de la adsorción de bacteriófagos a bacterias grampositivas, como *L. monocytogenes*, aún no se comprenden completamente (Bielmann et al., 2015). Una posible explicación para la menor eficacia de ciertos bacteriófagos podría ser la falta de afinidad en este proceso de adsorción. Por ejemplo, aunque el bacteriófago P100 presenta un amplio espectro de actividad frente al género *Listeria* (Kawacka et al., 2020) en un estudio donde se aplicó la formulación Listex™ en una planta de procesado de aguacate, solo el 26,7% de las 239 cepas de *L. monocytogenes*

aisladas fueron susceptibles al tratamiento (Strydom et al., 2015), lo que sugiere que una afinidad insuficiente podría haber influido en los bajos niveles de susceptibilidad.

En el caso del Listex™ P100,antes de su aplicación como tratamiento post-proceso, se evaluó la susceptibilidad de las cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas para el estudio, confirmándose que todas eran susceptibles. Sin embargo, este evaluación no se llevó a cabo con el tratamiento ListShield. Por esta razón, la menor eficacia de ListShield en comparación con Listex, se puede atibuir a dos razones: 1) la utilización de una menor concentración aplicada del producto, en base a las por recomendaciones del fabricante lo que también implica una menor proporción bacteriófago/bacteria (Guenther et al., 2009, Iacumin et al., 2016), y 2) una menor especificidad del cocktail de bacteriófago a las cepas de *L. monocytogenes* utilizadas para la inoculación. Resultados similares fueron publicados por Gutiérrez et al. (2017), al comparar la eficacia de ambos productos en el control de *L. monocytogenes* en jamón curado.

En cuanto a la actividad frente a *L. monocytogenes* de los cultivos protectores, otros estudios han evaluado la eficacia de cepas no comerciales para controlar *L. monocytogenes* y otros patógenos en hortalizas de hoja. Siroli et al. (2015), encontraron resultados similares a los obtenidos en el Capítulo III. Estos autores trataron canónigos inoculados con *L. monocytogenes* con una cepa experimental de *L. plantarum*. Esta cepa redujo aproximadamente en 0,5 Log_{10} UFC/g las poblaciones de *L. monocytogenes* en canónigos tras 7 días a 6ºC, en comparación con el control no tratado, aunque en este caso, al cabo de los 7 días el patógeno comenzó a crecer. Asimismo, encontraron que la eficacia de esta cepa dependía de la densidad del inoculo, siendo más eficaz a niveles mayores (a partir de 1,5 Log_{10} UFC/g). Otros autores como Trias et al. (2008) observaron, mediante el uso de cepas de *Leuconostoc*, una reducción significativa de *L. monocytogenes* en lechuga iceberg (< LOD: 40,0 UFC/g en lechuga) conservada a 25ºC

4 días. Este efecto se reducía al reducir la dosis aplicada de cultivo protector. El efecto contrario fue descrito por Russo et al. (2014), que al emplear un inoculo de aproximadamente 4,0 Log_{10} UFC/g de una cepa de *L. plantarum* (B2 CECT 8328) y otra de *L. fermentum* (PBCC11.5 CECT 8448), consiguieron inhibir el crecimiento de la población de *L. monocytogene*s en melón cortado tras 9 días a 4ºC. Sin embargo, al aplicar concentraciones de la solución de cultivo protector iguales o superiores a 8,0 Log_{10} UFC/g, las diferencias observadas entre el producto tratado y el control eran menores, llegando incluso a desaparecer.

La variabilidad observada en la eficacia de los distintos tratamientos post-proceso aplicados en el Capítulo III puede deberse a diversos factores como son: el tipo de agente de bioconservación (cultivos protectores o bacteriófagos) y cepa, las propiedades de la matriz alimentaria, la dosis aplicada, las condiciones de conservación y otros aspectos del diseño experimental (Grigore-Gurgu et al., 2024; Iacumin et al., 2016; Oliveira et al., 2014). También es importante considerar que los mecanismos de acción de algunos de los tratamientos utilizados en esta tesis son bastante diferentes. Como se ha mencionado en la introducción, los bacteriófagos son virus que invaden selectivamente células bacterianas específicas, interrumpiendo el metabolismo bacteriano y causando la lisis de la bacteria, sin comprometer la viabilidad del microbioma del alimento, ni compitiendo con el mismo (Moye et al., 2018; Truchado et al., 2024). Por otro lado, los cultivos protectores tienen un impacto más amplio en la comunidad microbiana general, lo cual puede provocar una menor eficacia en su capacidad de control de patógenos en la matriz alimentaria causada por la competición con otros microorganismos, como cepas de BAL, presentes de forma natural en los alimentos (Webb et al., 2022). Los tratamientos aplicados en los ensayos del capítulo III, implican la adición de cepas en lugar de la aplicación directa de bacteriocinas. Por lo tanto, la menor eficacia de los tratamientos con

cultivos protectores podría atribuirse también a las condiciones de crecimiento durante la conservación de los alimentos, que pueden definirse como subóptimas, así como a las interacciones competitivas con otros microorganismos. Su eficacia limitada, en comparación con el tratamiento con Listex P100™, también podría deberse a la eficacia dependiente de la producción de bacteriocinas y su baja solubilidad, lo que puede limitar su difusión en las matrices alimentarias (Ennahar et al., 2000; Rendueles et al., 2022).

Como los resultados del Capítulo III señalaron a Listex P100™ como el tratamiento post-proceso más prometedor para el control del crecimiento de *L. monocytogenes* en los cuatro tipos de hortalizas de hojas seleccionadas, fue necesario demostrar si el uso del tratamiento Listex™ podía tener algún efecto negativo en la calidad organoléptica de las mismas. Los resultados obtenidos demostraron que este tratamiento no afectaba negativamente la calidad del producto. Resultados similares a los presentados en este Capítulo coinciden con los descritos por Perera et al. (2015), que no encontraron ningún efecto negativo en la calidad organoléptica de la lechuga, cuando se había tratado con ListShield™. Asimismo, un estudio reciente ha demostrado que la aplicación de una lisina, obtenida de un bacteriófago experimental aislado para controlar *E. coli* O157:H7, tampoco alteró la calidad visual y textura de las hojas de lechuga en comparación con el control no tratado (Xu et al., 2021). No obstante, la mayoría de los estudios disponibles en la literatura científica sobre el impacto de los bacteriófagos en la calidad organoléptica de los alimentos se han realizado en productos de origen animal, y han concluido que el tratamiento con bacteriófagos no alteraba la calidad organoléptica de los productos (Colás-Medà et al., 2023, Volpi et al. 2023).

Los resultados del Capítulo III permitieron concluir que el tratamiento post-proceso con Listex P100™, aplicado a las hortalizas de hoja, puede ser una herramienta útil para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en estos productos a lo largo de la

vida útil, sin comprometer la calidad de los mismos. Los brotes recientes de enfermedades transmitidas por alimentos, como los relacionados con *L. monocytogenes*, han destacado la urgencia de mejorar e implementar nuevas prácticas de control para garantizar la seguridad alimentaria. En este contexto, la validación es un paso crucial cuando se busca trasladar los resultados obtenidos en laboratorio al entorno industrial, asegurando así su efectividad a escala comercial. Estos estudios son fundamentales para confirmar la efectividad y viabilidad del tratamiento en condiciones operativas normales y su posterior implementación en el sector (Ceylan et al., 2021, Wason et al., 2021). La obtención de resultados positivos en entornos industriales facilita la transferencia del conocimiento obtenido a nivel académico hacia potenciales aplicaciones comerciales y gubernamentales (Filter et al., 2016).

De esta forma, el Capítulo IV de la presente tesis persiguió el objetivo de validar, a escala industrial, la estrategia de intervención más eficaz en función de los resultados del capítulo III. Este trabajo permitió la confirmación de la viabilidad de la aplicación industrial de Listex P100™ en líneas de procesado reales de productos vegetales frescos en España y Dinamarca.

En la aplicación de este tipo de formulaciones, es fundamental ajustar cuidadosamente todos los parámetros, como las concentraciones, tiempos de aplicación y procedimientos de control, ya que la eficacia de cada bacteriófago o cocktail de bacteriófagos depende en gran medida de las características específicas del sistema virus-matriz alimentaria que se esté estudiando (Imran et al., 2023; Sillankorva et al., 2012). Por ejemplo, uno de los aspectos claves a la hora de aplicar tratamientos post-proceso es reducir la cantidad de agua añadida al producto final con el fin de evitar cualquier reacción de alteración causada por el exceso de agua. Volpi et al. (2023) aplicaron un bacteriófago comercial a carcasas de cerdo para controlar el crecimiento de *Salmonella* y observaron

que la optimización en la cantidad de agua aplicada era imprescindible, no solo por evitar la alteración del producto, sino también para hacer la producción más sostenible, con un menor uso de energía y agua.

La escasez de estudios sobre la aplicación de bacteriófagos en productos vegetales para el control de patógenos en condiciones reales de procesado subraya la necesidad de realizar investigaciones en entornos industriales, con el fin de verificar si los resultados positivos obtenidos en laboratorio son realmente extrapolables a escenarios prácticos. La actividad de la membrana y los niveles de energía de las bacterias puede influir en la capacidad del bacteriófago para infectarlas (Bouvier y Maurice, 2011). Estos factores resaltan la complejidad del uso de bacteriófagos en el biocontrol de cepas bacterianas en entornos de procesado reales, donde las condiciones ambientales y el estado de los microorganismos son variables (Maurice et al., 2010; 2013).

No obstante, la aplicación con resultados satisfactorios de Listex P100 en entornos industriales sugiere que el uso de tratamientos de bioconservación post-proceso con bacteriófagos ofrece un enfoque prometedor para abordar las potenciales contaminaciones por *L. monocytogenes* en hortalizas de hoja listas para el consumo y mejorar la seguridad alimentaria, pudiendo integrarse eficazmente en las líneas de procesado existentes, sin requerir cambios significativos en las operaciones (Truchado et al., 2024).

CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados para esta Tesis Doctoral sobre los factores determinantes del crecimiento y/o estado fisiológico de *L. monocytogenes* en productos vegetales frescos y las posibles estrategias de control, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. **Aplicaciones de la microbiología predictiva en la industria de productos vegetales frescos.**

En el capítulo I se evaluó, por primera vez, el uso de un modelo Gamma para predecir el comportamiento de crecimiento o no crecimiento de *L. monocytogenes* en diversas frutas y hortalizas frescas, considerando algunas de sus propiedades fisicoquímicas intrínsecas y la temperatura de conservación durante su vida útil. Los resultados obtenidos a partir de los datos extraídos de la literatura científica disponible indicaron que el modelo aplicado proporciona predicciones satisfactorias en todas las hortalizas, especialmente en el grupo de hortalizas de hoja, con un elevado grado de concordancia entre las predicciones y los datos empíricos. Sin embargo, las predicciones para el grupo de frutas resultaron menos satisfactorias, particularmente en las frutas ácidas, debido principalmente a una sobreestimación del efecto inhibitorio del pH. El modelo Gamma se presenta como una herramienta potencial para la evaluación del comportamiento de crecimiento de *L. monocytogenes* en productos vegetales frescos, ofreciendo un enfoque estratégico para la gestión de la seguridad alimentaria en la industria hortofrutícola. No obstante, es necesaria una mejora continua y validación del modelo mediante nuevos datos empíricos para mejorar su fiabilidad y aplicabilidad, especialmente en el grupo de las frutas. Este modelo permitió la identificación de las hortalizas de hoja, grupo en el que funcionaba satisfactoriamente, como grupo de alimentos de mayor riesgo en cuanto al crecimiento del patógeno considerado, ya que siempre predecía crecimiento al introducir los diferentes factores. En los grupos de

alimentos con mayor riesgo, las medidas preventivas y las estrategias de intervención a nivel industrial deben ser exhaustivas y estar enfocadas en la reducción y control de la contaminación y crecimiento de *L. monocytogenes*. El siguiente paso de esta tesis doctoral fue evaluar la implicación del estado fisiológico de *L. monocytogenes* en etapas críticas del procesado de este grupo de productos vegetales para favorecer la toma de decisiones en cuanto a las medidas de intervención a aplicar.

2. Estados fisiológicos de microorganismos patógenos y contaminación cruzada en la industria hortofrutícola.

Los resultados presentados en el capítulo II demuestran, por primera vez, la contaminación cruzada durante la etapa de lavado entre las células en estado VBNC de *L. monocytogenes* presentes en el agua de lavado y el producto vegetal. Además, se ha demostrado la capacidad de estas células VBNC para sobrevivir y resucitar durante la vida útil del producto. Sin embargo, bajo las condiciones comerciales de conservación probadas (7 días a 4°C), la probabilidad de resucitación del estado VBNC a un estado cultivable de estas células y el posible crecimiento de estas durante la vida útil del producto fresco fue muy baja. No obstante, este hallazgo indica que la presencia de células de *L. monocytogenes* en estado VBNC en el agua de lavado debe tenerse en cuenta, aunque a priori su capacidad de resucitación durante el post-proceso sea baja. Los resultados obtenidos ponen en relieve un riesgo a tener en cuenta en el contexto de la contaminación cruzada a lo largo del procesado de los productos vegetales frescos y subrayan la necesidad de aplicar estrategias post-proceso. Estos tratamientos deben ser capaces de reducir el riesgo de crecimiento de *L. monocytogenes* durante la conservación en productos que permiten el crecimiento de este patógeno, como las hortalizas de hoja, para añadir un nivel adicional de seguridad.

