

Formación de biopelículas por *Listeria monocytogenes* aisladas de queso fresco de mercados del Cercado de Lima

Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh cheese of markets in Cercado de Lima

Diego Villanueva^{1,a}, María Salazar^{2,a,b}

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

²Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo", Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

^a Químico Farmacéutico, ^b Doctora en Farmacia y Bioquímica

An Fac med. 2017;78(3):322-325 / <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i3.13768>

Resumen

Introducción. *Listeria monocytogenes*, bacteria de importancia en salud pública por causar la listeriosis y sus graves consecuencias, se asocia al consumo de alimentos que durante su producción se pueden contaminar con bacterias que se liberan de biopelículas formadas en tuberías, superficies y equipos. **Objetivo.** Analizar muestras de queso fresco con el fin de aislar e identificar *L. monocytogenes* y evaluar su capacidad formadora de biopelículas en dos medios de cultivo. **Diseño.** Estudio experimental, prospectivo. **Institución.** Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. **Material.** 75 muestras de queso fresco provenientes de diez mercados del Cercado de Lima. **Métodos.** En el análisis microbiológico se empleó metodologías del Manual de Bacteriología Analítica de la *Food and Drug Administration* (FDA). Para determinar la capacidad formadora de biopelículas se aplicó el método de microplaca descrito por Djordjevic modificado por Borucki. Se usó la prueba de Kruskal-Wallis. Principales medidas de resultados. Identificación de *L. monocytogenes*. **Resultados.** Se identificó *L. monocytogenes* en 14 muestras (18,7%), valor que representó un riesgo potencial para la salud de los consumidores. Se halló nueve cepas con capacidad de formar biopelículas que, según la densidad óptica a 595 nm, fueron clasificadas en formadoras débiles y moderadas, con diferencias significativas dependiendo del medio de cultivo utilizado, siendo el caldo infusión cerebro corazón (BHI) el más efectivo para esta bacteria. **Conclusiones.** Se identificó *L. monocytogenes* en 18,7% (14/75) de las muestras de quesos frescos adquiridas en 10 mercados del Cercado de Lima. De estas cepas, 64,3% (9/14) tuvieron capacidad formadora de biopelículas.

Palabras clave. *Listeria monocytogenes*; Queso; Biopelículas.

Abstract

Introduction: *L. monocytogenes* is a bacterium of importance in public health because it causes listeriosis, which has serious consequences. It is associated with the consumption of foods that can be contaminated during its production with bacteria released from pipes, surfaces and equipment biofilms. **Objectives:** To analyze cheese samples in order to isolate and identify *L. monocytogenes* and evaluate its ability for biofilm formation in two culture media. **Design.** Experimental, prospective study. **Setting:** Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru. **Material:** 75 samples of fresh cheese from ten markets of Cercado de Lima. **Methods:** The microbiological analysis used methods described in the Bacterial Analytical Manual of the Food and Drug Administration. The microplate method described by Djordjevic modified by Borucki was used to determine the ability of biofilm formation. The Kruskal-Wallis test was applied. Main outcome measures: Identification of *L. monocytogenes*. **Results:** *L. monocytogenes* was identified in 14 samples (18.7%), a value representing potential risk to the consumers' health. Nine biofilm-forming strains were found and classified according to their optical density at 595 nm in weak and moderate formers, with significant differences depending on the culture medium used. The brain heart infusion (BHI) was the most effective one. **Conclusions:** *L. monocytogenes* was identified in 18.7% (14/75) of samples of fresh cheese obtained in ten of Cercado de Lima's markets. Of these strains, 64.3% (9/14) were biofilm formers.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; Cheese; Biofilms.

Correspondencia:

María E. Salazar-Salvatierra
msalazars@unmsm.edu.pe

Jr. Puno 1002. Lima 1.

Teléfono: 6197000 anexo 4827

Recibido: 23 abril 2016

Aceptado: 18 mayo 2017

El contenido del manuscrito no ha sido publicado previamente ni ha sido remitido a otra revista biomédica.

Conflictos de interés: Ninguno.

Fuente de financiamiento: Propio.

Citar como: Villanueva D, Salazar M.

Formación de biopelículas por *Listeria monocytogenes* aisladas de queso fresco de mercados del Cercado de Lima. *An Fac med.* 2017;78(3):322-325.

DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i3.13768>

INTRODUCCIÓN

Las biopelículas son comunidades de microorganismos adheridos a una superficie sólida y rodeada de una matriz polimérica extracelular⁽¹⁾, cuya formación por ciertas bacterias, es considerada una estrategia adaptativa, ya que les permite incrementar su capacidad de supervivencia, desarrollando gran resistencia hacia agentes antimicrobianos, desinfectantes y sanitizantes, a la desecación y a la luz ultravioleta, entre otros⁽²⁾. Su estudio tiene gran relevancia en diversos campos, como el médico, ambiental e industrial, principalmente en la alimentaria, debido a que son fuente importante y constante de contaminación de alimentos, materia prima y áreas de producción. Pueden formarse en cualquier tipo de superficie, como plásticos, metales e incluso sobre los alimentos, siendo la causa principal de contaminación del producto final, además de interferir en los procesos de producción y causar daño a los equipos⁽³⁾.

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) define listeriosis como una infección grave causada por consumir alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes*⁽⁴⁾. Esta bacteria, grampositiva, psicrófila y con una amplia distribución en la naturaleza³, ha sido reconocida como un serio problema de salud pública. Afecta principalmente a neonatos, embarazadas, ancianos y pacientes inmunosuprimidos⁽⁵⁾. La capacidad de proliferación en ambientes fríos y húmedos así como la facilidad de adherencia a superficies hace que *L. monocytogenes* tenga la habilidad de formar biopelículas⁽⁶⁾ sobre materiales de uso frecuente en la industria alimentaria. De esta manera, los contaminan y les permite sobrevivir por largos períodos en el medio ambiente, en los alimentos y en las fábricas de alimentos⁽⁷⁾. Actualmente se investiga la formación de biopelículas por *Listeria monocytogenes* a fin de proponer estrategias que contribuyan a minimizar el riesgo que estas representan en la industria alimentaria y por ende para la salud humana⁽⁸⁾.

La aparición de los primeros brotes de origen alimentario de listeriosis humana forzó a diferentes países a sentar las

bases para la vigilancia, control y seguimiento microbiológico de *L. monocytogenes*⁽⁹⁾. En 1988, se fundó en Suiza el Centro Nacional de Referencia de Listeriosis (CNRL), para la caracterización de los cultivos provenientes de muestras humanas y posteriormente de animales, alimentos y ambiente. Por el año 1993, la tasa anual de incidencia en Estados Unidos disminuyó a 4,4 casos por millón, debido a mayor regulación de la industria alimentaria. A partir de ese mismo año, en Francia, se implementó medidas de control en todos los alimentos potencialmente contaminados con *L. monocytogenes*, las mismas que consistían en el seguimiento microbiológico, investigación, saneamiento y limpieza de las industrias^(9,10). En China, los reportes de listeriosis eran esporádicos; a pesar de ello, se han venido implementado sistemas de vigilancia epidemiológica⁽¹¹⁾. Las infecciones por esta bacteria han aumentado en años recientes en algunos países industrializados tales como el Reino Unido, Alemania y España; pero, han disminuido o se han mantenido estables en otros gracias a la adopción de estrategias de control de la contaminación de productos alimentarios y a programas de difusión de medidas preventivas en la población^(12,13).

El queso es un alimento de amplio consumo a nivel mundial, por sus características nutritivas, funcionales, texturales y sensoriales⁽¹⁴⁾. En nuestro país, el más consumido es el queso fresco. El proceso de elaboración de este alimento es simple. No obstante, es frecuente la contaminación por microorganismos patógenos⁽¹⁵⁾, principalmente en la fabricación de queso artesanal, que es el que se comercializa en los mercados urbanos. Los casos de listeriosis humana en el Perú se les considera esporádicos, y las publicaciones realizadas se han circunscrito a documentar casos clínicos. Es por ello que, al ser los alimentos, como el queso, vehículo de transmisión de enfermedades, como la listeriosis, el presente estudio tuvo como objetivo analizar muestras de queso fresco provenientes de diferentes mercados del Cercado de Lima, con la finalidad de aislar e identificar *L. monocytogenes* y evaluar su capacidad de formación de biopelículas en dos medios de cultivo.

