

UAB

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL Y DE LOS ALIMENTOS
ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**

*Estudio del Comportamiento Cinético de
Microorganismos de Interés en Seguridad
Alimentaria con Modelos Matemáticos*

*Memoria presentada para optar al Título de Doctor en Veterinaria, correspondiente al programa de
Doctorado en Ciencia de los Alimentos de la UAB*

Agatângelo Joaquim dos Santos Eduardo

*Directores: Dra Maria Teresa Mora Ventura
Dr. Emiliano José Quinto Fernández*



Barcelona, España 2007

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todo este tiempo hay muchas personas que me han ayudado a realizar este trabajo, a llevar mejor el estar fuera de casa y también a mejorar como persona. Por eso, muy sinceramente agradezco:

A la Profesora Doctora María Teresa Mora Ventura, por todo su cariño, apoyo incondicional, docta dirección científica, paciencia y atención personal fruto de sus incomparables cualidades como maestra y excelente persona, sin las cuales probablemente este trabajo y mucho de lo que hemos absorbido serían imposibles.

Al Profesor Doctor Emiliano José Quinto Fernández, por su especial tutoría y dirección, su comprensión y permanente disponibilidad, por todas sus cualidades personales y científicas, y por el trato siempre afectuoso y accesible, sin las cuales muy difícilmente habríamos realizado el presente trabajo.

A los Señores Artur Eduardo y Dorga Joaquim Engrácia, mis queridos padres, por todos los esfuerzos consentidos para mi existencia y como mis primeros y eternos profesores por la paciencia que han tenido al inculcarme el interés por la búsqueda del conocimiento.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional por la beca concedida, lo cual ha permitido mi estancia y estudios en España en los primeros años de este trabajo.

A la Universidade Agostinho Neto por me haber autorizado desplazarme a España para realizar esta formación, y a la Faculdade de Ciências Agrárias por todo el apoyo y comprensión recibidos.

A todos los que representando la Universidad Autónoma de Barcelona como institución científica de reconocido prestigio académico y científico hicieron posible mi aceptación como estudiante del programa de doctorado de Ciencia de los Alimentos.

A todos los profesores, funcionarios y compañeros del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria que de una manera directa o

indirecta me han ayudado a tener años de aprendizaje agradables en la UAB a través de su compañerismo, amistad y ayuda ofrecida.

A Joaquim y Anita Morais por nuestras convivencias y por la hermandad forjada en todos los días de la primera etapa de realización de este trabajo.

Al Mohammed Bachrouri de quien guardo buenos recuerdos de las primeras experiencias compartidas en equipo de trabajo y por el agradable compañerismo durante la primera etapa del trabajo.

Al INABE por el complemento de beca concedido, lo cual ha permitido soportar mi estancia hasta el penúltimo año de la realización de los estudios que integran el presente trabajo.

Al General Armando da Cruz Neto, en la cualidad de Embajador de la República de Angola, por su interés y apoyo en uno de los momentos de los muchos en los cuales mi salud estuvo al punto de comprometer el desarrollo de la tesis.

Y a todos mis amigos y familiares que directa o indirectamente han contribuido con su encomio para que en las “páginas de mi vida” hubiese una consagrada a este trabajo.

Dedicatoria

A mis queridos padres, muchas gracias por todo lo que han hecho y siguen haciendo por mi; sacrificios continuos imposibles de retribuir mientras sigo en esta aventura por el saber.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ACRÓNIMOS.....	viii
I – INTRODUCCIÓN	1
II – REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1 – Concepto e historia de la microbiología predictiva.....	4
2 – Relación de la microbiología predictiva con el HACCP y la evaluación de riesgos.....	7
3 – Clasificación de los modelos predictivos.....	9
3.1 – Modelos primarios.....	10
3.2 – Modelos secundarios.....	12
3.3 – Modelos terciarios.....	12
4 – Construcción de modelos predictivos.....	13
4.1 – Selección de cepas de microorganismos.....	13
4.2 – Generación de datos.....	14
4.3 – Método de recuentos de células viables.....	15
4.4 – Método de impedanciometría.....	16
4.5 – Método de citometría de flujo.....	17
4.6 – Método de turbidimetría.....	18
4.7 – Método de microscopía y tamaño de colonias.....	24
5 – Validación de modelos.....	25
6 – Crecimiento bacteriano.....	26
6.1 – Adaptabilidad y variabilidad de respuestas microbianas. Implicaciones sobre la microbiología predictiva.....	28
6.1.1 – Tiempo de latencia.....	28
6.1.2 – Tiempo de generación.....	32
6.1.3 – Velocidad de crecimiento.....	34
6.2 – Influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento bacteriano...34	
6.2.1 – Temperatura.....	36
6.2.2 – Actividad del agua.....	38
6.2.3 – pH.....	40
6.2.4 – Otros factores ambientales.....	42
7. – Microorganismos de interés en seguridad alimentaria.....	44
7.1 – <i>Escherichia coli</i>	45
7.1.1 – Historia.....	45
7.1.2 – Taxonomía	45
7.1.3 – Hábitat.....	46
7.1.4 – <i>Escherichia coli</i> no patógeno.....	47
7.1.5 – Patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	49

7.1.5.1 – Población susceptible.....	50
7.1.5.2 – Dosis infectante.....	50
7.1.5.3 – Período de incubación.....	51
7.1.5.4 – Síntomas.....	51
7.1.6 – Características de crecimiento y supervivencia de <i>E. coli</i> O157:H7.....	54
7.1.6.1 – Temperatura	54
7.1.6.2 – pH.....	55
7.1.6.3 – Actividad de agua.....	56
7.1.6.4 – Refrigeración.....	56
7.1.6.5 – Irradiación.....	56
7.1.6.6 – Desinfectantes.....	56
7.1.6.7 – Atmósfera.....	57
7.1.7 – Prevalencia de <i>Escherichia coli</i> en algunos alimentos.....	57
7.1.8 – Incidencia de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en España	59
7.1.9 – Prevención y control	60
7.2 – <i>Salmonella</i>	61
7.2.1 – Historia.....	61
7.2.2 – Taxonomía.....	62
7.2.3 – Hábitat.....	63
7.2.4 – Patogenicidad de <i>Salmonella</i>	64
7.2.4.1 – Población susceptible	64
7.2.4.2 – Dosis infectante	66
7.2.4.3 – Período de incubación	66
7.2.4.4 – Síntomas	66
7.2.5 – Características de crecimiento y de supervivencia de <i>Salmonella</i> ...68	
7.2.5.1 – Temperatura	68
7.2.5.2 – pH	69
7.2.5.3 – Actividad de agua	70
7.2.5.4 – Refrigeración	71
7.2.5.5 – Irradiación	72
7.2.5.6 – Desinfectantes	72
7.2.5.7 – Atmósfera.....	72
7.2.6 – Prevalencia de <i>Salmonella</i> en algunos alimentos.....	73
7.2.7 – Incidencia de <i>Salmonella</i> en España.....	74
7.2.8 – Prevención y control.....	75
7.3 – <i>Listeria monocytogenes</i>	76
7.3.1 – Historia.....	76
7.3.2 – Taxonomía.....	77
7.3.3 – Hábitat.....	78
7.3.4 – Patogenicidad de <i>Listeria monocytogenes</i>	79
7.3.4.1 – Población susceptible	79
7.3.4.2 – Dosis infectante.....	80
7.3.4.3 – Período de incubación.....	80
7.3.4.4 – Síntomas.....	81
7.3.5 – Características de crecimiento y de supervivencia de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	82

7.3.5.1 – Temperatura.....	82
7.3.5.2 – pH.....	83
7.3.5.3 – Actividad de agua.....	84
7.3.4.4 – Refrigeración.....	85
7.3.5.5 – Irradiación.....	86
7.3.5.6 – Desinfectantes	86
7.3.5.7 – Atmósfera.....	87
7.3.6 – Prevalencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en algunos alimentos.....	87
7.3.7 – Incidencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en España.....	91
7.3.8 – Prevención y control.....	91
7.4 – <i>Staphylococcus aureus</i>	95
7.4.1 – Historia.....	95
7.4.2 – Taxonomía.....	96
7.4.3 – Hábitat.....	97
7.4.4 – Patogenicidad de <i>Staphylococcus aureus</i>	98
7.4.4.1 – Población susceptible	99
7.4.4.2 – Dosis infectante.....	99
7.4.4.3 – Período de incubación.....	100
7.4.4.4 – Síntomas.....	100
7.4.5 – Características de crecimiento y de supervivencia de <i>S. aureus</i>	101
7.4.5.1 – Temperatura.....	101
7.4.5.2 – pH.....	102
7.4.5.3 – Actividad de agua.....	102
7.4.5.4 – Refrigeración.....	102
7.4.5.5 – Irradiación	102
7.4.5.6 – Desinfectantes.....	103
7.4.5.7 – Atmósfera.....	103
7.4.6 – Prevalencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en algunos alimentos.....	103
7.4.7 – Incidencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en España.....	104
7.4.8 – Prevención y control.....	105
III – OBJETIVOS.....	106
1 – Objetivo general.....	106
2 – Objetivos específicos.....	106
IV – MATERIAL Y MÉTODOS.....	107
1 – Cepas utilizadas.....	107
2 – Medio de cultivo.....	107
3 – Otros materiales.....	108
4 – Diseño experimental.....	108
4.1 – Procedimientos.....	109
4.1.1 – Preparación del inóculo e incubación.....	109
4.1.2 – Test de la microplaca.....	110
4.1.3 – Rectas de calibración y determinación del intervalo lineal.....	111
4.2 – Procesamiento de datos.....	111
4.2.1 – Cálculos cinéticos.....	111

4.2.2 – Elaboración de modelos matemáticos.....	113
4.3 – Análisis estadístico de resultados.....	113
V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	115
1 – <i>Escherichia coli</i> CECT-516	115
1.1 – Modelado de la velocidad de crecimiento de <i>E. coli</i> CECT- 516.....	122
1.2 – Modelado del tiempo de generación de <i>E. coli</i> CECT-516.....	127
1.3 – Modelado del tiempo de latencia de <i>E. coli</i> CECT-516.....	131
2 – <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	135
2.1 – Modelado de la velocidad de crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7.....	143
2.2 – Modelado del tiempo de generación de <i>E. coli</i> O157:H7.....	147
2.3 – Modelado del tiempo de latencia de <i>E. coli</i> O157:H7	151
3 – <i>Salmonella typhimurium</i>	155
3.1 – Modelado de la velocidad de crecimiento de <i>S. typhimurium</i>	162
3.2 – Modelado del tiempo de generación de <i>S. typhimurium</i>	166
3.3 – Modelado del tiempo de latencia de <i>S. typhimurium</i>	170
4 – <i>Listeria monocytogenes</i>	174
4.1 – Modelado de la velocidad de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	181
4.2 – Modelado del tiempo de generación de <i>L. monocytogenes</i>	186
4.3 – Modelado del tiempo de latencia de <i>L. monocytogenes</i>	190
5 – <i>Staphylococcus aureus</i>	193
5.1 – Modelado de la velocidad de crecimiento de <i>S. aureus</i>	200
5.2 – Modelado del tiempo de generación de <i>S. aureus</i>	203
5.3 – Modelado del tiempo de latencia de <i>S. aureus</i>	207
6 – Análisis estadístico.....	209
6.1 – Análisis del comportamiento cinético de <i>E. coli</i> no patógeno respecto al <i>E. coli</i> patógeno	209
6.2 – Análisis del comportamiento cinético de las cepas patógenas respecto a la coloración Gram	211
6.2.1 – Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas patógenas Gram negativas.....	211
6.2.2 – Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas patógenas Gram positivas.....	212
6.3– Análisis de los parámetros cinéticos de cada cepa entre las diferentes condiciones de temperatura, pH y cloruro sódico.....	214
VI – CONCLUSIONES.....	215
VII – BIBLIOGRAFIA	217
VIII – ACRÓNIMOS.....	244
IX – ANEXOS.....	247
Anexo I. – Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas de <i>Escherichia coli</i> patógena y no patógena.....	247
Anexo II. – Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas patógenas Gram negativas.....	248

Anexo III. – Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas patógenas Gram positivas.....	249
Anexo IV. – Análisis de los parámetros cinéticos de cada cepa estudiada entre las diferentes condiciones de temperatura, pH y cloruro sódico.....	250
X – ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	251

RESUMEN

RESUMEN

La microbiología predictiva combina el conocimiento del crecimiento microbiano sobre una serie de condiciones, con la aplicación de la modulación matemática, para permitir predicciones del crecimiento. El análisis microbiológico convencional de los alimentos presenta varias limitaciones, como son el tiempo requerido para la revitalización, el enriquecimiento y para la incubación de las muestras. Tomando en consideración la necesidad de estudiar metodologías rápidas para monitorizar el crecimiento bacteriano, y la necesidad de aplicar medidas para prevenir toxiinfecciones alimentarias, el presente trabajo ha sido realizado con el objetivo general de aplicar el uso de la turbidimetría como técnica para la monitorización del crecimiento de microorganismos de interés para la seguridad alimentaria.

Con los datos turbidimétricos, se calcularon los parámetros cinéticos y se compararon las curvas de la densidad óptica durante 24 horas en caldo infusión de cerebro y corazón de cinco microorganismos de las especies *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*. Los tiempos de latencia y de generación y la velocidad de crecimiento fueron calculados en el intervalo lineal de las curvas de la densidad óptica. Se elaboraron y compararon tres modelos matemáticos para el cálculo de cada uno de los tres parámetros cinéticos de las especies estudiadas. El comportamiento cinético fue analizado según la patogenicidad y no patogenicidad de *Escherichia coli*. Se compararon estadísticamente los resultados obtenidos para el comportamiento cinético de los microorganismos Gram positivos respecto a los Gram negativos estudiados.

Los microorganismos individualmente han tenido comportamientos diferentes en las 96 combinaciones de temperatura, pH y cloruro sódico. Pero, todos ellos presentaron reducción de la velocidad de crecimiento, y un aumento de los tiempos de latencia y de generación cuando se incrementaron la concentración de sal y la acidez del medio. La temperatura, el pH y el cloruro sódico pueden afectar de manera distinta a las respuestas de superficie de los modelos para predecir los parámetros cinéticos. Pero el pH fue el que más condicionó la cinética de los microorganismos estudiados.

ABSTRACT

ABSTRACT

Predictive microbiology combines both the knowledge about the response of microorganisms to several environmental conditions and the mathematical modelling to make growth predictions.

The conventional food microbiological tests have several limitations, such as the time needed for the enrichment and the culture of samples. Taking into account the need of (i) studying faster methods to monitor the bacterial growth and (ii) applying measures to prevent outbreaks of foodborne diseases, the aim of this study is to apply the turbidimetric technique to monitor the growth of microorganisms with interest in food safety.

With the obtained turbidimetric data, kinetic parameters were calculated and compared with the optical density curves for 24 h in BHI broth of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. Lag times, generation times, and growth rates were calculated within the lineal section of the optical density curves. Three mathematical models were obtained and compared for calculating the kinetic parameters of each microorganism.

The kinetic behaviour of these microorganisms was analyzed taking into account the pathogenicity and no pathogenicity of *Escherichia coli*. Moreover, kinetic results of 'Gram-positive microorganisms and Gram-negative microorganisms' were compared.

The individual behavior of each microorganism has been different in the 96 combinations of temperature, pH and NaCl. However, all of them reduced their growth rate, and increased their lag and generation times when the percentage of NaCl and the pH values were also increased. Temperature, pH and NaCl can affect in different ways the response surface models to predict the kinetic parameters. The pH was the parameter with more influence on the kinetic behaviour of all microorganisms studied.

ACRÓNIMOS

ACRÓNIMOS

APPCC	Análisis de peligros y Puntos de Control Crítico
Atm	atmósfera
ATP	Adenosina trifosfato
a_w	Actividad del agua
BES	Boletín Epidemiológico Semanal
BHI	Brain Heart Infusion (Caldo infusión de cerebro corazón)
C	Capacitancia
CDCP	Centers for disease control and prevention
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CO ₂	Dióxido de carbono
Csps	Cold shock proteins
Da	Dalton
DNA	ADN (ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidad óptica o absorbancia
ECVT	<i>Escherichia coli</i> verotoxigénico
f	Frecuencia
G	Conductividad
GAD	Glutamato descarboxilasa
GT	Tiempo de generación (Generation time)
GTSqR	Raíz cuadrada del tiempo de generación
HACCP	Hazard analysis critical control points
HC	Colitis hemorrágica (Hemorrhagic colitis)
HCl	Ácido clorhídrico
HTST	High temperature short time
HUS	Síndrome urémico hemolítico (Hemolytic Uremic Syndrome)
I	Intensidad de la luz transmitida por la suspensión
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos).
I_0	Intensidad de la luz sobre la suspensión
KCl	Cloruro de potasio
kDa	KiloDalton

kGy	kiloGray (1 Gy = 100 Rad)
lb	Libra
LnGT	Logarítmo neperiano del tiempo de generación
LnLT	Logarítmo neperiano del tiempo de latencia
Ln μ	Logarítmo neperiano de la μ
LT	Tiempo de latencia (lag time)
LTSqR	Raíz cuadrada del tiempo de latencia
MSE	Mean Square Error
μ	μ (velocidad de crecimiento)
MUG	4-metilumbeliferil- β -D-glucorónico
μ SqR	Raíz cuadrada de la μ
NaCl	Cloruro sódico
NaNO ₂	Nitrito de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NC	No calculado
NCTC	National Collection of Type Cultures
ng	Nanograma
nm	Nanómetros
P _{agua}	Presión del agua pura
PCA	Plate Count Agar
PCC's	Puntos de control críticos
pH	Logarítmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno (expresada en moles)
P _{sol}	Presión de vapor de la solución
pulg	pulgada
R	Resistencia
R ²	Coefficiente de determinación
RMSE	Root Mean Squared Error (raíz cuadrada del error cuadrático medio)
SERA	<i>Salmonella enteritidis</i> Risk Assessment
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
ST	Toxina termoestable
Stx	Toxina Shiga
TSA	Agar tripticasa-soja

TTD	Tiempo de detección (Time to detection)
TTP	Púrpura trombótica trombocitopénica (Thrombocytopenic thrombotic purpura)
ufc	Unidades formadoras de colonias
USDA	United States Department of Agriculture
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
Z	Impedancia
λ	Fase de latencia
μ	Velocidad de crecimiento
μl	microlitros
μm	micrometros
μmax	Velocidad de crecimiento máxima

I – INTRODUCCIÓN

I – INTRODUCCIÓN

El aumento del número y de la gravedad de los brotes de toxiinfecciones alimentarias en los países desarrollados ha provocado el aumento del control de los microorganismos como los de los géneros *Escherichia*, *Listeria*, *Salmonella*, y *Staphylococcus* en los alimentos, principalmente en lo que se refiere a sus cepas patógenas.

Para el estudio del problema se usan varios enfoques, como la mejora de las técnicas para la detección de microorganismos, la vigilancia de enfermedades, y las investigaciones sobre los factores de virulencia de los microorganismos. El crecimiento, la supervivencia y la muerte de estos microorganismos en los alimentos han sido y están siendo examinados con particular referencia a los ácidos orgánicos y a los valores ácidos del pH. También se han realizado estudios sobre la inoculación de microorganismos en los alimentos en los cuales se monitoriza su crecimiento y supervivencia. Pero la información resultante de estos trabajos puede ser limitada debido a las condiciones específicas de formulación y del uso del alimento (Presser y col., 1998).

Los métodos de preservación de los alimentos tales como la salazón, deshidratación y fermentación han sido llevados a cabo durante miles de años, representando una actitud empírica de control de poblaciones microbianas en los alimentos. Este proceso continúa en nuestros días entre las poblaciones indígenas, y, se cree, que con productos tradicionales en las sociedades más desarrolladas (McMeekin y col., 2002).

Los primeros ejemplos de aplicación de principios científicos en la preservación de los alimentos incluyen los trabajos de Pasteur en las fermentaciones específicas e indeseables en el vino, y el suministro de cultivos iniciadores lácteos por Hansens en Dinamarca a finales del siglo XIX. Mientras muchas fermentaciones industriales (probablemente debido a su producción a gran escala y a la influencia de los ingenieros químicos) han adoptado enfoques cuantitativos, gran parte de los microbiólogos de alimentos se han mantenido esencialmente cualitativos y, en el

mejor de los casos, semi-cuantitativos. Por ello, las técnicas de “agitación y placa” permiten la enumeración de hasta $0,5 \log$, con niveles mínimos de detección superiores a 100 ufc/g. Además, las técnicas del número más probable a menudo tienen un límite de confianza muy amplio, y los procedimientos de enriquecimiento permiten que la presencia (no necesariamente la ausencia) sea registrada en una muestra. La muestra, obviamente, puede ser totalmente inadecuada para proporcionar una verdadera representación de la prevalencia (probabilidad de ocurrencia o presencia) del organismo en el lote del producto, permitiendo solo una indicación numérica de su densidad (McMeekin y col., 2002).

Estos episodios de estado cualitativo/semi-cuantitativo continuarán impidiendo el progreso de la microbiología alimentaria como una disciplina que pretende comprender el comportamiento microbiano en los alimentos y, por tanto, proporcionar las bases científicas con las cuales la industria alimentaria puede suministrar alimentos seguros y saludables. La situación está resumida en la cita del renombrado físico Lord Kelvin: *“cuando lo que estás diciendo lo puedes medir y expresar con números, sabes algo sobre ello; pero si no lo puedes expresar con números, tu conocimiento es escaso e insatisfactorio”* (McMeekin y col., 2002).

En defensa de los microbiólogos (y probablemente de otros profesionales) de los alimentos, la derivación de las leyes físicas que gobiernan la naturaleza fue un ejercicio complicado debido a la variabilidad e incertidumbre inherente a los sistemas biológicos con respecto a la presencia y el potencial de determinados microorganismos (McMeekin y col., 2002).

En muchos sentidos, el factor incertidumbre está aumentando en un mundo caracterizado por la condensación, estratificación y movilidad de la población humana. Estamos experimentando un grado de cambios sin precedentes como resultado de los adelantos tecnológicos y científicos. La adaptación y explotación de los cambios es la característica primaria de los microorganismos que, debido a su pequeño tamaño, velocidad de reproducción, plasticidad fenotípica y promiscuidad genética, colonizan casi todos los hábitats de la tierra (McMeekin y col., 2002).

Por ello, no constituye una sorpresa el que nos enfrentemos a microorganismos patógenos emergentes y reemergentes en los alimentos (Lederberg, 1997).

El análisis microbiológico convencional de los alimentos presenta varias limitaciones, como son el tiempo requerido para la revitalización, para el enriquecimiento y para la incubación de las muestras. Además, para identificar un determinado microorganismo, con frecuencia se necesita utilizar medios selectivos y pruebas bioquímicas complementarias, lo que puede llevar días e incluso semanas. Tales limitaciones han impulsado el desarrollo de métodos rápidos que permitan disponer de los resultados en horas (Potter y Hotchkiss, 1999).

Cada uno de los factores intrínsecos de un alimento influye sobre el crecimiento microbiano y hace que favorezca el desarrollo de unos microorganismos en detrimento de otros. Teóricamente, el gran número de factores que intervienen podría ser cuantificado, por lo que podría establecerse si ese alimento en cuestión es o no medio adecuado para que se desarrollen gérmenes patógenos. Pero, debido a la gran diversidad de alimentos existentes, sería prácticamente imposible recoger todos los datos sobre la relación de cada factor con cada microorganismo (Buchanan, 1991). Por suerte, partiendo del principio de que en los alimentos están disponibles suficientes nutrientes, el crecimiento microbiano en los alimentos es controlado fundamentalmente por el pH, la actividad del agua (a_w) y la temperatura del almacenamiento, en combinación con otros factores como son los aditivos, conservantes, envasado en atmósferas modificadas, etc. En la práctica muchos de estos factores actúan en combinación unos con los otros. Si se pudiera estimar la respuesta de los microorganismos a estas variables, entonces sería posible estimar su posible desarrollo en los alimentos. Esta es la base de la microbiología predictiva, la cual se ocupa de relacionar cada factor determinante con el crecimiento o con la supervivencia de los microorganismos (García-Gimeno y Cosano, 1994).

II – REVISION BIBLIOGRÁFICA

1 – CONCEPTO E HISTORIA DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

El concepto de microbiología predictiva es que un detallado conocimiento de las respuestas microbianas a las condiciones ambientales permite una evaluación objetiva del efecto de las operaciones de procesado y almacenamiento en la seguridad alimentaria y en la calidad de los alimentos. Esto incluye la acumulación de conocimientos sobre el comportamiento microbiano en los alimentos y su derivación en modelos matemáticos (McMeekin y col., 2002).

La microbiología predictiva combina el conocimiento de las respuestas del crecimiento microbiano sobre un rango de condiciones, con el poder de la modulación matemática, para permitir predicciones del crecimiento. Con el uso de esta técnica, cuestiones sobre el deterioro microbiano de los alimentos y sobre la seguridad alimentaria pueden responderse mediante análisis objetivos basados en conocimientos científicos (Presser y col., 1997). Esto es especialmente relevante en vista del aumento de la incidencia de toxi-infecciones alimentarias en muchos países.

Muchos autores han sugerido que el origen de los modelos predictivos para los alimentos fue el modelo desarrollado por Esty y Meyer (1922) para describir el proceso térmico necesario para destruir 10^{12} esporas de *Clostridium botulinum* tipo A (Whiting y Buchanan, 2001; McMeekin y col., 2002). Este modelo describió un proceso con un largo margen de seguridad y, probablemente, su uso continuado impidió su reconocimiento como modelo predictivo.

También se ha determinado el tratamiento térmico necesario para asegurar la destrucción de microorganismos no formadores de esporas, tales como los protocolos de pasteurización de la leche para *Mycobacterium tuberculosis* y, más recientemente, para *Salmonella* en carne de vacuno asada y patógenos psicrotrofos en productos al vacío. En los casos en los que los protocolos se seleccionan para minimizar el procesamiento y para reducir el factor de seguridad, se necesita una selección y una validación más rigurosa de los modelos.

Mientras la “cocción botulínica” puede haber sido el primer modelo predictivo (aunque sólo recientemente haya sido reconocido como tal) con amplia utilidad en la industria alimentaria, la referencia sobre el uso potencial de la microbiología predictiva para describir el crecimiento microbiano puede situarse en la década de 1930 cuando Scott escribió: *“El conocimiento de la velocidad de crecimiento de ciertos microorganismos a diferentes temperaturas es esencial para los estudios sobre el deterioro de la carne fresca. Teniendo estos datos, podría ser posible predecir la influencia relativa ejercida por varios organismos en el deterioro a cada temperatura de almacenamiento. Posteriormente, eso posibilitaría predecir el posible alcance de los cambios que varios organismos pueden sufrir durante el enfriamiento de la superficie muscular a lo largo de los trabajos de carnicería cuando la superficie de la carne está, frecuentemente, a temperaturas que resultan muy favorables para la proliferación microbiana”*. Scott entendió claramente el uso potencial de la acumulación de datos cinéticos sobre las respuestas del crecimiento microbiano a la hora de predecir la vida útil y la seguridad de los alimentos (McMeekin y col., 2002).

Después de haber permanecido en silencio en la literatura científica, se podría situar el origen de la microbiología predictiva moderna entre la década de 1960 y 1970, cuando los modelos eran usados para tratar problemas sobre el deterioro de los alimentos (Spencer y Baines, 1964; Nixon, 1971; Olley y Ratkowsky, 1973a,b), seguido del uso de modelos de probabilidad para tratar problemas de intoxicación alimentaria, particularmente botulismo y otras intoxicaciones (Genigeorgis, 1981; Roberts y col., 1981). Desde la publicación de aquellos artículos sus autores dieron cuenta de su extensa utilidad (McMeekin y Ross, 2002). A pesar de eso, el tiempo medio para la aceptación de los modelos predictivos fue similar al del HACCP, y entre se mantuvo ampliamente como una actividad de orientación investigadora durante 30-40 años.

Investigando el deterioro microbiano en el pescado, Olley y Ratkowsky (1973a, b) reconocieron la similitud de muchos procesos de deterioro en cuanto a su respuesta a la temperatura, por lo que propusieron una curva “universal” de deterioro. A partir de

esta curva, estos autores concibieron el concepto de velocidad relativa, que se convirtió en la piedra clave en la aplicación de los modelos (Zwietering y col., 1996).

La década de 1980 mostró un marcado incremento del interés en la microbiología predictiva como resultado del mayor número de brotes de toxiinfecciones alimentarias y la consecuente conciencia pública (y política) de la necesidad del suministro de alimentos seguros y saludables. Dos patógenos vehiculados por los alimentos, uno de tipo tradicional (*Salmonella* en los huevos) y otro emergente (*Listeria monocytogenes*) con característica inusual (psicrotrofo), contribuyeron a situar las investigaciones en seguridad alimentaria como prioritarias de los gobiernos de los EE.UU., Reino Unido, otros países de la Unión Europea, Australia y Nueva Zelanda (McMeekin y col., 2002).

Durante los años de 1980 y una gran parte de los 1990, dominaron la escena de la microbiología predictiva diversos enfoques de modelos cinéticos, pero, muy recientemente, es evidente el retorno de los modelos de probabilidad. Esta tendencia puede ser atribuida a lo siguiente:

- Reconocimiento de que la variabilidad de las respuestas al tiempo estimadas (tiempo de generación y duración de la fase de latencia) no tienen una distribución normal, pero están usualmente descritas por una distribución gamma o incluso una distribución inversa de Gaussian donde la variancia del tiempo de respuesta es proporcional al cuadrado o al cubo del promedio de respuesta al tiempo (Ratkowsky y col., 1996).
- Emergencia de patógenos peligrosos (particularmente *Escherichia coli* O157:H7) con muy baja dosis infectante, y en los que el conocimiento es necesario para describir las condiciones para prevenir su proliferación, lo cuál conduce a su inactivación.
- Aumento del uso de estudios de evaluación cuantitativa de riesgos microbianos.

Durante el “boom” de modelos cinéticos de los años 80, fueron mayoritariamente utilizados dos enfoques de modelado:

- (i) Modelos basados en la determinación secuencial del efecto de factores individuales o velocidades de crecimiento, por ejemplo, raíz cuadrada o modelo de Arrhenius en función de la temperatura, para los cuales se añadieron otras condiciones como actividad de agua, pH, etc.
- (ii) Modelos polinomiales basados en la metodología de respuesta de superficie en los cuales los experimentos usualmente envuelven determinaciones simultaneas del efecto de varios factores en el comportamiento microbiano.

Una etapa importante en la cuantificación de los efectos de los factores ambientales es el desarrollo de modelos matemáticos para predecir el efecto de la combinación de dichos factores de crecimiento en los alimentos. Los modelos predictivos permiten la interpolación entre puntos de datos, y con esto es posible predecir respuestas para condiciones no estudiadas (Fernández y col. 1997).

Los modelos predictivos permiten la estimación de la vida útil de los alimentos, valorar la eficacia de la higiene, identificar los puntos críticos en el proceso de producción y distribución, y pueden guiar acerca de cómo las variables del medio afectan al comportamiento del microorganismo patógeno o alterante, y determinar la seguridad microbiológica del producto (McMeekin y col., 1993, Neumeyer y col., 1997, Grijspeerdt y Vanrolleghem, 1999).

2 – RELACIÓN DE LA MICROBIOLOGIA PREDICTIVA CON EL HACCP Y LA EVALUACIÓN DE RIESGOS

La microbiología predictiva ayuda en la formulación de planes HACCP a través de la identificación de peligros (hazards) y puntos de control crítico, y especificando los límites y las acciones correctoras (Ross y McMeekin, 1997; Miles y Ross, 1999; McMeekin y Ross, 2002). Con la valoración cuantitativa del riesgo microbiano, los modelos predictivos tienen un papel particular, proporcionando la información de valoración de exposición. De esta manera, los tres aspectos forman un triángulo de seguridad alimentaria.

El centro de ambos, el HACCP y la evaluación de riesgos, es el deseo de producir alimentos seguros utilizando estrategias basadas en la comprensión de la magnitud de los peligros. La evaluación de riesgos es parte del proceso para decidir lo que para nosotros es “seguro”, pero, para evaluar el riesgo, nosotros debemos evaluar la exposición de los humanos a los patógenos vehiculados por los alimentos. Los modelos predictivos están siendo utilizados en la evaluación de la exposición humana a los patógenos como sustitutos para los recuentos de bacterias en los alimentos (McMeekin y Ross, 2002).

Para trasladar el convenido nivel de seguridad (expresado como objetivos de seguridad alimentaria) en acciones prácticas, se utiliza el HACCP. Aunque los conceptos del HACCP implican un enfoque para la seguridad alimentaria basada en la identificación y control de peligros, y basada en la identificación y evaluación de las etapas claves de la cadena de producción alimentaria, lo cual tiene un elevado efecto en los riesgos asociados con los peligros, a menudo se aplica subjetivamente. Es decir, el HACCP se basa cuantitativamente en un sistema de riesgos que descansa sobre una evaluación cualitativa del riesgo (McMeekin y Ross, 2002).

Para establecer los límites y respuestas del HACCP, se requieren datos científicos. En el contexto de los peligros microbiológicos, esta información es cada vez más accesible a través de los modelos predictivos. En el caso de los peligros microbiológicos, la microbiología predictiva ayuda al HACCP, porque le proporciona un ligazón cuantitativa entre las mediciones en “tiempo real” utilizadas para monitorizar procesos, tales como temperatura, pH, concentración de sal, humedad relativa, y el potencial para el crecimiento o muerte específica de los respectivos microorganismos (McMeekin y Ross, 2002).

Los modelos pueden ser utilizados en varias etapas del HACCP, tales como:

Análisis de peligros: pueden utilizarse modelos (particularmente del tipo “crecimiento/no crecimiento”) para mostrar qué microorganismos crecerán en el producto y, en su caso, con qué rapidez crecerán. Por consiguiente, identificándolos como potenciales peligros.

Identificación de los PCCs: definiendo el proceso en términos de parámetros como la temperatura, actividad de agua, pH, etc., es posible identificar etapas en las cuales el crecimiento o muerte es posible, y si un control crítico puede ser logrado o perdido.

Especificación de límites: qué escenarios se pueden interpretar para diferentes formulaciones de productos, para verificar si las alteraciones van a permitir que surjan nuevos peligros o se incrementa el riesgo de peligros ya existentes.

Especificación de acciones correctoras: si se produce un control deficiente de un PCC, el cambio del número microbiano asociado con la desviación del proceso puede cuantificarse, y especificarse la medida correctora apropiada.

La relación de la respuesta a un peligro con la dosis del mismo en el proceso de infección indica que el riesgo está relacionado con esta última. Por ello, para evaluar el riesgo en la seguridad alimentaria se necesita conocer el número de microorganismos en los alimentos en el momento del consumo. Esa información raramente está disponible, pero los modelos predictivos pueden atender esta demanda.

Para estimar el número de microorganismos presentes en el momento del consumo a partir de niveles conocidos en un momento previo de la historia del producto, es necesario un conocimiento sólido de las respuestas de los microorganismos a las condiciones del medio (temperatura, nutrientes, agentes químicos, conservantes, otros microorganismos), su presencia en los alimentos y durante cuánto tiempo. Sin los modelos predictivos eso no sería posible. Varios autores (Buchanan, 1997; Walls y Scott, 1997, Van Gerwen y Zwietering, 1998; Coleman y Marks, 1999; Lammerding y Fazil, 2000; Whiting y Buchanan, 2001; Nauta, 2002) han discutido el nexo entre la microbiología predictiva y la evaluación del riesgo cuantitativo en la seguridad alimentaria microbiana (McMeekin y Ross, 2002).

3 – CLASIFICACIÓN DE LOS MODELOS PREDICTIVOS

Los modelos predictivos microbiológicos pueden dividirse en modelos cinéticos y modelos de probabilidad. Los primeros calculan la vida microbiológica de los

productos alimentarios, es decir, el período de tiempo durante el cual el número de microorganismos en el alimento es menor que un determinado valor. Los últimos determinan si el microorganismo puede crecer, e identifica las condiciones de almacenamiento con baja o nula probabilidad de crecimiento (Tienungoon y col., 2000). Ambos modelos suelen estar estrechamente relacionados, porque la probabilidad de detección de crecimiento durante un período de tiempo específico depende de la multiplicación del microorganismo, así como de la fase de latencia y del tiempo de generación, es decir, depende de los parámetros cinéticos. Tienungoon y col. (2000) hacen referencia a algunos ejemplos en los que, por una simple transformación matemática, de un modelo de probabilidad se ha derivado a un modelo cinético.

Whiting y Buchanan (1993) propusieron un esquema de clasificación de microbiología predictiva que está siendo muy utilizada actualmente (Geeraerd y col., 2004). En ella se distinguen tres niveles entre modelos predictivos microbiológicos: modelos primarios, modelos secundarios y modelos terciarios (Whiting, 1995; Geeraerd y col., 2004).

3.1 – Modelos primarios

Los modelos primarios se ocupan de la descripción de los cambios del número microbiano en función del tiempo (crecimiento, supervivencia, inactivación). Cuantitativamente pueden incluir unidades formadoras de colonias (ufc), biomasa, medidas de absorbancia, además de niveles de substratos o de productos metabólicos producidos (Geeraerd y col., 2004).

Muchos de los modelos primarios desarrollados hasta ahora son modelos deterministas de población. En estos modelos, la evolución del número total de células de una población es descrita a través de un sencillo conjunto de parámetros (máxima densidad poblacional, velocidad de crecimiento específica, fase de latencia) (Swinnen y col., 2004).

En la literatura se está sugiriendo que la conexión del comportamiento de células individuales al de la población entera es la siguiente etapa en el desarrollo de

enfoques más mecanísticos para la microbiología predictiva (Baranyi, 1997). Esto conduce a las técnicas de modelación estocástica o de probabilidad, en las que los parámetros del modelo están casualmente distribuidos dentro de la población total. Esto significa que los parámetros del modelo son parte de una determinada distribución casual, lo cual puede representar la variabilidad biológica entre las células individuales. A través de modelos matemáticos de probabilidad apropiados, la información obtenida sobre la fase de latencia celular (por ejemplo a través de mediciones con Bioscreen) puede ser utilizada para mejorar las predicciones sobre la supervivencia y tiempo de latencia de una población. Tales modelos de probabilidad se tornan más útiles cuando el tamaño del inóculo es pequeño y la latencia individual celular es altamente variable dentro de esta pequeña población (Swinnen y col., 2004).

Entre los modelos deterministas tenemos el modelo de crecimiento de población publicado por Baranyi y Roberts (1994); el modelo de número de masa (“mass-number”) de Hills y Wright (1994), en el cual se relaciona el crecimiento de la biomasa con el aumento del número de células viables; y el modelo de poblaciones heterogéneas de McKellar (1997), en el cual se asume que el inóculo está distribuido en dos compartimentos, es decir, células en crecimiento y células que no están en crecimiento.