3. Estudio de la eficacia de control de *L. monocytogenes* de tratamientos de bioconservación como estrategias post-proceso

En el capítulo III, tras el estudio comparativo de la capacidad de cuatro tratamientos comerciales post-proceso, dos a base de bacteriófagos (ListShield™ y PhagueGuard Listex™) y dos a base de bacterias acido lácticas (SafePro®, Holdbac®), para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en hortalizas de hoja, los resultados mostraron que los cuatro tratamientos fueron capaces de controlar la presencia del patógeno inoculado en diferentes tipos de hortalizas de hoja en comparación con el control. Sin embargo, el tratamiento a base de bacteriófagos, PhagueGuard Listex™ mostró mayor eficacia en la mayoría de los productos vegetales frescos durante su vida útil en comparación con el control. Este tratamiento tampoco afectó a las características organolépticas de las hortalizas de hoja tratadas. La eficacia registrada de este tratamiento destacó la importancia de optimizar y evaluar métodos innovadores en la gestión de la seguridad alimentaria, más aún si se tienen en cuenta los brotes de listeriosis y las retiradas comerciales de productos vegetales asociadas a la detección *L. monocytogenes*. Para ello, es fundamental establecer una conexión entre la investigación y su aplicación práctica en entornos industriales para que los resultados obtenidos no queden relegados al ámbito académico.

4. Validación industrial de un tratamiento comercial post-proceso a base de bacteriófagos frente a *L. monocytogenes.*

La validación industrial de PhagueGuard Listex™ en la industria de productos vegetales se llevó a cabo mediante la optimización del método de aplicación, que incluyó el dispositivo y los pasos operativos del proceso. Se consiguió alcanzar la concentración recomendada de bacteriófagos en el producto y una distribución homogénea del mismo,

mediante un dispositivo que permitía aplicar mediante una fina nebulización la solución de Listex P100™. El tratamiento no afectó a las características organolépticas de los productos vegetales incluidos en este estudio (lechuga rallada).

Se concluyó que el uso de PhagueGuard Listex™ como tratamiento post-proceso en la industria de hortalizas de hoja es viable en términos de consecución de la dosis efectiva, homogeneidad de aplicación en el producto y estabilidad de los agentes durante la vida útil del producto. Estos avances técnicos son cruciales para asegurar la eficacia y aceptación de tratamientos de bioconservación en la práctica industrial. No obstante, se requieren más investigaciones sobre la persistencia y estabilidad de los bacteriófagos en diferentes condiciones operativas y matrices vegetales durante su vida útil.

En conclusión, todos los resultados presentados en los capítulos I-IV han permitido avanzar en el conocimiento sobre el comportamiento y el control del riesgo *L. monocytogenes* en la industria de hortalizas frescas listas para el consumo. Este avance forma parte de un enfoque holístico de la seguridad alimentaria, en el que cada etapa del proceso y cada innovación que se pueda introducir contribuyen a un sistema más seguro y eficiente para la protección de la salud pública. La adopción de estrategias adecuadas no solo puede mitigar los riesgos asociadas a la contaminación por *L. monocytogenes*, sino también fortalecer la confianza del consumidor en la seguridad y calidad de las hortalizas de hoja, cumpliendo con las expectativas de consumidores y reguladores en cuanto a calidad y seguridad.

CONCLUSIONES

1

El modelo basado en el concepto Gamma es una herramienta útil para predecir el compartimento de *L. monocytogenes* en productos vegetales frescos, particularmente para las hortalizas de hoja. En base a las predicciones del modelo, las hortalizas de hoja son los productos vegetales con mayor riesgo en relación al crecimiento de *L. monocytogenes* durante la conservación.

2

3

A lo largo de las distintas etapas de proceso, y en particular durante la etapa de lavado, se puede inducir el estado viable no cultivable (VBNC) de las bacterias. Se ha demostrado que las bacterias en estado VBNC, son capaces de adherirse al tejido vegetal durante la etapa de lavado, contaminando el producto, y pueden revertir este estado al estado cultivable durante la conservación, lo que permite la multiplicación en el producto final.

La comparación de cuatro tratamientos comerciales basados en cultivos protectores y bacteriófagos demostró que el tratamieto PhageGuard Listex, aplicado como tratamiento post-proceso fue el más eficaz inhibiendo el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la vida útil del producto. Este tratamiento no afectó a las características organolépticas de las hortalizas de hoja.

4

La aplicación industrial de PhageGuard Listex en hortalizas de hoja en una línea de proceso comercial es viable. La metodología aplicada aseguró una cobertura eficaz del producto así como su homogénea distribución y estabilidad durante la conservación. La aplicación del tratamiento no afectó a la calidad sensorial de las hortalizas de hoja a lo largo de su vida útil.

REFERENCIAS

Abe, S., Matsui, T., Koseki, S. y Koyama, K. (2024). Hierarchical ranking sensory evaluation test of fresh produce quality: A case study of injured cherry tomato images. *Food Quality and Preference*, *118*, 105167. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2024.105167

Abedi, E. y Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production - producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, *6*(10), e04974. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974

Afari, G. K., Liu, H. y Hung, Y. C. (2019). The effect of produce washing using electrolyzed water on the induction of the viable but non-culturable (VBNC) state in *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, *110*, 275-282. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.089

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2019). *Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación con el peligro* Listeria monocytogenes *en alimentos listos para el consumo.* Ministerio de Sanidad Consumo y Bienestar social. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/noticias_y_actualizaciones/noticias/2019/verificacion_vida_util.htm

Agustí, G., Fittipaldi, M. y Codony, F. (2017). False-positive viability PCR results: An association with microtubes. *Current Microbiology*, *74*(3), 377-380. https://doi.org/10.1007/s00284-016-1189-3

Akkermans, S. y Van Impe, J. F. (2018). Mechanistic modelling of the inhibitory effect of pH on microbial growth. *Food Microbiology*, *72*, 214-219. https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.12.007

Aladhadh, M. (2023). A review of modern methods for the detection of foodborne pathogens. *Microorganisms*, *11*(5), 1111. https://doi.org/10.3390/microorganisms11051111

Alam, A. U., Rathi, P., Beshai, H., Sarabha, G. K. y Deen, M. J. (2021). Fruit quality monitoring with smart packaging. *Sensors*, *21*(4), 1–30. https://doi.org/10.3390/s21041509

Alegbeleye, O., Odeyemi, O. A., Strateva, M. y Stratev, D. (2022). Microbial spoilage of

vegetables, fruits and cereals. *Applied Food Research, 2*(1), 100122. https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100122

Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M. y Abadias, M. (2011). Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG.*Food microbiology,28*(1), 59-66. https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.006

Alegría, Á., Pintor-Cora, A., Ribeiro, D. C. S., López-Díaz, T. M. y Rodríguez-Calleja, J. M. (2024). Rapid detection of foodborne ESBL-Producing Enterobacteriaceae using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Medical Sciences Forum, 24*(1), 17. https://doi.org/10.3390/eca2023-16400

Aljasir, S. F. y D'Amico, D. J. (2021). Effect of pre-exposure to protective bacterial cultures in food on *Listeria monocytogenes* virulence. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology], 152*, 112373. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112373

AlMatar, M., Var, I., Sağlam, S. y Albarri, O. (2024). The Effectiveness of LISTEXTM P100 in Reducing the Biofilm of *Listeria* spp. on Steel, Plastic, and Galvanised Surfaces. *Current Pharmaceutical Biotechnology, 25*. https://doi.org/10.2174/0113892010299925240507063431

Amin, M., Odeyemi, O. A., Dewi, F. R. y Burke, C. M. (2023). Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Enterococcus faecium* MA115 and its potential use as a seafood biopreservative. *Open Agriculture*, *8*(1). https://doi.org/10.1515/opag-2022-0170

Amjad, N., Naseer, M. S., Imran, A., Menon, S. V., Sharma, A., Islam, F., Tahir, S. y Shah, M. A. (2024) A mini-review on the role of bacteriophages in food safety. *CyTA - Journal of Food*, *22*(1). https://doi.org/10.1080/19476337.2024.2357192

Anderson M., Jaykus L.-A., Beaulieu S. y Dennis, S. (2011). Pathogen-produce pair attribution risk ranking tool to prioritize fresh produce commodity and pathogen combinations for further evaluation (P^3ARRT). *Food Control, 22*(12), 1865-1872. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.028

Andrews, N., McCabe, E., Wall, P., Buckley, J. F. y Fanning, S. (2023). Validating the Utility of Multilocus Variable Number Tandem-repeat Analysis (MLVA) as a

Subtyping Strategy to Monitor *Listeria monocytogenes* in-built food processing environments. *Journal of Food Protection, 86*(10), 100147. https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100147

Ansah, F. A., Amodio, M. L. y Colelli, G. (2018). Quality of fresh-cut products as affected by harvest and postharvest operations. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 98*(10), 3614-3626. https://doi.org/10.1002/jsfa.8885

Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L'alimentation, de L'environnement et du travail. (2020). *Data sheet on foodborne biological hazards:* Listeria monocytogenes, 1–4. https://www.anses.fr/en/system/files/BIORISK2016SA0081FiEN.pdf

Bergis, H., Bonanno, L., Asséré, A. y Lombard, B. (2021). *EURL Lm Technical guidance document on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life of ready-to-eat foods related to* Listeria monocytogenes (Version 4 of 1 July 2021). EU Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* ANSES - Food Safety Laboratory, Maisons-Alfort, France. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/DOCUMENTO_ORIENTACION_TECNICA_EURL_LISTERIA_ALC_2021.pdf

Asakura, H., Makino, S.-I., Takagi, T., Kuri, A., Kurazono, T., Watarai, M. y Shirahata, T. (2002). Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. *FEMS Microbiology Letters*, *212*(1), 87-93. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11249.x

Astudillo, A., Leung, S. S. Y., Kutter, E., Morales, S. y Chan, H.-K. (2018). Nebulization effects on structural stability of bacteriophage PEV 44. *European Journal of Pharmaceutics AND Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, *125*, 124-130. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.01.010

Augustin, J.-C., Kalmokoff, M., Ells, T., Favret, S., Desreumaux, J., Decourseulles Brasseur, E. y Gnanou Besse, N. (2016) Modeling the behavior of *Listeria monocytogenes* during enrichment in half Fraser broth; impact of pooling and the

duration of enrichment on the detection of *L. monocytogenes* in food. *Food Microbiology, 60*, 131-1366. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.07.004.

Austrich-Comas, A., Serra-Castelló, C., Jofré, A., Gou, P. y Bover-Cid, S. (2022). Control of *Listeria monocytogenes* in chicken dry-fermented sausages with bioprotective starter culture and high-pressure processing. *Frontiers in Microbiology, 13*, 1-14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.983265

Awad, D. A., Masoud, H. A. y Hamad, A. (2024). Climate changes and food-borne pathogens: the impact on human health and mitigation strategy. *Climatic Change, 177*(6). https://doi.org/10.1007/s10584-024-03748-9

Barache, N., Belguesmia, Y., Martinez, B., Seal, B. S. y Drider, D. (2024). Bacteriocins and Bacteriophages as Dual Biological Players for Food Safety Applications. *Encyclopedia, 4*(1), 79-90. https://doi.org/10.3390/encyclopedia4010007

Baranyi, J., Buss da Silva, N. y Ellouze, M. (2017). Rethinking tertiary models: Relationships between growth parameters of *Bacillus cereus* strains. *Frontiers in microbiology, 8,* 1890. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01890

Baranyi, J., Rockaya, M. y Ellouze, M. (2024). From data to models and predictions in food microbiology. *Current Opinion in Food Science, 57,* 101177. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2024.101177

Batt, C.A. y Tortorello, M.-L. (2014). Encyclopedia Food Microbiology II. En Encyclopedia of Food Microbiology.

Baviera-Puig, A., García-Melón, M., Ortolá, M. D. y López-Cortés, I. (2021). Proposal of a new orange selection process using sensory panels and AHP. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 18*(7), 3333. https://doi.org/10.3390/ijerph18073333

Belias, A., Sullivan, G., Wiedmann, M., y Ivanek, R. (2022). Factors that contribute to persistent *Listeria* in food processing facilities and relevant interventions: A rapid review. *Food Control, 133*, 108579. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108579

Ben Said, L., Gaudreau, H., Dallaire, L., Tessier, M. y Fliss, I. (2019). Bioprotective culture: A new generation of food additives for the preservation of food quality and safety. *Industrial Biotechnology*, *15*(3), 138-147.

https://doi.org/10.1089/ind.2019.29175.lbs

Benítez-Chao, D. F., León-Buitimea, A., Lerma-Escalera, J. A. y Morones-Ramírez, J. R. (2021). Bacteriocins: An overview of antimicrobial, toxicity, and biosafety assessment by in vivo models. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 1-18. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630695

Berche, P. (2012). Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(5), 1-6. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03945.x

Bertó, R. y Orihuel, E. (2020). Condiciones de uso de los bacteriófagos para la reducción de niveles de patógenos en alimentos. CHRISTEYNS. Recuperado el 10 septiembre año de 2024. https://www.christeyns.com/es-es/condiciones-de-uso-de-los-fagos-para-la-reduccion-de-niveles-de-patogenos-en-alimentos-2/

Besnard, V., Federighi, M. y Cappelier, J. M. (2000). Evidence of Viable but Non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiology*, *17*(6), 697-704. https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0366

Beutin, L. y Martin, A. (2012). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *Journal of Food Protection*, *75*(2), 408-418. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-452

Bidlas, E. y Lambert, R. J. (2008). Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. *International Journal of Food Microbiology*, *124*(1), 98-102. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.031

Bielmann, R., Habann, M., Eugster, M. R., Lurz, R., Calendar, R., Klumpp, J. y Loessner, M. J. (2015). Receptor binding proteins of Listeria monocytogenes bacteriophages A118 and P35 recognize serovar-specific teichoic acids. *Virology*, *477*, 110-118. https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.035

Billington, C., Kingsbury, J. M. y Rivas, L. (2022). Metagenomics approaches for improving food safety: A review. *Journal of Food Protection*, *85*(3), 448-464. https://doi.org/10.4315/JFP-21-301

Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, *4*(4), 665-684. https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665

Bintsis, T. y Papademas, P. (2024). The application of protective cultures in cheese: A review. *Fermentation*, *10*(3), 1-16. https://doi.org/10.3390/fermentation10030117

Bolívar Carrillo, A. (2021). Application of Predictive Microbiology to investigate *Listeria monocytogenes* kinetics and bioprotective strategies on fishery products. [Tesis Doctoral, Universidad de Cordoba]. https://helvia.uco.es/handle/10396/21477

Bouvier, T. y Maurice, C. F. (2011). A single-cell analysis of virioplankton adsorption, infection, and intracellular abundance in different bacterioplankton physiologic categories. *Microbial ecology*, *62*(3), 669-678. https://doi.org/10.1007/s00248-011-9862-3

Bover-Cid, S. y Garriga, M. (2014). Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. (Informe final de la actividad del IRTA). https://acsa.gencat.cat/web/.content/_Publicacions/Informes-tecnics/Informes_ACSA/informe_listeria_irta_2014_castella.pdf

Boyacioglu, O., Sulakvelidze, A., Sharma, M. y Goktepe, I. (2016). Effect of a bacteriophage cocktail in combination with modified atmosphere packaging in controlling *Listeria monocytogenes* on fresh-cut spinach. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, *55*(1), 74-79. https://www.jstor.org/stable/26194209

Brauge, T., Faille, C., Leleu, G., Denis, C., Hanin, A. y Midelet, G. (2020). Treatment with disinfectants may induce an increase in viable but non culturable populations of *Listeria monocytogenes* in biofilms formed in smoked salmon processing environments. *Food Microbiology*, *92*, 103548. https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103548

Bren, L. (2007). Bacteria-eating virus approved as food additive. *FDA consumer*, *41*(1), 20-22.