MÉTODOS

El presente estudio experimental, prospectivo, fue realizado en el Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se adquirió un total de 75 muestras de queso fresco (200 g) procedentes de mercados del Cercado de Lima. Se adquirió 8 muestras en cada uno de los siguientes mercados: San Idelfonso, Palomino, Central, La Merced, Santa Rosa, El Progreso, Primero de Mayo, La Aurora, Buenos Aires; en el Mercado Melchoritas solamente se adquirió 3 muestras. Las muestras fueron colectadas durante la mañana y transportadas en conservadores hasta al laboratorio, donde inmediatamente fueron procesadas. En los análisis microbiológicos, el procedimiento de aislamiento e identificación fue de acuerdo al Manual de Bacteriología Analítica (BAM) de la FDA⁽¹⁶⁾.

Para determinar la capacidad de formación de biopelículas se utilizó el método de microplaca de 96 pocillos descrito por Djordjevic⁽¹⁷⁾, con las modificaciones recomendadas de Borucki⁽¹⁸⁾. Para ello se sembró cada cepa de *Listeria monocytogenes* en 10 mL de caldo tripticasa de soya (TSB) y en 10 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI), los que fueron colocados en incubadora a 32 °C, de 18 a 24 horas. Al término de la incubación, se llevó cada cultivo hasta una turbidez semejante al tubo 0,5 de la Escala McFarland. Luego se transfirió 100 µL de cada muestra a un pocillo de la microplaca. Esto se realizó por triplicado. Se empleó la mezcla de caldos sin inocular como control. Se llevó a incubación a 32 °C por 20 horas. Después, se removió el medio de cultivo de los pocillos, los cuales fueron lavados con agua estéril cinco veces. Se dejaron secar las placas y se agregó a los pocillos solución cristal violeta 0,1%, dejándose por 45 minutos, al término de los cuales, fueron lavados nuevamente con agua estéril. El análisis cuantitativo se realizó añadiendo 200 µL de etanol 96% a cada pocillo. Se transfirieron las alícuotas y se las llevó a 2 mL de etanol 96% para leer la densidad óptica a 595 nm.

Luego, se empleó las recomendaciones de Stepanovic ⁽¹⁹⁾ para definir el punto de corte (DOC) y la clasificación de las cepas. El DOC se define como el promedio de las densidades ópticas obtenidas en los controles negativos más 3 desviaciones estándar. La clasificación de la capacidad de formación de biopelícula de las cepas se hizo en base a la densidad óptica (DO) y DOC: cepas no formadoras: $DO \leq DOC$; cepas formadoras débiles: $DOC < DO \leq 2 \times DOC$; cepas formadoras moderadas: $2 \times DOC < DO \leq 4 \times DOC$; cepas formadoras fuertes: $4 \times DOC < DO$.

Los resultados obtenidos fueron analizados empleando el programa Sigma Stat *Statistical Software* (IBM SPSS Statistics 22.0); se aplicó las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis para determinación de diferencias significativas, con un nivel de significación $p < 0,05$.

RESULTADOS

De las 75 muestras de queso fresco analizadas, se logró aislar *L. monocytogenes* en 14 (18,7%). Según los resultados, correspondieron a cada mercado los siguientes porcentajes de muestras positivas: Primero de Mayo y La Aurora 37,5% (3/8) cada uno, Santa Rosa y Buenos Aires 25% (2/8) cada uno; Palomino, Mercado Central y La Merced 12,5% (1/8) cada uno; y Melchoritas 33,3% (1/3). No se detectaron muestras positivas en los mercados Sn Idelfonso y El Progreso.

Se encontró que 64,3% (9/14) de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas tenían la capacidad de formar biopelículas. Cuando se utilizó como sustrato el TSB, se halló que 7,1% (1/14) de las cepas tuvieron capacidad moderada, 57,2% (8/14) tuvieron capacidad débil y 35,7% (5/14) no presentaron capacidad de formar biopelículas. Al emplear un medio enriquecido como el caldo BHI, 14,3% (2/14) de las cepas tuvieron capacidad moderada de formar biopelículas, 50% (7/14) capacidad débil y 35,7% (5/14) no tuvieron capacidad de formar biopelículas.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las absorbancias de los medios de enriquecimiento estudiados (TSB y BHI) ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis).