Entre los modelos de existencia de poblaciones se pueden citar el modelo de Buchanan y col., (1997), un modelo lineal trifásico que describe la curva clásica de crecimiento en tres partes (fase de latencia, fase exponencial y fase estacionaria); el modelo de Baranyi (1998) que estudia la relación entre el tiempo de latencia individual y el tiempo de latencia de la población; el modelo discreto-continuo de McKellar y Knight (2000) que es una expansión del modelo de McKellar (1997), en el cual permiten la transición del compartimento en el que no hay crecimiento hacia el de células en crecimiento; y el modelo continuo-discreto-continuo de McKellar (2001) que es una ampliación del anterior al añadirle una etapa previa de adaptación continua (Swinnen y col., 2004).

3.2 – Modelos secundarios

Los *modelos secundarios* caracterizan los parámetros que pueden aparecer en los modelos primarios en función de las condiciones del medio (temperatura, pH, actividad de agua, etc.). Permiten considerar cómo dos o más factores interactúan sobre el crecimiento microbiano.

En el pasado los modelos secundarios para el tiempo de latencia solamente incorporaban el efecto del ambiente de incubación. Hoy en día han surgido muchos más modelos que incluyen otros factores relevantes como las condiciones de pre-incubación. Estos modelos podríamos agruparlos en dos secciones:

- (i) modelos que calculan la duración de la fase de latencia en función de las condiciones de incubación;
- (ii) modelos que calculan la duración de la fase de latencia en función de las condiciones de pre-incubación y de incubación.

En el caso de los primeros, se han publicado algunas revisiones y discusiones (Adair y col., 1989; Ratkowsky y col., 1991; Ross y McMeekin, 1994; Skinner y col., 1994; Whiting, 1995). Otros autores han desarrollado modelos secundarios independientemente del tiempo de generación y del tiempo de latencia, como, por ejemplo, enfoques polinomiales (Gibson y col., 1988; Buchanan y Phillips, 1990; Zaika y col., 1998) y enfoques de redes neurales artificiales de baja complejidad (Geeraerd y col., 1998; García-Gimeno y col., 2002). En el segundo caso, se han publicado diversos estudios, como los de Zwietering y col. (1994), Augustin y col. (2000b), y Whiting y Bagi (2002).

3.3 – Modelos terciarios

Los *modelos terciarios* pueden tener varias formas, comenzando por combinar los dos primeros niveles de modelos basados en experimentos laboratoriales (por ejemplo, el “Pathogen Modeling Program”, creado y puesto a disposición de la comunidad científica gratuitamente por la USDA); versiones más extendidas que incluyen la posibilidad de importar una historia de temperatura para predecir la vida

útil restante con respecto a un organismo deteriorador específico, como es el caso del “Seafood Spoilage Predictor” (Dalgaard y col., 2002); o llegando hasta la incorporación de modelos predictivos en una red de evaluación de riesgos microbiológicos, como, por ejemplo, el SERA (“*Salmonella enteritidis* Risk Assessment”) del USDA (Geeraerd y col., 2004).

4 – CONSTRUCCIÓN DE MODELOS

Para la elaboración de un modelo existen algunos procedimientos básicos que han de ser tenidos en cuenta para la generación de datos. Para ello, es necesario hacer la elección de la cepa microbiana a estudiar, y, a continuación, decidir el método para la generación de datos.

4.1 – Selección de cepas de microorganismos

Existen varios enfoques que pueden utilizarse para elegir que cepa debe ser utilizada con el propósito de la construcción del modelo. Se puede elegir entre una cepa sola o una mezcla de diferentes cepas. Antes de elegir cuál de las cepas va a estudiarse, es importante clarificar la intención a la que va dirigido el modelo: ¿el modelo va a ser usado para predecir un posible crecimiento de una especie de patógeno en particular, o es un modelo de una flora alterante de un producto alimentario específico?

Utilizar una cepa que haya sido previamente utilizada en varios estudios, o incluso con el propósito de crear modelos, proporciona el beneficio de los conocimientos previamente acumulados sobre la cepa en particular. Por otro lado, una cepa aislada a partir de un producto alimentario concreto, el cual es el objeto de la aplicación del modelo, proporciona la ventaja al producto (Rasch, 2004).

La importancia del uso de más de una cepa radica en la evaluación de la variación entre las cepas. De acuerdo con Whiting y Golden (2002), la variación entre cepas podría ser igual o inferior que la variación estadística experimental. Sin embargo, cuando estos autores investigaron el crecimiento, la supervivencia, la inactivación térmica y la producción de toxinas por parte de 17 cepas diferentes de *E. coli*,

verificaron que las variaciones entre cepas fueron mayores que las incertidumbres relacionadas con el error experimental. Begot y col. (1997) estudiaron la variación entre 58 cepas de *L. monocytogenes* y 8 cepas de *L. innocua*; muchas de las cepas fueron aisladas a partir de carne, productos cárnicos, y puntos industriales relacionados, e incluso cuatro cepas adicionales que fueron involucradas en brotes.

Salter y col. (1998) compararon el crecimiento de la cepa *E. coli* M23 no patógena con el crecimiento de diferentes cepas de *E. coli* patógena, y solamente encontraron pequeñas diferencias en las respuestas de crecimiento entre las diferentes cepas. También concluyeron que el modelo basado para describir *E. coli* M23 era capaz de describir el crecimiento de cepas patógenas de *E. coli* incluyendo *E. coli* O157:H7. Este resultado tiene utilidad práctica, ya que muchos grupos de investigación no tienen acceso a instalaciones laborales apropiadas para trabajar con *E. coli* O157:H7.

Las mezclas de cepas, también llamadas “cocktails”, están siendo utilizadas muy ampliamente. Los principales argumentos para su utilización son los siguientes: (i) la mezcla de varias cepas diferentes es más representativa de la situación real en los alimentos; (ii) no necesariamente la misma cepa muestra un crecimiento rápido bajo todas las condiciones estudiadas (por ejemplo, una cepa con una elevada tolerancia a la sal podría ser la que crezca más deprisa a altas concentraciones de sal y pH elevado, pero no necesariamente en condiciones de pH y concentraciones de sal bajos).

En determinados tipos de modelos, como es el caso de la cinética de inactivación, el uso de cepas individuales es más apropiado, con el fin de evitar dificultades en la interpretación de los resultados (Rasch, 2004).

4.2 – Generación de datos

Para seguir el curso del crecimiento es necesario efectuar mediciones cuantitativas. El crecimiento exponencial es, por lo general, equilibrado, de modo que para poder determinar la velocidad de crecimiento puede utilizarse la medición de cualquier

propiedad de la biomasa. Por comodidad, las propiedades habitualmente medidas son la masa celular o el número de células (Stanier y col., 1989).

4.3 – Método de recuento de células viables

El método estándar utilizado para monitorizar el crecimiento de una población bacteriana es el recuento total de células viables. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, el análisis microbiológico convencional de los alimentos presenta varias limitaciones, como son el tiempo requerido para la revitalización, para el enriquecimiento y para la incubación de las muestras. Además, para identificar un determinado microorganismo, con frecuencia se necesita utilizar medios selectivos y pruebas bioquímicas complementarias, lo que puede demorar el resultado días e incluso semanas. Tales limitaciones han impulsado el desarrollo de métodos rápidos que permitan disponer de los resultados en horas (Potter y Hotchkiss, 1999).

Y para la estimación exacta de los parámetros de una curva de crecimiento, son importantes el número y la calidad de las observaciones (recuentos) hechas (Bratchell y col., 1989; Poschet y col., 2004).

Walker y Jones (1993) recomendaron que, como mínimo, deberían recogerse 10 datos por punto. Baty y Delignette-Muller (2004) compararon el ajuste de tres modelos con conjuntos de datos con solamente pocos datos por punto y modelos con muchos datos por punto, indicando que la imprecisión en los parámetros estimados está claramente relacionada con la cantidad de datos.

Para simplificar la detección del crecimiento bacteriano se están desarrollando y están siendo estandarizados métodos alternativos como la impedanciometría, citometría de flujo, la turbidimetría, la microscopia del tamaño de la colonia, etc. (Begot y col., 1996).

Comparados con los recuentos viables, la impedanciometría y la turbidimetría son considerados métodos automáticos, los cuales permiten realizar un elevado número de experimentos, mientras que la citometría de flujo y la microscopia permiten

obtener información adicional, como puede ser el caso del estado fisiológico del cultivo (Rasch, 2004).

4.4 – Método de impedanciometría

Los aparatos de impedancia microbiológica miden el metabolismo microbiológico en el medio a través del movimiento de iones entre dos electrodos (conductancia), o el almacenamiento de carga en el electrodo del interfaz del medio (capacitancia). Para el crecimiento bacteriano, la conductividad del medio de crecimiento aumenta con el número de bacterias debido a la producción de moléculas orgánicas cargadas débilmente (McMeekin y col., 1993). Esta producción de moléculas cargadas se debe a, por ejemplo, la conversión de proteínas en aminoácidos, de carbohidratos en lactato, y de lípidos en acetato, todos los cuales incrementarán la conductividad (G) del medio de crecimiento (Firstenberg-Eden y Eden, 1984). Cuando los electrodos están inmersos en un medio conductivo, se generará un campo dieléctrico en el interfaz del electrodo-solución. El medio mostrará una capacitancia debido a la polarización del interfaz del electrodo-solución. Un potencial alternativo sinusoidal aplicado al sistema causará por tanto una corriente dependiente de la impedancia (Z) del sistema, lo cual es función de su resistencia (R, $G = 1/R$), su capacitancia (C), y la frecuencia aplicada (f) (Firstenberg-Eden y Eden, 1984).

$$Z = \sqrt{\left(\frac{1}{G}\right)^2 + \left(\frac{1}{2\pi fC}\right)^2}$$

La señal que debe medirse (impedancia, conductividad o capacitancia) depende del instrumento y del microorganismo y su metabolismo. Los tiempos de generación pueden calcularse basándose en los tiempos de detección o a partir del tiempo requerido para duplicar la conductancia (McMeekin y col., 1993). La conductancia ha sido utilizada para el modelado del crecimiento de *Yersinia enterocolitica* (Lindberg y Borch, 1994), y la impedancia y la conductancia fueron utilizadas para el modelado de *Salmonella enteritidis* (Fehlhaber y Kruger, 1998; Koutsoumanis y col., 1998; Rasch, 2004).

4.5 – Método de citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica rápida para mediciones de células individuales en suspensión. Las células individuales confinadas dentro de un chorro de agua, pasan rápidamente por una ventana de medición en la cual varios parámetros de varios millares de células por segundo pueden ser medidos simultáneamente con precisión alta (Vives-Rego y col., 2000).

La dispersión de la luz refleja el tamaño y la estructura celular, mientras que las mediciones de fluorescencia pueden determinar el contenido celular de cualquier constituyente que puede ser marcado con un tinte fluorescente (Walberg y col., 1997). De esta manera, la citometría de flujo combina la ventaja de ser una técnica de células individuales con el poder de ser capaz de medir un número de células muy amplio en corto tiempo. Los datos resultantes no son un mero promedio de mediciones de células más una distribución de los parámetros medidos de las células. La posibilidad de medición de la distribución da una estimación de la heterogeneidad de la población microbiana y, de ese modo, también la posibilidad de detectar subpoblaciones que, por ejemplo, son resistentes a un tratamiento bajo condiciones de investigación.

El uso de la citometría de flujo en microbiología predictiva es aún muy limitado. Sørensen y Jakobsen (1997) utilizaron la citometría de flujo para enumerar las células viables de *Debaryomyces hansenii* (levadura presente en quesos con actividad proteolítica y lipolítica) en diferentes condiciones ambientales. Los datos de crecimiento fueron utilizados para modelar la fase de latencia (λ) y la velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) en función de la temperatura, el pH y el NaCl. Rattanasomboon y col. (1999) compararon datos obtenidos a partir de citometría de flujo, turbidimetría, recuentos en placa y recuentos manuales por microscopía de enumeración de *Brocothrix thermosphacta*. Estos autores concluyeron que la turbidimetría sobreestimó el número celular cuando las células de *B. thermosphacta* cambiaron morfológicamente durante el crecimiento, mientras que la citometría de flujo proporcionó recuentos celulares más exactos que los recuentos en placa (Rattanasomboon y col., 1999). Esta sobreestimación de células no pudo ser

confirmada por Dalgaard y Koutsoumanis (2001), quienes verificaron que las mediciones turbidimétricas estimaban correctamente la μ_{\max} y la λ (Rasch, 2004).

4.6 – Método de turbidimetría

La turbidimetría es un método establecido para estudiar el crecimiento bacteriano a través de mediciones de densidad óptica, lo cual hace posible el seguimiento del crecimiento de la población bacteriana en tiempo real (Dalgaard y col., 1994; Begot y col., 1996; Presser y col., 1998).

La densidad óptica (DO) o absorbancia está siendo utilizada desde hace muchos años para medir la concentración, expresada en masa, número o longitud media celular, de suspensiones bacterianas (Meynell y Meynell, 1970; McClure y col., 1993). Y la llegada de los instrumentos turbidimétricos automatizados ha permitido a los microbiólogos conseguir mediciones de DO más eficazmente (McClure y col., 1993).

La absorbancia se define como el logaritmo decimal del cociente entre la intensidad de la luz incidente sobre la suspensión (I_o) y la luz transmitida por la suspensión (I) (Stanier y col., 1989):

$$A = \frac{\log(I_o)}{(I)}$$

Esta técnica se basa en el hecho de que las partículas pequeñas difractan la luz, dentro de ciertos límites, de manera proporcional a su concentración. Cuando un haz luminoso pasa a través de una suspensión bacteriana, la reducción en cantidad de luz transmitida a consecuencia de la difracción es pues una medida de masa bacteriana presente. Tales mediciones se hacen normalmente con un fotómetro o espectrofotómetro. Un espectrofotómetro está equipado con un prisma o una red de difracción que permite la iluminación de la muestra con luz de un margen estrecho y ajustable de longitudes de onda; un fotómetro tiene filtros intercambiables que

permiten pasar un margen relativamente amplio de longitudes de onda (Stanier y col., 1989).

En la turbidimetría el crecimiento microbiano está relacionado con el aumento de la turbidez del medio. Algunos fundamentos de este método fueron descritos por McMeekin y col. (1993). Estos autores enfatizaron las limitaciones de este método, siendo la más importante su utilidad solamente como método comparativo, no pudiendo ser utilizado para predecir recuentos viables al menos que sea hecha una calibración (McMeekin y col., 1993; Baranyi y Roberts, 1995).

Esta limitación tiene que ver con el hecho de que el típico umbral de detección corresponde a una concentración en un rango de $10^6 - 10^7$ bacterias/ml (Begot y col., 1996). Posicionando esta concentración en una curva se puede deducir que se alcanza el último crecimiento exponencial y, consecuentemente, se podrían obtener estimaciones erróneas de la fase de latencia debido a otros factores afines que influyen el crecimiento (Swinnen y col., 2004).

No obstante, también es posible cuantificar los parámetros de crecimiento cuando el tamaño del inóculo está por debajo del umbral de detección. En este caso, deben conocerse los recuentos celulares iniciales y la ecuación de calibración. Por ejemplo, Bréand y col. (1997) estimaron tiempos de latencia desde el punto de intersección entre la línea recta extrapolada con la pendiente igual a la velocidad de crecimiento (basada en las mediciones de DO detectables) en un punto del crecimiento visible y la línea horizontal en el logaritmo del recuento celular inicial.

Varios autores han descrito métodos de calibración (Dalgaard y col., 1994; Chorin y col., 1997). McClure y col. (1993) utilizaron una sencilla ecuación cuadrática para relacionar la densidad óptica con recuentos viables. Dalgaard y col. (1994) utilizaron dos métodos equivalentes de calibración: uno en el cual las células de la fase estacionaria fueron diluidas a la DO apropiada, y el otro en la cual se tomaron medidas de DO y de recuentos viables durante el crecimiento.

La calibración realizada por Hudson y Mott (1994) relacionó el tiempo de latencia obtenido a partir de las mediciones de densidad óptica con los recuentos de células

viabiles mediante una ecuación de regresión (McKellar y Knight, 2000; Ölmez y Aran, 2005).

En algunos trabajos, la ecuación de Gompertz fue ajustada directamente a los datos de densidad óptica, aunque no estén disponibles datos por debajo del mínimo de DO detectable (aprox. 10^7 UFC/ml), por lo cual, podrían cuestionarse las estimaciones del tiempo de latencia y de la velocidad de crecimiento (Hudson, 1993; Hudson y Mott, 1994). McMeekin y col. (1993) estudiaron el mejor modo de ajuste de la función Gompertz a la transmitancia, y este método está siendo utilizado para calcular los tiempos de generación (Neumeyer y col., 1997).

François y col. (2005 y 2007) transformaron en UFC/ml las curvas de crecimiento obtenidas a través de mediciones de DO.

Begot y col. (1996) describieron diversas recomendaciones para calcular los parámetros de crecimiento a partir de mediciones de densidad óptica, y se han publicado varios trabajos con datos de mediciones de DO sin ninguna calibración previa aparente (Huchet y col., 1995; Begot y col., 1996, 1997; Cheroutre-Vialette y col., 1998; Cheroutre-Vialette y Lebert, 2000; Vialette y col., 2003). En estos trabajos se han calculado los parámetros cinéticos tiempo de latencia y velocidad de crecimiento.

Hudson y Mott (1994) ajustaron la ecuación modificada de Gompertz (Zwietering y col., 1990) a los datos de crecimiento de *Pseudomonas fragi* (recuentos viabiles y mediciones de DO, ambos con un tamaño de inóculo por debajo del límite de detección) y obtuvieron tiempos de latencia (a partir de los datos de recuentos viabiles) menores que con las mediciones con DO. Esta discrepancia entre DO y recuentos viabiles es justificada por el incremento de la longitud celular durante la fase de latencia.

Cuppers y Smelt (1993) consideraron la medición del tiempo necesario para que el aparato detectara turbidez como un método alternativo para la obtención de información sobre el tiempo de latencia y la velocidad de crecimiento.

Otros autores han propuesto el uso del tiempo de detección observado, es decir, el tiempo necesario para que una población celular alcance un nivel de turbidez detectable, como alternativa a todas las curvas turbidimétricas de crecimiento. Para un instrumento turbidimétrico, el tiempo de detección se define como el período necesario para llegar a un incremento medible de la densidad óptica inicial, es decir, para que el crecimiento se torne visible de acuerdo con el tamaño de inóculo. Puede ser medido con el Bioscreen, con un lector de placas microtiter, o con tubos en un espectrofotómetro (Swinnen y col., 2004).

Baranyi y Pin (1999) propusieron un método numérico, es decir, un protocolo de análisis de variancia, para estimar la fase de latencia mediante medidas de tiempos de detección de diluciones seriadas de cultivos. Sin embargo, no presentaron datos para comparar los valores de los parámetros obtenidos con los recuentos de células viables.

No obstante, la variabilidad de los parámetros de crecimiento estimados (especialmente estimaciones de tiempo de latencia) no sólo se debe a la técnica utilizada para monitorizar el crecimiento bacteriano, sino también al modelo utilizado para ajustar los datos de crecimiento (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Baty y col., 2002).

Se han realizado comparaciones entre los tiempos de latencia estimados mediante densidad óptica y los recuentos de células viables. Augustin y col., (1999) compararon varios métodos y concluyeron que, para el modelo logístico, una combinación de algunos recuentos y de datos de absorbancia dieron como resultado estimaciones del tiempo de latencia más exactas. En contraste, Dalgaard y Koutsoumanis (2001) mostraron que la máxima velocidad de crecimiento y, por consiguiente, el tiempo de latencia, podrían ser estimadas exactamente con una razonable precisión a partir de curvas de absorbancia de crecimiento utilizando el modelo de Richards (Zwietering y col., 1990). Por otra parte, la exactitud y la precisión de estos valores corresponden a los valores estimados a partir de los tiempos de detección de la absorbancia de diluciones seriadas de cultivos, probando el método propuesto por Baranyi y Pin (1999). En cualquier caso, la desventaja es

que para determinar el tiempo de latencia a partir de los datos de absorbancia se necesitan recuentos adicionales de células viables.

Baty y col. (2002) también compararon los tiempos de latencia estimados a través del ajuste de diferentes modelos (Baranyi y Roberts, 1994; Hills y Wright, 1994) y un modelo exponencial con retraso, para diferentes tipos de datos (DO y recuentos). Concluyeron que, en general, la elección del modelo para estimar el tiempo de latencia parece ser crucial, mientras que la técnica utilizada para monitorizar el crecimiento bacteriano parece tener menos influencia (Swinnen y col., 2004).

En general, se puede concluir que la determinación del tiempo de latencia a partir de mediciones de densidad óptica está influenciada por la técnica de mediciones de la DO, el modelo utilizado para ajustar los datos, el microorganismo, el medio de incubación, las condiciones ambientales, etc. Por tanto, para cada método, una calibración y validación debería ser realizada entre recuentos viables y mediciones de DO (Swinnen y col., 2004).

Debido a la intensa laboriosidad que implican los métodos tradicionales consistentes en el recuento de células viables, no pueden ser utilizados para medir el tiempo de latencia de células individuales, ya que para ello serían necesarias técnicas de aislamiento de células individuales y una gran cantidad de repeticiones de mediciones. McKellar y Knight (2000) utilizaron diluciones binarias seriadas del inóculo para obtener células individuales y, posteriormente, calcularon el promedio del tiempo de latencia de células individuales de *Listeria monocytogenes* a través del tiempo de detección utilizando mediciones del Bioscreen (Swinnen y col., 2004).

Wu y col. (2000) compararon el método Bioscreen de McKellar y Knight (2000) con la microscopia a la hora de determinar los tiempos de latencia de células individuales. La diferencia entre el tiempo de latencia obtenido a partir de datos microscópicos o a partir de los tiempos de detección es que los primeros se observan cuando las células se dividen por primera vez, y los últimos se observan cuando la biomasa celular empieza a crecer, es decir, cuando la célula aumenta su volumen (Swinnen y col., 2004).

François y col. (2003b) también mostraron la posibilidad de calcular el tiempo de latencia de células individuales utilizando un lector de placas microtiter. Un protocolo para aislamiento de células individuales con un alto rendimiento (80 %) había sido previamente desarrollado por François y col. (2003a). Mediante la DO midieron el crecimiento y elaboraron una curva de calibración en la parte superior de la curva de crecimiento clásica. La técnica de extrapolación empleada fue idéntica al método de Bréand y col. (1997) para calcular el tiempo de latencia de una población (Swinnen y col., 2004).

Métris y col. (2003) realizaron las mediciones de la distribución individual de los tiempos de latencia a través del Bioscreen y observaron que el origen de la variabilidad de los tiempos de detección es cercano a la variabilidad de los tiempos de latencia individuales, si el número de células iniciales es bajo.

Krist y col. (1998) estudiaron los efectos del cloruro sódico, de la temperatura y de la acidez sobre *Escherichia coli* a través de mediciones turbidimétricas a 540 nm. González y Russel (1999) utilizaron una longitud de onda de 600 nm para estudiar los factores que afectan la extrema resistencia al ácido de *Escherichia coli* O157:H7. Así mismo, Guraya y col. (1998), con el mismo microorganismo e igual longitud de onda, efectuaron mediciones de densidad óptica para estudiar la efectividad de la sal, del pH y del diacetilo como inhibidores en productos lácteos conservados a temperaturas de refrigeración. Rattanasomboon y col. (1999), al observar que los valores obtenidos de los pesos de las células se comparaban bien con las mediciones turbidimétricas, sugirieron que la turbidimetría sería un buen indicador de las fluctuaciones en la masa de células durante el crecimiento. Becker y col. (1998), también con turbidimetría, hicieron estudios comparativos de *Escherichia coli* y otros microorganismos patógenos asociados a los alimentos.

Jakob y col. (1989) verificaron que los resultados obtenidos por la metodología turbidimétrica automática, además de presentar una buena correlación con los resultados obtenidos por la metodología convencional, proporcionan resultados en menos de 16 horas frente a las 48 horas de los métodos convencionales de recuento de células. Esto supondría una buena opción para el control de la calidad de los

alimentos con el objetivo de que los resultados estén disponibles antes de que aquellos salgan de la fábrica (Bajaj y col., 1991; Baumgart, 1992).

Según Koch (1981), la ley de Beer considera que la absorbancia es proporcional a la concentración y, en suspensiones diluidas, muchas bacterias tienen la misma absorbancia por unidad de peso de la concentración, independientemente del tamaño de la célula. Esta relación es la base del uso de la turbidimetría como un método rápido, no destructivo y económico para monitorizar el crecimiento de cultivos microbianos (Bajaj y col., 1991; Baumgart, 1992; Presser y col., 1998; Rosa y col., 1998).

La determinación de la velocidad de crecimiento bacteriano en caldos de cultivo utilizando métodos turbidimétricos proporciona un medio de modelación barato y rápido. Neumeyer y col., (1997) demostraron la reproducibilidad de ese método.

En el caso de *Listeria monocytogenes*, se han publicado diversos trabajos sobre modelos específicos para describir el efecto combinado de la temperatura, pH, a_w , ácidos orgánicos, NaNO_2 , CO_2 e irradiación sobre su crecimiento (Buchanan y Phillips, 1990; Duh y Schaffner, 1993; Grau y Vanderlinde, 1993; Patterson y col., 1993; Duffy y col., 1994; Farber y col., 1996; George y col., 1996; Murphy y col., 1996; Fernández y col., 1997; McClure y col., 1997; Giffel y Zwietering, 1999; Powell y col., 2006; Carrasco y col., 2007; François y col., 2007; Valero y col., 2007).

4.7 – Método de microscopía y tamaño de colonias

La microscopía es otro método que está ganando interés con el desarrollo de software y programas de análisis de imagen, herramientas para automatización que tornan el método más accesible. La microscopía permite estudios directos de células individuales, lo cual da nuevas oportunidades para el seguimiento de la misma célula durante largos períodos de tiempo. Una de las principales ventajas de la microscopía y de las mediciones del tamaño de la colonia es la posibilidad de estudiar sistemas sólidos, los cuales se parecen más de cerca a la situación de muchos sistemas

alimentarios. No obstante, también es posible investigar el crecimiento en sistemas líquidos (Rasch, 2004).

La literatura científica sobre el uso de la microscopía en el modelado predictivo es aún escasa. Wu y col. (2000) compararon el uso de la microscopía para la determinación de la duración de la fase de lactancia en células individuales de *L. monocytogenes* con el método de TTD (tiempos de detección). La microscopía es un método directo que permite una observación visual de la primera división celular, mientras que el método TTD depende del tiempo para la detección, la tasa de crecimiento, y la extrapolación regresiva a la célula individual. Además, cualquier tratamiento que resulte en ausencia de división celular no será detectable a través del método TTD (Wu y col., 2000; Rasch, 2004).

5 – VALIDACIÓN DE MODELOS

La microbiología predictiva está basada en la premisa de que las respuestas de las poblaciones de microorganismos a los factores ambientales son reproducibles, y que por caracterización de los factores dominantes de las respuestas de crecimiento, es posible, desde observaciones anteriores, predecir las respuestas de dichos microorganismos en otras condiciones ambientales similares (Ross y McMeekin, 1994).

Los modelos predictivos son típicamente generados en medios de cultivo líquidos en el laboratorio (Baranyi y col., 1999). Ross (1996) propuso los factores de sesgo (“bias”) y de exactitud (“accuracy”) como medidas de mejora de los modelos matemáticos usados en la microbiología predictiva, con el objetivo de facilitar la evaluación de la fiabilidad de tales modelos cuando son comparados con observaciones no utilizadas para generar los modelos, particularmente en alimentos, y, por lo tanto, para evaluar su utilidad en la toma de decisiones sobre la calidad y la seguridad alimentarias. Otro objetivo fue proveer una medida sencilla y cuantitativa de fiabilidad del modelo.

Se cuestionan frecuentemente la validez y la aplicabilidad de los modelos desarrollados en el laboratorio a la hora de aplicarlos a los alimentos reales. Por un

lado, ha sido demostrado que los alimentos reales soportan mejor el crecimiento de los microorganismos que los medios laboratoriales (Genigeorgis y col., 1971; Raevuori y Genigeorgis, 1975; Zhao y col., 2002). Por otro lado, el nivel de contaminación en los alimentos es generalmente muy bajo, mientras que el tamaño del inóculo utilizado en el laboratorio es, comparativamente, mucho más elevado (Zhao y col., 2002).

Para determinar qué predicciones proporcionan una buena descripción del crecimiento en los alimentos, los modelos deben validarse y evaluarse en su habilidad predictiva. Cuando un modelo matemático se construye y valida adecuadamente, permite, por ejemplo, la predicción del efecto del cambio de las condiciones de tratamiento sobre la evolución microbiana (Geeraerd y col., 2004). La precisión de los modelos puede ser valorada gráficamente enfrentando los valores observados contra las correspondientes predicciones del modelo. Además, el error cuadrado medio (“Mean squared error”, MSE), los valores de R^2 y los factores de sesgo y de exactitud pueden utilizarse como indicación de la confianza de los modelos cuando son aplicados a los alimentos (Giffel y Zwietering, 1999).

El objetivo del enfoque de todos los modelos es obtener buena generalización de propiedades. Esto significa que un modelo debería funcionar bien cuando se confronte con nuevos datos, incluso en la región de interpolación del diseño experimental original. Esto está relacionado con la sobreestimación o subestimación: un modelo muy rígido tendrá un bajo R^2 ajustado, no obstante, quizás expone un comportamiento lógico, mientras que un modelo flexible (como el tipo de modelos polinomiales o redes artificiales neurales) tendrá un alto R^2 ajustado, pero puede fallar cuando es usado con datos recientes o incluso con los datos usado para desarrollar el modelo (Geeraerd y col., 2004).

6 – CRECIMIENTO BACTERIANO

En microbiología, la palabra “crecimiento” se define como un incremento en el número de células o de masa celular por unidad de tiempo de una población microbiana (Madigan y col., 1997). Si un microorganismo es cenocítico, es decir,

multinucleado, en el que las divisiones nucleares no se acompañan de divisiones celulares, el crecimiento produce un incremento de tamaño pero no del número de células. El crecimiento ocasiona un aumento del número de células cuando los microorganismos se multiplican por procesos como gemación o fisión binaria. En este caso las células individuales se agrandan y dividen para originar dos células hijas de un tamaño aproximadamente igual (Prescott y col., 1999).

La microbiología predictiva está relacionada con la compleja dinámica del comportamiento de la población microbiana, tal como fue observado por Monod (1949), “El crecimiento de los cultivos bacterianos, a pesar de la inmensa complejidad del fenómeno, generalmente obedece a leyes relativamente sencillas, las cuales hacen posible definir ciertas características cuantitativas del ciclo del crecimiento, esencialmente las tres constantes del crecimiento: crecimiento total, tasa del crecimiento exponencial y crecimiento latente. Estas definiciones no son puramente arbitrarias y corresponden a elementos fisiológicamente distintos del ciclo de crecimiento” (McMeekin y Ross, 2002).

La curva de crecimiento de un cultivo microbiano puede ser subdividida en cuatro partes distintas denominadas *fase de latencia*, *fase exponencial*, *fase estacionaria* y *fase de muerte*.

La *fase de latencia*, es el período de ajuste que las células experimentan al ser transferidas de un medio al otro antes de iniciar su crecimiento. La *fase exponencial* o *logarítmica* es aquella durante la cual los microorganismos crecen y se dividen hasta el nivel máximo posible, en función de su potencial genético, tipo de medio y las condiciones en que crece. En este período hay una relación lineal entre el logaritmo del número de células (o cualquier otra propiedad medible de la población) y el tiempo. Los microorganismos se dividen y duplican en número en intervalos regulares. Como cada célula se divide en un momento ligeramente diferente del resto, la curva de crecimiento aumenta suavemente, en lugar de realizar discretos saltos. La *fase estacionaria* es resultado del agotamiento de los nutrientes disponibles o del efecto de acumulación de productos tóxicos de metabolismo que tienen como consecuencia la disminución de la velocidad del crecimiento. La transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria se caracteriza por un crecimiento

desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. Y la *fase de muerte* es consecuencia de diversos factores: uno importante es el agotamiento de las reservas celulares de energía. Al igual que el crecimiento, la muerte también asume una función exponencial que puede ser representada por una disminución lineal del número de las células viables a lo largo del tiempo (Madigan y col., 1997, Prescott y col., 1999).

6.1 – Adaptabilidad y variabilidad de respuestas microbianas. Implicaciones sobre la microbiología predictiva

El proceso de adaptación de los microorganismos a las condiciones del medio en que se encuentran depende de varios factores como es el caso de la composición del medio mismo o del estado fisiológico de la cepa, entre otros. Por eso, la variabilidad de las respuestas microbianas influye de manera distinta en la predicción de la cinética de los microorganismos.

Dichas respuestas de los microorganismos a las condiciones de crecimiento pueden ser evidenciadas a través de sus parámetros de crecimiento como son el tiempo de latencia, tiempo de generación y la velocidad de crecimiento.

6.1.1 – Tiempo de latencia

Un fenómeno inherente a la cinética microbiana es la latencia, la cuál es típicamente observada como la respuesta retardada de la población microbiana ante un (repentino) cambio en el ambiente. La fase de latencia puede producirse en ambos procesos, de crecimiento y de inactivación (Swinnen y col., 2004).

En el caso de las condiciones de crecimiento, la fase de latencia es el período de ajuste durante el cual las células bacterianas se modifican por si mismas con el objetivo de sacar ventaja del nuevo ambiente e iniciar el crecimiento exponencial (Buchanan y Klawitter, 1991). Por tanto, durante la fase de latencia las células se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de

determinadas enzimas, iniciando la replicación de su material genético, y, en el caso de las esporas, diferenciándose en células vegetativas (Montville, 2000).

Debido a que el crecimiento de patógenos en los productos alimentarios es inaceptable, es necesario predecir la fase de latencia con exactitud (McMeekin y col., 1997), lo cual en la actualidad no siempre se consigue (McKellar, 1997). Esto implica que es necesario un gran conocimiento de la fase de latencia y de los factores fisiológicos que la afectan (McDonald y Sun, 1999).

En el caso de las condiciones de inactivación, la respuesta retardada (fase de latencia) es observada como un “hombro” en la curva de inactivación logarítmica (Geeraerd y col., 2000).

La fase de latencia del crecimiento microbiano fue definida en 1914 por Penfold como el intervalo entre la inoculación del cultivo bacteriano y el tiempo del comienzo de su velocidad máxima de crecimiento. Y suele ser convencionalmente medido como el punto en el cuál la pendiente de la fase exponencial de crecimiento (en una gráfica semi-logarítmica) intercepta la línea horizontal trazada desde la concentración celular inicial, como refiere Robinson y col. (1998).

Buchanan y Solberg definieron en 1972 la fase de latencia como el tiempo necesario para que la densidad de población se duplique. Y Pirt en 1975 definió el crecimiento latente como el período de transición durante el cual la tasa del crecimiento específico aumenta hasta al máximo valor característico del ambiente de cultivo. Se trata pues de una definición similar a la establecida por Penfold en 1914 (Robinson y col. (1998).

El tiempo de latencia es la duración de la fase de latencia. Según Delignette-Muller (1998), el tiempo de latencia fue descrito en 1918 por Buchanan, y posteriormente fue matemáticamente definido por Buchanan y Cygnarowicz (1990) como el tiempo cuando la segunda derivada del logaritmo de la curva de crecimiento alcanza su máximo valor es decir, el tiempo en el cual el cambio de la tasa de crecimiento específico es máximo (máxima aceleración de la tasa de crecimiento): este es el

primer instante de tiempo en el que la tercera derivada del logaritmo neperiano del número de organismos con respecto al tiempo es cero (Swinnen y col., 2004).

Dado que la típica curva de crecimiento es de tipo sigmoideal, la duración de la fase de latencia puede ser cuantificada como el tiempo obtenido por la extrapolación de la tangente en la parte exponencial de la curva de crecimiento, hacia el nivel del inóculo. Esta definición está actualmente más extendida (Swinnen y col., 2004).

Comúnmente, la fase transitoria que sigue a la inoculación del microorganismo en un medio de cultivo del laboratorio (o de contaminación de un producto alimentario) en condiciones ambientales constantes puede definirse como la fase de latencia inicial. Sin embargo, variaciones ambientales durante este período de crecimiento pueden dar lugar a un crecimiento retardado, o latencia intermedia. Además del cambio del medio y del efecto de la dilución, la latencia inicial y la latencia intermedia pueden ser consideradas como esencialmente la misma, porque en ambos casos las células experimentan la transición de unas condiciones a otras (Swinnen y col., 2004).

La línea divisoria crecimiento/no crecimiento representa un límite en el cual la tasa de crecimiento es cero y la fase de latencia infinita. Probablemente, y más que cualquier otro factor, la determinación precisa de la fase de latencia ha creado problemas a los microbiólogos predictivos. Incluso ha sido ignorada en muchas aplicaciones prácticas de modelos predictivos, tales como la evaluación de la higiene de las operaciones del procesado de la carne (Gill y col., 1991). La gran dificultad es que las células que contaminan un alimento alcancen el nivel de capacidad fisiológica de aquellas que se están dividiendo activamente en el mismo. Hay diversos estados de latencia, como las células que se están dividiendo activamente, aquellas que demuestran una fase de latencia fisiológica, aquellas que están dañadas y requieren recuperación, y aquellas que han empezado un estado de animación suspendido (viables pero no cultivables). Además, pueden surgir complicaciones de modelado cuando las fluctuaciones en las condiciones ambientales sean de la suficiente magnitud y rapidez como para inducir a una población que ya ha superado su fase de latencia para empezar otra vez uno de los estados latentes citados anteriormente (McMeekin y col., 2002).

La duración de la fase de latencia se ve afectada por factores como la identidad y el fenotipo de la bacteria (Buchanan y Cygnarowicz, 1990), el tamaño del inóculo (Baranyi y Roberts, 1994; Besse y col., 2006), la historia fisiológica de la población (McMeekin y col., 1993), y por los cambios en el medio físico-químico, tales como la temperatura (Zwietering y col., 1994), el pH, la actividad de agua y la disponibilidad de nutrientes (Buchanan y Cygnarowicz, 1990).

Augustin y col. (2000a), estudiando el crecimiento de *L. monocytogenes* en un medio pobre en nutrientes y bajo condiciones subóptimas, concluyeron que la fase de latencia se prolonga cuando el inóculo es estresado severamente por escasez de nutrientes y el tamaño del inóculo es muy pequeño.

De acuerdo con Robinson y col. (1998), las causas de latencia reconocidas por Pirt en 1975 fueron las siguientes: cambios en la nutrición, cambios en el ambiente físico, presencia de algún inhibidor, germinación de esporas, estado del inóculo.

Varios autores han publicado que la fase de latencia es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento máxima específica (Smith, 1985; McMeekin y col., 1993; Baranyi y Roberts, 1994, McMeekin y col., 2002).

La duración del tiempo de latencia suele ser estimado erróneamente. Esto es usualmente atribuido al efecto de la historia previa de las células. Robinson y col., (1998) formalizaron el concepto de tiempo de latencia dependiente de dos elementos:

- La cantidad de trabajo necesario por parte de las células para adaptarse al nuevo ambiente y/o reparar los daños debidos ese cambio.
- La proporción en la que estas reparaciones pueden hacerse.