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C. y Whiting, R. C.

(2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, *75*, 1-13. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016

Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U. y Nicolau, A. I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1-18. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02700

Bumunang, E. W., Zaheer, R., Niu, D., Narvaez-Bravo, C., Alexander, T., McAllister, T. A. y Stanford, K. (2023). Bacteriophages for the targeted control of foodborne pathogens. *Foods, 12*(14), 1-24. https://doi.org/10.3390/foods12142734

Butler, F., Hunt, K., Redmond, G., dOnofrio, F., Barron, U. G., Fernandes, S., Cadavez, V., Iannetti, L., Centorotola, G., Pomilio, F., Diaz, A. V., Rodríguez, F. P. y Luque, O. M. B. (2023). Application of novel predictive microbiology techniques to shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (ListeriaPredict). *EFSA Supporting Publications, 20*(12). https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2023.en-8418

Byun, K. H., Han, S. H., Choi, M. W., Park, S. H. y Ha, S. Do. (2022). Isolation, characterization, and application of bacteriophages to reduce and inhibit *Listeria monocytogenes* in celery and enoki mushroom. *Food Control, 135*, 108826. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108826

Campbell, A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nature reviews. Genetics, 4*(6), 471-477. https://doi.org/10.1038/nrg1089

Cao, Y., Zhou, D., Li, R., Yu, Y., Xiao, X., Zhou, A., Liu, D. y Li, X. (2019). Molecular monitoring of disinfection efficacy of *E. coli* O157:H7 in bottled purified drinking water by quantitative PCR with a novel dye. *Journal of Food Processing and Preservation, 43*(2), 1-8. https://doi.org/10.1111/jfpp.13875

Cappelier, J. M., Besnard, V., Roche, S., Garrec, N., Zundel, E., Velge, P. y Federighi, M. (2005). Avirulence of viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* cells demonstrated by in vitro and in vivo models. *Veterinary research*, *36*(4), 589-599. https://doi.org/10.1051/vetres:2005018

Cappelier, J. M., Besnard, V., Roche, S. M., Velge, P. y Federighi, M. (2007). Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an

embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *Veterinary Research, 38*(4), 573-583. https://doi.org/10.1051/vetres:2007017

Carlin, C. R., Akins-Lewenthal, D., Bastin, B., Crowley, E., McMahon, W. y Ziebell, B. (2024). An alternative rapid confirmation method for identifying *Listeria monocytogenes* from a variety of 125 g food samples within two days of a PCR presumptive positive. *Journal of Food Protection, 87*(1), 100193. https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100193

Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., De Meester, E. D., y Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology, 43*(3), 301-312. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.08.005

Carstens, C. K., Salazar, J. K. y Darkoh, C. (2019). Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017. *Frontiers in Microbiology, 10*, 1-15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02667

Center for Food Security and Public Health [CFSPH]. (2017). *Listeriosis: Infecciones en humanos*. The Center for Food Security and Public Health Fact Sheets, 1–5. https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/listeriosis-es.pdf

Ceylan, E., Amezquita, A., Anderson, N., Betts, R., Blayo, L., Garces-Vega, F., Gkogka, E., Harris, L. J., McClure, P., Winkler, A. y Besten, H. M. W. D. (2021). Guidance on validation of lethal control measures for foodborne pathogens in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 20*(3), 2825-2881. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12746

Chen, J., Pang, H., Wang, L., Ma, C., Wu, G., Liu, Y., Guan, Y., Zhang, M., Qin, G. y Tan, Z. (2022). Bacteriocin-producing lactic acid bacteria strains with antimicrobial activity screened from Bamei pig feces. *Foods, 11*(5), 1-13. https://doi.org/10.3390/foods11050709

Chhetri, V. S., Han, Y., Janes, M. E. y Adhikari, A. (2020). Evaluation of viability of *E. coli* O157:H7 on chlorine and lactic acid treated spinach leaves using combined propidium monoazide staining and real-time PCR. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology], 125*, 109259.

https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109259

Chr Hansen (2024). https://www.chr-hansen.com/es/food-cultures-and-enzymes/bioprotection

Cifuentes Bachmann, D. E. y Leroy, F. (2015). Use of bioprotective cultures in fish products. *Current Opinion in Food Science*, *6*, 19-23. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.009

Clokie, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V. y Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, *1*(1), 31-45. https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942

Codony, F. (2014). *Procedimiento Para la Detección de Células Vivas, Con las Membranas Celulares Íntegras y Funcionales, Mediante Técnicas de Amplificación de Ácidos Nucleicos*. (Spanish patent, No. ES2568527B1). Spanish Patent and Trademark Office. https://sede.oepm.gob.es/eSede/en/index.html.

Codony, F., Agustí, G. y Allué-Guardia, A. (2015). Cell membrane integrity and distinguishing between metabolically active and inactive cells as a means of improving viability PCR. *Molecular and Cellular Probes, 29*(3), 190-192. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.03.003

Coelho, M. C., Malcata, F. X. y Silva, C. C. G. (2022). Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: from starter cultures to probiotic functions. *Foods*, *11*(15), 2276. https://doi.org/10.3390/foods11152276

Colás-Medà, P., Viñas, I. y Alegre, I. (2023). Evaluation of commercial anti-listerial products for improvement of food safety in ready-to-eat meat and dairy products. *Antibiotics, 12*(2), 414. https://doi.org/10.3390/antibiotics12020414

Costa, M. J., Pastrana, L. M., Teixeira, J. A., Sillankorva, S. M. y Cerqueira, M. A. (2023). Bacteriophage delivery systems for food applications: Opportunities and perspectives. *Viruses, 15*(6), 1271; https://doi.org/10.3390/v15061271

Couvert, O., Pinon, A., Bergis, H., Bourdichon, F., Carlin, F., Cornu, M., Denis, C., Gnanou Besse, N., Guillier, L., Jamet, E., Mettler, E., Stahl, V., Thuault, D., Zuliani, V. y Augustin, J. C. (2010). Validation of a stochastic modelling approach for *Listeria monocytogenes* growth in refrigerated foods. *International Journal of Food Microbiology, 144*(2), 236-242. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.024

Cristobal-Cueto, P., García-Quintanilla, A., Esteban, J. y García-Quintanilla, M. (2021). Phages in food industry biocontrol and bioremediation. *Antibiotics, 10*(7), 1-15. https://doi.org/10.3390/antibiotics10070786

Daranas, N., Bonaterra, A., Francés, J., Cabrefiga, J., Montesinos, E. y Badosa, E. (2018). Monitoring viable cells of the biological control agent *Lactobacillus plantarum* PM411 in aerial plant surfaces by means of a strain-specific viability quantitative PCR method. *Applied and Environmental Microbiology, 84*(10). https://doi.org/10.1128/AEM.00107-18

Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R. y Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis, 36*(1), 1-40. https://doi.org/10.1002/jcla.24093

De Cesare, A., Vitali, S., Tessema, G. T., Trevisani, M., Fagereng, T. M., Beaufort, A., Manfreda, G. y Skjerdal, T. (2018). Modelling the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in pasta salads at different storage temperatures and packaging conditions. *Food Microbiology, 76*, 154-163. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.013

De Corato, U. (2019). The Market of the minimally processed fresh produce needs of safer strategies for improving shelf life and quality: A critical overview of the traditional technologies. *Open Access Journal of Agricultural Research, 4*(1). https://doi.org/10.23880/oajar-16000216

DG Health and Food Safety [DG SANTE]. (2006). Unit D1 Activity Report 2006. https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/ahsc_report_2006_en.pdf

Diez-Gonzalez, F., Belina, D., Labuza, T. P. y Pal, A. (2007). Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* based on a time to detect model in culture media and frankfurters. *International Journal of Food Microbiology, 15, 113*(3), 277-283. http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.011.

Dillard, L. R., Payne, D. D. y Papin, J. A. (2021). Mechanistic models of microbial community metabolism. *Molecular Omics, 17*(3), 365-375. https://doi.org/10.1039/d0mo00154f

Ding, T., Liao, X., Deng, Y., Shen, C. y Feng, J. (2022). Viable But Nonculturable

Bacteria. En: Ding, T., Liao, X. y Feng, J. (Eds.) *Stress Responses of Foodborne Pathogens* (pp. 401–431). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-90578-1_14

Dinu, L. D. y Bach, S. (2011). Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the phyllosphere of lettuce: A food safety risk factors. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(23), 8295-8302. https://doi.org/10.1128/AEM.05020-11

Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y. y Liao, X. (2020). Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 19*(1), 149-183. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12513

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. y Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology, 42*(8), 3819-3822. https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004

Dreux, N., Albagnac, C., Federighi, M., Carlin, F., Morris, C. E. y Nguyen-The, C. (2007). Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(4), 1272-1281. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03351.x

Drews, G. (2000). The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. *FEMS Microbiology Reviews, 24*(3), 225-249. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00026-7

European Centre for Disease Prevention and Control y European Food Safety Authority. (2023). Prolonged multi-country cluster of *Listeria monocytogenes* ST155 infections linked to ready-to-eat fish products. *EFSA Supporting Publications, 20*(12). https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2023.en-8538

European Centre for Disease Prevention and Control. (2024). *Listeriosis* (Annual Epidemiological Report for 2022). European Centre for Disease Prevention and Control. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/LIST_AER_2022_Report.pdf

European Commission (25 de septiembre de 2024). Listeria monocytogenes *in ready-to-eat foods – update of safety criteria*. https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/13003-Listeria-monocytogenes-in-ready-to-eat-foods-update-of-safety-criteria_en

European Food Safety Authority (2011). Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France. *EFSA Journal.* https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2011.EN-176

European Food Safety Authority y European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update. (2018). *EFSA Supporting Publications, 1*5(7). https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.en-1448

European Food Safety Authority. (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal, 21*(12). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442

European Food Safety Authority, Costa, G., Di Piazza, G., Koevoets, P.,Iacono, G., Liebana, E., Pasinato, L., Rizzi, V. y Rossi, M. (2022). Guidelines for reporting Whole GenomeSequencing-based typing data through the EFSA One Health WGS System. *EFSA supporting publication* 2022:EN-7413. 29 pp. https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7413

EFSA Panel on Biological Hazards. (2016). Scientific opinion the evaluation of the safety and efficacy of Listex TM P100 for reduction of pathogens on different ready-to-eat (RTE) food products. *EFSA Journal, 14*(8). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4565

EFSA Panel on Biological Hazards. (2020). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from European Commission on The use and mode of action of bacteriophages in food production. *EFSA Journal*, 1076, 1-26. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1076

EFSA Panel on Biological Hazards, Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Jenkins, C., Malorny, B., Ribeiro Duarte, A. S., … Herman, L. (2019). Whole

genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms. *EFSA Journal, 17*(12). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5898

EFSA Panel on Biological Hazards, Koutsoumanis, K., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Jordan, K., Sampers, I., Wagner, M., . . . Allende, A. (2020). The public health risk posed by *Listeria monocytogenes* in frozen fruit and vegetables including herbs, blanched during processing. *EFSA Journal, 18*(4). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6092

EFSA Panel on Biological Hazards, Koutsoumanis, K., Ordoñez, A. A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist,R., Nauta, M., Nonno, R., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Banach, J.,Ottoson, J., Zhou, ... (2023). Microbiological hazards associated with the use of water in the post-harvesthandling and processing operations of fresh and frozen fruits, vegetables and herbs (ffFVHs). Part 1(outbreak data analysis, literature review and stakeholder questionnaire). *EFSA Journal*, *21*(11), 1–111.https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8332

EFSA Panel on Biological Hazards, Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordonez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Maradona, M. P., … Herman, L. (2024). Updated list of QPS-recommended microorganisms for safety risk assessments carried out by EFSA *Zenodo*. https://doi.org/10.5281/zenodo.8124409

EFSA Panel on Biological Hazards, Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escámez, P. S., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B., Threlfall, J., Wahlström, H., Takkinen, J., Wagner, M., Arcella, D., Da Silva Felicio, M.T., Georgiadis, M., Messens, W. y Lindqvist, R. (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), 5134. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.