DISCUSIÓN

Los alimentos asociados frecuentemente a brotes de listeriosis son los productos lácteos, los que pueden promover el crecimiento bacteriano debido a sus factores intrínsecos como pH, actividad de agua, entre otros. En el presente estudio, la proporción de *L. monocytogenes* en quesos frescos fue de 18,7%, la que se considera elevada, coincidiendo con Davison ⁽²⁰⁾ que investigó en Chile la presencia de *L. monocytogenes* en 68 muestras de quesos frescos artesanales, obteniendo una incidencia de 15% (10/68). En México, Soto ⁽²¹⁾ investigó la incidencia de dicha bacteria en 75 quesos frescos, obteniendo un valor de 9,3%. En Brasil, Brito ⁽²²⁾ aisló *L. monocytogenes* en leche, queso fresco y ambientes industriales, obteniendo una incidencia de 11% (6/55) en quesos frescos. Por otro lado, la proporción de *L. monocytogenes* en nuestro estudio es mayor a lo hallado por investigadores peruanos en Trujillo, como Díaz ⁽²³⁾ quien detectó su presencia en 3,34% de muestras de quesos frescos.

La capacidad de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* depende de una serie de factores, ya sea relacionados a las propiedades fisicoquímicas de la superficie y a la hidrofobicidad, pH, temperatura y composición de nutrientes; o relacionados a las cepas, como el serotipo. La producción de biopelículas por *L. monocytogenes* en el presente estudio fue muy variable, ya que el rango de absorbancias osciló entre 0,2 y 1,3 a 595 nm. Dichos resultados coinciden con las investigaciones de Djordjevic y col¹⁷, quienes estudiaron la capacidad de formación de biopelículas de 31 cepas, encontrando absorbancias que oscilaron entre 0,3 y 1,4, medidas a la misma longitud de onda. Harvey ⁽²⁴⁾ en su investigación sobre producción de biopelículas por *L. monocytogenes* evaluó 138 cepas, empleando como medio de cultivo TSB y encontró que todas las cepas eran formadoras de biopelículas, clasificándolas como débiles (92%), moderadas (6,5%) y fuertes (1,5%). Esta clasificación se realizó arbitrariamente, ya que no menciona el uso de un algoritmo para ello, y hace que difiera de lo obtenido en este estudio, en el cual se siguieron las reco-

mendaciones sugeridas por Stepanovic ⁽¹⁹⁾. Los resultados obtenidos además ponen de manifiesto la influencia del nivel nutricional del medio de cultivo sobre la formación de biopelículas, ya que se observó diferencias estadísticamente significativas entre las absorbancias en los cultivos en TSB y BHI ($p < 0,05$). El medio BHI permitió la expresión de una mayor cantidad de formadores moderados de biopelículas que el medio TSB. Dichos resultados coinciden con las investigaciones de Stepanovic y Carrillo ⁽¹⁹⁻²⁵⁾. Sin embargo, difiere de lo reportado por Kadam ⁽²⁶⁾, ya que encontró una mayor producción de biopelículas en medios mínimamente enriquecidos, postulando que condiciones mínimas nutricionales pueden estimular la producción de biopelículas por esta bacteria. El hallazgo de esta bacteria nos proporciona información que sustenta la revisión de las medidas de higiene y sanidad para lograr condiciones de calidad aceptables. La capacidad bacteriana de formación de biopelículas es una característica que podría ser incorporada como parte del monitoreo de superficies en ambientes de preparación de alimentos, pues es el principal origen de contaminación de los productos.

El presente estudio tiene como limitaciones el control de algunos factores que podrían influenciar en la formación de las biopelículas bacterianas, como las características propias del alimento, pH y composición proximal, que no fueron determinadas. Así mismo, también podrían estar implicados factores genéticos del microorganismo, lo cual requiere posteriores investigaciones para su aclaración.

En conclusión, la proporción de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos adquiridos en 10 mercados del Cercado de Lima fue 18,7% (14/75). Las muestras positivas fueron de los mercados Primero de Mayo y La Aurora 37,5% cada uno, del mercado Melchoritas 33,3%, en los mercados Santa Rosa y Buenos Aires 25% cada uno, en los mercados Palomino, Central y La Merced 12,5% cada uno, y en los mercados San Idelfonso y El Progreso no se detectó *L. monocytogenes*.