Una preadaptación a las condiciones perjudiciales al crecimiento puede reducir de manera espectacular los tiempos de latencia (Buchanan y Klawitter, 1991; Kroll y Patchett, 1992; Hudson, 1993; Dufrenne y col., 1997). Incluso cuando los efectos del inóculo han sido minimizados, todavía es difícil obtener una imagen clara de la forma en cómo la latencia varía en función del ambiente externo (Robinson y col.,

1998). Por tanto, la magnitud y el grado del cambio entre el ambiente anterior y el ambiente actual afectan el tiempo de latencia.

No obstante, varios estudios han demostrado la relación entre el tiempo de latencia y la tasa de crecimiento (Smith, 1985; Mackey y Kerridge, 1988; Adair y col., 1989; Baranyi y Roberts, 1994), aunque esta posibilidad no está siendo totalmente explorada (Robinson y col., 1998).

Para Robinson y col. (1998), la exactitud con la cual la latencia puede ser predicha dependerá del conocimiento del estado del inóculo y de la habilidad para predecir cómo la latencia se ve influenciada por los efectos separados del estado del inóculo y de las condiciones ambientales.

Whiting y Bagi (2002) examinaron la duración de la fase de latencia de células de *L. monocytogenes* crecidas en diferentes estados fisiológicos y transferidas a diferentes temperaturas: las células que crecían exponencialmente tuvieron fases de latencia más cortas; las células que estaban en la fase estacionaria y las células hambrientas tuvieron fases de latencia largas; las células refrigeradas tuvieron fases de latencia ligeramente largas y; las células desecadas exhibieron las fases de latencia más largas. Equivalentemente, Augustin y col. (2000b) y Mellefont y col. (2000) concluyeron para *L. monocytogenes* y *E. coli*, respectivamente, que las células que crecían activamente se ajustan más rápidamente a los cambios comparado con las células de inóculos extraídos de las fases de latencia o estacionaria.

Debido a la existencia de la multitud de factores anteriormente mencionados que afectan el comportamiento de la fase de latencia, es difícil obtener predicciones (Swinnen, 2004).

6.1.2 – Tiempo de generación

El *tiempo de generación* es el tiempo necesario para duplicar la población bacteriana. Según Stanier y col. (1989) se define como el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor de 2.

Durante este período de generación el número de células y la masa celular se duplica. El tiempo de generación varía entre los distintos microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1–3 horas, conociéndose pocos microorganismos que crezcan muy rápidamente dividiéndose en menos de 10 minutos. Otras tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días. El tiempo de generación es útil como indicador del estado fisiológico de una población celular, y es usado con frecuencia para comprobar el efecto negativo o positivo de un determinado tratamiento sobre un cultivo bacteriano (Madigan y col., 1997).

El tiempo de generación está directamente relacionado con la *velocidad de crecimiento exponencial*, que se define como la pendiente de la curva de crecimiento logarítmico en la fase de crecimiento exponencial. Generalmente, estos dos parámetros son estimados por el ajuste de los modelos primarios (Delignette-Muller, 1998), tales como la ecuación modificada de Gompertz (Gibson y col., 1988; Zwietering y col., 1990) o el modelo propuesto por Baranyi y Roberts (1994).

La relación proporcional entre el tiempo de latencia y el tiempo de generación es implícita o explícitamente asumida por algunos investigadores (Delignette-Muller, 1998). Generalmente, admiten que, a diferencia del tiempo de generación, el tiempo de latencia no depende solamente de las condiciones de crecimiento, sino que también de las condiciones de crecimiento previas, tal como se ha indicado anteriormente (Hudson, 1993; Dufrenne y col., 1997). Pero suponen que para los cultivos que tienen idénticos estados fisiológicos en el momento de la inoculación, y que fueron cultivados bajo diferentes condiciones, el ratio del tiempo de latencia sobre el tiempo de generación es constante (Delignette-Muller, 1998).

Según Robinson (1998), varios modelos que son muy adecuados para predecir la fase de latencia pueden diferir de aquellos que son mejores para predecir la velocidad de crecimiento (Zwietering y col., 1991; Ratkowsky y col., 1991; Duh y Schaffner, 1993; Buchanan, 1993), y, en muchos casos, no se ha tenido en cuenta en la latencia el efecto de la historia del inóculo.

6.1.3 – Velocidad de crecimiento

Como ya se ha indicado anteriormente, el crecimiento se define como un incremento en el número de células microbianas en una población, lo cual también puede ser medido como un incremento en masa microbiana. En este contexto, la *velocidad de crecimiento* se define como el cambio en número de células o masa celular por unidad de tiempo (Madigan y col., 1999).

Un cultivo microbiano creciendo en equilibrio imita una reacción autocatalítica de primer orden, es decir, la velocidad del aumento de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes durante ese tiempo (Stanier y col., 1989).

La tasa del crecimiento exponencial se ve influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio), así como por las características genéticas del microorganismo (Madigan y col., 1997).

6.2 – Influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento bacteriano

Los alimentos son ecosistemas complejos. Los ecosistemas están constituidos por el medio ambiente y los organismos que viven en él. El ambiente de un alimento está constituido por factores intrínsecos inherentes al alimento (por ejemplo, el pH, la actividad de agua y los nutrientes) y factores extrínsecos a él (por ejemplo, la temperatura, la composición del aire, o la presencia de otras bacterias) (Montville, 2000).

El crecimiento bacteriano está influido notablemente por la naturaleza química y física de su ambiente. El conocimiento de estas influencias ambientales permite controlar el crecimiento microbiano y estudiar la distribución ecológica de los microorganismos (Prescott y col., 1999).

Numerosos factores afectan el crecimiento de los microorganismos en los alimentos, y, a menudo, sus interacciones tienen un efecto significativo sinérgico o antagónico sobre el crecimiento. Estos efectos interactivos pueden ser muy importantes en los

sistemas alimentarios, en los cuales el crecimiento bacteriano puede verse favorecido o inhibido por los múltiples ingredientes, condiciones de almacenamiento o constituyentes alimentarios (Eifert y col., 1996).

De entre los varios factores ambientales que pueden tener influencia sobre el crecimiento bacteriano podemos destacar los siguientes: la temperatura, el pH, los solutos y la actividad de agua (a_w), la concentración de oxígeno, la presión y la radiación. En muchos sistemas alimentarios, la temperatura, la actividad de agua y el pH son los factores ambientales claves que controlan el crecimiento bacteriano. Las respuestas de las bacterias a estos factores de crecimiento son altamente reproducibles, permitiendo que las respuestas sean resumidas como modelos matemáticos (McMeekin y col., 1993; Krist y col., 1998).

Los factores intrínsecos y extrínsecos de los alimentos pueden ser manipulados para la conservación de los mismos, y, de este modo, puede considerarse su conservación como “la ecología de crecimiento cero” (Gould, 1995).

No obstante, si consideramos un alimento como un macroambiente, debemos tener en cuenta que también puede contener muchos microambientes distintos. Este hecho se puede ilustrar con la aparición de brotes de toxiinfecciones alimentarias por el consumo de alimentos con características típicamente aerobias causados por *Clostridium botulinum*, que es un anaerobio estricto. El crecimiento de *C. botulinum* en patatas, cebollas, y ensaladas de col expuestas al aire ha provocado brotes de botulismo (Lund, 1992). El oxígeno en estos alimentos es extraído durante el cocinado y difunde de nuevo al interior tan lentamente que en su interior el producto llega a permanecer anaerobio. El crecimiento de ciertos hongos y bacilos en la superficie de productos derivados del tomate puede generar gradientes de pH y oxígeno tales que permitan el crecimiento de *C. botulinum* y la producción de toxina en un área muy limitada del producto (Huhtanen y col., 1976; Montville, 1982). Éste es también un buen ejemplo de cómo se encajan los ecosistemas unos con otros. Los microbios habitan microambientes situados en el macroambiente del alimento contenido en el ambiente humano (cuando una persona olvida refrigerar un producto), en un ambiente global (cuando el tiempo atmosférico puede proporcionar una temperatura que favorezca el crecimiento microbiano) (Montville, 2000).

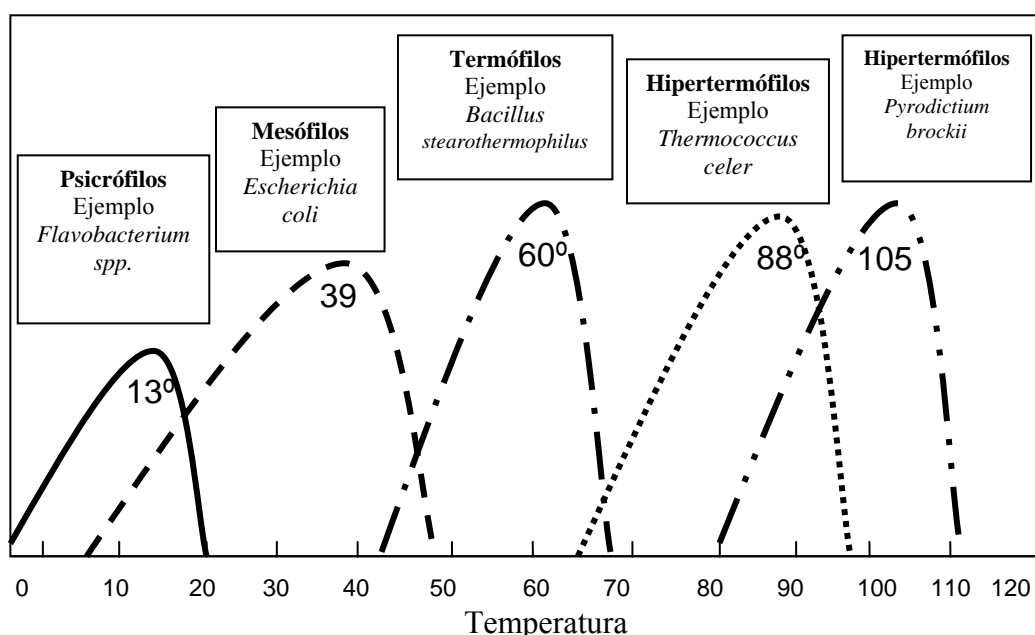
6.2.1 – Temperatura

El control de la temperatura se encuentra entre los factores más críticos precisos para el logro de un suministro alimentario que reúna las propiedades sanitarias y organolépticas correctas. Probablemente sea la temperatura el más importante de los factores ambientales que afectan a la viabilidad y el desarrollo microbianos (ICMSF, 1983). El factor que más influye sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento es la sensibilidad de las reacciones catalizadas por enzimas a determinadas temperaturas. En condiciones de baja temperatura, un aumento eleva la velocidad de crecimiento, porque la velocidad de una reacción catalizada por enzimas, como de cualquier reacción química, casi se duplicará por cada incremento de 10 °C. Como la velocidad de cada reacción aumenta, el metabolismo en general es más activo a temperaturas altas, y el microorganismo crece más rápidamente. A partir de cierto punto, un mayor incremento de la temperatura disminuye la velocidad de crecimiento, y temperaturas lo suficientemente elevadas son letales. Las altas temperaturas ocasionan daños a los microorganismos al desnaturalizar las enzimas, las proteínas transportadoras y otras proteínas (Prescott y col., 1999; Montville, 2000).

Todos los microorganismos tienen una temperatura mínima por debajo de la cual no se produce un crecimiento prolongado, así como una temperatura óptima en la cual el crecimiento es mucho más rápido, y una temperatura máxima por encima de la cual el crecimiento no es posible. Estas tres temperaturas son a menudo llamadas temperaturas cardinales, y son, generalmente, características de cada organismo, a pesar de que no son completamente fijas, ya que pueden ser modificadas ligeramente por otros factores ambientales, particularmente la composición del medio de crecimiento (Madigan y col., 1997). En función de la temperatura óptima de crecimiento, los microorganismos pueden ser clasificados en los siguientes grupos: *psicrófilos*, *psicrótrofos*, *mesófilos*, *termófilos*, *hipertermófilos*, tal como se presenta en la Figura 1. Tanto los psicrófilos como los psicrótrofos crecen, aunque lentamente, a 0 °C. Los verdaderos psicrófilos muestran su velocidad de crecimiento óptima a 15 °C y no crecen por encima de los 25 °C. Los psicrótrofos como *L. monocytogenes* y *C. botulinum* tipo E, tienen temperaturas óptimas cerca de los 25

°C y no crecen por encima de los 40 °C. Como estos patógenos de origen alimentario, junto con algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, pueden crecer a 10 °C, queda claro que la refrigeración convencional no es suficiente para garantizar la seguridad de un alimento (Palumbo, 1986). Deberían, por tanto, añadirse barreras adicionales en los alimentos refrigerados que no contengan otros inhibidores de crecimiento (NFPA, 1998).

Figura 1. Clasificación de microorganismos en función de la temperatura óptima (Madigan y col (1997).



Durante el crecimiento en ambientes fríos son importantes muchas capacidades metabólicas. La adaptación “homeoviscosa” permite a las células mantener la fluidez de sus membranas a bajas temperaturas. Conforme la temperatura disminuye, la célula sintetiza cantidades crecientes de ácidos grasos mono-insaturados y di-insaturados (Sinensky, 1974; Cossins y Sinensky, 1984). Las “arrugas” causadas por los dobles enlaces previenen el empaquetamiento de los ácidos grasos en una estructura cristalina. La acumulación de solutos compatibles a bajas temperaturas (Ko y col., 1994) es análoga a su acumulación en condiciones de baja actividad de agua.

La temperatura de crecimiento también puede influir sobre la sensibilidad de la célula al calor. Las células de *Listeria monocytogenes* precultivadas a 48 °C poseen una alta resistencia térmica (Montville, 2000).

Hudson (1993), estudiando la influencia de cuatro temperaturas previas en el tiempo de latencia de *Aeromonas hydrophila*, concluyó que se observan fases de latencia cortas cuando las temperaturas de crecimiento aumentan, y fases de latencia largas cuando las células son transferidas desde altas temperaturas de pre-incubación a bajas temperaturas de cultivo. Resultados análogos fueron obtenidos por Whiting y Bagi (2002) en el caso de *Listeria monocytogenes* (Swinnen y col., 2004).

6.2.2 – Actividad de agua

La *actividad de agua* (a_w) de una solución es el 1 % de su humedad relativa (cuando se expresa en porcentaje). Equivale también a la relación entre la presión de vapor de la solución (P_{sol}) y la del agua pura (P_{agua}). La actividad de agua de una solución o un sólido puede establecerse aislando la muestra en una cámara y midiendo la humedad relativa después de que el sistema haya alcanzado el equilibrio (Prescott y col., 1999).

$$a_w = \frac{P_{sol}}{P_{agua}}$$

La actividad de agua está inversamente relacionada con la presión osmótica. La mayoría de los microorganismos, incluyendo las bacterias patógenas, crecen más rápidamente a niveles de a_w de 0,995 – 0,980. La a_w de la mayoría de los medios de cultivo utilizados en el laboratorio es de 0,999 – 0,990. A valores de a_w inferiores a éstos, la velocidad de crecimiento y la población estacionaria o la masa celular final disminuyen, y la fase de latencia aumenta. A una a_w suficientemente baja, la cual es difícil de definir con precisión, la fase de latencia se hace infinita, es decir, el crecimiento cesa (ICMSF, 1983).

Los microorganismos tienen que realizar un esfuerzo adicional para crecer en un hábitat con un valor de a_w bajo porque deben mantener una concentración interna de solutos elevada para retener agua. Este tipo de microorganismos se denominan *osmotolerantes*. Pueden crecer en un amplio intervalo de a_w o de concentración osmótica. Los microorganismos *halófilos* se han adaptado tan bien a las condiciones

salinas que necesitan niveles elevados de cloruro sódico para crecer. En concreto, se pueden aislar bacterias en el Mar Muerto del género *Halobacterium*. Estas bacterias han modificado sustancialmente la estructura de sus proteínas y membranas, acumulando en el interior grandes cantidades de solutos y de potasio para mantener hipertónico su citoplasma (Prescott y col., 1999).

A muchos alimentos se les proporciona estabilidad, desde el punto de vista microbiológico, eliminando el agua (deshidratación) o mediante la adición de solutos hasta alcanzar un valor bajo de a_w . La sal y el azúcar son los solutos que habitualmente se añaden a los alimentos para reducir la a_w . La preparación de jaleas, mermeladas y productos similares generalmente va acompañada de una extracción parcial del agua (concentración) mediante calentamiento. La adición de sal se utiliza predominantemente en la carne, el pescado y algunas verduras. La sal se añade directamente en seco o mediante salmuera dependiendo siempre de la naturaleza del producto. Para que la sal penetre rápidamente puede aplicarse mediante presión; por ejemplo, cuando se inyecta la salmuera del curado en el espesor de los tejidos de grandes trozos de carne. En las carnes curadas, el efecto inhibitor sobre los microorganismos se incrementa mediante la adición de nitritos (ICMSF, 1983).

La osmorregulación ha sido ampliamente estudiada en las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. La adaptación de estas bacterias a concentraciones altas de solutos extracelulares generalmente se acompaña de la acumulación intracelular de iones de potasio y compuestos orgánicos como aminoácidos, compuestos amonio cuaternarios e hidratos de carbono (trealosa) (Csonka, 1989).

En climas cálidos y en países en los que no se dispone de suficiente capacidad para la refrigeración de los alimentos, como pueden ser los países africanos, los productos muy salados (carne y pescado) o deshidratados son mucho más habituales. Estos productos permiten una mayor facilidad de comercialización y de conservación. Por el contrario, en los países donde se dispone de refrigeración suficiente, los productos cárnicos más corrientes son los ligeramente salados que necesitan refrigeración para su mantenimiento.

Muchos hongos son osmotolerantes y, por ello, son los principales microorganismos involucrados en la putrefacción de alimentos salados y deshidratados (Prescott y col., 1999).

6.2.3 - pH

El pH es una medida de la actividad de los iones de hidrógeno de una solución que se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno (expresada en moles). Es decir, el cambio de una unidad de pH representa un cambio de 10 veces en la concentración de iones de hidrógeno. Por eso, por ejemplo el vinagre (con un pH aproximado a 2) y el amoníaco doméstico (con un pH aproximado a 11) tienen una diferencia de concentración de iones de hidrógeno aproximada a un billón de veces (Madigan y col., 1997).

Cada especie tiene un intervalo definido de pH para su crecimiento y un pH óptimo para su crecimiento. Aunque los microorganismos crecen a menudo en medios en un amplio de intervalo pH, su tolerancia tiene un límite. Variaciones intensas en el pH pueden dañar a los microorganismos alterando la membrana plasmática o inhibiendo la actividad de las enzimas y proteínas transportadoras. Los cambios en el pH externo pueden modificar también la ionización de las moléculas de nutrientes, disminuyendo, por ello, su disponibilidad para el organismo (Prescott y col., 1999).

La mayoría de los ambientes naturales tienen valores de pH entre 5 y 9, y son más comunes los microorganismos con un pH óptimo situado dentro de estos valores. Pocas especies pueden crecer en medios con valores de pH inferiores a 2 o superiores a 10. Los organismos que crecen en pH bajos son considerados *acidófilos*. Los hongos son un grupo que tienden a ser más acidotolerantes que las bacterias. Entre las bacterias acidófilas están las especies del género *Thiobacillus*. Muy pocos microorganismos pueden crecer en pH altos como 10 – 11, y son conocidos como *alcalinófilos*. Estas bacterias normalmente se encuentran en hábitats altamente básicos como lagos con carbonatos o suelos altamente carbonatados. Entre estos microorganismos han sido estudiadas algunas especies del género *Bacillus*. Sin

embargo, la mayoría de los microorganismos tienen un pH óptimo para su crecimiento situado entre 6 y 8. Son considerados *neutrófilos* (Madigan y col., 1997).

Los procesos de elaboración de alimentos que disminuyen el pH de los mismos y producen ácidos orgánicos como, por ejemplo, la fermentación, son muy usados como mecanismos de prevención del crecimiento microbiano en los alimentos y para garantizar la seguridad alimentaria. Sin embargo, trabajos recientes han descrito la tolerancia de cepas de *Escherichia coli* patógenas a pH bajo (Glass y col., 1992), la supervivencia en alimentos de pH bajo (Zhao y Doyle, 1994), y la resistencia al efecto letal del pH muy bajo (Conner y Kotrola, 1995; Leyer y col., 1995). Por eso es importante comprender y ser capaz de predecir respuestas de los microorganismos al pH, y así determinar lo más correctamente posible los riesgos en diferentes alimentos y la serie de condiciones del medio necesarias para reducir o controlar su crecimiento (Presser y col., 1997).

A menudo los microorganismos tienen que adaptarse a cambios ambientales de pH para poder sobrevivir. En las bacterias, los sistemas de transporte de sodio y de potasio posiblemente corrigen pequeñas variaciones de pH. Si el pH se vuelve demasiado ácido, se ponen en marcha otros mecanismos. Cuando el pH baja hasta valores de 5,5 a 6,0, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* sintetizan un grupo de proteínas nuevas como parte de la denominada respuesta de tolerancia en medio ácido. La ATPasa translocadora de proteínas contribuye a esta respuesta protectora, produciendo más ATP o bombeando protones fuera de la célula. Si el pH externo disminuye a valores de 4,5 o inferiores, se sintetizan proteínas de respuesta al shock ácido. Probablemente, estas sustancias eviten la desnaturalización de las proteínas y faciliten de nuevo el plegamiento de las desnaturalizadas (Prescott y col., 1999).

Hill (2004) estudió los mecanismos de respuesta bacteriana al estrés provocado por la presión, el pH y la sal. Entre ellos está el sistema glutamato descarboxilasa (GAD, “glutamate decarboxylase”) que desempeña un papel muy importante en la supervivencia y crecimiento en medios ácidos, resistencia a la bilis y osmotolerancia (principalmente por la acumulación de solutos compatibles).

Se desarrollan muchos modelos matemáticos para simular el crecimiento de microorganismos en relación a las condiciones del medio como temperatura, a_w , pH y/o NaCl (Cheroutre-Vialette y col., 1998; Cheroutre-Vialette y Lebert, 2000; Le Marc y col., 2002; Vialette y col., 2003).

En la Tabla 1 se presentan los intervalos normales de pH para algunos alimentos comerciales enlatados.

Tabla 1. – pH de algunos alimentos enlatados comerciales. (Adaptado del ICMSF, 1983).

Tipo de alimento	pH aproximado	Tipo de alimento	pH aproximado
Aceitunas negras	5,9 – 7,3	Judías verdes	4,9 – 5,5
Almejas	5,9 – 7,1	Judías blancas con cerdo	5,1 – 5,8
Atún	5,9 – 6,1	Leche entera	6,5 – 6,8
Bacalao	6,0 – 6,1	Melocotón	3,4 – 4,2
Espárragos trigueros	5,0 – 5,8	Pimiento	4,3 – 4,9
Espinacas	4,8 – 5,8	Pollo	3,4 – 3,7
Guisantes	5,6 – 6,5	Queso Roquefort	4,7 – 4,8
Jamón cocido condimentado	6,0 – 6,3	Salmón	6,1 – 6,5

6.2.4 – Otros factores ambientales

A parte de la temperatura, del pH y de la a_w , existen otros factores que influyen en el crecimiento microbiano. Entre ellos está la concentración de oxígeno, que en función de la necesidad de su presencia o no para el crecimiento, los microorganismos se pueden clasificar en *aerobios*, los que necesitan de oxígeno para su crecimiento, y *anaerobios*, los que crecen en ausencia de él. Estos últimos pueden ser clasificados en *anaerobios facultativos*, cuando no necesitan de oxígeno para crecer, pero que lo hacen mejor en su presencia; *anaerobios aerotolerantes*, los que pueden crecer bien tanto en la presencia o ausencia de oxígeno; *anaerobios estrictos* u *obligados*, los que no toleran en absoluto el oxígeno; y *microaerófilos*, los que precisan para su crecimiento niveles de oxígeno del orden del 2 al 10 %, pero que son dañados por el nivel del oxígeno atmosférico (20 %) (Madigan y col., 1999; Prescott y col., 1999).

Otro factor es la presión. La mayoría de los microorganismos pasa la mayor parte de su ciclo vital en la tierra o sobre la superficie de las aguas, siempre sometidas a una presión de 1 atmósfera (atm), sin que esta les afecte de forma importante. Sin

embargo, en las profundidades marinas (1000 metros o más de profundidad) la presión hidrostática puede alcanzar de 600 a 1100 atm, y temperaturas de 2 a 3 °C. A pesar de estos extremos, las bacterias pueden sobrevivir y adaptarse. Muchas son *barotolerantes*: un aumento de la presión las afecta negativamente pero no tanto como las haría a las no tolerantes. Algunas bacterias presentes en el intestino de invertebrados de los fondos marinos, como los anfípodos y holoturias son auténticos *barofílicos*, creciendo más rápidamente a presiones elevadas (Prescott y col., 1999).

La radiación es también un factor que puede afectar el crecimiento microbiano. Nuestro ambiente está bombardeado por radiaciones electromagnéticas de varios tipos. Muchas formas de radiación electromagnética son muy perjudiciales para los microorganismos. Esto es especialmente cierto en el caso de la radiación ionizante, de longitud de onda muy corta o de energía alta, que puede provocar que los átomos pierdan electrones, es decir, se ionicen. Existen dos formas principales de radiación ionizante: (i) los rayos X, que se producen artificialmente, y (ii) los rayos gamma, que se emiten durante la desintegración de los radioisótopos. Niveles bajos de radiación ionizante producirán mutaciones y pueden causar indirectamente la muerte, mientras que niveles superiores son directamente letales. Aunque los microorganismos son más resistentes a la radiación ionizante que los organismos superiores, pueden ser destruidos con una dosis suficientemente grande. Por ello, la radiación puede utilizarse para esterilizar objetos. Sin embargo, algunas bacterias (por ejemplo, *Deinococcus radiodurans*) y las endosporas bacterianas pueden sobrevivir a dosis elevadas de radiación ionizante (Prescott y col., 1999).

Cabe citar que ante determinados estrés ambientales los microorganismos pueden llegar a dañarse sin que se produzca realmente la muerte de los mismos, debido a que dichos factores de estrés actúan a un nivel subletal (el calor, la radiación, los ácidos o los desinfectantes). Este daño se caracteriza por una disminución de la resistencia a agentes selectivos, o por un aumento en las necesidades nutritivas (ICMSF, 1980a, Montville, 2000).

El daño es un proceso complejo y está influido por el tiempo de exposición, la temperatura, la concentración del agente estresante, la cepa de patógeno objeto de estudio, la metodología experimental, etc. Este fenómeno de daño celular es muy

importante en la seguridad alimentaria por muchas razones: (i) las células dañadas se clasifican erróneamente como muertas durante la determinación de la termorresistencia; es decir, se sobreestimarán la sensibilidad térmica del microorganismo y los valores *D* resultantes serán equivocadamente bajos. (ii) Las células dañadas que escapan a la detección en el momento del muestreo tras el procesado pueden recuperarse antes del consumo del alimento y constituir un problema importante de alteración o de seguridad. (iii) El agente selectivo puede ser un ingrediente alimentario común como por ejemplo la sal, un ácido orgánico, o también puede ser una temperatura inferior a la óptima. Por ejemplo, las células de *Staphylococcus aureus* dañadas con ácido durante la fermentación de los embutidos pueden crecer en agar tripticasa-soja (TSA), pero no en el mismo medio conteniendo un 7,5 % de sal. Estas células dañadas podrían repararse en el embutido si se mantuviera éste a 35 °C (pero no si se conserva a 5 °C) y podrían multiplicarse y producir la enterotoxina (Smith y Palumbo, 1978; Montville, 2000).

7 – MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN SEGURIDAD ALIMENTARIA

La idea de riesgo para el medio ambiente y la salud de las personas está muy difundida en la sociedad actual, algo para lo cual, sin duda, ha contribuido el tratamiento de algunos temas por parte de los medios de comunicación. Por eso, no es extraño que la seguridad se haya convertido en una de las mayores preocupaciones sociales, dentro de las cuales cobra especial relevancia la seguridad alimentaria.

En el conjunto de los microorganismos existentes en la naturaleza, algunos de ellos son considerados de interés en seguridad alimentaria debido a que su presencia en los alimentos puede representar un peligro para la salud del consumidor ya sea por sus características patógenas como por su capacidad toxinogénica. Como ejemplos de microorganismos de interés en seguridad alimentaria podemos citar las especies *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Virus de la hepatitis A, etc.

A continuación se describen los microorganismos elegidos para el estudio.

7.1 – *Escherichia coli*

7.1.1 – Historia

En 1885, Escherich (un pionero de la bacteriología alimentaria) descubre, en las heces del hombre y de los animales, un germen que denomina *Bacterium coli* y que, más tarde, identifica como dos, *B. coli commune* y *B. lactis aerogenes*. En 1895, Migula propone, y es aceptado, cambiar el nombre de *B. coli commune* por el de *Escherichia coli*, en honor de su descubridor (Moreno, 1982).

Basándose en el descubrimiento de Escherich, y de forma independiente, Schardinger en Austria en 1892, y Theobald Smith en EE.UU. en 1895, sugirieron que las aguas potables deberían examinarse en busca de lo que más tarde se llamaría *Escherichia coli*, en lugar de investigar la presencia de *Enterobacteriaceae* patógenas específicas, en particular *Salmonella typhi*, empresa en aquel tiempo bastante difícil (Mossel y García, 1985).

A mediados de la década de los años 40, el papel de *Escherichia coli* como enteropatógeno fue demostrado de modo válido, lo que hizo que los países desarrollados adoptaran medidas de control para reducir la incidencia de esta enfermedad (ICMSF, 1998).

7.1.2 – Taxonomía

Las bacterias de la especie *E. coli* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos cortos, Gram negativos, quimioheterotrofos, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar. Típicamente, la especie es rojo de metilo positiva y Voges-Proskauer negativa, lo cual indica que fermentan los hidratos de carbono por la vía ácido-mixta. No crece en medio citrato de Simmons, produciendo indol a partir de triptófano en la mayoría de las cepas (ICMSF, 1998). Produce ácido y gas a partir de la glucosa, lactosa, fructosa, galactosa, maltosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y manitol. Puede fermentar o no, según los casos, la

sacarosa, rafinosa, salicina, esculina, dulcitol y glicerina. Es variable la fermentación de la sacarosa y la salicina. Raramente fermenta la pectina y el adonitol. Nunca fermenta la dextrina, almidón, glucógeno e inositol. No licua la gelatina. Reduce los nitratos. Coagula y acidifica la leche sin peptonizarla. Oxida la patata produciendo un color moreno oscuro (Merchant y Packer, 1980).

Las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar unas de otras teniendo como base sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) (Evans y col., 1979). Han sido identificados por lo menos un total de 174 antígenos O, 56 antígenos H, y 80 antígenos K. La mayoría de las cepas son comensales inofensivos; sin embargo, algunas cepas son patógenas y provocan enfermedad diarreica (Doyle y col., 2000).

En la Tabla 2 se presentan las características antigénicas de *Escherichia coli*.

Tabla 2. – Características antigénicas de *Escherichia coli* (Scanlan, 1991).

Característica	Antígenos bacterianos			
	O	K	H	FIMBRIALES
Composición química	Lipopolisacárido	Polisacárido	Proteína	Proteína
Termosensibilidad (1h,100 °C)	Estable	Estable	Sensible	Sensible
Codificación genética:				
- Cromosoma	+	+	+	+
- Plásmidos	-	-	-	+

7.1.3 – Hábitat

La mayoría de las cepas pertenecientes a la especie *Escherichia coli*, forman parte de la microflora normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, encontrándose habitualmente en las heces. En los animales, desde las primeras horas después del nacimiento, una sucesión de cepas de *E. coli* habitan la parte más distal del íleon y todo el colon. *E. coli* representa el uno por ciento o menos de las bacterias presentes en el colon; sin embargo, la bacteria es la especie anaerobia facultativa más numerosa en el tracto gastrointestinal sano de los animales domésticos (Scanlan, 1991). Pero se puede hallar en el suelo, agua y otros lugares, aunque su procedencia

parece ser siempre intestinal. Su presencia en los alimentos es índice de contaminación fecal.

7.1.4 – *Escherichia coli* no patógeno

En 1920, se introdujo la utilización del grupo total de las bacterias del grupo coliformes como marcadores en el análisis microbiológico de la leche pasteurizada y de los helados, basándose en el principio de que un tratamiento térmico adecuado habría de eliminar todas las bacterias presentes de este grupo y de que el envasado debería impedir la recontaminación del producto. Pero este procedimiento ha sido objeto de críticas por parte de muchos expertos, sobre todo por falta de definiciones exactas (Mossel y García, 1985).

Por eso, distintos autores (Mossel y García, 1985; Pascual, 1989) distinguen dos grupos de microorganismos indicadores:

- Aquellos cuya presencia en los alimentos señala la posible presencia simultánea de gérmenes patógenos ecológicamente relacionados. Tales microorganismos podrían ser denominados índices. El microorganismo clásico es *Escherichia coli*.
- Aquellos cuya presencia en los alimentos indica deficiencias en su calidad higiénica. El término “microorganismos indicadores” sería utilizado para este grupo de bacterias. Los microorganismos indicadores más conocidos son los coliformes (Hans, 1981; Banwart, 1982; Mossel y García, 1985; Pascual, 1989; Eduardo, 1996; Nicholas, 1999). En la leche pasteurizada, por ejemplo, la existencia de bacterias de este grupo en número que exceda a un valor de referencia experimental y legalmente establecido puede poner de manifiesto o advertir diversas deficiencias de este producto, entre ellas un tratamiento térmico insuficiente, una contaminación posterior al tratamiento, o un almacenamiento del producto final a una temperatura demasiado elevada.

Escherichia coli puede actuar como índice o como indicador, incluso en un mismo alimento. Por ejemplo, su presencia en número significativo en camarones o gambas precocidas y congeladas pone de manifiesto o un tratamiento de inocuidad

inadecuado (función indicadora), o la posible presencia de microorganismos patógenos de procedencia entérica (función de índice).

Como indicador de contaminación fecal *Escherichia coli* presenta las siguientes características:

- Es la más específica de todas las bacterias de origen fecal, es decir, procede exclusivamente del intestino humano o animal.
- Su abundancia entre las enterobacterias.
- Una satisfactoria facilidad, rapidez y fiabilidad de las técnicas utilizadas en su investigación.
- Poca resistencia en cuanto a su supervivencia en ambiente externo y, en ciertos alimentos crudos o tratados, menor que las enterobacterias patógenas, sobre todo *Salmonella*. Este inconveniente hace que su presencia en los alimentos indique una contaminación reciente.
- Su presencia en los alimentos señala un peligro potencial de posibles patógenos entéricos con mucha más certeza que en el caso de los coliformes.

Aunque en la actualidad es posible la determinación directa de casi todos los microorganismos patógenos entéricos, existe todavía espacio en la microbiología moderna de los alimentos para pruebas o determinaciones adecuadas de microorganismos marcadores, además de buscar o aislar directamente los microorganismos patógenos. Algunas razones lo justifican (Mossel y García, 1985):

- 1- El fallo en la detección de bacterias patógenas concretas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* tiene un significado limitado, debido a la frecuente distribución irregular de estos microorganismos en los alimentos y a la falta de fiabilidad de las técnicas de aislamiento, incluyendo las que se refieren al género más estudiado, *Salmonella*, y mucho más a las que se utilizan para los géneros y especies tales como *Yersinia*, *Shigella*, etc. De este modo los valores negativos tienen un valor muy problemático.

- 2- En un laboratorio no especializado no es posible detectar en los alimentos la presencia de ciertos agentes patógenos entéricos, tales como el virus de la hepatitis A y los helmintos, por lo que con frecuencia no se realizan estas determinaciones.
- 3- Además, aún cuando falten todos los agentes patógenos entéricos en una alícuota adecuada de una partida de un alimento, este resultado tiene únicamente significado en lo que se refiere a la partida o lote en cuestión. Por el contrario, si se pone de manifiesto de forma repetida la ausencia de microorganismos marcadores en una serie de muestras tomadas en lotes sucesivos, la probabilidad de que tales productos puedan, en alguna ocasión, presentar niveles de contaminación peligrosos es prácticamente nula. Este último aspecto es de suma importancia tanto para las autoridades sanitarias como para los fabricantes y consumidores.

Por lo tanto, existen razones poderosas para utilizar, en el trabajo diario de comprobación de la calidad de los alimentos, los microorganismos marcadores (índices e indicadores), ya que su detección es más fácil, rápida, segura y económica que la de los microorganismos patógenos. El valor de los índices e indicadores también fue corroborado por la observación de que existe una correlación marcada entre la morbilidad por gastroenteritis y el nivel de marcadores en los alimentos consumidos (Mossel y García, 1985). Esto no impide que en las encuestas epidemiológicas sea indispensable la detección de los patógenos implicados.

7.1.5 – Patogenicidad de *Escherichia coli* O157:H7

El mecanismo exacto de la patogenicidad de *E. coli* O157:H7 no ha sido aclarado del todo. Sin embargo, se han identificado factores de virulencia importantes en base al examen histopatológico de los tejidos de los pacientes de síndrome urémico hemolítico (“Haemolytic Uremic Syndrome”, HUS) y de colitis hemorrágica (“Haemorrhagic Colitis”, HC), y a los estudios con cultivos de tejidos genéticos. Se ha desarrollado un cuerpo general de conocimientos sobre la patogenicidad de *E. coli* O157:H7 que indica que el microorganismo produce enfermedad por su capacidad de

adherirse a la membrana de las células de los hospedadores (posiblemente invadiendo estas células) y produciendo a continuación toxinas tipo Shiga: Stx1 y/o Stx2 (Doyle y col., 2000).

7.1.5.1 – Población susceptible

Todos los grupos de edad pueden resultar afectados por *E. coli* O157:H7, pero los bebés y los niños de corta edad padecen muy frecuentemente la enfermedad grave. El HUS se suele dar en niños, mientras que la púrpura trombótica trombocitopénica (“Thrombocytopenic Thrombotic Purpura”, TTP) se da rara vez pero principalmente en personas adultas (Kovacs y col., 1990).

Estudios basados en los grupos de población han indicado que la edad con mayor frecuencia de infección con *E. coli* O157:H7 se encuentra en el grupo de 2 a 10 años (Begue y col., 1994; Waters y col., 1994). Esta situación probablemente sea el resultado de una mayor exposición a alimentos y ambientes contaminados, y a animales infectados, además de la propagación persona-persona entre niños infectados, y de la falta de anticuerpos frente a las toxinas tipo Shiga (Reida y col., 1994). Generalmente, los enfermos eliminan rápidamente *E. coli* O157:H7 de su tracto gastrointestinal, con lo cual, antes de que aparezca el HUS, dos terceras partes de los enfermos ya no tienen el microorganismo en sus deposiciones (Doyle y col., 2000).