Elahi, Y., Nowroozi, J. y Nezhad Fard, R. M. (2021). Isolation and characterization of bacteriophages from wastewater sources on *Enterococcus* spp. isolated from clinical samples. *Iranian Journal of Microbiology, 13*(5), 671-677. https://doi.org/10.18502/ijm.v13i5.7434

Elois, M. A., Silva, R. da, Pilati, G. V. T., Rodríguez-Lázaro, D. y Fongaro, G. (2023). Bacteriophages as biotechnological tools. *Viruses, 15*(2), 1-25. https://doi.org/10.3390/v15020349

Endersen, L. y Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science, 36*, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.006

Engstrom, S. K., Anderson, K. M. y Glass, K. A. (2021). Effect of commercial protective cultures and bacterial fermentates on *Listeria monocytogenes* growth in a refrigerated high-moisture model cheese. *Journal of Food Protection, 84*(5), 772-780. https://doi.org/10.4315/JFP-20-247

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. y Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews, 24*(1), 85-106. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00534.x

Estorninho, M.J. y Teixeira, P. (2023). Fighting *Listeria monocytogenes* with Bacteriophages: Biotechnology for Food Safety. En: Garcia, M.d.G. y Cortês, A. (Eds) *Blue Planet Law. Sustainable Development Goals Series* (pp. 265-271). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-24888-7_21

Fagerlund, A., Idland, L., Heir, E., Møretrø, T., Aspholm, M., Lindbäck, T. y Langsrud, S. (2022). Whole-Genome sequencing analysis of *Listeria monocytogenes* from rural, urban, and farm environments in Norway: Genetic diversity, persistence, and relation to clinical and food isolates. *Applied and Environmental Microbiology, 88*(6), 1-17, e0213621. https://doi.org/10.1128/aem.02136-21

Fagerlund, A., Wagner, E., Møretrø, T., Heir, E., Moen, B., Rychli, K. y Langsrud, S. (2022). Pervasive *Listeria monocytogenes* is common in the norwegian food system and is associated with increased prevalence of stress survival and resistance determinants. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(18), e0086122. https://doi.org/10.1128/aem.00861-22

Fakruddin, M., Mazumdar, R. M. y Mannan, K. S. Bin. (2012). Predictive microbiology:

Modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences), 40*(2), 121-131. https://doi.org/10.4038/cjsbs.v40i2.3928

Fay, M. L., Salazar, J. K., Stewart, D. S., Khouja, B. A., Zhou, X. y Datta, A. R. (2024). Survival of *Listeria monocytogenes* on frozen vegetables during long-term storage at -18 and -10°C. *Journal of Food Protection, 87*(3), 100224. https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100224

Food and Agriculture Organization y World Health Organization. (2022). Listeria monocytogenes *in ready-to-eat (RTE) foods: attribution, characterization and monitoring* (Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No. 38). Rome. https://doi. org/10.4060/cc2400en

Food and Drugs, 21 C.F.R. § 117 (2016).

Food and Drugs, 21 C.F.R. § 172.785 (2011b). https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-172/subpart-H/section-172.785

Food and Drugs, 21 C.F.R. § 173.300 (2011a).

Food and Drugs, 21 C.F.R. § 173.315 (2012).

Food and Drug Administration. (2009). *Guidance for industry: guide to minimize microbial food safety hazards of melons; draft guidance*. 115(October), 1–38. http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/ucm174171.htm

Food and Drug Administration. (1996). *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds*. FDA U.S. Food y Drug Administration, 1–54. https://www.fda.gov/media/83812/download

Food and Drug Administration. (2024). Investigations of Foodborne Illness Outbreaks . Recuperado el 10 de septiembre de 2024 de https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/investigations-foodborne-illness-outbreaks

Feng, K., Ma, J. y Hu, W. (2024). Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut cucumbers at various storage temperatures. *Horticulturae, 10*(7), 667. https://doi.org/10.3390/horticulturae10070667

Fernández-Blanco, A., Hernández Pérez, M., Moreno Trigos, Y. y García-Hernández, J.

(2023). Development of optical label-free biosensor method in detection of *Listeria monocytogenes* from food. *Sensors, 23(*12), 5570. https://doi.org/10.3390/s23125570

Ferrer, J., Prats, C., López, D. y Vives-Rego, J. (2009). Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis. *International Journal of Food Microbiology, 134*(1-2), 2-8. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.016

Filter, M., Plaza-Rodríguez, C., Thoens, C., Kaesbohrer, A. y Appel, B. (2016). Towards community driven food safety model repositories. *Procedia Food Science, 7*, 105-108. https://doi.org/10.1016/j.profoo.2016.02.098

Fiore, A., Treglia, I., Ciccaglioni, G., Ortoffi, M. F. y Gattuso, A. (2023). Application of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in cooked ham. *Foods, 12*(1), 193. https://doi.org/10.3390/foods12010193

Firdous, N., Moradinezhad, F., Farooq, F. y Dorostkar, M. (2023). Advances in formulation, functionality, and application of edible coatings on fresh produce and fresh-cut products: A review. *Food Chemistry, 407*, 135186. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135186

Fischer, S. W. y Titgemeyer, F. (2023). Protective cultures in food products: From science to market. *Foods, 12*(7), 1541. https://doi.org/10.3390/foods12071541

Fleischmann, S., Robben, C., Alter, T., Rossmanith, P. y Mester, P. (2021). How to evaluate non-growing cells-current strategies for determining antimicrobial resistance of VBNC bacteria. *Antibiotics, 10*(2), 1-24. https://doi.org/10.3390/antibiotics10020115

Fresh Produce Safety Center. (2021). *FPSC 2025 Innovation Agenda Rapid Diagnostic Methods for Foodborne Pathogens: Outlook for the Fresh Produce Industry How can we quickly identify. July 2021*. https://fpsc-anz.com/wp-content/uploads/2021/07/FPSC-Rapid-Diagnostic-Methods-for-Foodborne-Pathogens-Summary.pdf

Food Standards Australia New Zealand Code. (2024). https://www.foodstandards.gov.au/food-standards-code/legislation

Fsihi, H., Steffen, P., y Cossart, P. (2001). *Listeria monocytogenes*. En: E. A. Groisman (Ed.), *Principles of Bacterial Pathogenesis* (pp. 752 - 803). Academic Press.

Gangsei, L. E., Skjerdal, T., Alvseike, O., Kausrud, K. y Hauge, S. (2024). Extension of the Gamma concept to handle changing environment during shelf-life. Applied to an example with *Listeria monocytogenes* in salads with changing pH. *Food Control, 163*, 110535. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110535

García Samaniego, Irene (2023). Diseño y Dimensionamiento de una planta de frutas de IV gama con una capacidad de 5.000 envases de fruta al día en el Polígono Industrial de San Agustín de Guadalix (Madrid) [Proyecto Fin de Carrera / Trabajo Fin de Grado, E.T.S. de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas]. UPM. https://oa.upm.es/view/institution/Agronomica.

Garner, D. y Kathariou, S. (2016). Fresh produce–associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, and insights. *Journal of Food Protection, 79*(2), 337-344. https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-15-387

Garsa, A. K., Kumariya, R., Sood, S. K., Kumar, A. y Kapila, S. (2014). Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. *Probiotics and Antimicrobial Proteins, 6*(1), 47-58. https://doi.org/10.1007/s12602-013-9153-z

Garthright, W. E. (1996). The three-phase linear model of bacterial growth: a response. *Food Microbiology, 14*(2), 193-195.https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0081.

Garvey, M. (2022). Bacteriophages and food production: biocontrol and bio-preservation options for food safety. *Antibiotics, 11*(10), 1-16. https://doi.org/10.3390/antibiotics11101324

Gil, Maria I., Selma, M. V., Suslow, T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M. y Allende, A. (2015). Pre- and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55*(4), 453-468. https://doi.org/10.1080/10408398.2012.657808

Gil, M. I. y Garrido, Y. (2020). The impact of light on modified atmosphere storage and quality of fresh produce. En R. M. Beaudry y M. I. Gil (Eds.). *Controlled and Modified Atmospheres for Fresh and Fresh-Cut Produce* (pp. 167–184). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804599-2.00010-7

Gil, M. I., Truchado, P., Tudela, J. A. y Allende, A. (2024). Environmental monitoring of three fresh-cut processing facilities reveals harborage sites for *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, *155*, 110093. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110093

Girbal, M., Strawn, L. K., Murphy, C. M., Bardsley, C. A. y Schaffner, D. W. (2021). ComBase models are valid for predicting fate of *Listeria monocytogenes* on 10 whole intact raw fruits and vegetables. *Journal of Food Protection*, *84*(4), 597-610. https://doi.org/10.4315/JFP-20-327

Gnanou Besse, N., Lombard, B., Guillier, L., François, D., Romero, K., Pierru, S., Bouhier, L. y Rollier, P. (2019). Validation of standard method EN ISO 11290 - Part 1 - Detection of *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 288, 13-21. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.024

Goisser, S., Wittmann, S., Fernandes, M., Mempel, H. y Ulrichs, C. (2020). Comparison of colorimeter and different portable food-scanners for non-destructive prediction of lycopene content in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *167*, 111232. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111232

Gombas, D., Luo, Y., Brennan, J., Shergill, G., Petran, R., Walsh, R., Hau, H., Khurana, K., Zomorodi, B., Rosen, J., Varley, R. y Deng, K. (2017). Guidelines to validate control of cross-contamination during washing of fresh-cut leafy vegetables. *Journal of Food Protection*, *80*(2), 312-330. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-258

Grath, S. M., y van Sinderen, D. (2007). Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology. Caister Academic Press. https://www.caister.com/phage

Gravesen, A., Warthoe, P., Knøchel, S. y Thirstrup, K. (2000). Restriction fragment differential display of pediocin-resistant *Listeria monocytogenes* 412 mutants shows consistent overexpression of a putative beta-glucoside-specific PTS system. *Microbiology*, *146*(6), 1381-1389. https://doi.org/10.1099/00221287-146-6-1381

Grigore-Gurgu, L., Bucur, F. I., Mihalache, O. A. y Nicolau, A. I. (2024). Comprehensive review on the biocontrol of *Listeria monocytogenes* in food products. *Foods*, *13*(5), 734. https://doi.org/10.3390/foods13050734

Gu, G., Bolten, S., Mowery, J., Luo, Y., Gulbronson, C. y Nou, X. (2020). Susceptibility of foodborne pathogens to sanitizers in produce rinse water and potential induction of viable but non-culturable state. *Food Control, 112*, 107138. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107138

Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S. y Loessner, M. J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(1), 93-100. https://doi.org/10.1128/AEM.01711-08

Guk, K., Yi, S., Kim, H., Kim, S., Lim, E. K., Kang, T. y Jung, J. (2024). PoreGlow: A split green fluorescent protein-based system for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Food Chemistry, 438*, 138043. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138043

Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Fernández, L., Martínez, B., Rodríguez, A. y García, P. (2017). Applicability of commercial phage-based products against *Listeria monocytogenes* for improvement of food safety in Spanish dry-cured ham and food contact surfaces. *Food Control, 73*, 1474-1482. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.007

Gutiérrez-Chocoza, M. A., López-Romero, J. C., García-Galaz, A., González-Ríos, H., Peña-Ramos, A., Juneja, V. K., Pérez-Báez, A. J. y Valenzuela-Melendres, M. (2023). Modeling the effects of temperature and pH on *Listeria monocytogenes* growth in Mexican-style pork chorizo. *Applied Food Research, 3*(2), 100336. https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100336

Gyimah, J., Saalidong, B. M. y Nibonmua, L. K. M. (2023). The battle to achieve Sustainable Development Goal Two: The role of environmental sustainability and government institutions. *PloS one, 18*(9), e0291310. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0291310

Habimana, O., Nesse, L. L., Møretrø, T., Berg, K., Heir, E., Vestby, L. K. y Langsrud, S. (2014). The persistence of *Salmonella* following desiccation under feed processing environmental conditions: A subject of relevance. *Letters in Applied Microbiology, 59*(5), 464-470. https://doi.org/10.1111/lam.12308

Han, Y., Linton, R. H., Nielsen, S. S. y Nelson, P. E. (2002). A comparison of methods

for recovery of chlorine dioxide-injured *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology, 19*(2-3), 201-210. https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0451

Hansen, E. B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology, 78*(1-2), 119-131. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00238-6

Haouet, M. N., Tommasino, M., Mercuri, M. L., Benedetti, F., Di Bella, S., Framboas, M., Pelli, S. y Altissimi, M. S. (2018). Experimental accelerated shelf life determination of a ready-to-eat processed food. *Italian Journal of Food Safety, 7*(4), 189-192. https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.6919

Hashemi, S. M. B., Roohi, R., Mahmoudi, M. R., y Granato, D. (2019). Modeling inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Byssochlamys fulva* and *Saccharomyces cerevisiae* and ascorbic acid and β-carotene degradation kinetics in tangerine juice by pulsed-thermosonication. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology], 111*, 612-621. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.060

Health Canada. (2015). Laboratory procedures for the microbiological analysis of foods - compendium of analytical methods. En: Canada.ca. Ottowa, Ontario, Canada, Government of Canada. https://www.canada.ca/en/health-canada/services/ food-nutrition/research-programs-analytical-methods/analytical-methods/ compendiummethods/laboratory-procedures-microbiological-analysis-foodscompendiumanalytical-methods.html

Highmore, C. J., Warner, J. C., Rothwell, S. D., Wilks, S. A. y Keevil, C. W. (2018). viable-but-nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Thompson induced by chlorine stress remain infectious. *mBio, 9*(2), e00540-18. https://doi.org/10.1128/mBio.00540-18

Hitchins, A., Jinneman, K. y Chen, Y. (2022). Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. En Bacteriological Analytical Manual (BAM), 1–23. FDA https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration

Hodzic, E., Glavinic, A. y Wademan, C. (2023). A novel approach for simultaneous detection of the most common food-borne pathogens by multiplex qPCR. *Biomolecules and Biomedicine, 23*(4), 640-648. https://doi.org/10.17305/bb.2022.8693

Hoelzer, K., Pouillot, R. y Dennis, S. (2012). *Listeria monocytogenes* growth dynamics on produce: a review of the available data for predictive modeling. *Foodborne pathogens and disease, 9*(7), 661-673. https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1087

Holzapfel, W. H., Geisen, R. y Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology, 24(*3), 343-362. https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00036-6

Hong, H., Yang, S. M., Kim, E., Kim, H. J. y Park, S. H. (2023). Comprehensive metagenomic analysis of stress-resistant and sensitive *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology, 107*(19), 6047-6056. https://doi.org/10.1007/s00253-023-12693-z

Hong, Y.-P. (2015). Combining of Bacteriophage and G. asaii Application to Reduce *L. monocytogenes* on fresh-cut melon under low temperature and packing with functional film. *Journal of Food and Nutrition Sciences, 3*(1), 79. https://doi.org/10.11648/j.jfns.s.2015030102.25

Houtsma, P. C., Kant-Muermans, M. L., Rombouts, F. M. y Zwietering, M. H. (1996). Model for the combined effects of temperature, pH, and sodium lactate on growth rates of *Listeria innocua* in broth and Bologna-type sausages. *Applied and environmental microbiology, 62*(5), 1616-1622. https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1616-1622.1996

Hu, L., Zhang, S., Xue, Y., Zhang, Y., Zhang, W. y Wang, S. (2022). Quantitative detection of viable but nonculturable *Cronobacter sakazakii* using photosensitive nucleic acid dye PMA combined with isothermal amplification LAMP in raw milk. *Foods, 11*(17), 2635. https://doi.org/10.3390/foods11172653

Hu, X., Lee, S., Manohar, M. y Chen, J. (2024). The fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* on alfalfa and fenugreek seeds and sprouts as affected by ascaroside #18 treatments. *Food Bioscience, 58*, 103633.

https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103633

Huang, K., Tian, Y., Tan, J., Salvi, D., Karwe, M. y Nitin, N. (2020). Role of contaminated organic particles in cross-contamination of fresh produce during washing and sanitation. *Postharvest Biology and Technology, 168*, 111283. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111283

Hyeon, J. Y., Mann, D. A., Townsend, A. M. y Deng, X. (2018). Quasi-metagenomic analysis of *Salmonella* from food and environmental samples. *Journal of Visualized Experiment, 140*, 5-9. https://doi.org/10.3791/58612

Hyla, K., Dusza, I. y Skaradzińska, A. (2022). Recent advances in the application of bacteriophages against common foodborne pathogens. *Antibiotics, 11*(11), 1536. https://doi.org/10.3390/antibiotics11111536

Iacumin, L., Manzano, M. y Comi, G. (2016). Phage inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele dry-cured ham and elimination of biofilms from equipment and working environments. *Microorganisms, 4*(1), 4. https://doi.org/10.3390/microorganisms4010004

Ibrahim, O. O. (2019). Classification of antimicrobial peptides bacteriocins, and the nature of some bacteriocins with potential applications in food safety and bio-pharmaceuticals. *EC Microbiology, 7*, 591–608.

Iglesias, M. B., Echeverría, G., Viñas, I., López, M. L. y Abadias, M. (2018). Biopreservation of fresh-cut pear using *Lactobacillus rhamnosus* GG and effect on quality and volatile compounds. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology], 87*, 581-588. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.025

Imran, A., Shehzadi, U., Islam, F., Afzaal, M., Ali, R., Ali, Y. A., Chauhan, A., Biswas, S., Khurshid, S., Usman, I., Hussain, G., Zahra, S. M., Shah, M. A. y Rasool, A. (2023). Bacteriophages and food safety: An updated overview. *Food Science and Nutrition, 11*(7), 3621-3630. https://doi.org/10.1002/fsn3.3360

Iqbal, S. M., Gopal, A., Sankaranarayanan, P. E. y Nair, A. B. (2016). Classification of selected citrus fruits based on color using machine vision system. *International Journal of Food Properties, 19*(2), 272-288. https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1020439

ISO (2017). ISO/IEC Directives Part 1. Consolidated ISO supplement - Procedures specific to ISO. Eighth Edition. Geneva, Switzerland: ISO, 2017

İzgördü, Ö. K., Darcan, C. y Kariptaş, E. (2022). Overview of VBNC, a survival strategy for microorganisms. *3 Biotech*, *12*(11), 307. https://doi.org/10.1007/s13205-022-03371-4

Jayeola, V., Farber, J. M. y Kathariou, S. (2022). Induction of the viable-but-nonculturable state in *Salmonella* contaminating dried fruit. *Applied and Environmental Microbiology, 88*(2), 1-13. https://doi.org/10.1128/AEM.01733-21

Jones, S. L., Ricke, S. C., Keith Roper, D. y Gibson, K. E. (2020). Swabbing the surface: critical factors in environmental monitoring and a path towards standardization and improvement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(2), 225-243. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1521369

Jorquera, D., Galarce, N., y Borie, C. (2015a). El desafío de controlar lasenfermedades transmitidas por alimentos: Bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Revista Chilena de Infectologia*, *32*(6), 678-688. https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000700010

Kawacka, I., Olejnik-Schmidt, A., Schmidt, M. y Sip, A. (2020). Effectiveness of Phage-Based Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Food Products and Food Processing Environments. *Microorganisms*, *8*(11), 1764. https://doi.org/10.3390/microorganisms8111764

Khorshidian, N., Khanniri, E., Mohammadi, M., Mortazavian, A. M.y Yousefi, M. (2021). Antibacterial Activity of Pediocin and Pediocin-Producing Bacteria Against *Listeria monocytogenes* in Meat Products. *Frontiers in microbiology*, *12*, 709959. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709959

Koopmans, M. M., Brouwer, M. C., Vázquez-Boland, J. A. y van de Beek, D. (2023). Human Listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews, 36*(1), 1-45. https://doi.org/10.1128/cmr.00060-19

Kroft, B., Gu, G., Bolten, S., Micallef, S. A., Luo, Y., Millner, P. y Nou, X. (2022). Effects of temperature abuse on the growth and survival of *Listeria monocytogenes* on a wide variety of whole and fresh-cut fruits and vegetables during storage. *Food Control, 137*, 108919. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108919

Kushwaha, S. O., Sahu, S. K., Yadav, V. K., Rathod, M. C., Patel, D., Sahoo, D. K. y Patel, A. (2024). Bacteriophages as a potential substitute for antibiotics: A comprehensive review. *Cell Biochemistry and Function, 42*(3), e4022. https://doi.org/10.1002/cbf.4022

Lakicevic, B., Jankovic, V., Pietzka, A. y Ruppitsch, W. (2023). Wholegenome sequencing as the gold standard approach for control of *Listeria monocytogenes* in the food chain. *Journal of Food Protection, 86*(1), 100003. https://doi.org/10.1016/j.jfp.2022.10.002

Lanni, L., Morena, V., Marchese, A. S., Destro, G., Ferioli, M., Catellani, P. y Giaccone, V. (2022). Challenge test as special tool to estimate the dynamic of *Listeria monocytogenes* and other foodborne pathogens. *Foods, 11*(1), 1-22. https://doi.org/10.3390/foods11010032

Law nº5996 on Veterinary Services Plant Health Food and Feed (2010). https://www.lawsturkey.com/law/5996-law-on-veterinary-services-plant-health-food-and-feed

Leclercq, A., Chenal-Francisque, V., Dieye, H., Cantinelli, T., Drali, R., Brisse, S. y Lecuit, M. (2011). Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. *International Journal of Food Microbiology, 147*(1), 74-77. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.010

Lee, C., Sung, D. y Oh, S. (2012). Profiling and priority selection of foodborne pathogens in fresh produce. *Han'gug Sigpum Wi'saeng Anjeonseong Haghoeji [Journal of Food Hygiene and Safety], 27*(4), 356-365.https://doi.org/10.13103/JFHS.2012.27.4.356

Lee, S. y Bae, S. (2018). Evaluating the newly developed dye, DyeTox13 Green C-2 Azide, and comparing it with existing EMA and PMA for the differentiation of viable and nonviable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, *148*, 33-39. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.03.018

Lee, S. H., Lee, S., Park, S. H. y Koo, O. K. (2023). Whole-genome sequencing of *Listeria monocytogenes* isolated from the first listeriosis foodborne outbreak in South Korea. *Frontiers in Microbiology*, *14,* 1-10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1182090

Leistner, L. y Gorris, L. G. M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends*

in Food Science & Technology, *6*(2), 41-46. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88941-4

Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C. M., Guyonnet, J. P., Mafart, P. y Thuault, D. (2002). Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology*, *73*(2-3), 219-237. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00640-7

Leprince, A. y Mahillon, J. (2023). Phage Adsorption to Gram-Positive Bacteria. *Viruses*, *15*(1), 196. https://doi.org/10.3390/v15010196

Leverentz, B., Conway, W. S., Camp, M. J., Janisiewicz, W. J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R. y Sulakvelidze, A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(8), 4519–4526. https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4519-4526.2003

Leverentz, B., Conway, W. S., Janisiewicz, W. y Camp, M. J. (2004). Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *Journal of Food Protection*, *67*(8), 1682-1686. https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.8.1682

Lewis, R. y Hill, C. (2020). Overcoming barriers to phage application in food and feed. *Current Opinion in Biotechnology*, *61*, 38-44. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.018

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D. y Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 258. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258

Lin, D. M. y Lin, H. C. (2019). A theoretical model of temperate phages as mediators of gut microbiome dysbiosis. *F1000Research*, 8. https://doi.org/10.12688/f1000research.18480.1

Lindbäck, T., Rottenberg, M. E., Roche, S. M. y Rørvik, L. M. (2010). The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Veterinary Research*, *41*(1), 8. https://doi.org/10.1051/vetres/2009056

Loessner, M. J. y Busse, M. (1990). Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology, 56*(6), 1912-1918. https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1912-1918.1990

Lone, A., Anany, H., Hakeem, M., Aguis, L., Avdjian, A. C., Bouget, M., Atashi, A., Brovko, L., Rochefort, D. y Griffiths, M. W. (2016). Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods. *International Journal of Food Microbiology, 217*, 49-58. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.011

López-Gálvez, F., Allende, A. y Gil, M. I. (2021). Recent progress on the management of the industrial washing of fresh produce with a focus on microbiological risks. *Current Opinion in Food Science, 38*, 46-51. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.026

López-Gálvez, F., Truchado, P., Tudela, J. A., Gil, M. I. y Allende, A. (2020). Critical points affecting the microbiological safety of bell peppers washed with peroxyacetic acid in a commercial packinghouse. *Food Microbiology, 88*, 103409. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103409

Lopez-Valladares, G., Danielsson-Tham, M. L. y Tham, W. (2018). Implicated food products for listeriosis and changes in serovars of *Listeria monocytogenes* Affecting humans in recent decades. *Foodborne Pathogens and Disease, 15*(7), 387-397. https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2419

Lotoux, A., Milohanic, E. y Bierne, H. (2022). The viable but non-culturable state of *Listeria monocytogenes* in the one-Health continuum. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12*, 849915. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.849915

Lourenco, A., Linke, K., Wagner, M. y Stessl, B. (2022). The saprophytic lifestyle of *Listeria monocytogenes* and entry into the food-processing environment. *Frontiers in Microbiology, 13*, 789801. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.789801

Lozano, L., Iglesias, I., Puy, J. y Echeverria, G. (2023). Performance of an expert sensory panel and instrumental measures for assessing eating fruit quality attributes in a pear breeding programme. *Foods, 12*(7). https://doi.org/10.3390/foods12071426

Lucchini, R., Carraro, L., Pauletto, M., Gallo, M., Andreani, N. A., Weiss, G., Tessaro, C., Babbucci, M. y Cardazzo, B. (2023). Molecular typing and genome sequencing

allow the identification of persistent *Listeria monocytogenes* strains and the tracking of the contamination source in food environments. *International Journal of Food Microbiology, 386*. 110025. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110025

Lücke, F. -K. (1994). Fermented meat products. *Food Research International, 27*(3), 299-307. https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90098-1

Ludwig, W., Schleifer, K.-H., y Whitman, W. B. (2009). *Revised road map to the phylum Firmicutes.* En W. B. Whitman (ed.), Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Volume Three: The Firmicutes. (pp. 244 - 268). Springer.

Luong, T., Salabarria, A. C., Edwards, R. A. y Roach, D. R. (2020). Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nature Protocols, 15*(9), 2867-2890. https://doi.org/10.1038/s41596-020-0346-0

Luque-Sastre, L., Arroyo, C., Fox, E. M., McMahon, B. J., Bai, L., Li, F. y Fanning, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Listeria* species. *Microbiology Spectrum, 6*(4). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0031-2017

Lv, X., Wang, L., Zhang, J., He, X., Shi, L. y Zhao, L. (2021). Quantitative detection of trace VBNC *Cronobacter sakazakii* by immunomagnetic separation in combination with PMAxx-ddPCR in dairy products. *Food Microbiology, 99*, 103831. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103831

Ma, M., Yang, X., Ying, X., Shi, C., Jia, Z. y Jia, B. (2023). Applications of gas sensing in food quality detection: a review. *Foods, 12*(21), 3966. https://doi.org/10.3390/foods12213966

Mahillon, J. (29 de marzo de 2017). *Biocontrol of foodborne pathogens: the pros and cons.* Comunicación a Congreso. IAFP 13th European Symposium on Food Safety. Bruselas. IAFP. (2017).

Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R. P. y van Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology, 22*(2), 157-163. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.008

Makino, S. I., Kii, T., Asakura, H., Shirahata, T., Ikeda, T., Takeshi, K. y Itoh, K. (2000). Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? *Applied and Environmental*

Microbiology, 66(12), 5536-5539. https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5536-5539.2000

Makky, S., Dawoud, A., Safwat, A., Abdelsattar, A. S., Rezk, N. y El-Shibiny, A. (2021). The bacteriophage decides own tracks: When they are with or against the bacteria. *Current Research in Microbial Sciences, 2*, 100050. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100050

Marik, C. M., Zuchel, J., Schaffner, D. W. y Strawn, L. K. (2020). Growth and survival of *Listeria monocytogenes* on intact fruit and vegetable surfaces during postharvest handling: A systematic literature review. *Journal of Food Protection, 83*(1), 108-128. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-283

Martín, I., Rodríguez, A., Delgado, J. y Córdoba, J. J. (2022). Strategies for biocontrol of *Listeria monocytogenes* using lactic acid bacteria and their metabolites in ready-to-eat meat- and dairy-ripened products. *Foods, 11*(4), 542. https://doi.org/10.3390/foods11040542

Martinez-Rios, V., Gkogka, E. y Dalgaard, P. (2019). New term to quantify the effect of temperature on pH min-values used in cardinal parameter growth models for *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology, 10*, 1510. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01510

Martinez-Velasco, J. D., Filomena-Ambrosio, A. y Garzón-Castro, C. L. (2023). Technological tools for the measurement of sensory characteristics in food: A review. *F1000Research, 12,* 340. https://doi.org/10.12688/f1000research.131914.1

Martino, K. G., Marks, B. P., Campos, D. T. y Tamplin, M. L. (2005). Quantifying the robustness of a broth-based model for predicting *Listeria monocytogenes* growth in meat and poultry products. *Journal of Food Protection, 68*(11), 2310-2316. https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.11.2310

Maurice, C. F., Bouvier, T., Comte, J., Guillemette, F. y Del Giorgio, P. A. (2010). Seasonal variations of phage life strategies and bacterial physiological states in three northern temperate lakes. *Environmental microbiology, 12*(3), 628-641. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02103.x

Maurice, C. F., Bouvier, C., de Wit, R. y Bouvier, T. (2013). Linking the lytic and lysogenic bacteriophage cycles to environmental conditions, host physiology and

their variability in coastal lagoons. *Environmental microbiology, 15*(9), 2463-2475. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12120

Mclauchlin, J. (1996). The role of the Public Health Laboratory Service in England and Wales in the investigation of human listeriosis during the 1980s and 1990s. *Food Control, 7*(4-5), 235-239. https://doi.org/10.1016/S0956-7135(96)00037-0

McMeekin, T. A., Chandler, R. E., Doe, P. E., Garland, C. D., Olley, J., Putro, S. y Ratkowsky, D. A. (1987). Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosus*. *The Journal of Applied Bacteriology, 62*(6), 543-550. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb02687.x

McMeekin, T. A. y Ross, T. (2002). Predictive microbiology: Providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology, 78*(1-2), 133-153. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00231-3

Meireles, A., Giaouris, E. y Simões, M. (2016). Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Research International, 82*, 71-85. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.021

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. (2023). *Informe del consumo alimentario en España 2023* (Informe del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Gobierno de España.

Ministry of Health of People's Republic of China. (2016). National standard of the People's Republic of China national of food safety standard, food microbiological examination: *Listeria monocytogenes*. https://sppt.cfsa.net.cn:8086/staticPages/BC60573F-7E60-4E3F-AC6C-19E2484D73CD.html

Mizzi, L., Maniscalco, D., Gaspari, S., Chatzitzika, C., Gatt, R. y Valdramidis, V. P. (2020). Assessing the individual microbial inhibitory capacity of different sugars against pathogens commonly found in food systems. *Letters in Applied Microbiology, 71*(3), 251-258. https://doi.org/10.1111/lam.13306

Modzelewska-Kapituła, M. y Jun, S. (2022). The application of computer vision systems in meat science and industry – A review. *Meat Science, 192*, 108904. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108904

Mogren, L., Windstam, S., Boqvist, S., Vågsholm, I., Söderqvist, K., Rosberg, A. K., Lindén, J., Mulaosmanovic, E., Karlsson, M., Uhlig, E., Håkansson, A. y Alsanius, B. (2018). The hurdle approach-A holistic concept for controlling food safety risks associated with pathogenic bacterial contamination of leafy green vegetables. A review. *Frontiers in Microbiology, 9*, 1-20. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01965

Mohi-Alden, K., Alabboud, M., Soltani, F., y Kalantari, S. (2021). Developing a postharvest color changes identification system of melon rind using image processing. *DYSONA - Applied Science, 2*(2), 13-20. https://doi.org/10.30493/DAS.2021.263257

Moye, Z. D., Woolston, J. y Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses, 10*(4), 205. https://doi.org/10.3390/v10040205

Moreira, J., Mera, E., Singh Chhetri, V., King, J. M., Gentimis, T. y Adhikari, A. (2023). Effect of storage temperature and produce type on the survival or growth of *Listeria monocytogenes* on peeled rinds and fresh-cut produce. *Frontiers in Microbiology, 14*, 1151819. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1151819

Mullan, W.M.A. (2015). Predictive microbiology. Modelling salmonella growth on tomatoes. DairyScience. Recuperado de septiembre de 2024, de: https://www.dairyscience.info/food-model/258-predict.html .

Murray, E. G. D., Webb, R. A. y Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology, 29*(4), 407-439. https://doi.org/10.1002/path.1700290409

Myelnikov, D. (2018). An Alternative cure: The adoption and survival of bacteriophage therapy in the USSR, 1922-1955. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences, 73*(4), 385-411. https://doi.org/10.1093/jhmas/jry024

Naureen, Z., Malacarne, D., Anpilogov, K., Dautaj, A., Camilleri, G., Cecchin, S., Bressan, S., Casadei, A., Albion, E., Sorrentino, E., Beccari, T., Dundar, M. y Bertelli, M. (2020). Comparison between American and European legislation in the therapeutical and alimentary bacteriophage usage. *Acta Biomedica, 91*, 1-7,

e2020023. https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-S.10815

Naveen Kumar, R., Uday Kumar, P., Bhaskar, V., Sudershan, R. V., Polasa, K., Hemalatha, R. y Ghosh, S. (2022). Microbiological hazard identification in selective food products and their association with food safety practices in Hyderabad, India. *Indian Journal of Microbiology Research, 9*(3), 223-231. https://doi.org/10.18231/j.ijmr.2022.040

Nayak, D. N., Savalia, C. V., Kalyani, I. H., Kumar, R., y Kshirsagar, D. P. (2015). Isolation, identification, and characterization of *Listeria* spp. from various animal origin foods. *Veterinary World, 8*(6), 695-701. https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.695-701

Ng, H. F., Ng, J. M. L. y Ngeow, Y. F. (2023). Mechanisms of Gentamicin Resistance in *Listeria monocytogenes*: A Mini Review. *Sains Malaysiana, 52*(9), 2625-2632. https://doi.org/10.17576/JSM-2023-5209-12

Nguyen, C. N., Vo, V. T. y Cong Ha, N. (2022). Developing a computer vision system for real-time color measurement - A case study with color characterization of roasted rice. *Journal of Food Engineering, 316*, 110821. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110821

Nicolò, M. S., Gioffrè, A., Carnazza, S., Platania, G., Silvestro, I. D. y Guglielmino, S. P. (2011). Viable but nonculturable state of foodborne pathogens in grapefruit juice: a study of laboratory. *Foodborne Pathogens and Disease, 8*(1), 11-17. https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0491

Nocker, A. y Camper, A. K. (2009). Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiology Letters, 291*(2), 137-142. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01429.x

Nogueira, R., Cabo, M. L., García-Sanmartín, L., Sánchez-Ruiloba, L. y Rodríguez-Herrera, J. J. (2023). Risk factor-based clustering of *Listeria monocytogenes* in food processing environments using principal component analysis. *Food Research International, 170,* 112989. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112989

Noll, M., Trunzer, K., Vondran, A., Vincze, S., Dieckmann, R., Al Dahouk, S. y Gold, C. (2020). Benzalkonium chloride induces a VBNC State in *Listeria monocytogenes*. *Microorganisms, 8*(2), 184.

https://doi.org/10.3390/microorganisms8020184

Nwaiwu, O. (2020). What are the recognized species of the genus Listeria? *Access Microbiology, 2*(9), 3-4. https://doi.org/10.1099/acmi.0.000153

Nyhan, L., Begley, M., Mutel, A., Qu, Y., Johnson, N. y Callanan, M. (2018). Predicting the combinatorial effects of water activity, pH and organic acids on *Listeria* growth in media and complex food matrices. *Food Microbiology, 74*, 75-85. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.002

Odeyemi, O. A. y Bamidele, F. A. (2016). Harnessing the potentials of predictive microbiology in microbial food safety and quality research in Nigeria. *Future Science OA, 2*(1), FSO91. https://doi.org/10.4155/fso.15.91

Office of Food Additive Safety. (2006). GRAS Notice No. 218. Bacteriophage P100 preparation from *Listeria innocua*. Scientific Procedures.

Office of Food Additive Safety. (2014). GRAS Notice No. 528. Preparation containing six bacterial monophages (LIST-36, LMSP-25, LMTA-34, LMTA-57, LMTA-94 and LMTA148) specific to *Listeria monocytogenes*. Scientific Procedures.

Oladunjoye A. O., Oyewole S. A., Singh S. y Ijabadeniyi O. A. (2017). Prediction of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 growth on fresh-cut produce treated with bacteriophage and sucrose monolaurate by using artificial neural network. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology], 76*, 9–17. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.042.

Oliveira, M., Viñas, I., Colàs, P., Anguera, M., Usall, J. y Abadias, M. (2014). Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiology, 38*, 137-142. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.018

Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews, 34*(4), 415-425. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x

Ölmez, H. y Kretzschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and*

Technology], 42(3), 686-693. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001

Orden, D., Fernández-Fernández, E., Rodríguez-Nogales, J. M. y Vila-Crespo, J. (2019). Testing SensoGraph, a geometric approach for fast sensory evaluation. *Food Quality and Preference, 72,* 1-9. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.09.005

Orsi, R. H. y Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology. 100*(12), 5273-5287. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2

Osek, J., Lachtara, B. y Wieczorek, K. (2022). *Listeria monocytogenes* – How this pathogen survives in food-production environments? *Frontiers in Microbiology, 13*, 1-21. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.866462

Ottesen, A., Ramachandran, P., Chen, Y., Brown, E., Reed, E. y Strain, E. (2020). Quasimetagenomic source tracking of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated ice cream. *BMC Infectious Diseases, 20*(1), 1-6. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4747-z

Palumbo, M., Attolico, G., Capozzi, V., Cozzolino, R., Corvino, A., de Chiara, M. L. V., Pace, B., Pelosi, S., Ricci, I., Romaniello, R. y Cefola, M. (2022). Emerging postharvest technologies to enhance the shelf-life of fruit and vegetables: An overview. *Foods, 11*(23), 1-29. https://doi.org/10.3390/foods11233925

Pan, H. y Ren, Q. (2023). Wake Up! Resuscitation of viable but nonculturable bacteria: mechanism and potential application. *Foods, 12*(1), 82. https://doi.org/10.3390/foods12010082

Paramithiotis, S. (2023). Molecular targets for foodborne pathogenic bacteria detection. *Pathogens, 12*(1), 104. https://doi.org/10.3390/pathogens12010104

Peleg, M. (2022). A new look at models of the combined effect of temperature, ph, water activity, or other factors on microbial growth rate. *Food Engineering Reviews, 14*(1), 31-44. https://doi.org/10.1007/s12393-021-09292-x

Perera, M. N., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J. y Sulakvelidze, A. (2015). Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. *Food Microbiology, 52*, 42-48. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.006

Pérez, E. y Rivas, A. (2022). Evaluación del daño subletal en bacterias por métodos de cultivo. 1-10. https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/183888/PerezRivas%20-%20Evaluacion%20del%20dano%20subletal%20en%20bacterias%20por%20metodos%20de%20cultivo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Pérez-Rodríguez y A. Valero (Eds.). (2013). *Predictive microbiology in foods*. Springer.

Petri, E., Virto, R., Mottura, M. y Parra, J. (2021). Comparison of peracetic acid and chlorine effectiveness during fresh-cut vegetable processing at industrial scale. *Journal of Food Protection, 84*(9), 1592-1602. https://doi.org/10.4315/JFP-20-448

Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membré, J. M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V. y Vialette, M. (2004). Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Applied and Environmental Microbiology, 70*(2), 1081-1087. https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1081-1087.2004

Pirie J. (1927). A new disease of veld rodents: Tiger River disease. Publication of the South African. *Institute of Medical Research, 3,* 163-186.