Se halló que 64,3% (9/14) de las cepas aisladas de queso fresco tuvieron capacidad para formar biopelículas, 7,1% de

ellas capacidad moderada y 57,2% capacidad débil, cuando se empleó TSB como sustrato. Cuando se empleó BHI, 14,3% de las cepas tuvieron capacidad moderada y 50% capacidad débil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Young-Gyun J, Jungil C, Soo-Kyoung K, Joon-Hee L, Sunghoon K. Embedded biofilm, a new biofilm model based on the embedded growth of bacteria. *App Environ Microbiol.* 2015;81(1):211-9. Doi: 10.1128/AEM.02311-14.
- Donlan R. Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Healthcare Epidemiology.* 2011;52(8):1038-45. Doi: 10.1093/cid/cir077.
- Sang-Hyun P, Ho-Lyeong C, Ki-Hwan P, Myung-Sub C, Sang C, Sangryeol R, et al. Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. *Int J Food Microbiol.* 2012;154:130-4. Doi: 10.1016/j.jfoodmicro.2011.12.018.
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). *Listeria (Listeriosis)*, Definición y síntomas. [citado el 03/01/2015]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/spanish/listeria/definition.html>.
- Chavada R, Keighley C, Quadri S, Asghari R, Hofmeyr A, Foo H. Uncommon manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. *BMC Infect Dis.* 2014;14(641):1-6. Doi: 10.1186/s12879-014-0641-x.
- Téllez S. Los biofilm y su repercusión en la industria alimentaria. *VISAVET Outreach Journal.* 2010. [citado el 29/12/2014] Disponible en: <https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php>.
- Comisión del Codex Alimentarius. Proyecto de directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos. *Estados Unidos.* 2006:79-99.
- Navia DP, Villalda HS, Mosquera SA. Las biopelículas en la industria de alimentos. *Rev Bio Agro.* 2010;8(2):118-28.
- Parrilla F. Estudio de incidencia de listeriosis en España. (Tesis doctoral). Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Medicina, 2012;236 pp.
- Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis.* 2013;13(11):1-7. Doi: 10.1186/1471-2334-13-11.
- Feng Y, Wu S, Varma JK, Klena JD, Angulo FJ, Ran L. Systematic review of human listeriosis in China, 1964 – 2010. *Trop Med Int Health.* 2013;18(10):1248-56. Doi: 10.1111/tmi.12173.
- Dawson SJ, Evans MR, Willby D, Bardwell J, Chamberlain N, Lewis DA. *Listeria* outbreak associated with sandwich consumption from a hospital retail shop, United Kingdom. *Euro Surveill.* 2006;11(6):89-91.
- Sedano R, Fica A, Guíñez D, Braun S, Porte L, Dabanch J y col. Infecciones por *Listeria monocytogenes*, una experiencia de dos décadas. *Rev Chilena Infectol.* 2013;30(4):417-25.
- Ramírez-López C, Vélez-Ruiz JF. Queso fresco: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *TSIA.* 2012;6(2):131-48.
- Antezana C. Efecto de la hidrólisis enzimática de la lactosa en el perfil de textura de queso fresco normal y bajo en grasa. (Tesis para optar al Título Profesional). Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2015:115 pp.
- Hitchins A, Jinneman K. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. *US Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 9th Edition.* Maryland. 2011.
- Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(6):2950-8. Doi: 10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002.
- Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(12):7336-42. Doi: 10.1128/AEM.69.12.7336-7342.2003.
- Stepanović S, Čirković I, Ranin L, Švabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol.* 2004;38(5):428-32.
- Davison P. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales. (Tesis de Licenciatura), Talca, Chile: Universidad de Talca, 2009;49 pp.
- Soto M, Gerba CP, Porto Fett A, Luchansky JB, Chaidez C. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from small Mexican retail markets of queso fresco. *Int J Environ Health Res.* 2015;25(2):140-8. Doi: 10.1080/09603123.2014.915016.
- Brito JR, Santos EM, Arcuri EF, Lange CC, Brito MA, Souza GN, et al. Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(15):4954-61. Doi: 10.1128/AEM.01828-07.
- Díaz MA, Chávez M, Saucedo EA. *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la Provincia de Trujillo, Perú. *Revista Ciencia y Tecnología, Escuela de Postgrado - UNT.* 2013;9(2):23-38.
- Harvey J, Keenan KP, Gilmour A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol.* 2007;24(4):380-92. Doi: 10.1016/j.fm.2006.06.006.
- Carrillo G, Redondo M, Arias ML. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de queso tierno de origen costarricense. *Arch Latinoam Nutr.* 2010;60(2):175-8.
- Kadam SR, den Besten HM, van der Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int J Food Microbiol.* 2013;165(3):259-64. Doi: 10.1016/j.jfoodmicro.2013.05.025.