7.1.5.2 – Dosis infectante

El análisis retrospectivo de los alimentos relacionados con brotes causados por *E. coli* O157:H7 han revelado que la dosis infectiva es baja. Por ejemplo, en los lotes de empanadas de carne congeladas, relacionadas con un brote importante en los Estados Unidos, se encontraron entre 0,3 y 15 células de *E. coli* O157:H7 por gramo (Griffin y col., 1994; Zhao y col., 1994). De forma similar, en varios paquetes intactos de salami que fueron relacionados con un brote se detectaron de 0,3 a 0,4 células de *E. coli* O157:H7 por gramo (CDCP, 1995). Estos datos indican que la dosis infectiva de

E. coli O157:H7 es muy baja, esto es, de menos de pocos cientos de células. Otra prueba de ello es la capacidad de transmisión persona-persona de la infección de *E. coli* O157:H7.

7.1.5.3 – Período de incubación

El período de incubación varía con la cepa, pero, como término medio, los síntomas suelen aparecer entre 8 y 72 horas.

7.1.5.4 – Síntomas

Algunas cepas de *E. coli* son capaces de causar enfermedad diarreica en el hombre y en los animales. Los síntomas de la enfermedad dependen del tipo de *E. coli* patógeno. La subdivisión de estas formas patógenas se realiza tomando como base el mecanismo subyacente a la enfermedad (Levine, 1987; Doyle y Padhye, 1989).

Según Pascual y Calderón (2000), Kauffman y Dupont comprobaron en 1950 que algunas cepas de *Escherichia coli* serológicamente definidas eran la causa de enteritis en niños muy pequeños (colidispepsia). Pero también los adultos pueden enfermar a causa de estas cepas, de las que se conocen 15 serotipos diferentes. Están referenciados como una de las causas de la llamada “diarrea del viajero” (“traveller disease”) que en la época del turismo en masa afecta a muchas personas (Hans, 1981; Mossel y García, 1985; Pelczar y col., 1988; Doyle y col., 1997; ICMSF, 1998; Nicholas, 1999).

Se prosiguieron los estudios y Lupski y Feigin (1988), sugirieron que este grupo de *Escherichia coli* patógenos se denominara, en general, *Escherichia coli* enterovirulentos (Enteric Virulent *Escherichia coli*).

De las cepas *Escherichia coli* enterovirulentas existen portadores asintomáticos que pueden contagiar a niños y adultos, sobre todo en casas con condiciones higiénicas deficientes, guarderías, residencias, etc., por la misma causa.

Aunque *Escherichia coli* es un microorganismo habitual del intestino humano y otros animales, las cepas que producen diarrea, exceptuando las enterohemorrágicas, son de origen humano. En cuanto a los alimentos, la transmisión de cepas enterotoxigénicas que han dado origen a enfermedad están en el agua de bebida, leche, ensaladas vegetales, queso de pasta blanda, etc.

Dentro de los *Escherichia coli* enterovirulentos, las cepas enteroinvasivas, además de poseer las propiedades comunes de los otros tipos patógenos tienen, por otra parte, ciertas propiedades atípicas que se relacionan con *Shigella* (inmovilidad, similitud bioquímica, algunas cepas no producen gas de la glucosa ni de otros azúcares, su fermentación lenta de la lactosa).

Las cepas citopatogénicas penetran en el intestino e invaden las células epiteliales del colon donde se multiplican y producen su muerte. Esto da lugar a la producción de ulceraciones cuya consecuencia es una diarrea sanguinolenta. La enfermedad que producen estas cepas es más grave que la de cepas enterotoxigénicas.

Los síntomas que ocasionan las cepas de *Escherichia coli* enteroinvasivas aparecen entre las 8 y 24 horas posteriores a su ingestión. Se manifiestan con escalofríos, malestar, dolor de cabeza, mialgia, fiebre, retortijones abdominales y diarrea profusa sanguinolenta. Es muy parecido a *Shigella* y, en su identificación, se puede confundir con ella. La enfermedad dura días y, aun, semanas. No se conoce bien la existencia de portadores asintomáticos de cepas enteroinvasivas. Su transmisión se hace de persona a persona por manipulaciones poco higiénicas y por falta de higiene personal, así como a través del agua, leche, queso, carne de ave y otros.

Las cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas dan lugar a una patología entérica muy parecida a la de las cepas enterotoxigénicas. Han sido la causa de numerosos brotes en guarderías y otras comunidades infantiles donde no se contaba con buenas condiciones higiénicas. Son los niños los más afectados. La enfermedad es más frecuente en países subdesarrollados, con condiciones de vida muy deficientes. Los clásicos tipos de dispepsia infantil por *Escherichia coli* pertenecen a este grupo. Se han citado algunos casos en adultos, aunque excepcionalmente, ya que parece que las personas van adquiriendo inmunidad con el transcurso del tiempo.

Las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas son aquellas que elaboran una toxina termolábil y/o una toxina termoestable. La primera se inactiva a una temperatura de 60 °C aplicada durante 30 minutos, y la segunda resiste a más de 100 °C aplicados durante 30 minutos. El microorganismo actúa colonizando el epitelio del intestino delgado, donde elabora la(s) toxina(s). La toxina termolábil rompe la función celular del epitelio intestinal produciendo secreción de agua y electrolitos que vierten en la luz intestinal produciendo diarrea acuosa profusa. La toxina termoestable, menos estudiada, probablemente actúa de forma análoga. Los síntomas de la toxina termolábil se asemejan a los del cólera. Los brotes de toxina termoestable son menos frecuentes. Los síntomas producidos por las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas se inician entre las 8 y las 44 horas que siguen a la ingestión del producto contaminado con el microorganismo. La enfermedad se manifiesta con diarrea acuosa, no sanguinolenta y, a veces, mucosa. Se producen retortijones, dolor abdominal, malestar general, náuseas, vómitos y, si aparece fiebre, ésta es leve. Los síntomas duran entre 3 y 9 días (Pelczar y col., 1988; ICMSF, 1998; Pascual y Calderon, 2000).

Las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas son probablemente las más importantes entre los *Escherichia coli* verotoxigénicos, y la toxina involucrada se denomina verotoxina (ICMSF, 1998; Pascual y Calderon, 2000). El serotipo representativo es el O157:H7. Se identifica como la causa de la colitis hemorrágica que con frecuencia se asocia principalmente con la ingestión de carne picada de ganado vacuno poco cocinada, aunque también pueden tenerse en cuenta otras carnes de abasto (cerdo, ovino y aves). El microorganismo, después de ser ingerido, coloniza el intestino grueso, dando lugar a varias formas de manifestación patógena (Doyle y col., 1997):

- Colitis hemorrágica.
- Síndrome urémico hemolítico (HUS).
- Púrpura Trombótica Trombocitopénica (TTP).

En la colitis hemorrágica se produce dolor abdominal, a veces vómitos, diarrea acuosa sanguinolenta y poca o ninguna fiebre. Los síntomas aparecen a los 3-9 días después de la ingestión del alimento contaminado. La enfermedad dura 2-9 días.

En el HUS, hay diarrea sanguinolenta y, sobre todo en niños, fallo renal agudo que puede terminar en muerte. No hay fiebre.

La TTP es, en cierto modo, parecida al HUS. No hay fiebre, existe hemorragia gastrointestinal y, en este caso, puede verse afectado el sistema nervioso central. A los enfermos se les pueden formar coágulos en el cerebro, con el peligro de muerte. Como esta cepa procede, principalmente, del ganado vacuno son, la carne poco cocinada, sobre todo la picada y la leche cruda los alimentos más involucrados en esta enfermedad. Los brotes son más frecuentes en guarderías, residencias de ancianos etc. por la mayor sensibilidad de estos seres. En todos los casos la aparición de la enfermedad se corresponde con falta de higiene.

E. coli O157:H7 tiene unas características propias que se pueden usar en su aislamiento e identificación:

- No fermentan el sorbitol.
- No producen la enzima beta-glucuronidasa (en la prueba MUG estas cepas no dan fluorescencia por carecer de la enzima citada).

7.1.6 – Características de crecimiento y de supervivencia de *Escherichia coli* O157:H7

7.1.6.1 – Temperatura

Algunas cepas de *E. coli* patógeno son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como 7 °C y tan altas como 46 °C, siendo la escala de crecimiento óptimo 35 – 40 °C. Sin embargo, *E. coli* O157:H7 tiene un intervalo de crecimiento ligeramente más limitado, con una temperatura mínima de crecimiento de 8 °C, una máxima de aproximadamente 44 – 45 °C y una óptima de 37 °C. Distintos estudios de inactivación térmica han revelado que *E. coli* O157:H7 es más sensible al calor que las cepas típicas de *Salmonella* spp. Por esta razón, los tratamientos térmicos que son suficientes para destruir *Salmonella* también deberían provocar la muerte de *E. coli* O157:H7 (ICMSF, 1998).

Los estudios de inactivación térmica de *E. coli* O157:H7 en la carne picada han revelado que el patógeno tiene resistencia con valores D de 270, 45, 24 y 9,6 segundos a temperaturas de 57,6, 60, 62,8 y 64,3 °C, respectivamente (Doyle y Schoeni, 1984). La presencia de grasa aumenta la termotolerancia de *E. coli* O157:H7 en la carne picada, con valores D para las carnes de vaca magra (2 % grasa) y para la carne de vaca grasa (30,5 %) de 4,1 y 5,3 minutos, respectivamente, a 57,2 °C y de 0,3 y 0,5 minutos, respectivamente, a 62,8 °C (Line y col., 1991).

También se ha determinado que la pasteurización de la leche (72 °C, 16,2 segundos) es tratamiento eficaz que destruirá más de 10^4 células de *E. coli* O157:H7 por ml (D'Aoust y col., 1988). Por tanto, se destruye a temperatura de pasteurización y también durante su almacenamiento en frío, sobre todo a la temperatura de congelación.

7.1.6.2 – pH

El efecto del pH sobre el crecimiento depende del tipo de ácido presente. *E. coli* O157:H7 es capaz de crecer a un pH 4,5 ajustado con HCl, pero no en un medio cuyo pH ha sido ajustado con ácido láctico. *E. coli* no crecerá en quesos fermentados a pH ≤ 5.4 . (ICMSF, 1998). El serotipo *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir durante mucho tiempo en alimentos ácidos o fermentados (Cameron y col., 1995; ICMSF, 1998). Cuando *E. coli* O157:H7 fue inoculado a niveles elevados, sobrevivió en la mayonesa (pH 3,6 a 3,9) durante 5 a 7 semanas a 5 °C y durante 1 a 3 semanas a 20 °C (Zhao y Doyle, 1994), y sobrevivió en la sidra de manzana (pH 3,6 a 4,0) durante 10-31 días o 2-3 días a 8 ó 25 °C, respectivamente. Los estudios que utilizaron los ácidos acético, cítrico, o láctico en concentraciones de hasta 1,5%, como los pulverizadores de ácidos orgánicos sobre la carne de vaca, revelaron que las poblaciones de *E. coli* O157:H7 no resultaban afectadas de forma sensible por ninguno de los tratamientos (Brackett y col., 1994; Doyle y col., 2000).

7.1.6.3 – Actividad de agua

Se ha determinado que *E. coli* puede crecer en un 6 % de NaCl y toleran mejor el cloruro sódico y nitrito sódico que las cepas típicas de *Salmonella* spp. La cepa *E. coli* O157:H7 es capaz de crecer, aunque lentamente, en un caldo que contenga 6.5 % de NaCl, pero no al 8.5 % (ICMSF, 1998).

7.1.6.4 – Refrigeración

A temperatura de refrigeración (3-7 °C), *E. coli* patógeno generalmente sobrevive bien en los alimentos con una reducción de $10^{0.5}$ a $10^{1.5}$ durante un almacenamiento de 1–5 semanas. En carne picada de vacuno, en poblaciones de *E. coli* O157:H7 después de haber permanecido durante 9 meses a –20 °C, se observa una pequeña modificación o no se observa modificación alguna, mientras que las poblaciones de *E. coli* no patógeno después de haber permanecido 38 semanas a –25,5 °C se reducen 10 veces (ICMSF, 1998). Cuando se conservaron a 5 °C, las poblaciones de *E. coli* O157:H7 disminuyeron en la lechuga troceada, en el pepino cortado en dados y en la zanahoria troceada.

7.1.6.5 – Irradiación

De modo parecido a los estudios de la inactivación térmica, los estudios de la irradiación han revelado que *E. coli* no patógeno no tiene una resistencia singular a la radiación gamma por lo que debería ser destruido por los tratamientos de una intensidad suficiente para eliminar los organismos de *Salmonella* (ICMSF, 1998).

7.1.6.6 – Desinfectantes

El *E. coli* no patógeno no tiene una resistencia singular al cloro, por lo que debería ser destruido por los tratamientos de una intensidad suficiente como para destruir a *Salmonella* (ICMSF, 1998).

7.1.6.7 – Atmósfera

A 12 y 21 °C, las cifras de microorganismos *E. coli* O157:H7 aumentaron rápidamente en la lechuga y en el pepino en atmósferas compuestas por un 3 % de oxígeno y un 97 % de nitrógeno, parecidas a las que se utilizan a escala comercial (Abdul-Raouf y col., 1993; ICMSF, 1998).

7.1.7 – Prevalencia de *Escherichia coli* en algunos alimentos

En la actualidad es difícil determinar hasta qué punto este microorganismo está implicado en enfermedades transmitidas por los alimentos a nivel mundial, pudiendo su implicación ser subestimada debido a que las técnicas de caracterización y aislamiento no son apropiadas para el análisis microbiológico de rutina, y porque pocos laboratorios están suficientemente dotados de material para identificar a este patógeno (ICMSF, 1998; Cuno, 2002).

Distintos frutos secos pueden estar contaminados por *Escherichia coli* (Banwart, 1982). Marcus y col. (1973) aislaron *Escherichia coli* del 23 % de las muestras de pacanas (árbol de América del Norte) procedentes de huertos donde pastaban animales, en contraste con el 4 % de los huertos vetados a los mismos. Sin embargo, incluso en el suelo sin manipular de los campos de almendros, Kokal y Thorpe (1969) constataron una incidencia de *Escherichia coli* del 25 %. Aunque las almendras maduras no contienen *Escherichia coli*, a medida que iban madurando aparecía *Escherichia coli* hasta afectar a cerca del 40 % durante la recolección y el tratamiento, antes de descascarillar. Banwart (1982), refiere que Hall y col. (1967) analizaron los coliformes y *Escherichia coli* en diversos alimentos, encontrando esta especie en el queso y productos derivados (75 % de las muestras), pescado de río y de mar (30 %), verdura cruda y congelada (15,8 %), alimentos preparados (50 %), carne cruda (76,5 %) y bocadillos (16,3 %). Sólo 30 de 74 porciones de carne de buey contenían 10 ó más *Escherichia coli* por gramo (Sarkiewicz y col., 1975). Doyle (1991) relacionó la aparición de brotes de *Escherichia coli* enterohemorrágico con el consumo de carne picada de vacuno insuficientemente cocida.

Las investigaciones llevadas a cabo en Wisconsin, EEUU, respecto a *E. coli* O157:H7 en los alimentos, revelaron que hasta el 3 % de la carne picada de vacuno que se vende al por menor y el 1-2 % de la carne de cerdo y de aves de corral estaban contaminadas con el microorganismo (ICMSF, 1998). Las hamburguesas crudas o poco cocinadas (estando implicadas en casi todos los brotes documentados y en casos esporádicos) y la leche cruda son los alimentos más frecuentemente asociados a la infección con *E. coli* O157:H7 (Cuno, 2000).

En años recientes la frecuencia de las infecciones causadas por *E. coli* O157:H7 se está asociando al consumo de frutas y vegetales frescos, particularmente como resultado de la baja demanda de productos procesados (Beuchat, 1996; De Roever, 1998; Francis y col., 1999; Nguyen-The y Carlin, 2000).

La resistencia a los ácidos puede permitir que este patógeno sobreviva en medios ácidos como zumos de fruta, sidra de manzana, mayonesa, salchichas fermentadas o salami seco, sobreviviendo también en los ácidos del estómago del hombre (Small y col., 1994; Benjamín y Datta, 1995).

En 1980, 13 niños canadienses fueron diagnosticados con síndrome urémico hemolítico (HUS), siendo relacionados estos casos al consumo de sidra de manzana. Debido a que los pacientes manifestaron diarrea con sangre y calambres abdominales previos al comenzar el HUS, se ha creído que la causa fue el agente *E. coli* O157:H7 (Steele y col., 1982).

En 1992, la sidra de manzana fresca fue de nuevo vehículo de *Escherichia coli* O157:H7 infectando a 18 personas en Massachusetts, EE.UU. (Besser y col., 1993).

Numerosos estudios han demostrado que *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir en alimentos ácidos refrigerados durante semanas. Y han verificado que la supervivencia es más prolongada a temperatura de refrigeración que a temperatura ambiente (Zhao y Doyle, 1994; Weagant y col., 1994; Tsai y Ingham, 1997).

En 1996 se registraron otros brotes en varios estados de los EE.UU. en los cuales estaba implicado este patógeno después del consumo de zumo de manzana fresco (CDCP, 1996, 1997).

Se destruye a temperatura de pasteurización y también durante su almacenamiento en frío, sobre todo a temperatura de congelación.

7.1.8 – Incidencia de *Escherichia coli* O157:H7 en España

En España, los cuadros de enfermedad debidos a *E. coli* O157:H7 no son objeto de declaración obligatoria, excepto si los mismos proceden de un brote (Soler Crespo y col., 1998). Algunos datos de incidencias registradas en España por *Escherichia coli* son los siguientes:

1.- Según Margall y col. (1997), desde octubre de 1986 a junio de 1997, se había comunicado en España el aislamiento de 24 cepas de *E. coli* verotoxigénico (ECVT) de origen humano, de los cuales 23 correspondieron a cepas de *E. coli* O157:H7 ó H- y una cepa de *E. coli* O128:H-.

2.- En el Laboratorio de Enterobacterias del Centro Nacional de Microbiología fueron confirmados la identificación de 4 casos: Tres de ellos eran casos esporádicos en Madrid en el año 1996, uno de los cuales desarrolló HUS (Anónimo, 1996). El otro caso era procedente de un brote de 11 afectados en un grupo de turistas de distintas nacionalidades que tuvo lugar en Fuerteventura en el año 1997 (Anónimo, 1997).

3.- De 1992 a 1997 el Sistema de Información Microbiológica tiene registrados 11 casos detectados (Soler Crespo y col., 1998).

4.- Entre los años 1989 y 1997, 13 laboratorios de microbiología clínica de hospitales generales y de los centros de investigación de las provincias respondieron a una encuesta para conocer la situación en España con relación al diagnóstico de este agente. Se obtuvieron los siguientes resultados: en Galicia se realizaron 58 aislamientos (se halló un buen número de aislamientos ya que existe un grupo de investigación de la Universidad de Santiago de Compostela que estudia este ECVT), en Cataluña 8, Castilla y León 7, Canarias 5, País Vasco 4, Madrid 3, Navarra 1, Castilla-La Mancha 1 y Andalucía 1 (Soler Crespo y col., 1998).

5.- Ocho niños de una guardería de Guipúzcoa resultaran afectados en 1999, de los cuales 1 manifestó el HUS y 6 casos fueron sintomáticos.

6.- En Barcelona, en septiembre del 2000, se produjo un brote de toxiinfección alimentaria que afectó a 181 personas, en su mayoría niños menores de cinco años, de los cuales seis desarrollaron el HUS causado por *Escherichia coli* O157:H7, productor de la Stx2 del fagotipo 2 (Anónimo, 2001; Cuno, 2002).

7.- De acuerdo con Hernández-Pezzi y col., (2004) y Cevallos, y col. (2005), en el decenio de 1993-2003, los brotes de *Escherichia coli* enterohemorrágico transmitidos por los alimentos (excluyendo los casos hídricos) publicados en el Boletín Epidemiológico Semanal fueron: 1 en 1998; 2 en 1999; 1 en 2000 y 2 en 2003.

8.- En el año de 2006, hasta la semana del 11 de Marzo, fueron identificados 4 casos de *E. coli* O157:H7, declarados al sistema de información microbiológica (BES, 2006).

7.1.9 – Prevención y control

Las medidas de prevención de infecciones por *Escherichia coli* vehiculada por los alimentos deben tender, en primer lugar, a evitar que los alimentos frescos (leche, carne) puedan ser un vehículo de las cepas mediante el adecuado control de la pasteurización/esterilización de la leche (Doyle y col., 1997). La higiene en la obtención de la carne en el matadero (ICMSF, 2001) y el decomiso de los animales afectados de colibacilosis. En segundo lugar, se vigilará también la posible contaminación de origen exógeno de los alimentos frescos y la recontaminación de los alimentos higienizados; la refrigeración adecuada de los alimentos impedirá el posible crecimiento de cepas de *Escherichia coli* enteropatógeno presentes en los mismos (Mossel y García, 1985). La formación de los operarios que manipulan los alimentos en cuanto a técnicas de manipulación e higiene son fundamentales. Además, se recomienda no utilizar aguas residuales humanas o animales para abonar las hortalizas y los cultivos que se emplean para el consumo humano (ICMSF, 1998).

La aplicación de sistemas de Análisis de Peligros y de Puntos de Control Crítico (APPCC) o HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) a todos los sectores de la cadena, desde la producción, pasando por el procesado, el transporte y la venta, hasta su uso en los establecimientos de servicios alimentarios o en hogares, es una de las medidas de prevención más eficaz.

En resumen, como medidas preventivas generales se recomienda (Eduardo, 1996; Frazier y Westhoff, 1985; Cuno, 2000):

- Cocinar/cocer bien los alimentos.
- Evitar consumir leche sin pasteurizar.
- Lavar las manos cuidadosamente antes de preparar y consumir alimentos.
- Utilizar agua potable.
- Lavar las frutas y vegetales antes de manipularlos y consumirlos.
- Evitar la contaminación cruzada (contacto de alimentos cocinados con crudos).
- Formación continúa de los manipuladores y consumidores.

7.2 – Salmonella

7.2.1 – Historia

El primero en deducir que la fiebre tifoidea era transmitida por el agua y por los alimentos fue Budd en 1874. *Salmonella typhi*, el agente etiológico de la enfermedad, fue descubierto en 1880 por Eberth y aislado en 1884 por Gaffky. *Salmonella cholerae-suis* (la especie tipo) fue aislada en cerdos en los que se diagnosticó clínicamente que padecían de peste porcina (Salmón y Smith, 1885).

El nombre del género fue acuñado por Lignières en 1900 en honor de la investigación del Dr. Salmón. El primer brote de salmonelosis transmitida por alimentos confirmado en el laboratorio implicó a 57 personas que comieron carne de una vaca enferma (ICMSF, 1998).

7.2.2 – Taxonomía

Salmonella es un género bacteriano, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Brenner, 1984). Son gérmenes de forma bacilar, no formadoras de esporas, habitualmente móviles mediante flagelos peritricos, aunque *S. pullorum*, *S. gallinarum* y algunas mutantes de otras serovariedades son inmóviles. Gram negativos, aerobios-anaerobios facultativos, fermentan la glucosa con producción de gas. No fermentan la lactosa. Reducen nitratos a nitritos. Suelen ser catalasa-positivos y oxidasa negativos. Forman colonias típicas sobre medios de cultivo sólidos y poseen características bioquímicas y serológicas definidas (ICMSF, 1998; Pascual y Calderon, 2000).

La mayoría de las cepas, salvo *S. typhi*, son aerógenas, utilizan citrato como única fuente de carbono, descarboxilan la lisina, la arginina y la ornitina y producen sulfuro de hidrógeno. La reacción de rojo de metilo es positiva, la prueba de Voges-Proskauer es negativa y la prueba del indol es negativa. La fenilalanina no es desaminada, la urea no es hidrolizada, la gelatina no es licuada rápidamente en los medios nutritivos y no son producidas ni DNAasa ni lipasa (ICMSF, 1998).

En el *Bergey's Manual* (Brenner, 1984) el género se subdivide en cinco subgéneros, basados en la hibridación DNA/DNA, en las características bioquímicas y en el sitio habitual donde se aíslan. El subgénero I contiene las *Salmonellas* patógenas típicas que se aíslan en el contenido intestinal de los animales de sangre caliente. Los subgéneros II y III, que incluyen los organismos anteriormente denominados *Arizona*, se aíslan frecuentemente en los animales de sangre fría. Los subgéneros IV y V se encuentran principalmente en el ambiente y rara vez se identifica como patógenos para los seres humanos.

Posteriormente se propuso que *Salmonella* se designase a una especie única, *Salmonella entérica*, subdividida en siete subespecies (Le Minor y Popoff, 1987) que se diferencian entre sí mediante la hibridación DNA/DNA o por las propiedades bioquímicas. Estas siete subespecies son: subesp. *entérica* (I), subesp. *salamae* (II), subesp. *arizonae* (*arizonae* IIIa monofásica), subesp. *diarizonae* (*arizonae* IIIb difásica) subesp. *houtenae* (IV), subesp. *bongori* (V), subesp. *indica* (IV). Las

cuatro primeras subespecies se corresponden con la clasificación Kaufmann. Cada especie se divide en serovariedades basadas en los antígenos O y H (Le Minor, 1988).

Han sido identificadas aproximadamente 2.200 serovariedades de *Salmonella* spp., aunque de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White son posibles 20.000 combinaciones (Ewing, 1986). En este esquema las serovariedades se definen por medio de una serie de números y letras que representan 64 antígenos O (somáticos), Vi (capsulares) y H (flagelares) diferentes. Las determinaciones genéticas de los factores antigénicos suelen ser estables y, por esta razón, resultan útiles en las investigaciones epidemiológicas. Sin embargo, existen algunas serovariedades plásmido-dependientes, y por tanto se les atribuye un menor valor epidemiológico por su menos estabilidad antigénica. Las serovariedades se pueden subdividir por las características bioquímicas (biovariedades o biotipos), por la resistencia a bacteriófagos (fagovariedades o lisotipos), a los antibióticos o metales pesados, y por la producción de bacteriocinas o por la producción de estas. En algunos casos dichas características pueden depender del DNA extracromosómico, pero suelen ser estables durante el tiempo que dura un brote transmitido por alimentos (ICMSF, 1998).

7.2.3 – Hábitat

La mayoría de los representantes de la familia se encuentran en el trato intestinal del hombre y de los animales, bien como patógenos, bien como comensales (D'Aoust, 1991a).

En el ambiente las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* spp. están presentes en los afluentes de los ríos, y heces secas de los animales, en el lodo residual de arroyos y aguas costeras, con el consiguiente riesgo de diseminación. En grupos de animales destinados al consumo humano, pueden permanecer viables durante varios meses y pueden ser diseminadas por aerosoles y el polvo, originando una contaminación ambiental acumulativa (ICMSF, 1998).

7.2.4 – Patogenicidad de *Salmonella*

Algunas serovariedades (por ejemplo, *S. typhi*, *S. paratyphi* A., *S. paratyphi* C y *S. sendai*) están adaptadas al hombre como hospedador y generalmente causan síndrome septicémico-tifoideo en los seres humanos. Las demás serovariedades, sin embargo, causan gastroenteritis en el hombre. La fiebre tifoidea es muy común en algunos países en desarrollo, mientras que es rara en los países desarrollados en los que la gastroenteritis causada por *Salmonella* se encuentra entre las causas principales de morbilidad por consumo de alimentos. Las serovariedades implicadas varían de acuerdo con la zona geográfica, pero frecuentemente incluyen a *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. agona*, *S. newport*, *S. infantis*, *S. panama*, *S. saint paul* y *S. welteveden*. En la actualidad *S. enteritidis* ha llegado a ser la serovariedad predominantemente responsable de la enfermedad, seguida de *S. typhimurium* (ICMSF, 1998).

La enterotoxina causante de diarrea figura de modo predominante como un factor de virulencia de *Salmonella* debido a su capacidad para producir síntomas clínicos manifiestos en los casos humanos de salmonelosis. Es una proteína termolábil con un peso molecular de 90 a 110 kDa (D'Aoust, 1991).

En contraposición a varios patógenos bacterianos como *Yersinia*, *Shigella*, y cepas enteroinvasoras de *Escherichia coli*, que se multiplican dentro del citoplasma de las células hospedadoras, las salmonellas están encerradas en vacuolas endocitóticas donde empieza la replicación bacteriana en un plazo de horas después de la interiorización (García-del Portillo y Finlay, 1994; D'Aoust, 2000).

7.2.4.1 – Población susceptible

Son muy sensibles los bebés y los niños de corta edad, las personas ancianas, las personas desnutridas y las personas con resistencia reducida debido a otras infecciones o a enfermedades crónicas. El sistema inmunológico desarrollado incompletamente en los recién nacidos y los niños, las respuestas inmunológicas débiles y/o retardadas en las personas ancianas y debilitadas, y la producción de

ácido en el estómago, generalmente escasa en los niños y en las personas de edad, facilitan la colonización intestinal y la diseminación sistémica de las salmonellas en ese segmento de la población. Las muertes como consecuencia de salmonelosis se dan principalmente en las personas ancianas (ICMSF, 1998; D'Aoust, 2000).

En las gallinas, la gastroenteritis aguda acompañada de una elevada mortalidad ha sido causada por *S. pullorum* y *S. gallinarum*, organismos que están adaptados a las aves de corral como hospedadores y son de escasa patogenicidad para los humanos. Determinados fagos de *S. enteritidis* han llegado a ser un problema grave en las manadas reproductoras, en los pollitos y en los huevos como consecuencia de la transmisión ovárica (ICMSF, 1998).

S. cholerae-suis y *S. typhi-suis*, causan gastroenteritis en los lechones. El hábito de revolcarse y de introducir las patas en los comedores facilita la contaminación del pelo y de la piel. *S. dublín* y *S. typhimurium* son aislamientos habituales en ganado vacuno.

Se han aislado salmonellas en muchos otros animales mamíferos (por ej., en las cabras, ovejas, caballos, gatos, perros, camellos, búfalos, elefantes, canguros, liebres, visones, conejos, murciélagos, ballenas, delfines, ratas, ratones, cobayas), en las aves (por ej., en los gorriones, gaviotas, palomas, patos, gansos), en los reptiles (por ej., en las tortugas de mar, tortugas de tierra, culebras, lagartos, cocodrilos), en los anfibios (por ej., en las ranas, sapos), en los artrópodos (por ej., en los camarones, cucarachas), en los peces (por ej., en los siluros), y en los insectos (por ej., en las moscas) (ICMSF, 1998).

En la mayoría de los animales domésticos, el estrés durante el transporte incrementa la excreción de salmonellas. Y la diseminación del microorganismo se ve aumentada en los mataderos durante el descanso de los animales que aguardan el sacrificio, y por la contaminación cruzada en la cual intervienen los manipuladores de alimentos.

7.2.4.2 – Dosis infectante

Investigaciones detalladas de brotes transmitidos por alimentos han indicado que la ingestión de sólo unas cuantas células de *Samonella* puede resultar infecciosa. Datos científicos indican que de 1 a 10 células pueden constituir una dosis infectiva humana (D'Aoust y col., 1985; Kapperud y col., 1990).

En la salmonelosis, los factores determinantes no están limitados a la heterogeneidad inmunológica en las poblaciones humanas ni a la virulencia de las cepas infectantes, sino que también influyen la composición química de los vehículos alimentarios implicados. El denominador común de los alimentos relacionados con dosis bajas fue el elevado contenido en grasa. La inclusión de salmonellas en el interior de las micelas de lípidos hidrófobos posiblemente puede proporcionar protección contra la actividad bactericida de la acidez gástrica (D'Aoust, 2000).

7.2.4.3 – Período de Incubación

Un estudio epidemiológico en profundidad de un brote por *Salmonella typhimurium* provocado por un pollo servido a los delegados de un congreso médico, demostró que el curso clínico en los enfermos estaba relacionado directamente con el número de salmonellas ingeridas (Glynn y Palmer, 1992). El período de incubación para el comienzo de los síntomas estaba relacionado inversamente con la dosis infecciosa. Los enfermos con períodos de incubación cortos (≤ 22 h) padecieron movimientos intestinales diarreicos más frecuentes, temperaturas corporales máximas más elevadas, mayor persistencia de los síntomas clínicos, y mayor frecuencia de hospitalización. Curiosamente no se observó relación alguna entre la edad de los individuos infectados y la duración del período de incubación (D'Aoust, 2000).

7.2.4.4 – Síntomas

De acuerdo con el ICMSF, (1998) los síntomas se pueden caracterizar de la siguiente manera:

Gastroenteritis

El período de incubación varía desde 5 horas a 5 días. Los signos y los síntomas empiezan 12 – 36 horas después de la ingestión de los alimentos contaminados. Los signos y síntomas incluyen diarrea (que varía de unas pocas heces claras parecidas a la sopa de hortalizas hasta evacuaciones sólidas con deshidratación concomitante), náuseas, dolor abdominal, fiebre ligera y escalofríos. A veces hay vómitos, abatimiento, anorexia, cefalalgia y malestar. El síndrome suele durar 2 – 5 días.

Fiebre entérica

El período de incubación con duración media de 14 días, dependiendo principalmente de la dosis, varía de 7 a 28 días. Hay malestar, cefalalgia, fiebre alta persistente, dolor abdominal, dolores en el cuerpo y debilidad, generalmente acompañados de una diarrea parecida al puré de guisantes o de estreñimiento. A veces, en el tronco, en el dorso y en el tórax, aparecen manchas de color rosa. Otras veces se observan un ritmo cardíaco lento, un abdomen sensible y dilatado, un aumento del tamaño del bazo y en ocasiones hemorragia intestinal o nasal. Los sentidos están embotados y los pacientes pueden llegar a desvariar.

Bacteriemia, infecciones focales y secuelas

La bacteriemia o septicemia es causada por la presencia de salmonellas en la sangre. Esto sucede por metástasis cuando el sitio inicial de la infección es el tracto intestinal u otros focos. El resultado es una fiebre alta y persistente, dolor en el dorso, en el abdomen y en el tórax, escalofríos, sudoración, malestar, anorexia y pérdida de peso. El estado puede ser pasajero o crónico. Las cepas de *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, y de *S. dublin* son propensas a invadir la corriente sanguínea y pueden sobrevenir infecciones focales de varios tejidos. En ocasiones se pueden identificar secuelas como: apendicitis, artritis, colecistitis, endocarditis, abscesos locales, meningitis, osteomielitis, osteoartritis, pericarditis, peritonitis, pleuritis, neumonía e infección de las vías urinarias (Smith y col., 1993; ICMSF, 1998).

7.2.5 – Características de crecimiento y de supervivencia de *salmonella*

El género *Salmonella* está integrado por microorganismos resistentes que se adaptan fácilmente a las condiciones extremas del medio (D'Aoust, 2000).

En la Tabla 3 están presentadas las condiciones límites de temperatura, pH y a_w para el crecimiento de *Salmonella*.

Tabla 3. – Condiciones límites para el crecimiento de *Salmonella* (ICMSF, 1998).

Condiciones	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura °C	5,2 ¹	35 – 43	46,2
pH	3,8	7 – 7,5	9,5
a_w	0,94	0,99	>0,99

7.2.5.1 – Temperatura

A pesar de un primer informe de crecimiento de salmonellas en natillas y en pollo en salsa rey inoculados a 45 °C (Angelotti y col., 1961), la evidencia mas reciente indica que la exposición prolongada de cepas mesófilas a condiciones de estrés térmico se traduce en mutantes de *Salmonella typhimurium* capaces de crecer a 54 °C (Droffner y Yamamoto, 1992). Aunque todavía no ha sido esclarecido el mecanismo de este fenómeno, los hallazgos preliminares indican que dos mutaciones independientes permiten a *Salmonella typhimurium* crecer activamente a 48 °C y a 54 °C (D'Aoust, 2000).

La viabilidad de las salmonellas en los alimentos secos almacenados a temperatura ≥ 25 °C disminuye con el aumento de la temperatura de almacenaje y con el aumento del contenido de humedad (Corry, 1976; D'Aoust, 1989).

Si bien la termorresistencia de *Salmonella* spp. aumenta a medida que disminuye la a_w del medio de calentamiento, estudios detallados han demostrado que los solutos utilizados para modificar la a_w del medio de calentamiento desempeña un papel determinante en el nivel de resistencia adquirida (D'Aoust, 1989). El calentamiento

¹ La mayoría de los serotipos no crecen a temperaturas <7°C

de *Salmonella typhimurium* en medio ajustado a a_w 0,90 con sacarosa y glicerol confirió niveles diferentes de termorresistencia, según se puso de manifiesto por los valores $D_{57,2}$ de 40 a 55 y de 1,8 a 8,3 minutos, respectivamente (Goepfert y col., 1970).

7.2.5.2 – pH

La capacidad de adaptación fisiológica de *Salmonella* spp. se demuestra por su capacidad de multiplicarse a valores de pH que varían desde 3,8 hasta 9,5. Los efectos bacteriostáticos o antibacterianos de los medios ácidos dependen del acidulante (D'Aoust, 1989). De los ácidos orgánicos formados por los cultivos iniciadores en la carne, en los alimentos lácteos y en otros alimentos fermentados, y de los diversos ácidos orgánicos que se utilizan en la acidificación de productos, los ácidos propiónico y acético son más bactericidas que los ácidos láctico y cítrico asociados a los alimentos corrientes (D'Aoust, 2000).

La primera investigación sobre la propensión para el crecimiento de salmonellas en medios ácidos demostró que las cepas de tipo silvestre acondicionadas previamente en placas de gradiente de pH podían crecer en medios líquidos y sólidos a valores de pH considerablemente más bajos que las cepas originarias (Huhtanen, 1975). Estos hallazgos suscitan preocupaciones con respecto a la inocuidad de alimentos fermentados como los embutidos curados y los productos de leche fresca fermentada, a la acidificación progresiva dependiente del cultivo inicial de la que podría derivar un medio propicio para la elevación de las salmonellas endógenas hacia un estado de acidotolerancia. El crecimiento y/o la supervivencia aumentados de este patógeno bacteriano humano durante el proceso fermentativo, daría como resultado un producto listo para comer contaminado. Un informe revela la supervivencia aumentada de *Salmonella* spp. adaptada al ácido en leche fermentada y durante el almacenamiento (5 °C) de los quesos Cheddar, suizo y Mozzarella (Leyer y Johnson, 1992). Además, la presencia de salmonellas acidotolerantes en estos alimentos aumenta más el nivel del peligro de salud pública porque este rasgo fisiológico adquirido podría reducir al mínimo la actividad antimicrobiana de la acidez gástrica (pH 2,5) y favorecer la supervivencia de las salmonellas en el citoplasma ácido de los

fagocitos mononucleares y polinucleares del hospedador humano (D'Aoust, 1991; 2000).

La exposición breve de *Salmonella typhimurium* a medios ligeramente ácidos de pH 5,5 a 6,0 (prechoque) seguida de la exposición de las células adaptadas al pH de valor $\leq 4,5$ (choque ácido) desencadena una compleja respuesta de acidotolerancia que potencia la supervivencia del microorganismos en medios sumamente ácidos (pH 3,0 a 4,0) (D'Aoust, 2000).

El estrés ácido también puede desencadenar resistencia bacteriana frente a otras condiciones ambientales adversas. El crecimiento de *Salmonella typhimurium* a pH 5,8 originó una resistencia térmica aumentada a 50 °C, una tolerancia aumentada al estrés osmótico elevado (2,5 M de NaCl) atribuida a la síntesis inducida de proteínas OmpC, una mayor hidrofobicidad de la superficie, y una resistencia aumentada al sistema lactoperoxidasa bacteriano y a agentes activos de superficie como el cristal violeta y la polimixina B (Leyer y Johnson, 1993).