Poimenidou, S. V., Chatzithoma, D. N., Nychas, G. J. y Skandamis, P. N. (2016). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat, salinity and low pH, after habituation on cherry tomatoes and lettuce leaves. *PLoS ONE, 11*(10), 1-16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165746

Polese, P., Del Torre, M., Venir, E. y Stecchini, M. L. (2014). A simplified modelling approach established to determine the *Listeria monocytogenes* behaviour during processing and storage of a traditional (Italian) ready-to-eat food in accordance with the European Commission Regulation N° 2073/2005. *Food Control, 36*(1), 166-173. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.026

Possas, A. y Pérez-Rodríguez, F. (2023). New insights into cross-contamination of fresh-produce. *Current Opinion in Food Science, 49,* 100954. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100954

Possas, A., de Souza, P. M., Alvarenga, V. y Valero, A. (2023). Biopreservation strategies for sustainable food processing. *Frontiers in Sustainable Food Systems,* 7, 31-33. https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1269777

Pujol, L., Kan-King-Yu, D., Le Marc, Y., Johnston, M. D., Rama-Heuzard, F., Guillou, S., McClure, P. y Membré, J. M. (2012). Establishing equivalence for microbial-growth-inhibitory effects ("iso-hurdle rules") by analyzing disparate *Listeria monocytogenes* data with a Gamma-type predictive model. *Applied and Environmental Microbiology, 78*(4), 1069-1080. https://doi.org/10.1128/AEM.06691-11

Punia Bangar, S., Suri, S., Trif, M. y Ozogul, F. (2022). Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Bioscience, 46*, 101615. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101615

Puxty, R. J. y Millard, A. D. (2023). Functional ecology of bacteriophages in the environment. *Current Opinion in Microbiology, 71*, 102245. https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102245

Quintela, I. A., Vasse, T., Lin, C. S., y Wu, V. C. H. (2022). Advances, applications, and limitations of portable and rapid detection technologies for routinely encountered foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology, 13*, 1054782. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1054782

Rameez K. V. M, Santhoshkumar P, Yoha K. S. y Moses J. A. (2024). Biopreservation of food using probiotics: Approaches and challenges. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal, 12*(2), 539-560. http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.12.2.5

Ranveer, S. A., Dasriya, V., Ahmad, M. F., Dhillon, H. S., Samtiya, M., Shama, E., Anand, T., Dhewa, T., Chaudhary, V., Chaudhary, P., Behare, P., Ram, C., Puniya, D. V., Khedkar, G. D., Raposo, A., Han, H. y Puniya, A. K. (2024). Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain. *Npj Science of Food, 8*(1), 1. https://doi.org/10.1038/s41538-023-00245-8l

RASFF (2024). RASFF window for Consumers. Recuperado el 10 de septiembre de 2024 de https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search

Ratprakhon, K., Neubauer, W., Riehn, K., Fritsche, J. y Rohn, S. (2020). Developing an automatic color determination procedure for the quality assessment of mangos (*Mangifera indica*) using a CCD camera and color standards. *Foods, 9*(11), 1709. https://doi.org/10.3390/foods9111709

Reglamento (CE) No 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de La Unión Europea*, *L338*, de 22 de diciembre de 2005. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj

Reglamento (CE) No 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, por el que se establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, *L354*, de 31 de diciembre de 2008. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2008/1331/oj

Rendueles, C., Duarte, A. C., Escobedo, S., Fernández, L., Rodríguez, A., García, P. y Martínez, B. (2022). Combined use of bacteriocins and bacteriophages as food biopreservatives. A review. *International Journal of Food Microbiology, 368*, 109611. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109611

Ripolles-Avila, C., Martínez-Garcia, M., Capellas, M., Yuste, J., Fung, D. Y. C. y Rodríguez-Jerez, J. J. (2020). From hazard analysis to risk control using rapid methods in microbiology: A practical approach for the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 19*(4), 1877-1907. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12592

Rocourt, J. y Buchrieser, C. (2007). The Genus Listeria and Listeria monocytogenes: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification. En E. T. Ryser y E. H. Marth (Eds.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety* (Third Edit, pp. 1–20). CRC PRESS.

Rodriguez, C., Taminiau, B., García-Fuentes, E., Daube, G. y Korsak, N. (2021). *Listeria monocytogenes* dissemination in farming and primary production: Sources, shedding and control measures. *Food Control*, *120*, 107540. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107540

Rodriguez, M. R. (2003). Desarrollo y Validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos. [Tesis Doctoral, Universidad de Cordoba]. https://core.ac.uk/download/pdf/60852611.pdf

Rogers, L. A. y Whittier, E. O. (1928). Limiting factors in the lactic fermentation. *Journal of Bacteriology, 16*(4), 211-229. https://doi.org/10.1128/jb.16.4.211-229.1928

Rooney, W. M., Grinter, R. W., Correia, A., Parkhill, J., Walker, D. C. y Milner, J. J. (2020). Engineering bacteriocin-mediated resistance against the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Biotechnology Journal, 18*(5), 1296-1306. https://doi.org/10.1111/pbi.13294

Ross, T. y Dalgaard, P. (2003). Secondary models. En R. C. McKellar y X. Lu (Eds.), *Modeling Microbial Responses in Food* (pp. 63–150). CRC Press. http://doi.org/10.1201/9780203503942.ch

Ross, T., McMeekin, T. A., y Baranyi, J. (1999). Predictive Microbiology and Food Safety. En Carl A. Batt and Mary Lou Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 1699–1710). Elsevier. https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.1270

Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S. y Flandrois, J. P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology, 61*(2), 610-616. https://doi.org/10.1128/aem.61.2.610-616.1995

Rosso, L. y Robinson, T. P. (2001). A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *International journal of food microbiology*, *63*(3), 265–273. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00469-4

Rothwell, J. G., Hong, J., Morrison, S. J., Vyas, H. K. N., Xia, B., Mai-Prochnow, A., McConchie, R., Phan-Thien, K.-Y., Cullen, P. J. y Carter, D. A. (2023). an effective sanitizer for fresh produce production: *in situ* plasma-activated water treatment inactivates pathogenic bacteria and maintains the quality of Cucurbit fruit. *Microbiology Spectrum, 11*(4), 1-16. https://doi.org/10.1128/spectrum.00034-23

Russo, S., Cosciani-Cunico, E., Dalzini, E., Daminelli, P., Ricchi, M., Arrigoni, N. y Cammi, G. (2023). Evaluation of maximum growth rate of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat fresh-cut papaya and melon. *International Food Research Journal, 30*(4), 953-963. https://doi.org/10.47836/ifrj.30.4.13

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. y Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology, 84*(3), 197-215. https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00375-8

Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., Kim, H. S. y Ha, S. Do. (2017). Effectiveness of a phage cocktail as a biocontrol agent against *L. monocytogenes*

biofilms. *Food Control, 78,* 256-263. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.056

Santivarangkna, C., Kulozik, U., y Foerst, P. (2007). Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress, 23*(2), 302-315. https://doi.org/10.1021/bp060268f

Schlech, W. F. (2019). Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. Gram-Positive *Pathogens, 13,* 793–802. https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch50

Schoder, D., Guldimann, C. y Märtlbauer, E. (2022). Asymptomatic carriage of *Listeria monocytogenes* by animals and humans and its impact on the food chain. *Foods, 11*(21), 1-17. https://doi.org/10.3390/foods11213472

Schvartzman, M. S., Gonzalez-Barron, U., Butler, F. y Jordan, K. (2014). Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear- or mold-ripened cheese. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 4,* 1-9. https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00090

Seeliger, H. P. y Höhne, K. (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. En T. Bergan y J. R. Norris (Eds.), *Methods in Microbiology, 13* (pp. 31-49). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70372-6

Segura, L. I., Salvadori, V. O. y Goñi, S. M. (2017). Characterisation of liquid food colour from digital images. *International Journal of Food Properties*, *20*(1), 467-477. https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1299758

Serra-Castelló, C., Desriac, N., Jofré, A., Belletti, N., Coroller, L. y Bover-Cid, S. (2022). Key Factors Determining the Behavior of Pathogens in Dry-Cured Ham after High Pressure Processing. *Applied Sciences*, *12*(24), 12732. https://doi.org/10.3390/app122412732

Sharma, A. (2018). Importance of probiotics in cancer prevention and treatment. En Viswanath Buddolla (Ed.), *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* (pp 33-45). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00004-0

Sheng, L. y Zhu, M. J. (2021). Practical in-storage interventions to control foodborne

pathogens on fresh produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 20*(5), 4584-4611. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12786

Sibanda, T. y Buys, E. M. (2022). *Listeria monocytogenes* pathogenesis: the role of stress adaptation. *Microorganisms, 10*(8), 1522. https://doi.org/10.3390/microorganisms10081522

Sillankorva, S. M., Oliveira, H., & Azeredo, J. (2012). Bacteriophages and their role in food safety. *International journal of microbiology, 2012,* 863945. https://doi.org/10.1155/2012/863945

Silva, B.N., Cadavez, V., Teixeira, J.A. y Gonzales-Barron, U. (2017). Meta-analysis of the incidence of foodborne pathogens in vegetables and fruits from retail establishments in Europe. *Current Opinion in Food Science, 18,* 21-28. https://doi.org/10.1016/j. cofs.2017.10.001

Silva, C. C. G., Silva, S. P. M. y Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology, 9,* 594. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594

Sim, J., Hood, D., Finnie, L., Wilson, M., Graham, C., Brett, M. y Hudson, J. A. (2002). Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Letters in Applied Microbiology, 35*(5), 409-413. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01207.x

Singh, S., Nath, G. y Maheshwari, A. (2024). Bacteriophages. Newborn, 2(4), 297–309.

Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Tabanelli, G., Montanari, C., Gardini, F. y Lanciotti, R. (2015). Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food Microbiology, 47,* 74-84. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.008

Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. Ben, Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D. y Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiology Reviews, 45*(1), 1-24. https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039

Somasundaram, S. (2 de abril de 2023). Scaling Up: A Comprehensive Comparison Between Laboratory-Scale, Pilot-Scale, and Full-Scale Studies in Research.

ilovePhD. Recuperado el 10 de septiembre de 2024 de https://www.ilovephd.com/pilot-scale-lab-scale-full-scale/

Souza, L. V., Martins, E., Moreira, I. M. F. B., de Carvalho, A. F. y Comi, G. (2022). Strategies for the development of bioprotective cultures in food preservation. *International Journal of Microbiology*, 6264170. https://doi.org/10.1155/2022/6264170

Stambach, N. R., Carr, S. A., Cox, C. R. y Voorhees, K. J. (2015). Rapid detection of listeria by bacteriophage amplification and SERS-lateral flow immunochromatography. *Viruses*, *7*(12), 6631-6641. https://doi.org/10.3390/v7122962

Stavropoulou, E. y Bezirtzoglou, E. (2019). Predictive modeling of microbial behavior in food. *Foods*, *8*(12), 1-16. https://doi.org/10.3390/foods8120654

Stephan, R., Althaus, D., Kiefer, S., Lehner, A., Hatz, C., Schmutz, C., Jost, M., Gerber, N., Baumgartner, A., Hächler, H. y Mäusezahl-Feuz, M. (2015). Foodborne transmission of *Listeria monocytogenes* via ready-to-eat salad: A nationwide outbreak in Switzerland, 2013–2014. *Food Control, 57*, 14-17. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.034

Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, *International Journal of General and Molecular Microbiology, 70*(2-4), 331-345. https://doi.org/10.1007/BF00395940

Strydom. A. (2015). Control of *Listeria monocytogenes* in an avocado processing facility. [Tesis Doctoral, Universidad del Estado Libre]. openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/b1eb7636-6a33-4c43-97c4-2769ccb09eb8/content

Stupar, J., Holøymoen, I. G., Hoel, S., Lerfall, J., Rustad, T. y Jakobsen, A. N. (2021). diversity and antimicrobial activity towards *Listeria* spp. and *Escherichia coli* among lactic acid bacteria isolated from ready-to-eat seafood. *Foods*, *10*(2), 271. https://doi.org/10.3390/foods10020271

Su, X., Xue, B., Wang, Y., Hashmi, M. Z., Lin, H., Chen, J., Mei, R., Wang, Z. y Sun, F. (2019). Bacterial community shifts evaluation in the sediments of Puyang River and its nitrogen removal capabilities exploration by resuscitation promoting factor.

Ecotoxicology and Environmental Safety, 179, 188-197. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.067

Summers, W. C. (2012). The strange history of phage therapy. *Bacteriophage, 2*(2), 130-133. https://doi.org/10.4161/bact.20757

Summers, W. C. (2016). Félix Hubert d'Herelle (1873-1949): History of a scientific mind. *Bacteriophage*, *6*(4), e1270090. https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1270090

Szymczak, B. (2023). Phenotypic and genotypic characteristics of non-hemolytic *L. monocytogenes* isolated from food and processing environments. *Foods, 12*(19), 3630. https://doi.org/10.3390/foods12193630

Taiwo, O. R., Onyeaka, H., Oladipo, E. K., Oloke, J. K. y Chukwugozie, D. C. (2024). Advancements in predictive microbiology: integrating new technologies for efficient food safety models. *International Journal of Microbiology*, 6612162. https://doi.org/10.1155/2024/6612162

Tamburro, M., Sammarco, M. L., Ammendolia, M. G., Fanelli, I., Minelli, F. y Ripabelli, G. (2015). Evaluation of transcription levels of inlA, inlB, hly, bsh and prfA genes in Listeria monocytogenes strains using quantitative reverse-transcription PCR and ability of invasion into human CaCo-2 cells. *FEMS Microbiology Letters*, *362*(6). https://doi.org/10.1093/femsle/fnv018

Tarlak, F. (2023). The Use of Predictive Microbiology for the Prediction of the Shelf Life of Food Products. Foods, 12(24). https://doi.org/10.3390/foods12244461

Tchuenchieu, A., Sado Kamdem, S., Bevivino, A., Etoa, F. X., y Essia Ngang, J. J. (2022). Development of a predictive model of the microbial inactivation of *L. monocytogenes* during low thermal treatment of fruit juices in combination with carvacrol as aroma compound. *Current Research in Food Science, 5*, 374-381. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.02.002

Te Giffel, M. C. y Zwietering, M. H. (1999). Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology, 46*(2), 135-149. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00189-5

Todorov, S. D., Popov, I., Weeks, R. y Chikindas, M. L. (2022). Use of Bacteriocins and

bacteriocinogenic beneficial organisms in food products: Benefits, challenges, concerns. *Foods, 11*(19), 1-21. https://doi.org/10.3390/foods11193145

Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E. y Montesinos, E. (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology, 123*(1-2), 50-60. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.065