7.2.5.3 – Actividad de agua

Los estudios han demostrado que los alimentos con a_w de valores $\leq 0,93$ no sustentan el crecimiento de salmonellas (D'Aoust, 1989). Aunque por lo general las salmonellas son inhibidas en presencia de un porcentaje de sal de 3 a 4 %, la tolerancia de la sal por parte de las bacterias aumenta con el aumento de la temperatura en el intervalo de 10 a 30 °C. Sin embargo, el fenómeno último va acompañado de una fase de latencia prolongada y de una tasa de crecimiento disminuida. Además, la evidencia indica que la magnitud de esta respuesta de adaptación es específica del alimento y de la serovariedad (D'Aoust, 1989). Un informe sobre la anaerobiosis y su potenciación de la mayor tolerancia a la sal en las salmonellas suscita preocupaciones acerca de la inocuidad de los alimentos envasados en atmósfera modificada y de los alimentos envasados al vacío que contienen niveles elevados de sal (Anónimo, 1986).

Varios estudios han subrayado la capacidad aumentada de los microorganismos que crecen en condiciones ácidas (pH $\leq 5,0$) o en medios de salinidad elevada (≥ 2 %

NaCl) al aumentar la temperatura (D'Aoust, 1989; Ferreira y Lund, 1987; Thomas y col., 1992). Un estudio parecido sobre la interrelación entre el pH y el NaCl a temperaturas próximas a la óptima de crecimiento (de 20 a 30 °C), ha subrayado la influencia del pH del medio en el crecimiento de las salmonellas (Thomas y col., 1992). Curiosamente, la presencia de sal en los alimentos acidificados puede reducir la acción antibacteriana de los ácidos orgánicos; las concentraciones bajas de NaCl o de KCl estimulan el crecimiento de *Salmonella enteritidis* en un medio de caldo acidificado hasta 5,19 con ácido acético (Radford y Board, 1995). Estos hallazgos y otros informes sobre la supervivencia aumentada de las salmonellas dependientes de la sal en el suero de cuajo y en la mayonesa, indican que concentraciones bajas de sal pueden desmerecer la actividad conservadora de los ácidos orgánicos y posiblemente ponen en peligro la inocuidad de los alimentos fermentados y acidificados. El papel de la salinidad para restablecer la homeostasis puede estar ligado a los sistemas de antiporte de los protones Na^+/K^+ (Foster y Hall, 1991; Olson, 1993; Foster y Bearson, 1994).

Salmonella typhimurium en su temperatura óptima de crecimiento es capaz de crecer en un medio con 7 % de cloruro de sodio (w/w) (Mañas y col., 2001).

7.2.5.4 – Refrigeración

Las Salmonellas tienen propiedades psicrotróficas, reflejadas en la capacidad de crecer en alimentos almacenados a temperaturas comprendidas entre 2 y 4 °C (D'Aoust, 1991a). Además, el acondicionamiento previo de las células a temperaturas bajas puede aumentar notablemente el crecimiento y la supervivencia de las salmonellas en alimentos refrigerados (Airoldi y Zottola, 1988). Estas características del crecimiento suscitan preocupaciones acerca de la eficacia de las temperaturas de refrigeración para garantizar la inocuidad de los alimentos por medio de la bacteriostasis (D'Aoust, 2000).

7.2.5.5 – Irradiación

La sensibilidad a la radiación puede ser expresada como valores D_{10} . La supervivencia está influida en gran manera por el sustrato en el que son irradiadas las células. La presencia de oxígeno durante el tratamiento con radiación aumenta el efecto letal. Las salmonellas son destruidas más rápidamente mediante irradiación a temperaturas elevadas, pero subletales (por ej., 45-55 °C). A temperaturas reducidas las bacterias son menos sensibles a la radiación ionizante. La resistencia a la radiación aumenta en el estado de congelación. Las condiciones y las dosis de radiación necesarias para eliminar las salmonellas en los alimentos no congelados, congelados o desecados, están perfectamente determinadas y los tratamientos están admitidos por muchas autoridades sanitarias (ICMSF, 1998).

7.2.5.6 – Desinfectantes

Las salmonellas son destruidas fácilmente por los desinfectantes comerciales que se utilizan habitualmente en la industria alimentaria, como es el caso del cloro (ICMSF, 1998).

7.2.5.7 – Atmósfera

Se ha comprobado que las mezclas gaseosas formadas por un porcentaje de 60 al 80 % (vol/vol) de CO_2 con diversos porcentajes de N_2 y/o de O_2 , inhiben el crecimiento de microorganismos aeróbicos de la alteración como *Pseudomonas* spp. sin favorecer el crecimiento de *Salmonella* spp (D'Aoust, 1991a).

Sin embargo, la multiplicación de las salmonellas inoculadas en carne de vaca cruda picada y en carne de cangrejo cocida a temperaturas comprendidas entre 8 y 11 °C en atmósferas modificadas que contienen niveles bajos de CO_2 [20 a 50 % (vol/vol)], justifica la cautela en la aplicación de esta nueva tecnología de tratamiento (Bergis y col., 1994; Ingham y col., 1990a).

7.2.6 – Prevalencia de *Salmonella* en algunos alimentos

Las salmonellas se encuentran en todas las partes y están universalmente reconocidas como agentes zoonóticos. Tal como se ha referido anteriormente, han sido identificados numerosos reservorios animales. Algunos alimentos, especialmente los de origen animal y los que están expuestos a contaminación por aguas residuales, han sido identificados como vehículos para la transmisión de estos patógenos a los seres humanos y para diseminarlos a los ambientes de elaboración y de las cocinas.

De aquí que los alimentos que con más frecuencia dan lugar a casos de salmonelosis son:

- Carnes de los animales que padecen septicemia inducida por *Salmonella*, pero más corrientemente llegan a las superficies de la carne desde el contenido intestinal y desde las heces que se adhieren en el pelo, en la piel y en las patas de los animales cuando llegan para el sacrificio.
- En productos cárnicos y algunos productos de charcutería elaborados con carnes contaminadas.
- Carnes de aves. Las canales y porciones de pavo y de pollo están con frecuencia contaminadas con salmonellas que llegan desde el tracto intestinal o desde la materia fecal existente en las patas y en las plumas. Se recomienda el control del desplumado y la evisceración de las aves y el enfriamiento de las canales así como el respeto de las medidas higiénicas de los operarios y de los utensilios para evitar diseminar la bacteria durante las operaciones subsiguientes de tratamiento, troceado y preparación de las carnes.
- Huevos y ovoproductos. La superficie de la cáscara de los huevos se puede contaminar durante su tránsito a través de la cloaca o cuando se halla expuesta en un ambiente contaminado con material fecal. En las ponederas, la infección transovárica puede tener importancia en la propagación de *S. enteritidis*, lo mismo que ocurre con *S. pullorum* y *S. gallinarum*.

- Leches y productos derivados de la leche. Las salmonellas pueden llegar a la leche por medio de la contaminación de la ubre y de los pezones, menos corrientemente durante infecciones septicémicas de las vacas y posiblemente desde los operarios que manipulan la leche.
- Agua contaminada con aguas residuales han sido vehículos de *Salmonella*, especialmente *S. typhi* (Feachem y col., 1983). Este tipo de aguas contaminadas también acaban por contaminar a los mariscos y los berros recolectados en ellas.

7.2.7 – Incidencia de *Salmonella* en España

En la Tabla 4 se muestran los casos registrados de salmonelosis dentro de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en el decenio de 1993 a 2003.

Durante los años 2002 y 2003 fueron aisladas 1.060 cepas de *Salmonella* spp. implicadas en brotes de origen alimentario, siendo 450 cepas de los 128 brotes notificados en 2002, y 610 cepas de los 177 registrados en 2003. A partir de muestras clínicas de origen humano se fagotiparon 1.376 cepas de *Salmonella typhimurium* en 2002, y 1.428 en 2003.

En el año de 2006, hasta la semana del 11 de Marzo, fueron identificados 120 casos de *Salmonella typhimurium*, declarados al sistema de información microbiológica (BES, 2006).

Tabla 4. – Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en España de 1993-2003*.

Agente Causal	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
<i>E. coli</i> O157:H7	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	2
<i>Salmonella</i> spp.	471	379	433	456	445	554	525	546	577	558	733
<i>Salmonella typhimurium</i>	7	11	5	9	9	8	5	9	10	7	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	39	24	40	39	36	21	22	27	31	22
Otros agentes	416	540	442	382	378	343	374	382	375	325	449
Total	944	969	904	887	871	942	927	960	989	921	1221

*Excluye brotes hídricos. (Adaptado de Hernández-Pezzi y col. (2004); Cevallos y col. (2005).

7.2.8 – Prevención y control

Puesto que pequeñas cantidades de Salmonellas pueden causar enfermedad, es importante garantizar su ausencia en los alimentos listos para comer. Según el ICMSF (1998), los principales procedimientos de control implican

- Una operación de destrucción para garantizar la destrucción de las salmonellas en los alimentos contaminados, especialmente en los productos agrícolas crudos de origen animal;
- Prevención de la contaminación de alimentos listos para comer;
- Almacenamiento de los alimentos a temperaturas bajas o elevadas que impidan el crecimiento de las Salmonellas.

Los animales cuyas carnes se destinan al consumo humano, sobretodo terneros, cerdos y aves considerados sanos, son portadores de *Salmonella* en una tasa que oscila entre el 20 – 30 %. Este microorganismo se aloja en el contenido intestinal y ganglios mesentéricos de los animales de abasto. Los huevos se pueden contaminar en el trato intestinal o con las heces de las aves. En circunstancias especiales, el contraste entre una temperatura exterior más fría y el calor del contenido del huevo da lugar a la creación de un vacío que puede absorber posibles salmonellas de la cáscara, haciéndolas llegar a la yema. No obstante, se han detectado cepas de *Salmonella enteritidis* que colonizan en los ovarios de las aves, pasando a la yema del huevo (Pascual y Calderon, 2000).

Para destruir Salmonellas en los alimentos se han descubierto varios procedimientos que incluyen el empleo de calor, de la irradiación, de la acidificación y de asociaciones de varios factores.

7.3 – *Listeria monocytogenes*

7.3.1 – Historia

Las primeras descripciones de organismos que se parecían a *Listeria monocytogenes* que causaban infección en las personas y en los animales, aparecen en la literatura científica en 1891, cuando el francés Hayen observó en tejido humano unas pequeñas bacterias en forma de bastón. Esta observación fue repetida en 1893 por Henle en Alemania (Gray y Killinger, 1966; Toca, 1998). En 1911 Hülphers, en Suecia, lo volvió a aislar en hígado de conejo, llamándolo por este motivo *Bacillus hepatis* (Donnelly, 1988; Toca, 1998).

En 1926, Murray y col. aislaron una bacteria corta, Gram positiva, asporógena, de forma bacilar, que causaba enfermedad en los conejos y en los cobayas. Los autores la denominaron *Bacterium monocytogenes* porque infectaba a los monocitos (leucocitos) de la sangre.

El primer informe del primer caso de listeriosis humana fue de un soldado de la primera guerra mundial que padeció de meningitis (Rocourt y Brosch, 1992). En 1929, Nyfeldt aisló la bacteria en sangre de pacientes que padecían una enfermedad similar a la mononucleosis infecciosa, llamándola *Listerella monocytogenes hominis* (Donnelly, 1988; Toca, 1998). Desde entonces hasta 1950, muy pocos casos humanos fueron descritos, pero ahora centenares de casos son publicados cada año.

Pirie (1930) aisló un organismo parecido en el hígado de gerbos enfermos y lo denominó *Listerella hepatolytica*, en recuerdo del famoso cirujano Joseph Lister. Como quiera que la denominación “*Listerella*” había sido adoptada anteriormente para un grupo de mohos productores de mucílago, finalmente fue acordada la denominación de *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940; ICMSF, 1998).

La emergencia de listeriosis es resultado de interacciones complejas entre varios factores reflejados en los cambios de los patrones sociales. Estos factores incluyen progresos médicos y consecuentes cambios demográficos, como el aumento de la proporción de personas inmunodeprimidas y ancianos; cambios en la producción

primaria de alimentos (producción a larga escala de materias-primas, modificaciones en los procesamientos tecnológicos alimentarios, expansión de la industria agroalimentaria y desarrollo de sistemas de almacenamiento en frío); y cambios en los hábitos alimentarios (aumento de la demanda del consumo por conveniencia alimentaria que pueden ser vendidos como “ready-to-eat”, refrigerados o congelados, que pueden ser preparados rápidamente y requieren esencialmente una sencilla cocción antes del consumo) y cambios en las prácticas de manipulación y preparación (Rocourt y Cossart, 1997).

7.3.2 – Taxonomía

La *Listeria* es un bacilo corto, regular, de 0,4-0,5 μm de diámetro y 0,5-2 μm de largo con los extremos redondos, no tienen cápsula y son asporógenos. Accidentalmente originan formas cocóides o células aisladas de 10 μm de longitud. Son móviles a 25 °C, gracias a unos flagelos peritricos (1 a 4) mostrando una característica movilidad de “volteo”, pero no son móviles a 37 °C. El desarrollo de flagelos puede ser tan pobre que la movilidad puede llegar a ser imperceptible o nula.

En preparaciones de gota-pendiente, los movimientos de volteo y rotación pueden alternarse con períodos de descanso. Los cultivos en picadura en medios semi-sólidos para la movilidad, producen una forma típica de “paraguas” o “abeto invertido” aproximadamente a medio centímetro de la superficie, porque es microorganismo microaerófilo (Rocourt, 1988; Toca, 1998).

Las colonias tienen un aspecto característico gris-azulado, que cambia a azul-verde cuando se observan con luz oblicua [iluminación de Henry] (Henry, 1933).

Son gram positivos, catalasa-positivos, oxidasa-negativos, y anaeróbios facultativos. Producen citocromos y tienen un metabolismo fermentativo de la glucosa produciendo principalmente L(+) –ácido láctico. Son rojo de metilo positivo y Voges-Proskauer positivo. No utilizan citrato exógeno y no producen indol. Hidrolizan la esculina pero no la urea (Seeliger y Jones, 1986). Solo las especies *L.*

grayi y *L. murrayi* reducen nitratos a nitritos, lo cual se utiliza en la diferenciación de estas especies (Roucourt, 1988).

Fueron identificadas siete especies de *Listeria* todas ellas emparentadas íntimamente, tal como se presentan en la Tabla 5. Una octava especie, anteriormente denominada *Listeria denitrificans*, ha sido reclasificada como *Jonesia denitrificans* (Rocourt y col., 1987). Las especies *L. innocua* y *L. murrayi* (Sin. *L. grayi*) son consideradas apatógenas, mientras que *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. welshimeri* rara vez causan infección humana (Jones, 1991), reservando para *L. monocytogenes* la consideración de especie más importante (ICMSF, 1998).

Tabla 5. – Diferencias entre *Listeria monocytogenes* y otras *Listeria* spp. (ICMSF, 1998).

Especie de <i>Listeria</i>	Fermentación de Carbohidratos			Prueba de CAMP		Hemólisis β
	...	M	R	X	SA	
<i>monocytogenes</i>	-	+	-	+	-	+
<i>innocua</i>	-	±	-	-	-	-
<i>welshimeri</i>	-	±	+	-	-	-
<i>seeligeri</i>	-	-	+	+	-	+
<i>ivanovii</i>	-	-	+	-	+	+
<i>murrayi</i> (<i>grayi</i>)	+	±	-	-	-	-

M, manitol; R, L-ramnosa; X, D-xilosa; +, fermentación de azúcar y formación de gas, prueba de CAMP, fenómeno de Cristie, Atkins, Munich-Petersen, esto es *L. monocytogenes* presenta una zona β -hemolítica típica en placas de agar sangre cuando se siembran por estría a la vez con *Staphylococcus aureus* (SA) y/o *Rhodococcus equi* (RE).

7.3.3 – Hábitat

A pesar de no formar esporas, es capaz de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en medios diferentes. Es un organismo psicrótrofo. Por ello, el alimento se puede contaminar en cualquier eslabón de la cadena alimentaria, y el almacenamiento en frío no inhibe el crecimiento de las listerias.

Ha sido aislada durante décadas en varios ambientes (Rocourt y Cossart, 2000):

- Ensilados;
- Vegetación natural en putrefacción y estiércol;

- Agua de superficie de canales y lagos, zanjas y terrenos ganados al mar en Holanda, efluentes de agua dulce que desaguan en una bahía, y aguas residuales;
- Plantas de tratamiento de alimentos;
- Adheridos en superficies diversas como: acero inoxidable, vidrio, caucho, pavimentos, etc.;
- Alimentos diversos como: leche y productos lácteos, carnes y productos cárnicos, hortalizas, marisco crudo y en productos derivados del pescado, etc.

7.3.4 – Patogenicidad de *Listeria monocytogenes*

La listeriosis es caracterizada por una variedad de síndromes. *Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista, capaz de sobrevivir y de multiplicarse fuera de los hospedadores animales y en medios nutritivos simples. Cuando infecta a los animales o a las personas, se multiplica intracelularmente.

Como se ha presentado anteriormente, no todas cepas de *Listeria* son patógenas. Pero todas las cepas de *Listeria monocytogenes* son hemolíticas y la producción de hemolisina es una de las propiedades asociadas a la patogenicidad, ya que todas las cepas no hemolíticas son apatógenas. Otros factores asociados con la patogenicidad son la producción de una proteína de 60.000 Da y de una fosfolipasa (Farber y Peterkin, 1991).

Existen varios esquemas de tipado de *Listeria monocytogenes*. El serotipado diferencia 13 serovariedades, pero sólo tres de ellas (principalmente la 4b y ocasionalmente la 1/2a y la 1/2b) explican la mayoría de los casos de listeriosis humana (ICMSF, 1998).

7.3.4.1 – Población susceptible

Aproximadamente una tercera parte de las infecciones humanas por *Listeria monocytogenes* son perinatales, afectando a mujeres gestantes y a sus bebés no

nacidos o recién nacidos y las dos terceras partes restantes se presentan en personas no gestantes de todas las edades, mayoritariamente adultas.

Si bien algunos de los casos no relacionados con la gestación no tienen ninguna enfermedad predisponente, la mayoría de las infecciones por *Listeria monocytogenes* se dan en personas cuya inmunidad ha sido menoscabada por la edad, por enfermedades tales como tuberculosis (Ferri, 1992), el cáncer, por el transplante de órganos, por el uso de corticoesteroides o enfermedades como el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), leucemia, linfoma, o mieloma (Rocourt y Cossart, 1997). Las mujeres gestantes también tienen un estado de inmunidad alterado que probablemente explique su mayor sensibilidad (Ferri, 1992; ICMSF, 1998).

La listeriosis es 300 veces más frecuente en pacientes con SIDA que en la población general. Un pequeño porcentaje de pacientes con listeriosis sufre de enfermedades no asociadas habitualmente con la inmunodepresión como es el caso de diabetes, cirrosis, alcoholismo, fallo cardíaco congestivo y lupus eritematoso sistémico (Rocourt y Cossart, 1997).

7.3.4.2 – Dosis infectante

La dosis infectante depende de muchos factores, incluyendo el estado inmunológico del individuo. Los datos publicados indican que el número de *Listeria monocytogenes* en los alimentos contaminados implicados en epidemias y brotes esporádicos fueron superiores a 10^2 UFC/g (Rocourt y Cossart, 1997). Scheider (1990) considera que el número estimado de *Listeria monocytogenes*, necesario para causar la enfermedad en los humanos está entre $10^3 - 10^5$ UFC/g.

7.3.4.3 – Período de incubación

McLauchlin (1994) señala que el período de incubación varía según la forma de transmisión de la enfermedad, aunque en la mayoría de los casos es corto: 1 – 2 días para las lesiones cutáneas, 5 – 12 días para la infección neonatal y 1 día para la de

transmisión alimentaria. Pero diversos autores indican que el período de incubación por transmisión alimentaria en algunos individuos es largo, llegando a ser hasta de 90 días (Toca, 1998). *Listeria monocytogenes* puede ser encontrada en las heces de un porcentaje de la población humana sana, así como en animales, en los que parece ser que es parte integrante de la flora normal (ICMSF 1998).

7.3.4.4 – Síntomas

Los síntomas que causa la infección en los casos perinatales sólo consisten en una fiebre moderada en la madre, acompañada o no de síntomas de ligera gastroenteritis o de tipo gripal, pero con frecuencia las secuelas en el feto o en el recién nacido son importantes o mortales. El feto no siempre resulta afectado gravemente, pero puede manifestar una infección septicémica general abrumadora que afecta a varios órganos y la formación de lesiones granulomatosas (granulomatosis infantiséptica). Muy frecuentemente, la muerte intrauterina del feto se produce antes del tercer trimestre de gestación. En la última fase de gestación el niño puede nacer muerto o nacer prematuramente y estar gravemente enfermo. En estos casos, la septicemia es muy frecuente y en algunos casos va acompañada de meningitis. Ocasionalmente sólo se observan lesiones cutáneas. Se cree que la listeriosis “de aparición tardía” es consecuencia de la infección del niño por la madre durante el parto (o por otro niño infectado) y aparece hasta aproximadamente 10 días después del nacimiento. La infección perinatal de aparición tardía frecuentemente origina meningitis. En los casos que no implican gestación, aproximadamente las dos terceras partes de los enfermos padecen sólo de bacteriemia y aproximadamente una tercera parte padecen meningitis, con o sin bacteriemia (manifiesta). Un pequeño porcentaje tiene lesiones focales, que incluyen endooftalmítis, artritis séptica, osteomielítis, pericardítis y endocardítis, sin bacteriemia manifiesta (ICMSF 1998).

Aunque se cree que la mayoría de los casos de listeriosis son debidos a infección por los medios de los alimentos, en aquellas personas que manejan animales infectados se dan algunas lesiones cutáneas localizadas y algunos empleados de laboratorios han

contraído accidentalmente infecciones oculares por manipular cultivos de listerias (ICMSF, 1998).

La mortalidad suele ser elevada (30 – 40 %) entre individuos inmunodeprimidos, pacientes idosos, y pacientes que sufren infecciones en el sistema nervioso central (Rocourt y Cossart, 1997).

En la Tabla 6 están presentadas las formas clinicopatológicas de listeriosis.

Tabla 6. Formas clinicopatológicas de Listeriosis. (Domingo y col., 1992)

Formas Clinicopatológicas	Vías de Entrada	Especies
Septicémica	Oral	Humano, animales jóvenes de las especies domésticas, roedores, lagomorfos
Abortiva	Oral	Humano, roedores, roedores
Meningítica	Oral	Humano, animales jóvenes de las especies domésticas, roedores, lagomorfos
Romboencefalítica	Neurógena (n. trigemino)	Humano, rumiantes
Miocárdica (postencefalítica)	Oral	Aves domésticas
Cutánea	Contacto	Humano
Querotoconjuntival	Contacto	Humano, rumiantes, roedores, lagomorfos
Mastitis	Oral	Vaca
Endocarditis	Oral?	Humano
Prótesis	Oral?	Humano

7.3.5 – Características de crecimiento y de supervivencia de *Listeria monocytogenes*

7.3.5.1 – Temperatura

La temperatura óptima de crecimiento está entre 30 y 37 °C. Supervive a temperaturas de – 0,1 hasta 45 °C (Walker y col., 1990; Duché y col., 2002). No sobrevive a una temperatura de 60 °C durante 30 minutos (Toca, 1998).

Uno de los hechos del mayor interés, por su trascendencia en la conservación de determinados tipos de alimentos, resulta en lo que se refiere a la resistencia térmica de este microorganismo. Entre las bacterias vegetativas Gram negativas, *L.*

monocytogenes no es insólitamente termorresistente. A no ser que se hallen presentes cifras iniciales muy elevadas (por ej., $10^5 - 10^6$ UFC/ml) no debería resistir el tratamiento comercial de la pasteurización normal de la leche (71 °C a 15 seg.). La resistencia en la nata es parecida a la correspondiente en la leche desnatada, aunque en las carnes, incluyendo el salami, se observan valores más elevados y se indica que la grasa aumenta la resistencia (Fain y col., 1991; ICMSF, 1998). Presenta un punto de muerte térmica de 10 min. a 58 °C., siendo su valor Z de 6,5 °C, lo que en general supone una resistencia térmica 4 veces superior a la de *Salmonella* por ejemplo, habiéndose señalado la influencia de factores adicionales que exaltan este carácter, como es el caso de la temperatura de crecimiento o la atmósfera de recuperación. En la práctica, el interés por cuanto se refiere a la resistencia térmica de *L. monocytogenes*, se despertó fundamentalmente con ocasión del brote de listeriosis que tuvo lugar en Massachussets en 1983, asociado epidemiológicamente al consumo de leche pasteurizada. Aunque se han ofrecido datos diversos en relación con la experiencia de los distintos investigadores, parece cierto que por un lado, el número de listerias presente puede condicionar el resultado final (niveles de 10^5-10^6 listerias permiten obtener recuperaciones después de un enriquecimiento a 4 – 6 °C durante 4 días, del orden de $10^1 - 10^2$, tanto después de tratamientos de pasteurización baja (63 °C a 30 min.) como HTST (72 °C 15 seg.), a la vez que la presencia intracelular de *L. monocytogenes* en los fagocitos podría representar una fórmula de protección que permitiera el “escape” del microorganismo a los efectos del calor (en condiciones experimentales se ha demostrado supervivencia intracelular a combinaciones de 72,2 °C durante 16,4 seg., pero no combinaciones de 76,4 – 77,8 °C durante 15,4 seg.), si bien es justo reconocer que el proceso de homogeneización habitual de la leche, previo al tratamiento, liberaría la mayor parte de los agentes, convirtiéndolos en blanco más fácil a los efectos térmicos (Ferri, 1992).

7.3.5.2 – pH

Listeria monocytogenes tiene una amplia escala de pH de crecimiento, siendo el límite superior aproximadamente el pH 9,2 y el inferior un pH de 4,6 – 5,0 (Ferri, 1992; ICMSF, 1998). Esta bacteria es capaz de tolerar pH bajo como 3,5 después de

una fase de adaptación a pH 5,5 (O'Driscoll y col. 1996). Este alto grado de adaptabilidad es una razón de la dificultad de controlar el patógeno en un número de productos alimenticios desde que los tratamientos usados en el procesamiento y preservación a menudo utilizan agentes estresantes y parámetros para los cuales *L. monocytogenes* es resistente (Duché y col., 2002).

L. monocytogenes es incapaz de crecer a un pH inferior a 4,5. Experimentalmente, la presencia de 0,1 % de ácidos acético, cítrico y láctico en caldo de triptosa inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes*, aumentando la inhibición cuando la temperatura disminuye (Ahamad y Marth, 1989). El grado de disociación del ácido determina la actividad anti-*Listeria*. Los ácidos cítrico y láctico tienen un efecto menos inhibitorio en su equivalente de pH del ácido acético (Rocourt y Cossart, 1997).

7.3.5.3 – Actividad de agua

L. monocytogenes puede sobrevivir a una variedad de situaciones de stress como 10 % NaCl (McClure y col. 1989, Ferri, 1992, Duché y col., 2002), sobreviviendo a valores de 20-30 % de NaCl (Ferri, 1992) y puede ser detectada en sal pura después de 150 días a 22 °C (Besse y col. 2000, Duché y col., 2002). Asimismo puede sobrevivir en las concentraciones de nitritos permitidas en los alimentos (Doyle, 1988; Rocourt y Cossart, 1997).

Está siendo demostrado que el microorganismo responde a elevada osmolaridad por la acumulación intracelular de solutos compatibles, llamados osmolitos (Smith, 1996), por activación osmótica de su transporte desde el medio en vez de a través de nueva síntesis (Duché y col., 2002). Los solutos comúnmente acumulados incluyen los iones potasio, aminoácidos, compuestos de amonio cuaternarios y carbohidratos (Patchett y col., 1992). Entre los solutos compatibles, la glicina betaína (Csonka, 1989; Csonka y Hanson, 1991; y Smith, 1996) y la carnitina son los más efectivos, particularmente contra el stress osmótico (Beumer y col. 1994, Ko y col. 1994; Duché y col., 2002). Estos osmolitos actúan en el citosol para contrarrestar la osmolaridad externa, lo cual previene que el agua salga de la célula y la plasmólisis no

afectando adversamente su estructura macromolecular y función (Yancey y col. 1982, Smith 1996, Duché y col. 2002).

La glicina betaína confiere un aumento de osmotolerancia y criotolerancia a *Listeria monocytogenes*. Mediciones directas de la glicina betaína muestran que las células transportan betaína 200 veces más rápido a altas concentraciones de sal (4 % NaCl) que sin sal y 15 veces más rápido a 7 que a 30 °C (Ko y col. 1994). La betaína y la carnitina están presentes en los alimentos derivados de plantas y animales, respectivamente. Por lo tanto estos compuestos pueden contribuir significativamente para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en varios alimentos a elevadas osmolaridades (Beumer y col., 1994). La glicina betaína es un trimetil aminoácido (N,N,N-trimethylglycine) [(CH₃)₃-N⁺-CH₂-COO⁻]. La carnitina también es un trimetil aminoácido (β-hidroxy-γ-N-trimethyl aminobutirato) [(CH₃)₃-N⁺-CH₂-CHOH-CH₂-COO⁻]. La carnitina suele ser adicionada en ciertos alimentos como en el caso de las fórmulas infantiles debido a su actividad similar a la de las vitaminas (Beumer y col., 1994).

La prolina también puede contribuir significativamente en la tolerancia osmótica de *L. monocytogenes* en medios conteniendo concentraciones relativamente altas y en ausencia de betaína, sus precursores o análogos. Debido a que en los alimentos la prolina está disponible en pequeñas cantidades, desempeña solamente un pequeño papel en la osmoprotección. No obstante, es concebible que la liberación de prolina desde las proteínas por las proteasas de otras bacterias en los alimentos puede tornar viable este aminoácido para el crecimiento de *L. monocytogenes* en medios de elevada osmolaridad (Beumer y col., 1994).

7.3.5.4 – Refrigeración

A temperaturas de refrigeración, la resistencia de *L. monocytogenes* a pH ácido resulta incrementada, aunque a este respecto parecen influir factores como la composición del substrato o el tipo de ácido (Ferri, 1992).

La congelación de los alimentos y la conservación a – 18 °C, y también la congelación repetida, ejercen poco efecto y es más probable que en estas condiciones

dañen a *Listeria monocytogenes* en vez de inactivarle (Rocourt y Cossart, 2000). Bajas temperaturas tienen profundo efecto en el crecimiento de la bacteria por influencia en los ribosomas, membrana citoplasmática y alteraciones en la síntesis de proteínas y captación de solutos (Berry y Foegeding, 1997; Thieringer y col., 1998; Phadtare y col., 2000; Liu y col., 2002). Se ha dedicado un mayor énfasis a los recientes estudios sobre el incremento de la expresión de las proteínas bacterianas de choque al frío en respuesta a las temperaturas reducidas (Panoff y col., 1998; Phadtare y col., 2000; Wouters y col., 2000, Liu y col., 2002).

7.3.5.5 – Irradiación

L. monocytogenes presenta una resistencia a la irradiación gamma del mismo orden que otras bacterias Gram positivas (ICMSF, 1980), variando los valores D desde 0,34 – 0,5 kGy en el caldo hasta 0,51 -1,0 kGy en la carne picada de vacuno (El-Shenawy y col., 1989) y hasta 2 kGy en el helado a – 78 °C (Hashisaka y col., 1989). Se ha indicado que los valores D en la carne de pollo y en la carne picada de vacuno se hallan entre 0,27 y 1,06 kGy. Los resultados de irradiar pollos enteros refrigerados contaminados de modo natural con *Listeria* spp., indican que una dosis de 2,5 kGy reduce considerablemente el número pero no elimina totalmente las bacterias (Mead y col., 1990; Lewis y Corry, 1991), lo que indica que *L. innocua* no sería un indicador apropiado de la presencia de *Listeria monocytogenes* en los alimentos irradiados. Una dosis de 3 kGy no fue suficiente para eliminar *Listeria monocytogenes* de una carne de cerdo envasada al vacío (Lebepe y col., 1990).

Según la ICMSF (1980), *Listeria monocytogenes* es menos resistente a la radiación ultravioleta que otras bacterias vegetativas Gram positivas (ICMSF, 1998).

7.3.5.6 – Desinfectantes

En ausencia de materia orgánica, una gran variedad de desinfectantes, que incluye el hipoclorito sódico, el yodo, los peróxidos y los compuestos de amonio cuaternario, es eficaz *in vitro* contra *Listeria monocytogenes*. El hipoclorito es inactivado por la materia orgánica por lo que la descontaminación de las hortalizas requiere concentraciones de por lo menos 200 ppm de cloro. En superficies secas, *Listeria*

monocytogenes es mucho más resistente a los desinfectantes que en las húmedas (Best y col., 1990; ICMSF, 1998).

7.3.5.7 – Atmósfera

Se indica que *Listeria monocytogenes* resulta poco afectada por la atmósfera gaseosa. En condiciones aeróbicas, microaerofílicas y anaeróbicas, se han observado tiempos de generación parecidos, sin que existan indicios de que las elevadas concentraciones de CO₂ ejerzan un efecto inhibitorio (Ingham y col., 1990).

El crecimiento óptimo se produce en una atmósfera constituida por 5 % de O₂ y 5-10 % de CO₂ (Pascual, 1989).

A presiones comprendidas entre 3.000 y 4.000 atmósferas (1 atm = 14,7 lb/pulg² = 1,033 kg/cm²), se han hallado valores D comprendidos entre 100 y 10 minutos (ICMSF, 1998).

7.3.6 – Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en algunos Alimentos

L. monocytogenes se aísla en numerosos alimentos crudos y se encuentra con frecuencia en los ambientes de producción y procesamiento de los alimentos, por lo que parece difícil, sino imposible, su total eliminación en este tipo de alimentos. En estas condiciones la presencia de niveles bajos de *L. monocytogenes* en los alimentos frescos probablemente ha de ser tolerada, a pesar de que la contaminación cruzada y un insuficiente cocinado puedan representar un posible riesgo (Escobar y Serra, 1992).

En alimentos elaborados que están listos para el consumo, pero que no constituyen un sustrato adecuado para el crecimiento de *L. monocytogenes*, la tolerancia de bajos niveles sería discutible, en tanto no se conozca con exactitud la dosis infectiva del microorganismo. Por el contrario, los alimentos de este tipo que permiten la multiplicación de *L. monocytogenes* y que además pueden conservarse durante largos períodos a temperatura de refrigeración, no habrán de presentar contaminación por *L. monocytogenes*, incluso cuando el recuento inicial sea bajo. La clasificación de los alimentos según sus características y tecnología por una parte, y según la evidencia

epidemiológica de transmitir la listeriosis por otra, puede ser muy útil en el establecimiento en cada tipo de alimento de un criterio de aceptabilidad para el consumo respecto a la presencia de *L. monocytogenes* (Escobar y Serra, 1992).

Por las características del género *Listeria*, en particular por su amplia ubicuidad, y su capacidad de sobrevivir durante semanas, incluso meses, tanto en ambientes húmedos como secos, es posible la contaminación de alimentos por este microorganismo.

La capacidad de supervivencia o multiplicación de *L. monocytogenes* en los alimentos depende de diversos factores, que en muchas ocasiones actúan de manera interrelacionada. Las características físico-químicas del propio alimento (pH, contenido en sal, actividad de agua, etc.) su microflora natural, presencia de sustancias inhibidoras, temperatura de conservación, o el proceso tecnológico a que somete el alimento durante su elaboración (tratamientos térmicos, fermentación, aditivos, radiaciones, etc.) son factores que van a influenciar en la capacidad de supervivencia y multiplicación de *L. monocytogenes* en estos productos (Garayzabal y Blanco, 1992).

Brotes de listeriosis suelen ser asociados con la leche, queso, vegetales y saladas, y productos cárnicos (Giffel y Zwietering, 1999).

El efecto de nisina sobre *L. monocytogenes* ha sido demostrado y su actividad en los alimentos es fuertemente dependiente de la composición química del alimento en el que es añadido. Pediocinas (de *Pediococcus pentosaceus* y *P. acidilactici*) inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes*. Bacteriocinas de *Lactobacillus bavaricus* afecta transitoriamente a *L. monocytogenes* en varios sistemas cárnicos a bajas temperaturas. Un efecto similar fue observado con la bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* en leche descremada (Mathieu y col., 1994; Rocourt y Cossart, 1997). No obstante, una desventaja del uso de bacteriocinas es la aparición de mutantes resistentes, como fue observado con la bavaricina A y la nisina (Davies y Adams, 1994; Rocourt y Cossart, 1997).

La leche y los productos lácteos fueron los primeros alimentos investigados y se encuentran entre los alimentos estudiados más extensivamente. Su riqueza en proteínas, grasa y carbohidratos hace de la leche un medio favorable al crecimiento de muchos microorganismos. La contaminación de la leche puede tener origen endógeno (mamitis, septicemias, abortos, e incluso encefalitis), o exógena a partir de los piensos contaminados, eliminación fecal de vacas sanas portadoras, y del ambiente de la granja, debido a las precarias condiciones higiénicas y tecnológicas de algunas explotaciones (Rocourt y Cossart, 2000).

En caso de infección de la ubre por *Listeria monocytogenes*, este microorganismo puede encontrarse en la leche en dos estados: libremente suspendida dentro del líquido o en el interior de los leucocitos bovinos, comúnmente presentes en la leche cruda (Toca, 1998).

Al ser un parásito intracelular facultativo hace que pueda sobrevivir en el interior de los monocitos presentes en leches de vacas mamíticas. De esta forma la leche cruda contaminada constituye un vehículo de la bacteria para los productos lácteos (Peláez, 1990).

Pueden estar contaminados una gran variedad de quesos, pero son de máximo interés los quesos blandos debido a su pH ($> 5,5$) y a la ausencia de bacterias iniciadoras del cultivo. Por ello, con frecuencia la contaminación suele ser entre 2 al 10 % y en los cuales las poblaciones de *Listeria monocytogenes* varían de 10 a 10^7 UFC/g

El helado no es frecuentemente contaminado por *Listeria monocytogenes* (0,3 – 2 % de las muestras analizadas), pero cuando se hallan presentes, las poblaciones son generalmente bajas (< 1 a 10 UFC/ml). De modo parecido, el yogur y la mantequilla rara vez aparecen contaminados, una vez que los cultivos lácticos termófilos inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (Rocourt y Cossart, 2000).

Ha sido relacionada con la contaminación por *Listeria monocytogenes* una variedad considerable de carnes y productos cárnicos, que incluyen la carne de vaca, carne de cerdo, carne picada, el jamón, los embutidos ahumados y fermentados, el salami, y el paté (Farber y col., 1993). La mayor parte de contaminación es de superficie. El

predominio de contaminación de la carne cruda y de los productos cárnicos tratados puede ser alta (desde el 1 hasta el 70 %). Las aves de corral (pollo de tipo broiler, listo para comer, precocinado, refrigerado o congelado) también están contaminadas, con una incidencia del 60 % de las muestras positivas en algunas investigaciones (Rocourt y Cossart, 2000).