Trinh, K. T. L. y Lee, N. Y. (2022). Recent methods for the viability assessment of bacterial pathogens: Advances, challenges, and future perspectives. *Pathogens, 11*(9), 1057. https://doi.org/10.3390/pathogens11091057

Truchado, P., y Allende, A. (2020a). La implicación de las frutas y hortalizas en las toxiinfecciones alimentarias y la relevancia del estado fisiológico de las bacterias. *Arbor, 196*(795), a541. https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1005

Truchado, P., Elsser-Gravesen, A., Gil, M. I. y Allende, A. (2020b). Post-process treatments are effective strategies to reduce *Listeria monocytogenes* on the surface of leafy greens: A pilot study. *International Journal of Food Microbiology, 313*, 108390. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108390

Truchado, P., Gil, M. I. y Allende, A. (2021). Peroxyacetic acid and chlorine dioxide unlike chlorine induce viable but non-culturable (VBNC) stage of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in wash water. *Food Microbiology, 100*, 103866. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103866

Truchado, P., Gil, M. I. y Allende, A. (2024). Evidence for the industrial application of bacteriophages to control *Listeria monocytogenes* in leafy greens. CPS 2022 RFP Final Project Report. https://www.centerforproducesafety.org/assets/research-database/CPS-Final-Report_TRUCHADO-April-2024.pdf

Truchado, P., Gil, M. I., Kostic, T. y Allende, A. (2016). Optimization and validation of a PMA qPCR method for *Escherichia coli* quantification in primary production. *Food Control, 62*, 150-156. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.014

Truchado, P., Gil, M. I., Larrosa, M. y Allende, A. (2020c). Detection and Quantification methods for viable but non-culturable (VBNC) cells in process wash water of fresh-cut produce: Industrial validation. *Frontiers in Microbiology, 11*, 1-10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00673

Truong, H. N., Garmyn, D., Gal, L., Fournier, C., Sevellec, Y., Jeandroz, S. y Piveteau, P. (2021). Plants as a realized niche for *Listeria monocytogenes*. *Microbiology Open, 10*(6), 1-16. https://doi.org/10.1002/mbo3.1255

Tucci, P., Centorotola, G., Salini, R., Iannetti, L., Sperandii, A. F., D'Alterio, N., Migliorati, G. y Pomilio, F. (2019). Challenge test studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Science and Nutrition,* 7(12), 3845-3852. https://doi.org/10.1002/fsn3.1167

Tudela, J. A., López-Gálvez, F., Allende, A., Hernández, N., Andújar, S., Marín, A., Garrido, Y. y Gil, M. I. (2019). Operational limits of sodium hypochlorite for different fresh produce wash water based on microbial inactivation and disinfection by-products (DBPs). *Food Control, 104*, 300-307. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.005

Tuytschaever, T., Raes, K. y Sampers, I. (2023). *Listeria monocytogenes* in food businesses: From persistence strategies to intervention/prevention strategies-A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 22*(5), 3910-3950. https://doi.org/10.1111/1541-4337.13219

Valderrama, W. B., Dudley, E. G., Doores, S. y Cutter, C. N. (2016). Commercially available rapid methods for detection of selected food-borne pathogens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56*(9), 1519-1531. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.775567

Valente, L., Prazak, J., Que, Y. A. y Cameron, D. R. (2021). Progress and pitfalls of bacteriophage therapy in critical care: a concise definitive review. *Critical Care Explorations, 3*(3), e0351. https://doi.org/10.1097/CCE.0000000000000351

Van der Linden, I., Cottyn, B., Uyttendaele, M., Vlaemynck, G., Maes, M. y Heyndrickx, M. (2014). Evaluation of an attachment assay on lettuce leaves with temperature- and starvation-stressed *Escherichia coli* O157:H7 MB3885. *Journal of Food Protection, 77*(4), 549-557. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-332

Van Paepeghem, C., Taghlaoui, F., De Loy-Hendrickx, A., Vermeulen, A., Devlieghere, F., Jacxsens, L. y Uyttendaele, M. (2024). Prevalence and growth potential of *Listeria monocytogenes* in innovative, pre-packed, plant-based ready-to-eat food products on the Belgian market. *International Journal of Food Microbiology, 410,*

110506. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110506

Vila, Montserrat. (26 a 29 de noviembre de 2013). *Listeria monocytogenes* en comidas preparadas. Comunicación a Congreso. Workshop MRAMA. Bellaterra, Cerdanyola del Vallès, Núm. XII (2013)

Vignolo, G., Fadda, S. y Castellano, P. (2008). *Starter cultures: bioprotective cultures.* En: Toldrá, F. (Ed.). Handbook of fermented meat and poultry. Blackwell Publishing. https://doi.org/10.1002/9780470376430.ch14

Villalpando-Aguilar, J. L., Matos-Pech, G., López-Rosas, I., Castelán-Sánchez, H. G. y Alatorre-Cobos, F. (2022). Phage Therapy for Crops: Concepts, Experimental and Bioinformatics Approaches to Direct Its Application. *International Journal of Molecular Sciences, 24*(1), 325. https://doi.org/10.3390/ijms24010325

Volpi, M., Gambino, M., Kirkeby, K., Elsser-Gravesen, A. y Brøndsted, L. (2023). Full-scale industrial phage trial targeting *Salmonella* on pork carcasses. *Food Microbiology, 112*, 104240. https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104240

Wagh, R. V., Priyadarshi, R., y Rhim, J. W. (2023). Novel bacteriophage-based food packaging: An innovative food safety approach. *Coatings*, *13*(3), 1-13. https://doi.org/10.3390/coatings13030609

Wagner, E., Fagerlund, A., Langsrud, S., Møretrø, T., Jensen, M. R. y Moen, B. (2021). Surveillance of *Listeria monocytogenes*: Early detection, population dynamics, and quasimetagenomic sequencing during selective enrichment. *Applied and Environmental Microbiology, 87*(24), 1-20. https://doi.org/10.1128/AEM.01774-21

Waltner-Toews D. (2019). Responding to globalised food-borne disease: risk assessment as post-normal science. *EFSA journal*, *17*(1), e170718. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.e170718

Wang, Yaqi, Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y. y Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9,* 1-19. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285

Wang, Yu, Shang, N., Huang, Y., Gao, B. y Li, P. (2024). The progress of the biotechnological production of class IIa bacteriocins in various cell factories and its

future challenges. *International Journal of Molecular Sciences, 25*(11), 5791. https://doi.org/10.3390/ijms25115791

Wang, Yue, Chen, Z., Zhao, F. y Yang, H. (2023). Metabolome shifts triggered by chlorine sanitisation induce *Escherichia coli* on fresh produce into the viable but nonculturable state. *Food Research International, 171*, 113084. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113084

Wason, S., Verma, T. y Subbiah, J. (2021). Validation of process technologies for enhancing the safety of low-moisture foods: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 20*(5), 4950-4992. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12800

Webb, L., Ma, L. y Lu, X. (2022). Impact of lactic acid bacteria on the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Food Quality and Safety, 6*, fyac045. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyac045

Whiting, R.C. y Buchanan, R.L. (1993). A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology, 10*, 175-177.

Whiting, R. C. y Cygnarowicz-Provost, M. (1992). A quantitative model for bacterial growth and decline. *Food Microbiology, 9*, 269-277. https://doi.org/10.1016/0740-0020(92)80036-4

Whitehead, H. R. (1933). A substance inhibiting bacterial growth produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochemical Journal*, *27*(6), 1793-1800. https://doi.org/10.1042/bj0271793

Wideman, N. E., Oliver, J. D., Crandall, P. G. y Jarvis, N. A. (2021). Detection and potential virulence of viable but non-culturable (VBNC) *Listeria monocytogenes*: A review. *Microorganisms*, *9*(1), 1-11. https://doi.org/10.3390/microorganisms9010194

Wilking, H., Lachmann, R., Holzer, A., Halbedel, S., Flieger, A. y Stark, K. (2021). Ongoing high incidence and case-fatality rates for invasive listeriosis, Germany, 2010-2019. *Emerging Infectious Diseases, 27*(9), 2485-2488. https://doi.org/10.3201/eid2709.210068

World Health Organization. (2018). *Whole genome sequencing for foodborne disease*

surveillance: landscape paper. https://iris.who.int/handle/10665/272430

World Organisation for Animal Health. (2021). *Listeria monocytogenes*. En Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, thirteenth edition 2024 (pp. 1–19). https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/

Xiang, Y. Z., Wu, G., Zhang, Y. P., Yang, L. Y., Zhang, Y. M., Zhao, Z. S., Deng, X. Y. y Zhang, Q. L. (2022). Inhibitory effect of a new bacteriocin RSQ04 purified from *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes* and its application on model food systems. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology], 164*, 113626. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113626

Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A.E. y Sheard, M.A. (1999). A mathematical model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology, 46*(1), 45-55. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00172-x.

Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J. y Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology, 8*(4), 313-323. https://doi.org/10.1007/BF02010671

Xu, S., Campisi, E., Li, J. y Fischetti, V. A. (2021). Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh Romaine lettuce using a novel bacteriophage lysin. *International Journal of Food Microbiology, 341*, 109068. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109068

Xu, Z., Ding, Z., Zhang, Y., Liu, X., Wang, Q., Shao, S., y Liu, Q. (2023). Shelf-life prediction and storage stability of *Aeromonas* bacteriophage vB_AsM_ZHF. *Virus research, 323*, 198997. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198997

Yang, S. -C., Lin, C. -H., Sung, C. T. y Fang, J. -Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology, 5*, 1-10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241

Yang, X. y Scharff, R. (2024). Foodborne illnesses from leafy greens in the United States: Attribution, burden, and cost. *Journal of food protection, 87*(6), 100275. https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100275

Yi, Y., Li, P., Zhao, F., Zhang, T., Shan, Y., Wang, X., Liu, B., Chen, Y., Zhao, X. y Lü, X. (2022). Current status and potentiality of class II bacteriocins from lactic acid bacteria: structure, mode of action and applications in the food industry. *Trends in Food Science and Technology, 120*, 387-401. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.018

Yoon, J. H., Bae, Y. M., Jung, S. Y., Cha, M. H., Ryu, K., Park, K. H. y Lee, S. Y. (2014). Predictive modeling for the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on fresh-cut cabbage at various temperatures. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 57*(5), 631-638. https://doi.org/10.1007/s13765-014-4096-y

Yoshikawa, Y., Ochiai, Y., Mochizuki, M., Fujita, O., Takano, T., Hondo, R. y Ueda, F. (2016). Genetic subtyping of *Listeria monocytogenes* via multiple-locus sequence typing using iap, sigB and actA. *Journal of Veterinary Medical Science, 78*(12), 1831-1839. https://doi.org/10.1292/jvms.16-0367

Zacharof, M. P. y Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia, 2*, 50-56. https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010.

Zapaśnik, A., Sokołowska, B. y Bryła, M. (2022). Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods, 11*(9), 1-17. https://doi.org/10.3390/foods11091283

Zhang, C., Zhang, S., Liu, W., Guo, T., Gu, R. y Kong, J. (2019). Potential application and bactericidal mechanism of lactic acid-hydrogen peroxide consortium. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 189*(3), 822-833. https://doi.org/10.1007/s12010-019-03031-z

Zhang, J., Yang, H., Li, J., Hu, J., Lin, G., Tan, B. K. y Lin, S. (2023). Current perspectives on viable but non-culturable foodborne pathogenic bacteria: A review. *Foods, 12*(6), 1-15. https://doi.org/10.3390/foods12061179

Zhang, X. H., Ahmad, W., Zhu, X. Y., Chen, J., y Austin, B. (2021). Viable but nonculturable bacteria and their resuscitation: implications for cultivating uncultured marine microorganisms. *Marine Life Science and Technology, 3*(2), 189-203. https://doi.org/10.1007/s42995-020-00041-3

Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C. W. y Ding, T. (2017). Current perspectives on viable

but non-culturable state in foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology, 8*, 580. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00580

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G. y Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782-2858. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107

Zia, S. y Alkheraije, K. A. (2023). Recent trends in the use of bacteriophages as replacement of antimicrobials against food-animal pathogens. *Frontiers in Veterinary Science, 10*, 1-11. https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1162465

Ziegler, M., Kent, D., Stephan, R. y Guldimann, C. (2019). Growth potential of *Listeria monocytogenes* in twelve different types of RTE salads: Impact of food matrix, storage temperature and storage time. *International Journal of Food Microbiology, 296*, 83-92. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.016

Zimina, M., Babich, O., Prosekov, A., Sukhikh, S., Ivanova, S., Shevchenko, M. y Noskova, S. (2020). Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins. *Antibiotics*, *9*(9), 553. https://doi.org/10.3390/antibiotics9090553

Ziso, D., Chun, O. K. y Puglisi, M. J. (2022). Increasing access to healthy foods through improving food environment: A review of mixed methods intervention studies with residents of low-income communities. *Nutrients, 14*(11), 2278. https://doi.org/10.3390/nu14112278

Zolfaghari, M., Rezaei, M., Mohabbati Mobarez, A., Forozandeh Moghaddam, M., Hosseini, H. y Khezri, M. (2020). Virulence genes expression in viable but non-culturable state of *Listeria monocytogenes* in fish meat. *Ciencia y Tecnologia de Los Alimentos Internacional [Food Science and Technology International], 26*(3), 205-212. https://doi.org/10.1177/1082013219877267

Zwietering, M. H., De Wit, J. C. y Notermans, S. (1996). Application-of predictive

microbiology to estimate the number of Bacillus cereus in pasteurised milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology*, *30*(1-2), 55-70. https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00991-9

Zwietering, M. H., Wijtzes, T., De Wit, J. C. y Riet, K. V. T. (1992). A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*, *55*(12), 973-979. https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.12.973