Es frecuente la contaminación de hortalizas frescas (pepinos, rábanos, col, patatas), pero las cifras son bajas. Las hortalizas para ensaladas de acidez baja, los tomates y las zanahorias no son sustrato adecuado para el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Las fuentes de contaminación incluyen la tierra, el agua, el estiércol de los animales, la vegetación en putrefacción y los efluentes de aguas residuales de plantas de tratamiento (Rocourt y Cossart, 2000).

Una serie de productos de la pesca, particularmente los productos levemente conservados (< 6 % de concentración de sal, pH>5) tal como los productos de pescado ahumados (ahumados por frío o calor), productos ligeramente salados (gambas salmueradas cocinadas) o productos marinados, son capaces de permitir el crecimiento de *L. monocytogenes* (Huss y col., 2000; Viallete y col., 2003). Es importante notar que el ahumado a frío se hace a temperaturas debajo de 30 °C, más frecuentemente entre 19-22 °C, durante 2 a 3 horas, lo cual provee un posible ambiente para el crecimiento bacteriano (Rorvik, 2000; Sabanadesan y col., 2000; Viallete y col., 2003).

Aunque *Listeria* se encuentre en algunos animales, la mayoría de los autores están de acuerdo en que probablemente la contaminación de la carne y productos cárnicos se produce en las plantas de elaboración durante el procesado, siendo el matadero la fuente primaria de la contaminación con *Listeria* de los productos cárnicos, ya que además, *L. monocytogenes* tiene una gran resistencia a las condiciones ambientales, pudiendo sobrevivir hasta 30 días en la superficie de las baldosas secas (McLauchlin y col., 1986; Toca, 1998).

Listeria fue aislada en desagües, suelos, agua estancada, residuos y superficie de contacto de los alimentos de los equipos de plantas de producción de alimentos (Scheider, 1990). Además, se encontró *Listeria* en la zona de aturrido de un

matadero de bovinos y porcinos (Gobat y Jemmi, 1990) y las cámaras de refrigeración a una temperatura de 5 °C (Pochiecha y col., 1991), cintas transportadoras y superficies de las tablas de una sala de despiece de pollos (Franco y col., 1995; Toca, 1998).

La presencia de *Listeria monocytogenes* en las plantas de procesamiento de alimentos ocurre a través de la suela de los zapatos y del vestuario de los trabajadores, a través de los equipamientos de transporte, animales que excretan bacterias o hayan contaminado piel o superficies, vegetales crudos, alimentos crudos de origen animal y posiblemente portadores humanos sanos (Rocourt y Cossart, 1997).

7.3.7 – Incidencia de *Listeria monocytogenes* en España

En los años de 2004 y 2005, fueron registrados, respectivamente, 100 y 70 casos de *Listeria monocytogenes*, mientras que en el año de 2006 hasta la semana del 11 de Marzo, fueron identificados 17 casos declarados al sistema de información microbiológica (BES, 2005 y 2006).

7.3.8 – Prevención y control

El control de *L. monocytogenes* es difícil por dos razones (Smith, 1996). La primera es su naturaleza ubicuitaria. Es comúnmente encontrada en las plantas, en el suelo, muestras de agua superficiales y también se suele aislar en las heces del ganado en mataderos y medios de procesamiento de alimentos y en los hogares (Farber y Peterkin, 1991, Johnson y col., 1990, Pinner y col., 1992). La contaminación de más del 60 % de carne fresca, pollo (Farber y Peterkin, 1991) y un tercio de los productos cárnicos preparados para el consumo (Johnson y col., 1990, Farber y Peterkin, 1991). La segunda razón es su habilidad de tolerar difíciles de crecimiento (Smith, 1996), es decir su osmo y cryotolerancias y la capacidad de supervivir a pH relativamente bajos.

Un grupo de trabajo informal de la Organización Mundial de la Salud concluyó que la pasteurización es un método seguro que reduce el número de *L. monocytogenes* en la leche cruda a niveles que no ponen en riesgo apreciable para la salud humana (WHO, 1988).

Difícilmente puede ser totalmente eliminada de los mataderos, siendo en muchos casos técnicamente imposible garantizar la ausencia total de dicha bacteria (Gobat y Jemmi, 1990). Durante el faenado es posible que se produzca fácilmente una recontaminación de las canales, tanto por el ambiente del matadero como por los útiles, ropa y manos de los trabajadores. Por tanto, la mejora en medidas preventivas al nivel de matadero estableciendo un adecuado sistema HACCP constituye una posibilidad concreta para minimizar la incidencia de *Listeria* en el producto acabado (Rodríguez, 1992; Moreno y García, 1993; Franco y col., 1995).

Los productos alimenticios constituyen el principal vehículo en la transmisión de listeriosis al hombre, por tanto un adecuado plan de control de listeriosis desde la producción de alimentos de origen animal es fundamental para disminuir el riesgo de diseminación hacia las siguientes etapas de la elaboración de alimentos (EC, 1999). Por ejemplo para prevenir la infección por listerias en la crianza de ganado ovino y caprino, se recomiendan algunas medidas elementales como la elaboración de ensilados de buena calidad, la ejecución de estrictas desinfecciones luego después de casos de abortos o mastitis y la oportuna eliminación de animales excretores de *Listeria monocytogenes* (Dijkstra, 1989). La acidificación rápida del ensilado hasta un pH < 4.0, impide el desarrollo de cantidades elevadas de *Listeria monocytogenes*. Este control es especialmente importante con respecto al ensilado que se debe dar al ganado vacuno lechero, porque la leche producida puede posteriormente ser utilizada sin pasteurizar en la fabricación de quesos. Asimismo se recomienda la conservación de la leche en la granja a temperaturas no superiores a 5 °C mientras no se transporte a la planta de productos lácteos (ICMSF, 1998).

A nivel de los pollos las medidas de prevención se orientan a la utilización del sistema “all-in, all out” a nivel de las naves de crianza, con rigurosos sistemas de limpieza y desinfección, controlar la presencia de roedores y otros vectores no deseados a nivel de naves, y establecer un estricto sistema de inspección y control

higiénico desde la salida de las granjas hasta el faenado en mataderos (Dykes y col., 1994).

De acuerdo con estas características, las medidas de control deben comenzar en el origen de los alimentos, pasando por los puntos intermedios hasta llegar al producto terminado (Pascual y Calderon, 2000). Estas medidas podrían ser, principalmente:

- Utilizar materia prima mínimamente contaminada;
- Obtener los productos de granja en las mejores condiciones higiénicas;
- No emplear aguas contaminadas para el riego;
- Evitar el empleo de abonos animales;
- Mantener una higiene perfecta en granjas, establos y animales;
- Utilizar piensos de buena calidad bacteriológica;
- Controlar las mastitis animales;
- Transportar higiénicamente los productos.
- Planificar correctamente las plantas de procesado:
 - con separación entre zonas destinadas a productos crudos y productos terminados;
 - teniendo en cuenta que se debe evitar la entrada de animales domésticos, pájaros, insectos, roedores, polvo, etc.
- Instaurar programas de control de calidad en las fases de procesamiento y ambiente, así como del personal;
- Investigar la posible presencia de *L. monocytogenes* en el ambiente y en el producto terminado;
- Vigilar y controlar los acondicionadores de aire;
- Controlar y limpiar la maquinaria (válvulas, placas, etc.), desmontándola para la comprobación de sus condiciones físicas y limpieza.

El control de listeriosis humana es un caso clásico en el que se debe aplicar el HACCP desde la granja hasta el consumidor con el fin de reducir al mínimo el riesgo de la enfermedad transmitida por alimentos.

El ICMSF (1998) recomienda que las plantas de tratamiento en sus programas HACCP deben perseguir tres objetivos principales:

– Primero. Reducir al mínimo la multiplicación de *Listeria monocytogenes* en las materias primas, especialmente antes y durante el tratamiento de los alimentos crudos elaborados no sometidos a tratamiento listericida por calentamiento. Se aplica a alimentos como ensalada de col, los embutidos fermentados, los quesos fabricados con leche no tratada;

– Segundo. Utilizar tratamientos listericidas por calentamiento que garanticen la destrucción de *Listeria monocytogenes* en alimentos expuestos a posible recontaminación durante la subsiguiente manipulación. Se aplica a alimentos como determinados quesos y las carnes tratadas a escala comercial que se cortan en tajos o se alteran después del tratamiento térmico; también se aplica a alimentos tratados dentro de un envoltorio íntegro como por ejemplo el jamón cocido, o alimentos que son envasados asépticamente inmediatamente después del tratamiento listericida, como es el caso de algunos productos lácteos;

– Tercero. Reducir el riesgo de recontaminación de los alimentos listos para comer que después se elaboran tras recibir un tratamiento listericida.

Teniendo en cuenta que el riesgo es mayor en personas con inmunidad reducida (mujeres gestantes, personas con enfermedades malignas o con el SIDA) y con enfermedades subyacentes (por ejemplo, la enfermedad cardíaca, la diabetes, la enfermedad renal) (Schuchat y col., 1991). Para estas poblaciones el ICMSF (1998) recomienda las siguientes normas a tener en cuenta en la selección y manipulación de los alimentos:

1. No comer alimentos de origen animal crudos o insuficientemente cocidos.
2. Evitar la contaminación cruzada entre los alimentos crudos y los cocidos durante la preparación y conservación de los alimentos.

3. Calentar las sobras hasta que estén excesivamente calientes para tocarlas. A los alimentos que se calientan al microondas se les debe conceder el tiempo suficiente para que el calor se equilibre en todo el alimento antes de comerlos.
4. No comer paté ni quesos blandos madurados (por ej., el de Camembert, el de Brie, el queso rojo para extender) ni tampoco los quesos no madurados (por ej., quesos al estilo mexicano). Los quesos duros, el queso fresco (por ej., el requesón) y los quesos elaborados (por ej., el queso de nata al estilo de Filadelfia) se pueden comer sin la preocupación del riesgo de listeriosis.
5. Las hortalizas crudas se deben lavar abundantemente antes de comerlas.
6. Se deben comprar y utilizar alimentos en cuyo envase conste la fecha de “consumo preferentemente antes de”, de “venta antes de” o de “utilización antes de”.
7. Los alimentos se deben preparar y manipular de acuerdo con las normas recomendadas por su elaborador.
8. Mantener la nevera limpia.
9. Conservar los alimentos perecederos en la zona más fría de la nevera, preferentemente a 5 °C o a una temperatura inferior.
10. No guardar alimentos perecederos en la nevera durante más de 1–3 días.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el problema de las *Listeria* no está en impedir su presencia, sino en controlar su supervivencia y crecimiento, con el fin de reducir las cantidades en que se encuentran en los alimentos (Pascual y Calderon, 2000).

7.4 – *Staphylococcus aureus*

7.4.1 – Historia

La denominación *Staphylococcus* (que significa racimos parecidos a los de la uva) fue mencionada por primera vez por el cirujano escocés Sir Alexander Ogston quien, en una serie de artículos clásicos publicados entre 1879 y 1882 describió la presencia

de este organismo en el pus obtenido de abscesos humanos y demostró que causaba una enfermedad piógena cuando se inyectaba a los ratones. Dos años más tarde Rosembach describió su crecimiento en un cultivo puro y llamó *Staphylococcus aureus* al coco que formaba colonias de color naranja (Baird-Parker, 1990; ICMSF, 1998).

La primera observación registrada que asoció los estafilococos con la intoxicación alimentaria probablemente fue hecha por Vaughan y Stemberg quienes, en 1884, describieron la investigación de un importante brote de enfermedad en Michigan que se creía que había sido causada por comer queso. Sin embargo no fue hasta 30 años más tarde cuando Barber demostró claramente la intoxicación alimentaria estafilocócica por beber leche que se había guardado sin refrigerar, procedente de una vaca que padecía de mastitis estafilocócica. De momento, no se reconoció la importancia de esta investigación. El papel de los estafilococos en la intoxicación alimentaria fue descubierto en 1930 por Dack y sus colegas. Éstos demostraron que el filtrado estéril de un cultivo de estafilococo amarillo aislado en un papel de Navidad a base de bizcocho relleno de nata causó síntomas típicos de la intoxicación alimentaria en personas voluntarias (ICMSF, 1998).

Desde entonces está muy bien documentada la implicación de este microorganismo y de su enterotoxina como causante de intoxicación alimentaria (Minor y Marth, 1972a,b,c; Bryan, 1976; Bergdoll, 1979, 1989).

7.4.2 – Taxonomía

Staphylococcus aureus es la especie bacteriana tipo del género *Staphylococcus*. La taxonomía de los estafilococos ha experimentado un cambio importante y en la edición del *Bergey's Manual* de 1986 se admiten 19 especies de estafilococos en contraposición a los únicamente tres “grupos de especies” que figuraban en la 8ª edición de 1974; en 1995 se admitían un total de 30 especies. La diferenciación de especies está amparada por la homología del DNA y por los estudios inmunoquímicos. Además, en base a pruebas bioquímicas y a patrones de resistencia, *Staphylococcus aureus* se puede dividir en varios biotipos y ecotipos y, además,

puede ser clasificado mediante fagotipado y serotipado (Devriese, 1984; ICMSF, 1998), mediante análisis de los plásmidos (Zuccarelli y col., 1990; ICMSF, 1998) y mediante ribotipado (Blumberg y col., 1992; ICMSF, 1998).

El Comité Internacional responsable de las recomendaciones sobre taxonomía ha indicado que los estafilococos se deben encuadrar en una familia independiente de los micrococos, denominada familia *Staphylococcaceae* (ICMSF, 1998).

Tiene formas cocáceas de 0,8 – 1,0 µm de diámetro, que se dividen en más de un plano, por lo que se agrupan irregularmente en racimos tridimensionales de células. Son inmóviles y carecen de esporos. Morfológicamente se parecen al género *Micrococcus* pero tienen características metabólicas diferentes (ICMSF, 1998; Pascual y Calderon, 2000).

Son gram positivas. Crece en anaerobiosis y muestra un metabolismo anaerobio facultativo. Es muy sensible al calor y a los desinfectantes. Su presencia o la de sus toxinas en los alimentos es signo evidente de falta de higiene. Cuando sus toxinas se encuentran en los alimentos, pueden ser causa de intoxicación (Pascual y Calderon, 2000).

7.4.3 – Hábitat

Este microorganismo se encuentra en la piel y mucosas de la mayoría de animales de sangre caliente, así como en los alimentos de origen animal. Las fosas nasales del hombre constituyen el reservorio principal del germen, desde donde se disemina a piel, manos, rostro, etc. (Eifert y col., 1996). Al menos el 50 % de las personas son portadoras, de vez en cuando, de *Staphylococcus aureus* en fosas nasales, garganta, heces y manos, lo cual permite que se encuentren en el ambiente: aire, suelo, aguas, vestidos, etc. De este modo, los alimentos expuestos a la manipulación humana tienen la posibilidad de contaminarse con esta especie bacteriana, destacándose como factores que contribuyen para ello las impropias temperaturas de conservación y el no cumplimiento de las medidas higiénicas por los manipuladores de alimentos (Pascual y Calderon, 2000).

7.4.4 – Patogenicidad de *Staphylococcus aureus*

Las enfermedades que causan incluyen infecciones agudas, por ejemplo septicemia, y toxemias agudas, por ejemplo intoxicación alimentaria estafilocócica.

Staphylococcus aureus produce una gama especialmente amplia de sustancias (agresivas y exotoxinas) asociadas con la infecciosidad y con la enfermedad. Varían desde componentes de la pared celular, por ejemplo ácidos teicoicos, hasta una amplia gama de exoenzimas que incluyen la estafiloquinasa, hialuronidasas, fosfatasas, coagulasas, catalasas, proteasas, nucleasas y lipasas, leucocidinas y hemolisinas y, por último, pero de ningún modo menos importante, las enterotoxinas que causan la intoxicación alimentaria (Arbuthnott y col., 1990; ICMSF, 1998).

Las enterotoxinas estafilocócicas son proteínas de cadena sencilla, que incluyen unas cadenas polipeptídicas que contienen cantidades relativamente grandes de lisina, tirosina y ácidos aspártico y glutámico y que se caracterizan por tener solamente dos restos de hemicistina y uno o dos de triptófano. En la actualidad se admiten siete tipos antigénicos de enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE). La composición de aminoácidos de las enterotoxinas SEA, SED, SEE, por una parte, y la de las enterotoxinas SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, por otra, es parecida (Bergdoll, 1989). Se ha indicado que son producidas por el organismo por lo menos en dos formas diferentes. La producción de los tipos SEB y SEC se halla bajo control plasmídico/cromosómico y son producidas principalmente al final de la fase estacionaria del crecimiento como metabolitos secundarios; Los tipos SEA y SEE se hallan bajo control cromosómico (el tipo SED bajo control plasmídico) y son producidos durante toda la fase logarítmica del crecimiento (Bergdoll, 1979; ICMSF, 1998). Estas diferencias están reflejadas en la formación de los diferentes tipos en los alimentos. La mayoría de los brotes de intoxicación alimentaria implican a las enterotoxinas A y D, que se forman en los alimentos en una gama de valores de pH, a_w y de Eh mucho más amplia, por ejemplo, que la correspondiente a las enterotoxinas B y C. Los biotipos humanos de *Staphylococcus aureus* producen enterotoxinas más frecuentemente que los biotipos aviares y que los biotipos animales (Isigidi y col., 1992; ICMSF, 1998).

El modo de acción de la toxina no ha sido esclarecido del todo, pero se cree que tanto los vómitos como la respuesta diarreica son el resultado de la estimulación de receptores locales existentes en el tracto intestinal y de la transmisión de los estímulos al centro del vómito del cerebro a través del vago y de otras partes del sistema simpático (ICMSF, 1998).

La cantidad de toxina que causa la enfermedad depende del peso y de la sensibilidad individual, pero generalmente se coincide en que 0,1 – 1 µg/kg causará la enfermedad en una persona (Evenson y col., 1988). En los animales, la exposición reiterada a un determinado tipo antigénico de toxina origina un aumento de la tolerancia (ICMSF, 1998).

7.4.4.1 – Población susceptible

La muerte por intoxicación estafilocócica alimentaria no es frecuente, pero el porcentaje de mortalidad varía de 0,03 % en la población general hasta 4,4 % en las poblaciones más sensibles, por ejemplo los niños y las personas de edad (Holmberg y Blake, 1984).

7.4.4.2 – Dosis infectante

No se puede pronosticar con certeza el número de organismos de *S. aureus* existentes en el alimento, necesario para provocar intoxicación alimentaria estafilocócica. Los factores que coadyuvan en los niveles de concentración de toxina incluyen las condiciones del medio tales como la composición de alimento, la temperatura, otros parámetros físico-químicos y la presencia de inhibidores. A pesar de esta variabilidad, existen normas generales que son útiles para valorar el riesgo general. Se pueden alcanzar dosis de enterotoxinas estafilocócicas cuando las poblaciones de *S. aureus* son superiores a 10^5 microorganismos por gramo de alimento contaminado (Anónimo, 1992). En otras investigaciones, se observó que el intervalo típico era un número de organismos de 10^5 a 10^8 , a pesar del hecho de que a veces están implicados niveles más bajos (Holmberg y Blake, 1984).

Con respecto a la concentración de toxina en un alimento contaminado, una concentración de aproximadamente 1 ng de enterotoxina estafilocócica es suficiente para provocar los síntomas asociados con la intoxicación alimentaria estafilocócica. Aunque los niveles de 1 a 5 µg de toxina ingerida están típicamente asociados con muchos brotes, las concentraciones reales de enterotoxinas estafilocócica detectable fueron aun menores ($> 0,01 \mu\text{g}$) en 16 brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica (Gilbert y Wieneke, 1973). En el estudio de un brote ocasionado por la ingestión de leche con chocolate contaminada, la dosis oral mínima para ocasionar síntomas de intoxicación alimentaria estafilocócica en niños de edad escolar fue de $144 \pm 50 \text{ ng}$ (Evenson y col., 1988).

La sensibilidad del individuo a la toxina, la cantidad de alimento ingerido, y el estado general de la persona son factores que coadyuvan en la posibilidad que se manifiesten síntomas y en la gravedad de los mismos (Doyle y col., 2000).

7.4.4.3 – Período de incubación

La aparición de los síntomas de intoxicación alimentaria tiene lugar entre 1 y 7 horas (generalmente 2–4 horas) después de la ingestión del alimento que contiene enterotoxinas estafilocócicas (ICMSF, 1998).

7.4.4.4 – Síntomas

Los síntomas más corrientes son náuseas, vómitos, arcadas, espasmos abdominales y diarrea. En los casos graves se puede presentar cefalalgia y colapso. La curación es rápida, generalmente en un plazo de 2 días (ICMSF, 1998). Un número importante de pacientes no vomita. La diarrea suele ser acuosa pero también puede contener sangre. En este tipo de intoxicación la ausencia de fiebre es compatible con la ausencia de infección aunque algunos pacientes presenten fiebre de grado bajo. La debilidad general, el vértigo, escalofríos y sudoración figuran entre los otros síntomas (Doyle y col., 2000).

7.4.5 – Características de crecimiento y de supervivencia de *Staphylococcus aureus*

7.4.5.1 – Temperatura

El crecimiento óptimo se verifica a temperaturas entre 35 y 40 °C, siendo sus límites aproximadamente en las temperaturas de 7 y 48 °C. A 10 °C, la fase de latencia es prolongada (> 20 horas) y cuando comienza el crecimiento, este es muy lento. A temperaturas más bajas, el crecimiento es limitado por las reducciones insignificantes de la actividad del agua o del pH y además se reduce por la conservación en condiciones de anaerobiosis. Las enterotoxinas estafilocócicas son producidas bajo una serie de condiciones que, comparadas con las condiciones de crecimiento, son más limitadas pero resultan afectadas de modo parecido por los factores de crecimiento. Las enterotoxinas A y D generalmente son producidas bajo una serie de condiciones de crecimiento más amplias que en el caso de la enterotoxina B (ICMSF, 1998).

El organismo suele ser destruido fácilmente a las temperaturas que se utilizan en la pasteurización y en la cocción de los alimentos. En los alimentos secos y en alimentos con elevado contenido en grasa, la resistencia aumenta. Todas las enterotoxinas son extraordinariamente resistentes al calor y pueden resistir al tratamiento térmico que se utiliza para esterilizar los alimentos enlatados de acidez baja. Después del tratamiento térmico, la actividad tóxica puede persistir cuando no existe actividad serológica. El tratamiento con urea de la enterotoxina dañada por el calor puede restablecer la actividad serológica. La termorresistencia de las células resulta afectada por las condiciones de crecimiento, de modo que la resistencia es incrementada algo por las condiciones de crecimiento a temperaturas elevadas (> 37 °C) y es disminuida por el crecimiento a temperaturas bajas (< 20 °C) (ICMSF, 1998).

7.4.5.2 – pH

Bajo condiciones por otra parte óptimas, *S. aureus* es capaz de crecer a $\text{pH} < 4,3$ con un ácido inorgánico, por ejemplo con HCl, como acidulante. Sin embargo, en presencia de ácido orgánicos, los límites de crecimiento son mucho más elevados (ICMSF, 1998).

7.4.5.3 – Actividad de agua

S. aureus es un organismo tolerante a la sal y crece a una actividad de agua tan baja como 0,85 (contenido de sal de 25 % p/p) bajo condiciones de crecimiento por otra parte óptimas. Sin embargo, con otros humectantes, el crecimiento con frecuencia es limitado en una a_w más elevada. La producción de toxina tiene lugar bajo una serie de condiciones más limitada que el crecimiento; la producción de enterotoxina A puede tener lugar a actividades de agua más bajas que la producción de enterotoxina B (ICMSF, 1998).

7.4.5.4 – Refrigeración

Staphylococcus aureus es muy resistente a la congelación y a la descongelación y sobrevive perfectamente en los alimentos que se conservan a temperaturas ≤ -20 °C. A temperaturas superiores, por ejemplo desde -10 °C a 0 °C, la viabilidad decrece notablemente durante la conservación en congelación. En alimentos que se conservan congelados, las enterotoxinas estafilocócicas son muy estables (ICMSF, 1998).

7.4.5.5 – Irradiación

Staphylococcus aureus es destruido fácilmente por las radiaciones ionizante y no ionizante; la resistencia es más elevada en los alimentos que en los tampones. La enterotoxina estafilocócica es muy resistente a la radiación gamma y no será destruida por las dosis que se utilizan en el tratamiento de los alimentos (ICMSF, 1998).

7.4.5.6 – Desinfectantes

Staphylococcus aureus es destruido fácilmente por los desinfectantes que habitualmente se utilizan en la fabricación de alimentos. En el ICMSF (1998) aparecen publicados el efecto de una amplia gama de desinfectantes sobre *Staphylococcus aureus*, entre los cuales podemos mencionar el hipoclorito sódico, peróxido de hidrógeno, diacetato de clorhexidina, ácido peracético, alcohol etílico, etc. (ICMSF, 1998).

7.4.5.7 – Atmósfera

Staphylococcus aureus crece tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, pero generalmente más lento bajo condiciones de anaerobiosis. En cambio, comparada con la supervivencia en aerobiosis, la supervivencia de las células se puede mejorar en condiciones de anaerobiosis (ICMSF, 1998).

Ha sido estudiado el efecto de las interacciones de los factores extrínsecos e intrínsecos sobre el crecimiento, sobre la supervivencia y sobre la muerte de *S. aureus*. Así, el pH reducido, la a_w y el aire, limitan el crecimiento a temperaturas subóptimas y retardan el crecimiento y la producción de enterotoxina a temperaturas óptimas. Tales interacciones están publicadas en el ICMSF (1998).

7.4.6 – Prevalencia de *Staphylococcus aureus* en algunos alimentos

Como se ha referido anteriormente, *Staphylococcus aureus* es comensal. Es un patógeno oportunista. Las vehiculaciones nasal o perineal son muy frecuentes, aunque en algunas circunstancias son colonizadas las manos y otras partes del organismo: por ejemplo, si la piel resulta dañada o cuando encuentra con frecuencia condiciones de humedad. El organismo es resistente a la desecación y puede colonizar el material que se utiliza en la elaboración de alimentos que resulta difícil de limpiar y se deja húmedo: por ejemplo, se han encontrado cepas resistentes al cloro en las factorías de aves de corral (Bolton y col., 1988). Con frecuencia se encontrará en el polvo existente en los sistemas de ventilación y en los aspiradores.

Staphylococcus aureus compite mal con otras bacterias y por ello rara vez causa intoxicación alimentaria en producto crudo; una excepción es la leche fresca de una vaca con mastitis, en la que los niveles de *Staphylococcus aureus* pueden ser muy elevados. Los estafilococos son destruidos fácilmente por la cocción, pero las toxinas que producen resistirán ese tratamiento. En los alimentos enlatados de baja acidez, también parece ser que las toxinas resisten al tratamiento de esterilización de los alimentos enlatados de acidez baja (Bergdoll, 1989).

La intoxicación estafilocócica aparece muy frecuentemente cuando un alimento cocido es contaminado por una persona colonizada y después se guarda en un ambiente caliente (20–40 °C) durante varias horas. Con frecuencia están implicados los productos de panadería rellenos de nata, las carnes cocidas (especialmente el jamón), el marisco y otros platos preparados con mucha antelación al consumo (Roberts, 1982).

Productos tales como los quesos y los salamis también pueden fermentar incorrectamente, permitiendo que los organismos de *S. aureus* existentes en los mismos crezcan y elaboren toxinas durante su maduración (Gilmour y Harvey, 1990; Nychas y Arkoudelos, 1990).

7.4.7 – Incidencia de *Staphylococcus aureus* en España

Según Hernández-Pezzi y col. (2004) y Cevallos y col. (2005), en el decenio de 1993 a 2003, en España fueron registrados entre 21 a 50 brotes de *S. aureus* por año transmitidos por los alimentos, tal y como se presenta en la Tabla 4 (apartado 7.2.7). En los años 2004 y 2005 fueron registrados, respectivamente, 528 y 560 casos de *Staphylococcus aureus*, mientras que en el año de 2006, hasta la semana del 11 de Marzo, fueron identificados 152 casos declarados al sistema de información microbiológica (BES, 2005 y 2006).

7.4.8 – Prevención y control

El control de brotes de intoxicación estafilocócica de origen alimentario se consigue protegiendo los productos de la contaminación y evitando las condiciones en las que puede existir el crecimiento. Con respecto a los productos cuya fabricación implica mantenerlos a temperaturas a las que puede existir el crecimiento de *S. aureus*, por ejemplo en la fabricación de algunos embutidos fermentados y quesos, es muy importante realizar el control de las materias primas así como de las fases de fermentación y de maduración. Las células de *S. aureus* son destruidas fácilmente por el calor, pero toleran la sal por lo que pueden ser relacionadas en los productos que contienen sal o en productos con valores reducidos de la actividad del agua. Son muy resistentes a la desecación y, por ello, pueden resistir durante algún tiempo en las zonas de producción de alimentos, donde pueden actuar como fuente de contaminación de productos que no están adecuadamente protegidos. Las enterotoxinas se producen bajo una amplia gama de condiciones ambientales y de almacenamiento. Son muy resistentes al calor y resistirán la cocción y algunos tratamientos de esterilización (ICMSF, 1998).

III – OBJETIVOS

III – OBJETIVOS

Tomando en consideración la necesidad de estudiar metodologías rápidas para monitorizar el crecimiento bacteriano, teniendo en consideración la necesidad de aplicar medidas capaces de prevenir la aparición de toxiinfecciones alimentarias, hemos realizado el presente trabajo con los objetivos siguientes:

1 – Objetivo general

Aplicar el uso de la turbidimetría como técnica para la monitorización del crecimiento de microorganismos de interés para la seguridad alimentaria.

2 – Objetivos específicos

1. Estudiar la influencia del efecto combinado de tres factores (pH, temperatura y NaCl) sobre el crecimiento de algunos microorganismos de interés para la seguridad alimentaria, concretamente *Escherichia coli* (patógeno y no patógeno), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*.
2. Derivar los parámetros cinéticos de los referidos microorganismos a partir de los datos turbidimétricos obtenidos.
3. Elaborar modelos matemáticos para el cálculo de los parámetros cinéticos de las especies estudiadas.
4. Analizar el comportamiento cinético de *Escherichia coli* no patógeno respecto a la cepa patógena, con vistas a su utilidad como indicador de la calidad higiénica.
5. Establecer una comparación de los resultados obtenidos para el comportamiento cinético de los microorganismos patógenos Gram positivos y Gram negativos estudiados.

IV – MATERIAL Y MÉTODOS

IV – MATERIAL Y MÉTODOS

1 – Cepas utilizadas

Escherichia coli CECT 516 y *Escherichia coli* O157:H7 CECT 4076 (aislada por el Dr. H. Lior a partir de una paciente con colitis hemorrágica en Canadá), suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, Burjassot, España).

Listeria monocytogenes, aislada a partir de muestras de pollo en el laboratorio de Higiene, Inspección y Control de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Salmonella typhimurium NCTC 5710, cedida por gentileza de la Dra. Maria Angels Calvo de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Staphylococcus aureus CECT 240, obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, Burjassot, España).

Cada una de estas cepas fue reconstituida en caldo infusión de cerebro y corazón (BHI) durante 24 horas a 37 °C.

2 – Medio de cultivo

Infusión de cerebro y corazón (Brain Heart Infusion: BHI) (DIFCO, EEUU), cuya composición fue la siguiente:

Infusión de Cerebro de Ternero	200,0g/l
Infusión de corazón de bovino.....	250,0g/l
Peptona de Proteasa	10,0g/l
Dextrosa	2,0g/l
Cloruro de sodio	5,0g/l

Fosfato disódico2,5g/l

PH final: 7,4+/-0,2

Para su preparación, se disolvieron 37 gramos en un litro de agua destilada y se distribuyeron a razón de 10 ml en tubos de vidrio. A continuación se esterizaron a 121 °C en autoclave, durante 15 minutos.

3 – Otros materiales

- Balanza (AND, Electronic Balance FY-300).
- Tubos de ensayo.
- Pipetas 10 ml.
- Pipetas dosificadoras de 1000 µL.
- Estufas de incubación.
- pHmetro (micropH 2000, Crison).
- Lector de microplacas (SLT 340 ATTC, SLT LABINSTRUMENTS, Austria).
- Campana de flujo laminar (Micro-V TELSTAR, Barcelona, España).
- Autoclave (P SELECTA AUSTESTER-G).
- Agitador de tubos de ensayo (HEIDOLPH REAX 2000).
- Botes de vidrio de 500 y 1000 ml.

4 – Diseño experimental

Para el estudio se eligieron 6 temperaturas (22, 26, 30, 34, 38 y 42 °C). Estas temperaturas se encuentran en el intervalo ideal para el crecimiento óptimo de los microorganismos estudiados. Por otro lado el lector de placas microtiter utilizado solo permitía lecturas de la densidad óptica a temperatura mínima de 17 °C. Para ello la temperatura ambiente debía ser inferior a dicho valor para permitir el normal funcionamiento de la placa de calentamiento que se regula por un termostato. En nuestras condiciones experimentales no era posible mantener la temperatura del laboratorio a menos de 20 °C puesto que el mismo era de uso común con otros compañeros de trabajo.

En el medio de cultivo utilizado se adicionaron diferentes concentraciones de NaCl (2,5, 3,5, 4,5, 5,5 %). Según la bibliografía, estas concentraciones de NaCl son tolerables por los microorganismos ya que son valores que se pueden encontrar en algunos alimentos como conservantes.

Los valores de pH utilizados fueron de: 4,5, 5,5, 6,5 y 7,4. Estos valores de pH se sitúan en un intervalo que abarca una serie de alimentos, como se puede observar en la Tabla 1.

Por lo tanto, el diseño experimental fue el siguiente:

6 temperaturas x 4 concentraciones de NaCl x 4 valores de pH = **96 combinaciones por microorganismo.**

5 microorganismos x 96 combinaciones x 20 repeticiones = **9.600 determinaciones por h.**

9.600 determinaciones x 24 h = **230.400 resultados de los 5 microorganismos.**

En definitiva, fueron procesados un total de 230.400 datos.

4.1 – Procedimientos

4.1.1 – Preparación del inóculo e incubación

Se procedió a la preparación de botes de vidrio de tapón roscado de 1000 ml de capacidad con caldo BHI repartido a razón de 1litro/bote. Posteriormente se procedió a la regulación del pH utilizando ácido clorhídrico (HCl) 0,1 y 1 N, y/o hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 y 1 N hasta obtener los valores deseados: 4,5; 5,5; 6,5 y 7,4. El contenido de cada uno de estos botes fue repartido en otros cuatro de 250 ml, añadiéndose respectivamente a cada uno de ellos NaCl a la razón de 2,5; 3,5; 4,5 y 5,5 % y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

A partir del cultivo de cada microorganismo en BHI durante 24 h a 37 °C (aprox. 10^9 ufc/ml) se procedió a realizar diluciones decimales seriadas.

Bajo la protección de la campana de flujo laminar se dispensaron alícuotas de 200 μ l de la dilución 10^{-3} (aprox. 10^6 - 10^7 ufc/ml) en cada una de las celdillas de las placas de microtiter. Las lecturas de la densidad óptica (DO) (Figura 2) se realizaron cada 900 segundos (15 minutos) durante 24 horas consecutivas, con agitación previa de 5 segundos, y utilizando un filtro de 595 nm. Las lecturas fueron tomadas bajo distintas temperaturas (22, 26, 30, 34, 38, y 42 °C) para cada una de las combinaciones de pH y de NaCl fijadas inicialmente.

Cada dilución fue sembrada en 20 pocillos, es decir, en los diez primeros pocillos de cada dos filas. Los dos últimos pocillos de cada fila fueron reservados para el BHI no inoculado, lo cual permitió conocer la DO del medio y controlar eventuales contaminaciones.

Debido a que la memoria del lector de microplacas sólo permite realizar lecturas durante 8 h, para conseguir las 24 h consecutivas de trabajo se reinició dos veces más el programa inmediatamente después de terminar cada ciclo de lectura de 8 horas.

Los datos correspondientes a cada curva de DO han sido obtenidos a partir de 20 curvas distintas. Es decir, el dato de cada punto de lectura es el resultado del promedio de los 20 puntos iniciales e independientes. Aunque las mediciones fueron realizadas cada 15 minutos, se seleccionaron los relativos a cada hora desde las cero hasta las veinticuatro horas, ya que, de esta forma, se simplifica el tratamiento de los datos sin afectar la “tendencia” de cada curva. Previamente fueron realizadas curvas de calibración para cada microorganismo.

4.1.2 – Test de la microplaca

Si los valores de la observancia de los pocillos de la microplaca no son consistentes, los resultados obtenidos usando ese tipo de microplacas pueden ser muy inconsistentes. Esa inconsistencia puede ser verificada haciendo lecturas de la microplaca vacía. Los valores de la absorbancia obtenidos de las mediciones de la

microplaca vacía deben tener una variación aproximada de (0.010 absorbancia). Si los valores de la absorbancia no se encontraban en este intervalo, la microplaca no era usada para estudio.

4.1.3 – Rectas de calibración y determinación del intervalo lineal

El intervalo lineal, es el rango de la absorbancia donde la Ley de Beer-Lambert es verificada. Fue determinada del siguiente modo: Suspensiones en BHI de las cepas estudiadas fueron enumeradas en PCA (Difco) a 37 °C durante 24 horas, y diluidas en BHI a razón de 1/2, 1/4, 1/5, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000. Las diluciones iniciales dieron recuentos de poblaciones aproximadas a 5×10^9 ufc/ml.

Para medir la absorbancia se depositaron en 6 pocillos 200 μ l cada dilución. En 12 pocillos se depositó BHI no inoculado. La lectura de la absorbancia se efectuó a 595 nm.

Los datos de absorbancia fueron confrontados con los correspondientes valores de ufc para obtener las rectas de calibración para cada cepa estudiada.

4.2 – Procesamiento de datos

Los datos obtenidos de los diferentes experimentos fueron sometidos a un tratamiento estadístico en hoja de cálculo Excel (Microsoft Software). Se calcularon los promedios, la desviación estándar y los límites máximo y mínimo de las observaciones. Los promedios fueron transformados en logaritmos decimales para la elaboración de las curvas de DO.

4.2.1 – Cálculos cinéticos

Según Bégot y col., (1996) se procedieron a los siguientes cálculos:

1. $(DO_i)_t$, el promedio de la DO de los 20 pocillos sembrados;
2. $(DO_{ni})_t$, el promedio de la DO del BHI no inoculado;
3. $(\Delta OD)_t = (DO_i)_t - (DO_{ni})_t$;

4. $\text{Log}_{10} [(\Delta\text{DO})_t / (\Delta\text{DO}_{\text{min}})]$, siendo que $(\Delta\text{DO}_{\text{min}})$ es la mínima densidad óptica por encima del umbral de detección.

El umbral de detección fue considerado el valor inmediato al correspondiente de la densidad óptica de la dilución más alta de la recta de calibración (primera medición del cultivo).

El tiempo de latencia (LT) y la velocidad de crecimiento (μ) fueron calculados en el intervalo lineal de las curvas de la DO ajustadas con la ecuación modificada de Gompertz (Zwietering y col., 1990) y mediante el uso de la opción Solver de Excel.

$$\begin{aligned} 5. \text{Log}_{10}(N/N_0) &= \text{Log}_{10} (\Delta\text{OD})_t / \Delta\text{OD}_{\text{min}} \\ &= A. \exp (- \exp (((\mu \cdot e)/A) \cdot (L-t) + 1)) \quad (e = 2.718) \end{aligned}$$

$$6. \text{GT} = \text{Log}_{10} (2) / \mu$$

Desde el punto de vista estadístico, los parámetros de crecimiento (tiempo de latencia, velocidad de crecimiento exponencial, tiempo de generación) son obtenidos con buena precisión cuando un suficiente número de curvas de crecimiento son reproducidas y cada reproducción contiene un gran número de puntos experimentales (Begot y col. 1996).

El método de Begot y col. (1996), ha sido utilizado en diferentes trabajos de investigación (Begot y col. 1997; Cheroutre-Vialette y col., 1998, 2000; Vialette y col., 2003).

Los valores de los parámetros de crecimiento fueron utilizados de tres maneras: uno directamente con los datos originales y los otros con los correspondientes valores de la raíz cuadrada y el logaritmo neperiano de los mismos. Las dos últimas transformaciones han sido realizadas para homogeneizar la variancia de los resultados obtenidos en los cálculos de la velocidad de crecimiento y los tiempos de latencia y de generación (Ross y col., 2003).

4.2.2 – Elaboración y validación de modelos matemáticos

Para la elaboración de modelos matemáticos, el tratamiento de los resultados se hizo con el programa estadístico JMP 5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA., 2002) y se eligió el modelo de regresión polinómica de superficie respuesta de los resultados que presentaron un coeficiente de determinación (R^2) más elevada y la dispersión del error, RMSE (“Root mean squared error”) más bajo.

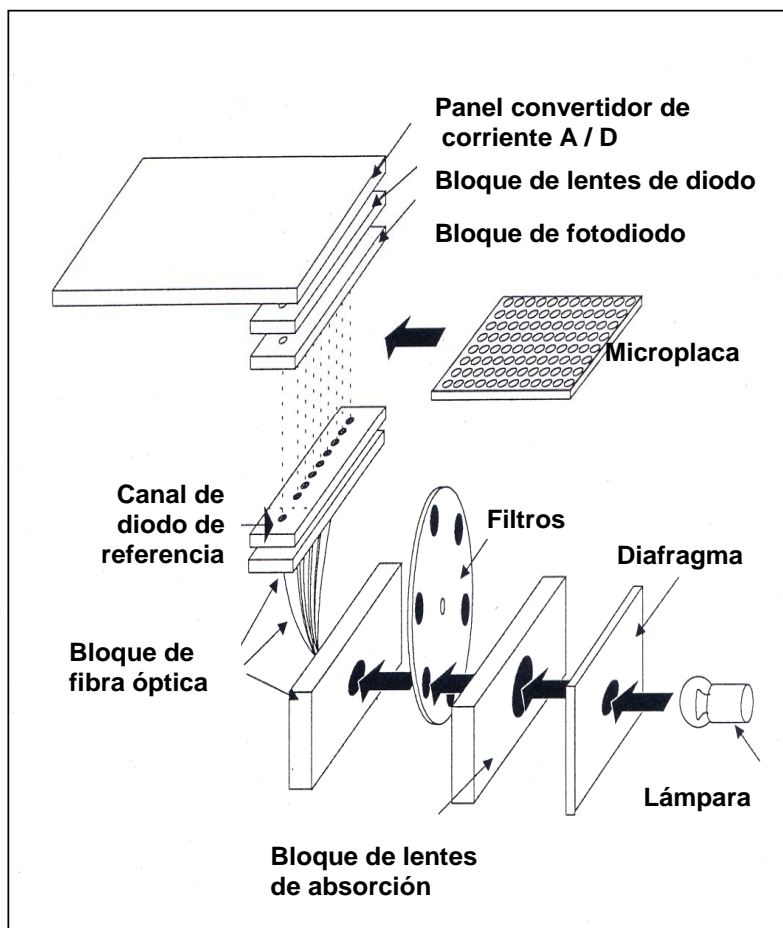
La validación de los modelos se hizo mediante la evaluación de la precisión, valorando gráficamente el ajuste con el enfrentamiento de los valores observados contra las correspondientes predicciones del modelo. Además, se tuvieron en cuenta los valores de la R^2 y RMSE así como los factores de sesgo y de linealidad, según Giffel y Zwietering (1999).

4.3 – Análisis estadístico de resultados

Mediante la utilización del programa estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA., 2003) y aplicando el método de Anova se compararon los parámetros cinéticos de las cepas de la siguiente manera:

- De acuerdo con la patogenicidad y no patogenicidad de la especie de *E. coli*.
- Cada cepa, según la temperatura, el pH y el cloruro sódico.
- Los microorganismos patógenos Gram positivos y negativos, según la temperatura, el pH y el cloruro sódico.

Figura 2. – Diagrama del sistema óptico utilizado



V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 – *Escherichia coli* CECT 516

Nuestro trabajo constituye un experimento multifactorial, lo cual hace difícil discernir de manera precisa la respuesta del microorganismo a cada uno de los factores (sal, temperatura y pH) por separado. Esta dificultad también ha sido descrita por Robinson y col. (1998). Por ello, los resultados de los parámetros cinéticos reflejan el efecto combinado de los tres factores juntos.

En las Tablas 7, 8, 9, 10, 11 y 12 se presentan los resultados de los parámetros cinéticos en las diferentes combinaciones de temperatura, pH y cloruro sódico calculados a través de los datos de la densidad óptica (DO) ajustados con la ecuación de Gompertz. No están presentados los valores de las correspondientes transformaciones a la raíz cuadrada ($\sqrt{}$) y al logaritmo neperiano (\ln).

En las condiciones en las que no se ha registrado alteración de la DO se considera que no ha sido detectado crecimiento del microorganismo, por lo cual no fueron calculados los parámetros cinéticos.

De una manera general, la velocidad de crecimiento ha disminuido con el incremento de la concentración de sal en todas las combinaciones de temperatura y pH. Este comportamiento es similar al descrito por Robinson y col. (1998), relativo a una reducción de la tasa de crecimiento con el aumento de la osmolaridad. Por otro lado, en nuestro trabajo, a una misma temperatura y concentración de cloruro sódico, la velocidad de crecimiento disminuyó con el incremento de acidez del medio.

El incremento en la densidad óptica no ha sido observado con el pH 4,5, combinado con las mayores concentraciones de sal (4,5 y 5,5%) en todas las temperaturas, lo cual indica la contribución sinérgica de la osmolaridad en la inhibición del crecimiento del microorganismo por el carácter ácido del medio. Por esta razón, no fueron calculados los parámetros cinéticos en dichas condiciones. No obstante, con 2,5 % NaCl ha sido monitorizado un ligero incremento de la DO, la cual disminuye con el aumento de la temperatura, llegando a no registrarse a los 42 °C. También se

registró un pequeño aumento de la DO con 3,5% NaCl a 22 °C y 26 °C, siendo ligeramente mayores los valores de la DO a la temperatura más baja.

Con el pH más ácido estudiado, prácticamente no ha sido detectada alteración de la densidad óptica a 42 °C en todas las concentraciones de sal. Esto indica que el incremento de la temperatura parece tener un efecto sinérgico de inhibición sobre el crecimiento de *Escherichia coli* CECT 516 sometido al pH de 4,5 con diferentes concentraciones de NaCl.

El hecho de que haya habido un cambio de la densidad óptica en algunas temperaturas, siendo el pH 4,5, indica crecimiento del microorganismo en dichas combinaciones, teniendo en cuenta la posibilidad de adaptarse a menudo a cambios ambientales de pH para sobrevivir. En estos casos, de acuerdo con Prescott y col. (1999), los sistemas de transporte potasio y sodio corrigen, probablemente, pequeñas variaciones de pH. Si el pH se vuelve demasiado ácido, se ponen en marcha otros mecanismos. Cuando el pH baja de valores entre 6,0 a 5,5, *Escherichia coli* sintetiza un grupo de nuevas proteínas, como parte de la denominada respuesta de tolerancia en medio ácido. La ATPasa translocadora de proteínas contribuye a esta respuesta protectora, produciendo más ATP o bombeando protones fuera de la célula. Si el pH externo disminuye a valores de 4,5 o inferiores, se sintetizan las proteínas de shock ácido o de shock térmico. Probablemente, estas sustancias eviten la desnaturalización de las proteínas y faciliten de nuevo el plegamiento de las desnaturalizadas. Por otro lado, Hill (2004) publicó que otro mecanismo de respuesta bacteriana al estrés provocado por la presión osmótica y el pH puede ser el sistema glutamato descarboxilasa (GAD, del inglés *glutamate decarboxylase*) que desempeña un papel muy importante en la supervivencia y crecimiento en medios ácidos, principalmente por la acumulación de solutos compatibles.

La combinación que mejor ha favorecido el crecimiento de *Escherichia coli* CECT 516 ha sido la de 38 °C, pH 7,4 y 2,5% NaCl, la cual ha permitido la velocidad de crecimiento más elevada ($1,88 \text{ h}^{-1}$), así como el tiempo de latencia (3,45 h) y de generación (0,16 h) más bajos. El hecho de la mayor velocidad de crecimiento versus menor tiempo de generación observado por nosotros confirman a relación entre estos dos parámetros de crecimiento, según Delignette-Muller (1998).

De manera general el crecimiento más rápido se ha monitorizado a pH 7,4. No obstante, con la temperatura de 42 °C se ha verificado el crecimiento óptimo a un pH de 6,5. Este hecho nos indica que el efecto sinérgico del % de NaCl y de la temperatura se ve afectado por el pH, es decir, a una temperatura de 42 °C, y a una concentración de NaCl entre 2,5 y 5,5%, el pH ideal para el crecimiento de la cepa de *E. coli* CECT 516 es de 6,5. Y en las mismas condiciones de temperatura y de sal, el microorganismo tolera mejor el pH 7,4 que 5,5. Este comportamiento puede servir para explicar como en los alimentos numerosos factores que afectan el crecimiento, a menudo, en sus interacciones, pueden tener efectos sinérgico o antagónico sobre el microorganismo, tal y como lo han sugerido Eifert y col. (1996). Por otro lado, como la velocidad de cada reacción aumenta, el metabolismo en general es mas activo a temperaturas altas, y el microorganismo crece más rápidamente con el incremento de la temperatura. Pero, a partir de cierto punto, un mayor incremento disminuye la velocidad de crecimiento, y temperaturas lo suficientemente elevadas son letales, puesto que ocasionan daños a los microorganismos al desnaturalizar las enzimas, las proteínas transportadoras y otras proteínas (Prescott y col., 1999; Montville, 2000).

Los tiempos de latencia más cortos se han registrado con las temperaturas estudiadas más elevadas, asumiendo un aumento proporcional a la disminución de la temperatura. Siguiendo la misma lógica, los tiempos de generación han disminuido con el aumento de la temperatura. Todo eso ha sido obtenido con las combinaciones del pH más elevado (7,4), y con la concentración más baja de cloruro sódico (2,5%), tal y como se presenta en la Tabla 11.

Respecto al incremento de la concentración de cloruro sódico, hubo un aumento de los tiempos de generación y de latencia. Esto también correspondió a la dinámica observada en trabajos de Robinson y col. (1998). Y en cierta medida se ha registrado un progresivo aumento de los tiempos de generación y de latencia, tal como publicaron Duffy y col. (1994).

La relación inversamente proporcional entre los tiempos de latencia y la velocidad de crecimiento verificada en los resultados de nuestro trabajo está en armonía con estudios de otros autores como McMeekin y col. (1993) y Baranyi y Roberts (1994).

En las Figuras 3, 4 y 5 se presentan las velocidades de crecimiento máximas y los tiempos de generación y de latencia mínimos *E. coli* CECT 516, respectivamente.

Figura 3. – Velocidades de crecimiento máximas

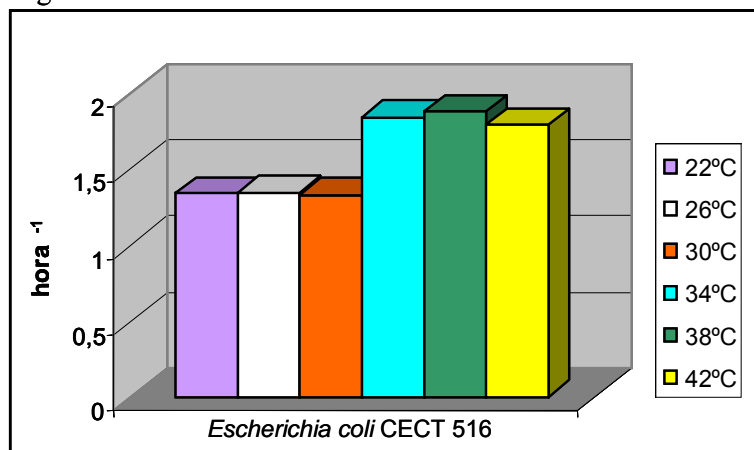


Figura 4. – Tiempos de generación mínimos

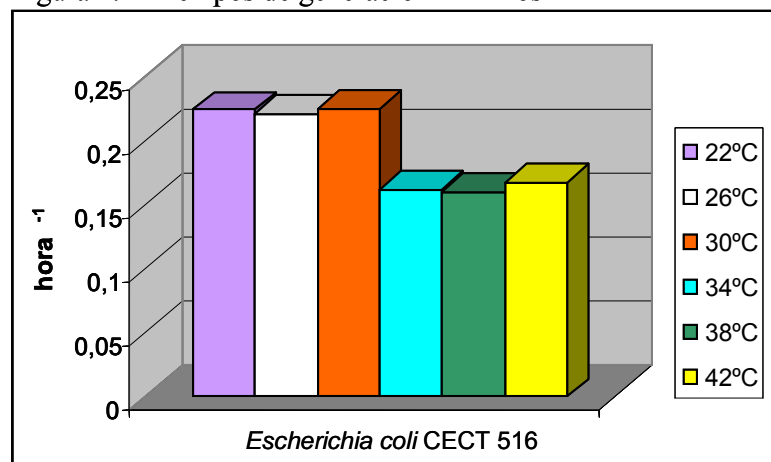
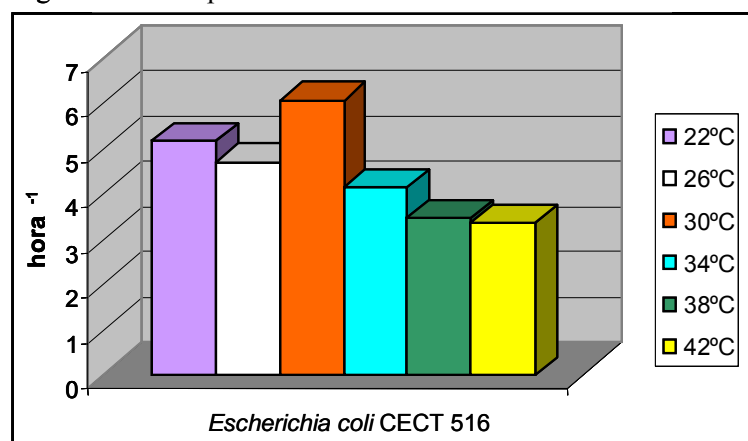


Figura 5. – Tiempos de latencia mínimos

Tabla 7. – Parámetros cinéticos de *E. coli* CECT 516 a 22 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
22	4,5	2,5	0,600	7,091	0,502
		3,5	0,422	11,905	0,714
		4,5	NC*	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	1,045	5,499	0,288
		3,5	0,776	7,009	0,388
		4,5	0,733	7,874	0,411
		5,5	0,613	10,305	0,491
	6,5	2,5	1,183	5,087	0,255
		3,5	0,986	6,358	0,305
		4,5	0,788	7,871	0,382
		5,5	0,680	9,321	0,443
7,4	2,5	1,342	5,149	0,224	
	3,5	1,126	6,779	0,267	
	4,5	0,781	8,430	0,385	
	5,5	0,692	9,702	0,435	

*NC = No calculado

Tabla 8. – Parámetros cinéticos de *E. coli* CECT 516 a 26 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
26	4,5	2,5	0,526	7,307	0,573
		3,5	0,415	11,478	0,725
		4,5	NC*	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	1,102	5,236	0,273
		3,5	0,842	6,499	0,357
		4,5	0,910	6,891	0,331
		5,5	0,601	8,765	0,501
	6,5	2,5	1,270	4,568	0,237
		3,5	1,015	6,483	0,297
		4,5	1,083	6,663	0,278
		5,5	0,741	7,824	0,406
7,4	2,5	1,356	4,696	0,222	
	3,5	1,183	6,593	0,254	
	4,5	0,789	8,196	0,381	
	5,5	0,746	8,154	0,404	

*NC = No calculado

Tabla 9. – Parámetros cinéticos de *E. coli* CECT 516 a 30 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
30	4,5	2,5	0,451	11,280	0,667
		3,5	NC*	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	1,083	5,571	0,278
		3,5	0,965	6,955	0,312
		4,5	0,551	9,479	0,546
		5,5	0,494	12,029	0,610
	6,5	2,5	1,207	6,094	0,249
		3,5	1,030	6,952	0,292
		4,5	0,729	8,732	0,413
		5,5	0,577	11,248	0,522
7,4	2,5	1,338	6,060	0,225	
	3,5	1,201	7,025	0,251	
	4,5	0,877	8,131	0,343	
	5,5	0,696	10,611	0,433	

*NC = No calculado

Tabla 10. – Parámetros cinéticos de *E. coli* CECT 516 a 34 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
34	4,5	2,5	0,266	10,569	1,134
		3,5	NC*	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	1,116	4,462	0,270
		3,5	1,154	6,217	0,261
		4,5	0,628	8,328	0,479
		5,5	0,439	11,490	0,686
	6,5	2,5	1,232	4,464	0,244
		3,5	1,069	5,321	0,282
		4,5	0,788	7,001	0,382
		5,5	0,631	9,283	0,477
	7,4	2,5	1,853	4,149	0,162
		3,5	1,558	5,156	0,193
		4,5	1,592	6,157	0,189
		5,5	0,810	7,705	0,372

*NC = No calculado

Tabla 11. – Parámetros cinéticos de *E. coli* CECT 516 a 38 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
38	4,5	2,5	0,270	10,748	1,115
		3,5	NC*	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	1,146	4,300	0,263
		3,5	1,152	5,974	0,261
		4,5	0,639	7,950	0,471
		5,5	0,482	10,484	0,625
	6,5	2,5	1,661	3,402	0,181
		3,5	1,600	4,307	0,188
		4,5	1,176	5,602	0,256
		5,5	0,870	6,707	0,346
	7,4	2,5	1,884	3,448	0,160
		3,5	1,866	4,268	0,161
		4,5	1,557	5,361	0,193
		5,5	1,164	6,169	0,259

*NC = No calculado

Tabla 12. – Parámetros cinéticos de *E. coli* CECT 516 a 42 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
42	4,5	2,5	NC*	NC	NC
		3,5	NC	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	1,110	4,521	0,271
		3,5	0,854	7,032	0,352
		4,5	0,433	9,538	0,695
		5,5	0,390	11,634	0,772
	6,5	2,5	1,796	3,338	0,168
		3,5	1,203	4,606	0,250
		4,5	1,006	5,828	0,299
		5,5	0,538	8,125	0,560
	7,4	2,5	1,543	3,723	0,195
		3,5	1,186	4,938	0,254
		4,5	0,626	6,475	0,481
		5,5	0,689	8,571	0,437

*NC = No calculado

1.1 – Modelado de la velocidad de crecimiento (μ) de *Escherichia coli* CECT 516

De acuerdo con la Tabla 13 entre las tres hipótesis de cálculo, ha sido seleccionado el modelo elaborado con los resultados obtenidos con la transformación de la raíz cuadrada de los datos de la velocidad de crecimiento por ser los que nos han ofrecido la menor RMSE (“root mean squared error”, raíz cuadrada de la media de la suma de los errores previamente elevados al cuadrado), es decir, una menor dispersión del error.

En la validación del modelo, la Figura 6 presenta una buena linealidad del modelo completo de la $\sqrt{\mu}$ con los valores actuales y predichos. Han sido obtenidos una R² de 0,86 y una RMSE de aproximadamente 0,08.

La Figura 7 presenta el cuadro de los valores residuales y predichos de la velocidad de crecimiento, en la cuál se puede observar una distribución uniforme de los mismos. Eso se percibe por la ausencia de sesgo, lo que significa que los valores residuales (o errores, es decir, obtenidos de restar los valores predichos de los

obtenidos o actuales) se distribuyen uniformemente tanto en los valores positivos como en los negativos en todos los μ (μ) predichos.

Tabla 13. – Modelos para cálculo de la μ de *E. coli* CECT 516 (P<0,0001)

Fórmula	μ	$\sqrt{\mu}$	$\ln\mu$
Intercept	-0,052	0,415	-0,868
Temp	0,009*	0,004*	0,007*
pH	0,269	0,150	0,251
% NaCl	-0,221	-0,117	-0,238
pH x Temp	0,015	0,009	0,010*
Temp x % NaCl	-0,006*	-0,004*	–
% NaCl x pH	–	–	–
Temp ²	–	–	–
pH ²	-0,122	-0,077	-0,162
% NaCl ²	–	–	–
R ²	0,82	0,86	0,88
RMSE	0,18	0,08	0,14

* = P<0,05

En las Figuras 8, 9 y 10 se presentan, respectivamente, la influencia de la temperatura, del pH y del % de NaCl sobre la variable μ de *E. coli* CECT 516.

Figura 6. – Modelo completo de la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* CECT 516

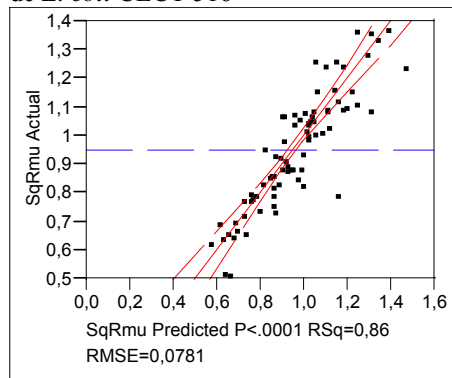


Figura 7. – Residuales por Predichos de la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* CECT 516

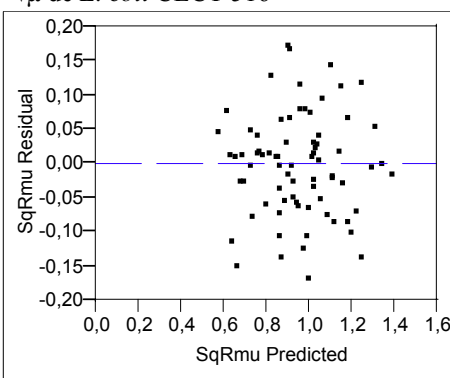


Figura 8. – Influencia de Temperatura sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* CECT 516

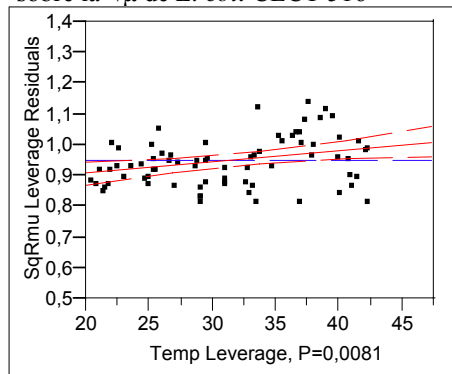


Figura 9. – Influencia de pH sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* CECT 516

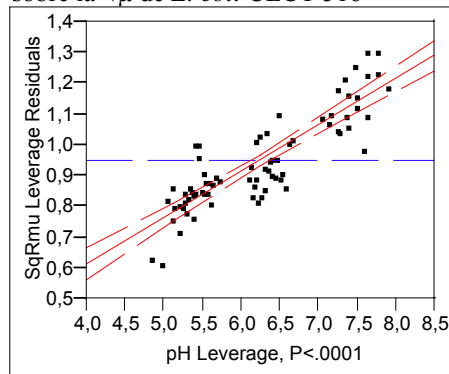


Figura 10. – Influencia de NaCl sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* CECT 516

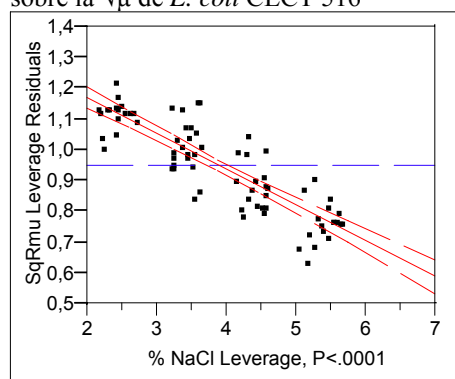
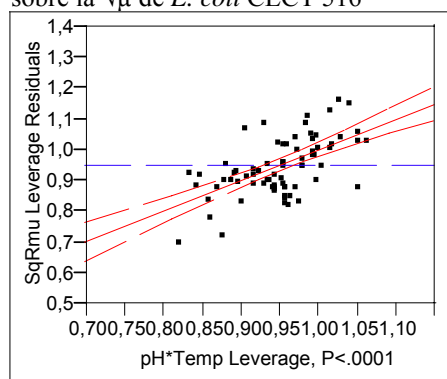


Figura 11. – Influencia de pH x Temp sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* CECT 516



Los valores residuales de la acción combinada del pH con la temperatura, del cloruro sódico con la temperatura y de la acción del pH elevado al cuadrado están gráficamente representados en las Figuras 11, 12 y 13, respectivamente.

Figura 12. – Influencia de NaCl x Temp sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* CECT 516

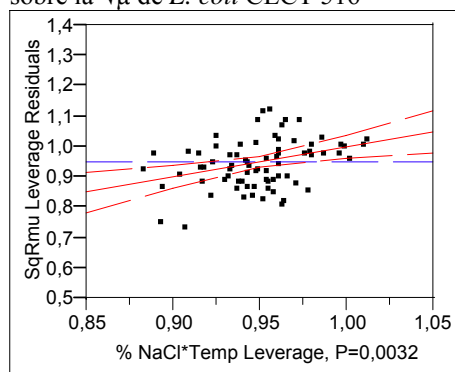
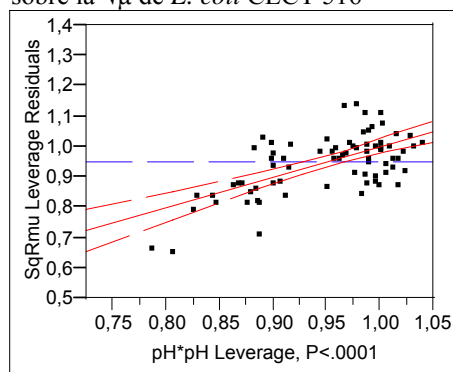


Figura 13. – Influencia de pH² sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* CECT 516



Este tipo de gráficas (“leverage plots”, gráficas de palanca) muestran cuál sería el residuo o error de cada punto tanto con como sin ese efecto en el modelo.

La distancia desde un punto hasta la línea de ajuste muestra el residuo o error actual de ese punto. Y la distancia desde ese punto hasta la línea horizontal de la media muestra cuál sería el error residual si quitáramos ese efecto del modelo. En otras palabras, la línea media en esta gráfica representa el modelo cuando el valor hipotetizado del parámetro o efecto es disminuido hasta cero. Así, la fuerza del efecto considerado (temperatura, pH, sal) se muestra según cuan lejos los puntos desplacen la línea de ajuste con respecto a la línea horizontal. También se muestran

los intervalos de confianza al 95%. Si las curvas que muestran estos intervalos cortan la línea horizontal, el efecto es significativo. Si no es así, no es significativo (a un nivel del 5%). Por lo tanto, de acuerdo con Sall, (1990), en las Figuras 8, 9, 10, 11, 12 y 13 se aprecia que son significativos los efectos aislados de la temperatura, pH, del NaCl % y los efectos combinados del pH con la temperatura y de esta con el cloruro sódico, bien como del pH elevado al cuadrado, respectivamente.

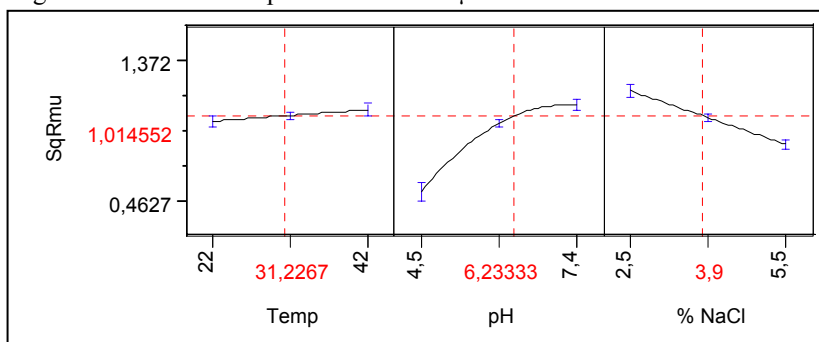
En la Figura 14 se muestra cómo cambian los valores predichos con respecto al cambio de un factor cada vez. El "prediction profiler" (perfilador de predicción) muestra "trazados de predicción" para cada variable X. Un trazado de predicción es la respuesta predicha cuando una variable se cambia mientras que las otras se mantienen constantes en los valores actuales. El prediction profiler tiene la capacidad de recalcular los trazados cada vez que se varía el valor de una variable X.

En el eje X: Valores actuales de los factores. La línea punteada vertical muestra el valor actual. En el eje Y: Valores predichos actuales para cada variable Y. La línea punteada horizontal muestra el valor actual de la variable Y.

En el interior del gráfico: La línea o curva generada (trazado de predicción) y sus marcadores muestran cómo cambia el valor predicho cuando cambiamos el valor actual de una variable individual X. El intervalo de confianza al 95% de los valores predichos se muestra mediante barras de error por encima y por debajo de cada marcador. Si en el modelo hay interacción de variables o efectos, los trazados de predicción cambian su pendiente y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X. Si no hay interacción de efectos, los trazados sólo cambian en altura, no en pendiente ni en su forma.

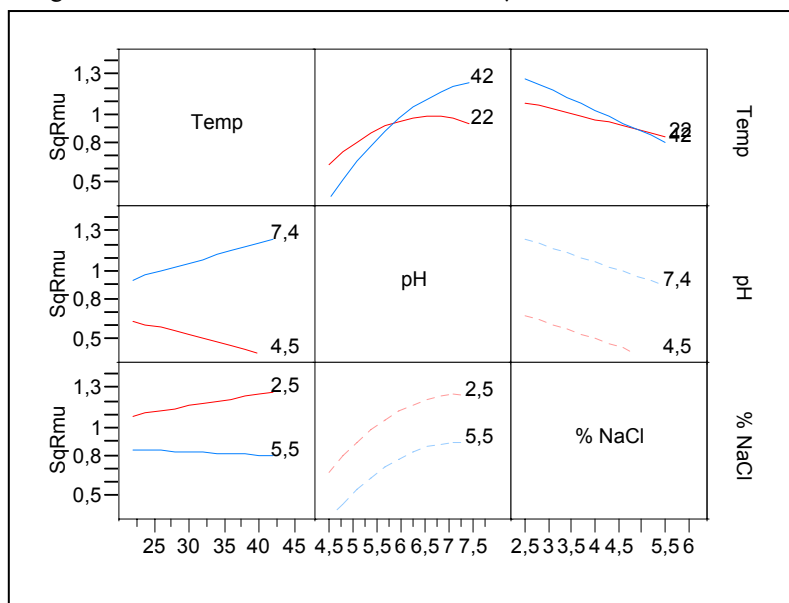
Como se puede observar en el caso de la Figura 14, el pH parece tener interacciones no lineales de efecto sobre el modelo de la raíz cuadrada de la μ , mientras que la temperatura y el % de NaCl parecen tenerlas lineales. La velocidad de crecimiento registra un aumento con el incremento de la temperatura y del pH, mientras que el aumento de la concentración de sal implica una disminución de la velocidad de crecimiento.

Figura 14. – Perfiles de predicción de la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* CECT

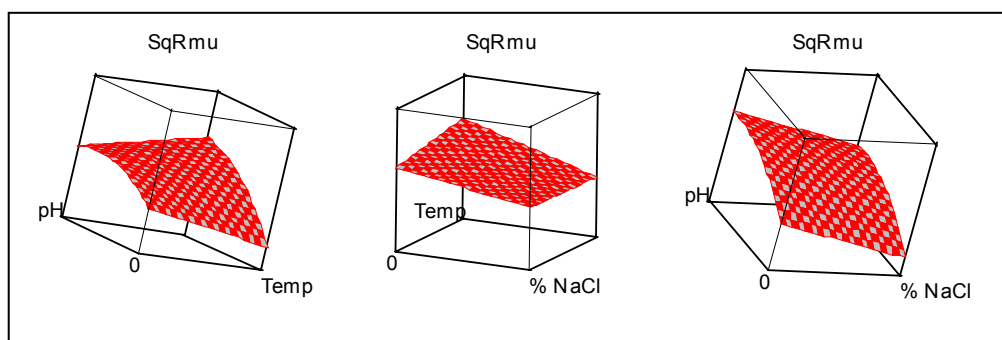


La Figura 15 muestra una matriz de gráficas de interacción de los diferentes factores estudiados. La interacción de los factores en el modelo es cuantificable y se evidencia gráficamente mediante líneas no paralelas.

Figura 15. – Perfiles de interacciones de la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* CECT 516



En la Figura 16 se presenta la superficie de respuesta de los efectos de la temperatura, del pH y del cloruro sódico sobre la variable μ , combinándolos de dos en dos.

Figura 16. Perfiles de superficie respuesta de predicción de la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* CECT 516

1.2 – Modelado del tiempo de generación (GT) de *Escherichia coli* CECT 516

Como se observa en la Tabla 14, entre las tres hipótesis de cálculo se ha seleccionado el modelo elaborado con los resultados obtenidos tras la transformación de los datos con la raíz cuadrada del tiempo de generación, al ser el que ha ofrecido una dispersión menor del error (RMSE menor).

Tabla 14. – Modelos para cálculo del GT de *E. coli* CECT 516 ($P < 0,0001$)

Fórmula	GT	\sqrt{GT}	LnGT
Intercept	0,542	0,899	-0,349
Temp	–	-0,003*	-0,010*
pH	-0,087	-0,083	-0,229
% NaCl	0,080	0,066	0,227
pH x Temp	–	-0,004	-0,008*
Temp x % NaCl	–	–	–
% NaCl x pH	–	–	–
Temp ²	–	–	–
pH ²	0,066	0,052	0,154
% NaCl ²	–	–	–
R ²	0,80	0,90	0,84
RMSE	0,07	0,04	0,16

* = $P < 0,05$.

La Figura 17 expresa linealidad en la validación del modelo completo de la raíz cuadrada del tiempo de generación con los valores actuales y predichos. La fiabilidad del modelo se indica por una buena precisión del mismo a través de los valores de R² de 0,90 y de una RMSE de aproximadamente 0,04.

Con utilidad en la validación del modelo, la Figura 18 presenta ausencia de sesgo en el cuadro de los valores residuales y predichos del GT, en la que se puede observar una distribución uniforme de los valores residuales por los predichos.

En las Figuras 19, 20 y 21 se presentan, respectivamente, la influencia de la temperatura, del pH y del % de NaCl sobre el tiempo de generación. El efecto del pH combinado con la temperatura, y del pH elevado al cuadrado sobre el tiempo de generación se muestran, respectivamente, en las Figuras 22 y 23. De acuerdo con Sall (1990), en dichas Figuras se aprecia que son significativos los efectos aislados de la temperatura, del pH, del % NaCl, así como la combinación del pH con la temperatura, y el cuadrado del pH elevado.

Figura 17. – Modelo completo de la \sqrt{GT} de *E. coli* CECT 516

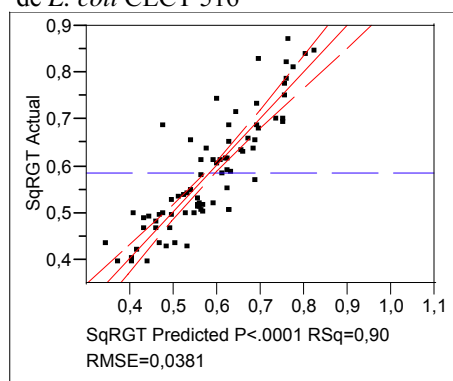


Figura 18. – Residuales por Predichos de la \sqrt{GT} de *E. coli* CECT 516

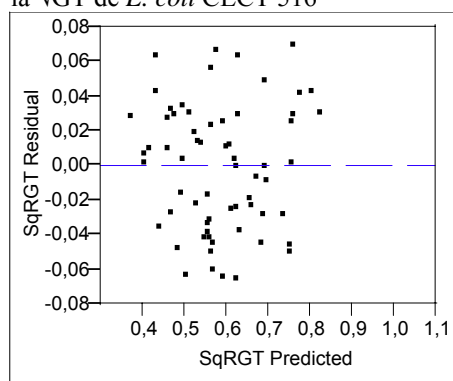


Figura 19. – Influencia de Temperatura sobre la \sqrt{GT} de *E. coli* CECT 516

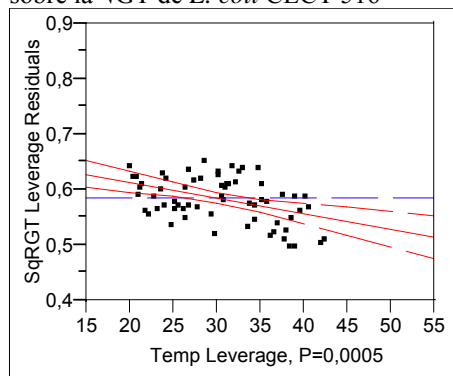


Figura 20. – Influencia de pH sobre la \sqrt{GT} de *E. coli* CECT 516

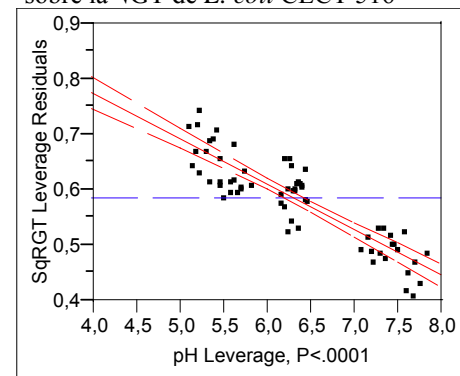
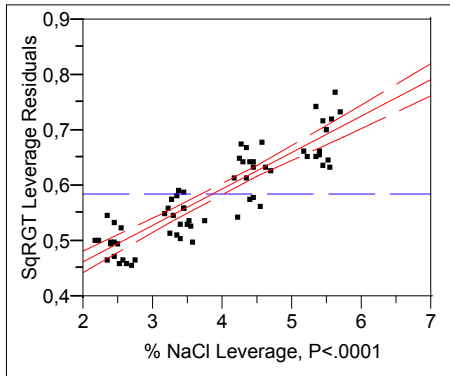
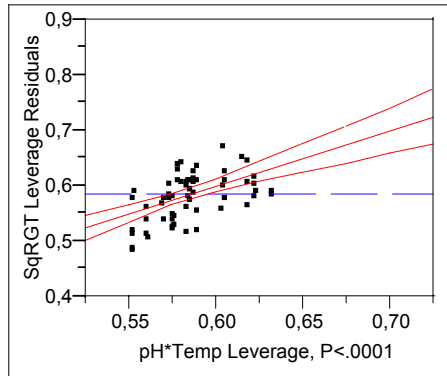
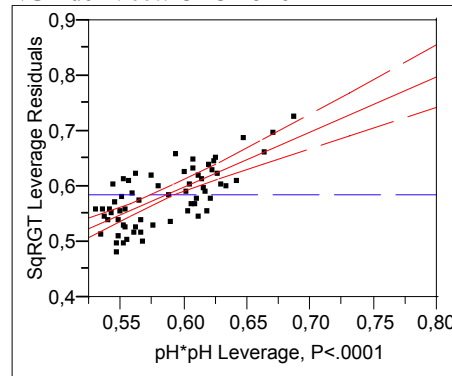
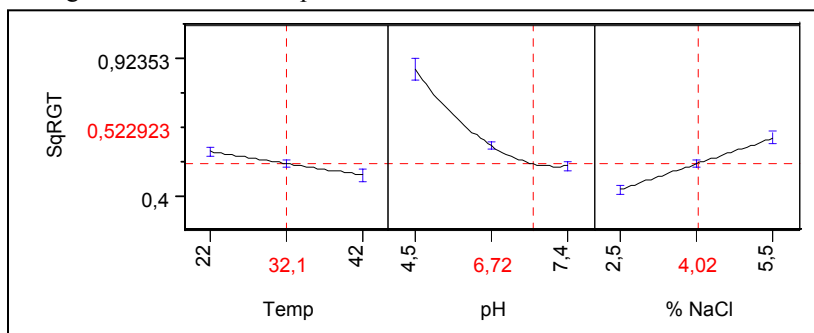


Figura 21. – Influencia de NaCl sobre la \sqrt{GT} de *E. coli* CECT 516Figura 22. – Influencia de pH x Temp sobre la \sqrt{GT} de *E. coli* CECT 516Figura 23. – Influencia de pH² sobre la \sqrt{GT} de *E. coli* CECT 516

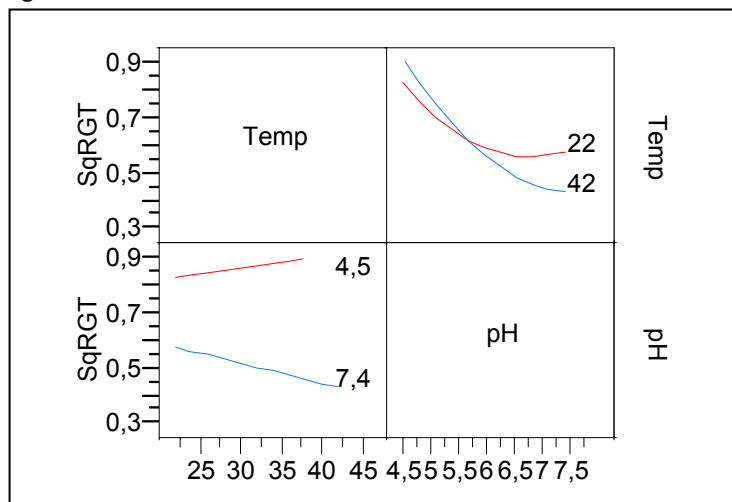
Como se puede observar en el caso de la Figura 24, los trazados de predicción del pH cambian su pendiente y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X. Esto indica que el pH tiene interacciones no lineales de efecto sobre el modelo de la raíz cuadrada del tiempo de generación, mientras que la temperatura y el % de NaCl parecen no tenerlo. Los tiempos de generación disminuyen con el incremento de la temperatura y del pH. Y el aumento de la concentración de sal implica un aumento de los tiempos de generación.

Figura 24. – Perfiles de predicción de la \sqrt{GT} de *E. coli* CECT 516

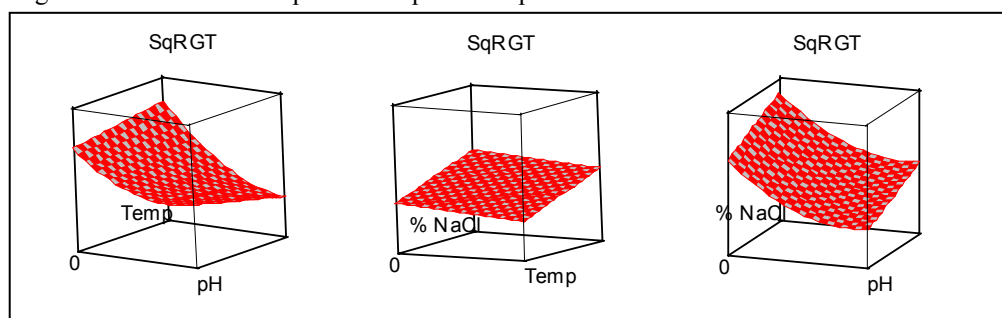


A semejanza de lo que se ha comentado para el caso del modelo de la velocidad de crecimiento de *Escherichia coli* CECT 516, la Figura 25 muestra que hay una interacción del efecto del pH con la temperatura. Esto se evidencia por las líneas no paralelas.

Figura 25. – Perfiles de interacciones de la \sqrt{GT} de *E. coli* CECT 516



En la Figura 26 se muestra la superficie respuesta de los efectos de la temperatura, pH y del cloruro sódico, sobre la variable tiempo de generación, combinándolos de dos en dos.

Figura 26. – Perfiles de superficie respuesta de predicción de la \sqrt{GT} de *E. coli* CECT 516

1.3 – Modelado del tiempo de latencia (LT) de *Escherichia coli* CECT 516

Para el modelado del tiempo de latencia de *E. coli* CECT 516, entre las tres hipótesis de cálculo (Tabla 15) han sido seleccionados los resultados obtenidos mediante el uso de la transformación con la raíz cuadrada, con la que se ha obtenido una R^2 de 0,85 y una RMSE de 0,17.

Tabla 15. – Modelos para cálculo del LT de *E. coli* CECT 516 ($P < 0,0001$)

Fórmula	LT	\sqrt{LT}	LnLT
Intercept	8,551	3,010	1,979
Temp	-0,047*	-0,011*	-0,012
pH	-1,146	-0,221	-0,117
% NaCl	1,576	0,299	0,235
pH x Temp	-0,085	-0,017	-0,010*
Temp x % NaCl	–	–	–
% NaCl x pH	-0,283*	–	–
Temp ²	–	–	–
pH ²	1,379	0,221	0,149
% NaCl ²	–	–	–
R^2	0,85	0,85	0,87
RMSE	0,93	0,17	0,13

* = $P < 0,05$.

También se ha tenido en cuenta para la selección que en la validación del modelo completo de la raíz cuadrada del tiempo de latencia los valores actuales y predichos presentan linealidad en la Figura 27. Por otro lado, la gráfica de los valores residuales y predichos del tiempo de latencia que se presentan en la Figura 28, permite observar ausencia de sesgo y de valores extremos influyentes, es decir, una distribución uniforme de los valores residuales por los predichos.

En las Figuras 29, 30 y 31, respectivamente, se presenta de manera aislada la influencia de la temperatura, del pH y del % de NaCl, respectivamente, sobre el tiempo de latencia. Los efectos combinados del pH con la temperatura y del pH elevado al cuadrado sobre el tiempo de latencia se observan en las Figuras 32 y 33, respectivamente. De acuerdo con Sall (1990), en las cinco últimas figuras se aprecia que son significativos los efectos aislados de la temperatura, del pH, del NaCl %, y los efectos combinados del pH con la temperatura, y del pH elevado al cuadrado.

Figura 27. – Modelo completo de la \sqrt{LT} de *E. coli* CECT 516

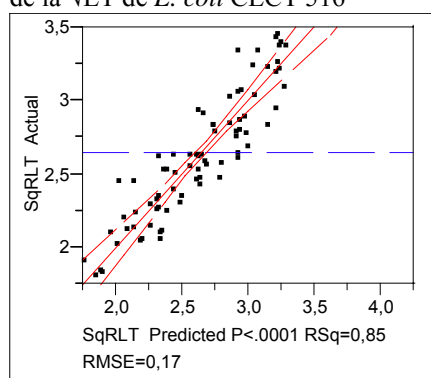


Figura 28. – Residuales por Predichos de la \sqrt{LT} de *E. coli* CECT 516

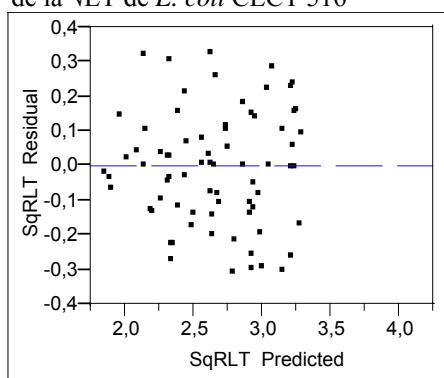


Figura 29. – Influencia de Temperatura sobre la \sqrt{LT} de *E. coli* CECT 516

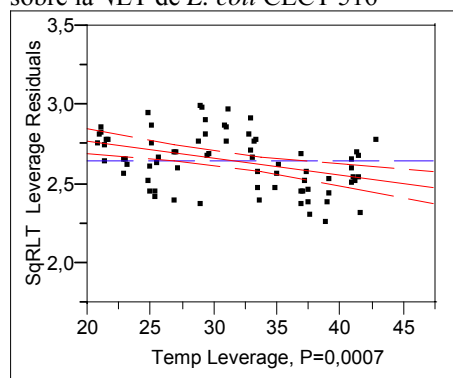


Figura 30. – Influencia de pH sobre la \sqrt{LT} de *E. coli* CECT 516

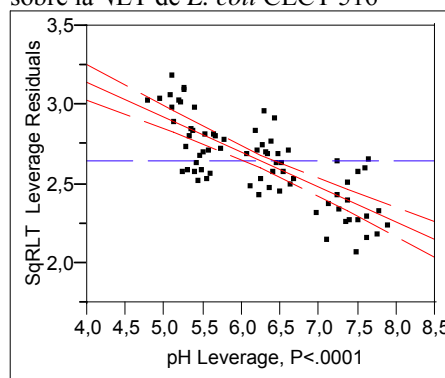


Figura 31. – Influencia de NaCl sobre la \sqrt{LT} de *E. coli* CECT 516

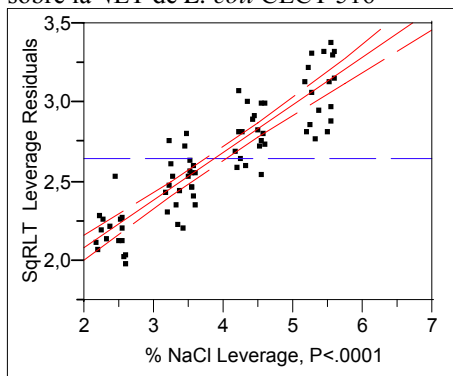


Figura 32. – Influencia de pH x Temp sobre la \sqrt{LT} de *E. coli* CECT 516

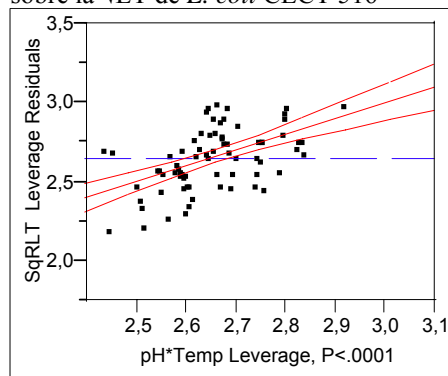
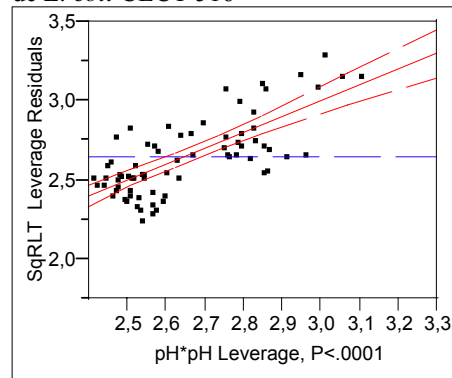
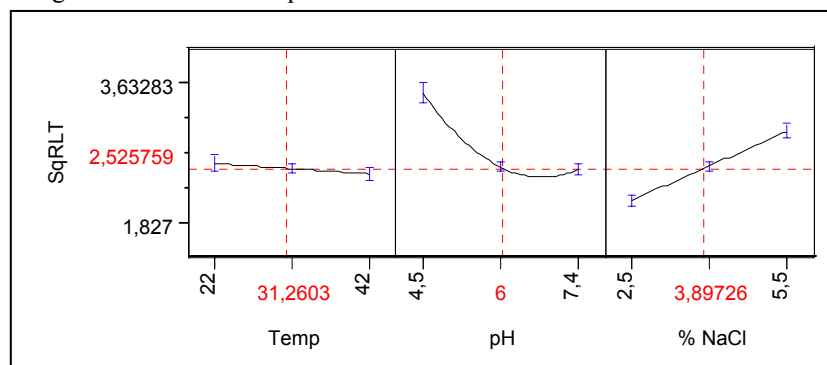


Figura 33. – Influencia de pH^2 sobre la $\sqrt{\text{LT}}$ de *E. coli* CECT 516



Como se puede observar en la Figura 34, los trazados de predicción del pH cambian su pendiente y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X, lo cuál indica que el pH tiene interacciones de efecto no lineal sobre el modelo de la raíz cuadrada del tiempo de latencia. A su vez, tanto la temperatura como el % de NaCl parecen no tener interacciones no lineales sobre el modelo de la raíz cuadrada del tiempo de latencia, puesto que los trazados sólo cambian en altura pero no en su forma. Por tanto, a semejanza de los tiempos de generación, los tiempos de latencia disminuyen con el incremento de la temperatura y del pH. Mientras que el aumento de la concentración de sal implica un aumento de los tiempos de latencia.

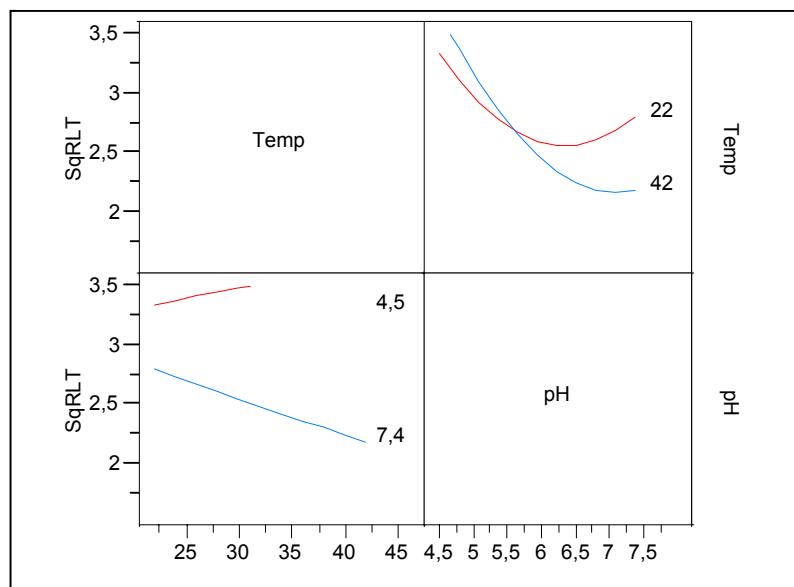
Figura 34. – Perfiles de predicción de la $\sqrt{\text{LT}}$ de *E. coli* CECT 516



Tal y como se ha mostrado en los modelados de la velocidad de crecimiento y del tiempo de generación de *Escherichia coli* CECT 516, la Figura 35 muestra una matriz de gráficas de interacción. Dicha interacción es cuantificable y se evidencia mediante las líneas no paralelas. Por tanto, la interacción de los efectos de la

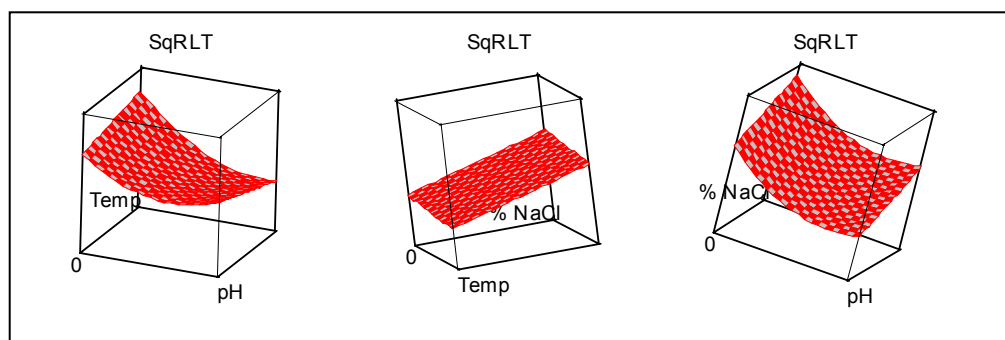
temperatura y del pH afecta el modelo. Dichos efectos son mayores a la medida que se incrementa la temperatura y el pH.

Figura 35. – Perfiles de interacciones de la \sqrt{LT} de *E. coli* CECT 516



La superficie respuesta en la combinación de los efectos del pH con la temperatura, de esta con el % NaCl y de este con el pH, mostrando su efecto sobre la variable tiempo de generación se presentan en la Figura 36.

Figura 36. – Perfiles de superficie respuesta de predicción de la \sqrt{LT} de *E. coli* CECT 516



2 – *Escherichia coli* O157:H7

En las Tablas 16, 17, 18, 19, 20 y 21 se presentan los resultados de las variables del crecimiento cinético calculados a través de los datos de la densidad óptica (DO) ajustados con la ecuación de Gompertz. Estos resultados reflejan el efecto combinado de la de temperatura, pH y NaCl juntos, ya que se trata de un experimento multifactorial, como señalaron Robinson y col. (1998). De modo general indican que a una misma temperatura, la velocidad de crecimiento disminuye con la reducción del pH y con el incremento de la concentración de sal.

En las condiciones en las que no se ha registrado alteración de DO se admite que no ha sido detectado crecimiento del microorganismo, por lo que no fueron calculados los parámetros cinéticos.

Como se indicó en el caso de *E. coli* CECT 516, de una manera general, la velocidad de crecimiento ha disminuido con el incremento de la concentración de sal en todas las combinaciones de temperatura y pH. Este comportamiento es similar al publicado por Robinson y col. (1998), quienes han descrito una disminución de la tasa de crecimiento aproximadamente lineal con el aumento de la osmolaridad.

Con el pH 4,5 no se ha observado alteración de los valores iniciales de la DO, indicando que, aparentemente, no se ha producido crecimiento durante el período de estudio. Por eso, no fueron calculados los parámetros cinéticos en dichas condiciones. Esto significaría que el carácter ácido del pH a 4,5 impidió el crecimiento del microorganismo a todas las concentraciones de NaCl en todas las temperaturas, haciendo percibir la sinergia bacteriostática de la combinación de acidez y de la presión osmótica sobre el microorganismo patógeno. Como se explicó en el caso de *E. coli* CECT 516, esto concuerda con Eifert y col. (1996). Por otro lado, también está de acuerdo con Buchanan y Klawiter (1992), quienes no han observado crecimiento de *E. coli* O157:H7 a 37 °C con pH 4,5 utilizando una concentración de 5% de NaCl, aunque han publicado parámetros cinéticos del patógeno utilizando 0,5% de NaCl. Asimismo, el ICMSF (1998) indica que el microorganismo es capaz de crecer a un pH 4,5 ajustado con HCl, pero no en un

medio cuyo pH ha sido ajustado con ácido láctico y en quesos fermentados a un pH \leq 5,4.

Glass y col. (1992) indicaron que los tiempos de latencia y de generación de *E. coli* O157:H7 no se ven afectados prácticamente por las concentraciones de NaCl iguales o inferiores a 2,5%, a pH 7,3, y 37 °C. Sutherland y col. (1995) mostraron en su modelo que al pH 6,8 (característica del queso Camembert) a temperaturas de 20 y 30 °C, son necesarias concentraciones entre 3 y 4% de NaCl para que los tiempos de generación aumenten significativamente. Como consecuencia, a menos que el contenido en cloruro sódico sea superior a 2,5-3% no parece afectar el crecimiento de *E. coli* en el queso. Este postulado se ha observado de manera general en nuestro trabajo puesto que el incremento de la concentración de sal ha afectado los parámetros cinéticos.

A la temperatura de 42 °C, y al pH de 7,4 no se ha observado incremento de la densidad óptica cuando los valores de la concentración de sal fueron de 4,5 y 5,5%, lo cual indica que, aparentemente, no se ha producido crecimiento del microorganismo durante las 24 horas del estudio en las condiciones indicadas, y eso implicaría la necesidad de una fase de latencia superior a 24 horas, período durante el cual la cepa de *E. coli* O157:H7 se adaptaría al medio o repararía eventuales daños causados en su equilibrio homeostático. Esto sería posible mediante la activación de los mecanismos indicados por Eifert y col. (1996), Prescott y col. (1999), Montville (2000) y Hill (2004), ya descritos para el caso de *E. coli* CECT 516. Teniendo esto en consideración, no debería descartarse la posibilidad de un crecimiento posterior a las 24 h, puesto que el ICMSF (1998) indica que el patógeno es capaz de crecer lentamente en un caldo que contenga 6,5% de NaCl. Por otro lado, es importante señalar que la temperatura de 42 °C actuó de manera sinérgica en la inhibición provocada por la presión osmótica.

Aunque en el presente estudio no se ha detectado posible crecimiento a 42 °C con un pH 4,5 y en todas concentraciones de sal estudiadas, Sutherland y col. (1995) han publicado tiempos de generación a 42 °C, a pH 4,5 y con 0,5% de NaCl, lo que hace pensar que, para dichas condiciones de temperatura y de pH, el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en caldo BHI es posible a concentraciones inferiores a 2,5% de NaCl.

Dichos autores han publicado el valor de 0,5 h como tiempo de generación de *E. coli* O157:H7 calculado según el modelo de Gompertz modificado a 37 °C, pH 7,5 y 5% NaCl. En condiciones relativamente similares en el presente trabajo (38 °C, pH 7,4 y 5,5% de NaCl), se han calculado 0,2 h como el tiempo de generación del mismo microorganismo. Tales diferencias podrían ser atribuidas a las variaciones de los valores de temperaturas y de la concentración de sal utilizados tanto por dichos autores como en este estudio.

Se ha obtenido un tiempo de generación aproximado de 0,4 h a 30 °C, pH 5,5 a 2,5% de NaCl. Este valor es cercano al tiempo de generación publicado por Sutherland y col. (1995) para *E. coli* O157:H7 en carne de vacuno cruda, en carne de pato y de cerdo con 0,5, 1 y 1,5% de NaCl, respectivamente. En el presente estudio se han encontrado resultados similares (bajo las condiciones de 30 °C, pH 6,5 y 2,5% NaCl) a los descritos por dichos autores en el caso del pollo con 0,5% NaCl.

Incubando el microorganismo a 37 °C en caldo de soja triptona con pH 7,3, utilizando concentraciones de 2,5 y 4,5% de NaCl, Sutherland y col. (1995) han obtenido tiempos de generación de aproximadamente 0,3 y 0,4 h, respectivamente. En el presente estudio, en caldo BHI a 38 °C, pH, 7,4 se han obtenido 0,2 y 0,4 h, para las concentraciones de 2,5 y 4,5% de NaCl, respectivamente. Por otro lado, los mismos autores publicaron un tiempo de generación de 0,18 h para 37 °C con pH 6,5 y 0,5% NaCl, mientras que en este trabajo se han obtenido valores de 0,23 h para 38 °C, pH 6,5 y 2,5% NaCl.

Con las combinaciones de pH 6,5, 5,5% de NaCl y temperaturas de 26 °C y 30 °C, en el presente trabajo obtuvimos, respectivamente, velocidades de crecimiento de 0,37 y 0,36 h⁻¹, tiempos de generación de 0,82 y 0,85 h, y tiempos de latencia de 17,9 y 16,7 h. En condiciones aproximadas a las estudiadas, pero utilizando otros humectantes en lugar de NaCl, Buchanan y Bagi (1997) han obtenido una velocidad de crecimiento de 0,54 h⁻¹, tiempo de generación de 0,6 h, y fase de latencia de 2,5 h utilizando las combinaciones de 28 °C, pH 6,5 y 5% de sorbitol como humectante; y velocidad de crecimiento de 0,50 h⁻¹, tiempo de generación de 0,6 h, y fase de latencia de 2,4 h utilizando las combinaciones de 28 °C, pH 6,5 y 5% de sacarosa como humectante. Las diferencias entre el sorbitol, la sacarosa y el cloruro sódico podrían justificar las

diferencias de valores entre los resultados, principalmente en lo que respecta a los tiempos de latencia.

De las 96 combinaciones de temperatura, pH y NaCl que se han realizado, la mayor velocidad de crecimiento ($\mu = 1,51 \text{ h}^{-1}$), los menores tiempos de latencia ($LT = 3,77 \text{ h}$) y de generación ($GT = 0,20 \text{ h}$) han sido obtenidos a $38 \text{ }^\circ\text{C}$ con un pH de 7,4 a una concentración de 2,5% de NaCl (Tabla 20). En condiciones aproximadas a las que hemos estudiado ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, pH = 6,5, 5% de NaCl) pero con la presencia de 5% de NO_2 , Buchanan y Bagi (1994), encontraron una velocidad de crecimiento mas baja que la citada en el presente estudio ($\mu = 0,38 \text{ h}^{-1}$), y tiempos de latencia ($LT = 17,3 \text{ h}$) y de generación ($GT = 0,8 \text{ h}$) más elevados. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la presencia de NO_2 , lo cual potenció aun más el efecto inhibitor del cloruro sódico, y también con la metodología de cálculo por ellos utilizada.

De manera general, el crecimiento más rápido se ha monitorizado a pH 7,4. Sin embargo, con la temperatura de $42 \text{ }^\circ\text{C}$ se ha encontrado el crecimiento óptimo a un pH de 6,5. Este hecho nos hace creer que el efecto sinérgico del % de NaCl y de la temperatura se ve afectado por el pH, es decir, a una temperatura de $42 \text{ }^\circ\text{C}$, y a una concentración de NaCl entre 2,5 y 5,5%, el pH ideal para el crecimiento de la cepa de *E. coli* O157:H7 estudiada es de 6,5. Y en las mismas condiciones de temperatura y de sal, el patógeno tolera mejor el pH 5,5 que 7,4, contrariamente al registrado con la cepa no patógena estudiada. Los tiempos de latencia más cortos se han registrado con las temperaturas más elevadas, asumiendo un aumento proporcional a la disminución de la temperatura. Obedeciendo la misma lógica, los tiempos de generación han disminuido con el aumento de la temperatura. Todo esto ha sido obtenido con las combinaciones de pH más alto (7,4) y la concentración más baja de cloruro sódico (2,5%); excepto a $42 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura en la cual los menores tiempos de generación y latencia se han observado con el pH de 6,5, tal y como se muestra en la Tabla 21. Y este comportamiento se ajusta a la descripción de Prescott y col. (1999) y Montville (2000).

A semejanza de lo descrito en el caso de la cepa de *E. coli* no patógeno, también se ha observado la relación inversamente proporcional entre los tiempos de latencia y la

velocidad de crecimiento, concordando con estudios de otros autores como McMeekin y col. (1993) y Baranyi y Roberts (1994). Del mismo modo, se ha demostrado la relación de mayor velocidad de crecimiento versus menor tiempo de generación de acuerdo con Delignette-Muller (1998).

En las Figuras 37, 38 y 39 se presentan las velocidades de crecimiento máximas y los tiempos de generación y de latencia mínimos de *E. coli* O157:H7, respectivamente.

Figura 37. – Velocidades de crecimiento máximas

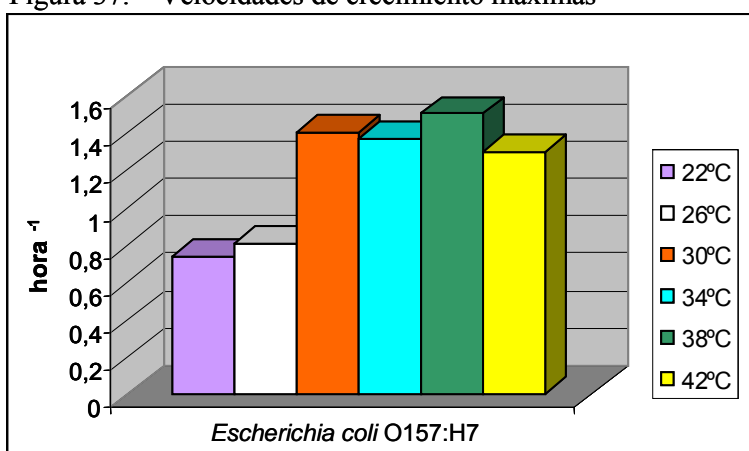


Figura 38. – Tiempos de generación mínimos

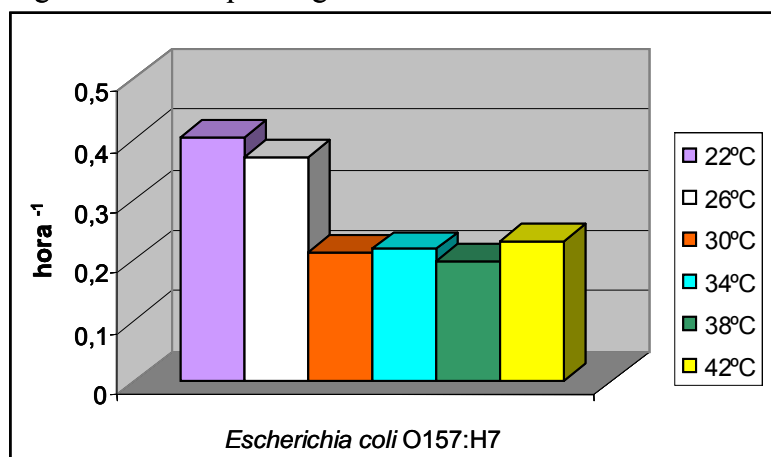


Figura 39. – Tiempos de latencia mínimos

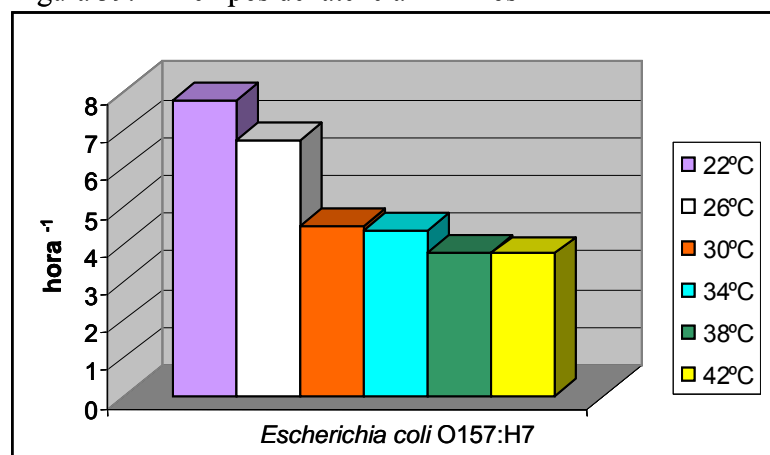


Tabla 16. – Parámetros cinéticos de *E. coli* O157:H7 a 22 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
22	4,5	2,5	NC*	NC	NC
		3,5	NC	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	0,694	9,272	0,434
		3,5	0,568	12,013	0,530
		4,5	0,531	17,187	0,567
		5,5	0,382	19,806	0,789
	6,5	2,5	0,673	7,670	0,447
		3,5	0,483	9,935	0,623
		4,5	0,371	13,518	0,811
		5,5	0,301	19,786	1,001
	7,4	2,5	0,744	7,802	0,404
		3,5	0,618	10,290	0,487
		4,5	0,449	14,741	0,671
		5,5	0,340	20,314	0,886

*NC = No calculado

Tabla 17. – Parámetros cinéticos de *E. coli* O157:H7 a 26 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
26	4,5	2,5	NC*	NC	NC
		3,5	NC	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	0,783	7,214	0,384
		3,5	0,671	9,888	0,449
		4,5	0,582	13,763	0,517
		5,5	0,486	18,691	0,620
	6,5	2,5	0,621	6,333	0,485
		3,5	0,484	9,004	0,622
		4,5	0,427	12,852	0,706
		5,5	0,369	17,851	0,815
	7,4	2,5	0,813	6,728	0,370
		3,5	0,694	8,939	0,434
		4,5	0,517	12,452	0,582
		5,5	0,343	18,244	0,878

*NC = No calculado

Tabla 18. – Parámetros cinéticos de *E. coli* O157:H7 a 30 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
30	4,5	2,5	NC*	NC	NC
		3,5	NC	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	0,844	6,674	0,357
		3,5	0,762	8,863	0,395
		4,5	0,615	11,850	0,490
		5,5	0,461	17,427	0,653
	6,5	2,5	0,761	5,616	0,396
		3,5	0,610	7,627	0,493
		4,5	0,478	11,151	0,629
		5,5	0,356	16,686	0,845
	7,4	2,5	1,410	4,483	0,214
		3,5	1,050	6,066	0,287
		4,5	0,583	8,968	0,516
		5,5	0,376	13,322	0,800

*NC = No calculado

Tabla 19. – Parámetros cinéticos de *E. coli* O157:H7 a 34 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
34	4,5	2,5	NC*	NC	NC
		3,5	NC	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	0,966	5,376	0,312
		3,5	0,825	7,255	0,365
		4,5	0,648	9,783	0,465
		5,5	0,434	14,312	0,693
	6,5	2,5	1,219	4,209	0,247
		3,5	1,239	5,297	0,243
		4,5	1,044	6,895	0,288
		5,5	0,626	8,261	0,481
	7,4	2,5	1,372	4,360	0,219
		3,5	1,074	6,077	0,280
		4,5	0,779	9,174	0,387
		5,5	0,480	15,005	0,627

*NC = No calculado

Tabla 20. – Parámetros cinéticos de *E. coli* O157:H7 a 38 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
38	4,5	2,5	NC*	NC	NC
		3,5	NC	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	1,100	4,751	0,274
		3,5	0,913	6,272	0,330
		4,5	0,690	8,198	0,436
		5,5	0,371	12,757	0,811
	6,5	2,5	1,488	4,706	0,202
		3,5	1,263	6,349	0,238
		4,5	0,994	7,621	0,303
		5,5	0,689	10,639	0,437
	7,4	2,5	1,507	3,765	0,200
		3,5	1,141	5,513	0,264
		4,5	0,803	8,872	0,375
		5,5	0,393	16,036	0,765

*NC = No calculado

Tabla 21. – Parámetros cinéticos de *E. coli* O157:H7 a 42 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
42	4,5	2,5	NC*	NC	NC
		3,5	NC	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
5,5	5,5	2,5	0,876	5,001	0,344
		3,5	0,763	6,718	0,395
		4,5	0,503	8,924	0,599
		5,5	0,315	12,079	0,956
6,5	6,5	2,5	1,301	3,743	0,231
		3,5	1,206	4,493	0,250
		4,5	0,889	5,544	0,339
		5,5	0,691	6,577	0,436
7,4	7,4	2,5	0,859	4,446	0,350
		3,5	0,463	23,150	0,650
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC

*NC = No calculado

2.1 – Modelado de la velocidad de crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7

De acuerdo con lo que se presenta en la Tabla 22, entre las tres hipótesis de cálculo fueron seleccionados los resultados obtenidos con la transformación de la raíz cuadrada de los datos de la velocidad de crecimiento, ya que son los que nos han ofrecido una RMSE más baja.

Tabla 22. – Modelos para cálculo de la μ de *E. coli* O157:H7 (P<0,0001)

Fórmula	μ	$\sqrt{\mu}$	$\ln\mu$
Intercept	0,152	0,483	-1,083
Temp	0,024	0,015	0,034
pH	0,092	0,054	0,112*
% NaCl	-0,192	-0,109	-0,267
pH x Temp	0,015	0,010	0,023
% NaCl x Temp	-0,009	-0,003*	–
% NaCl x pH	-0,063*	-0,023*	–
Temp ²	–	–	–
pH ²	–	–	–
% NaCl ²	–	–	–
R ²	0,87	0,85	0,85
RMSE	0,12	0,07	0,17

* = P<0,05

La Figura 40 presenta el modelo completo de la $\sqrt{\mu}$ con los valores actuales y predichos. Han sido obtenidos una R^2 de 0,85 y una RMSE de aproximadamente 0,07.

La Figura 41 presenta el cuadro de los valores residuales y predichos de la μ , observándose en ella una distribución prácticamente uniforme de los valores residuales por los predichos. Eso significa que los valores residuales (o errores, es decir, obtenidos de restar los valores predichos de los obtenidos o actuales) se distribuyen sin sesgo, es decir, uniformemente tanto en los valores positivos como en los negativos en todos los μ predichos.

Figura 40. – Modelo Completo de la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* O157:H7

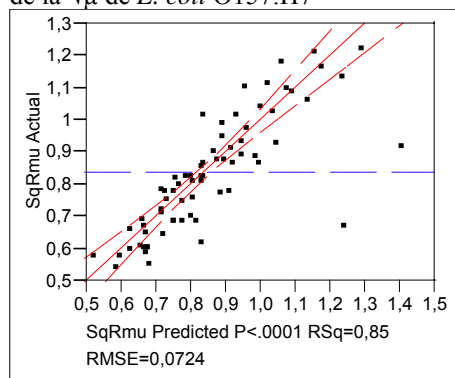


Figura 41. – Residuales por Predichos de la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* O157:H7

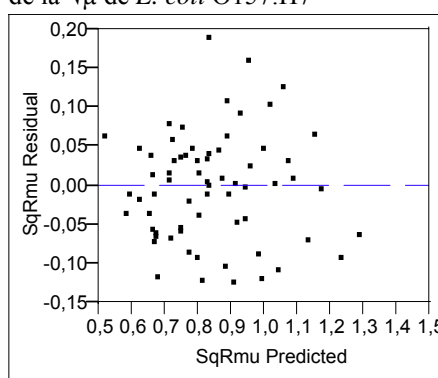


Figura 42. – Influencia de la Temperatura sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* O157:H7

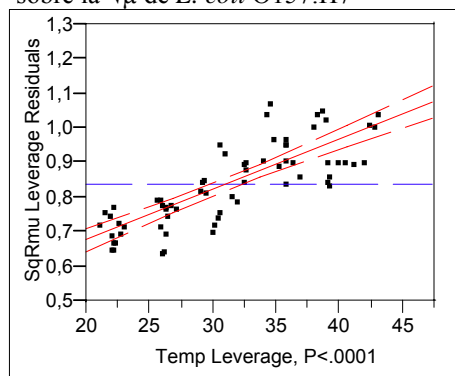


Figura 43. – Influencia de pH sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* O157:H7

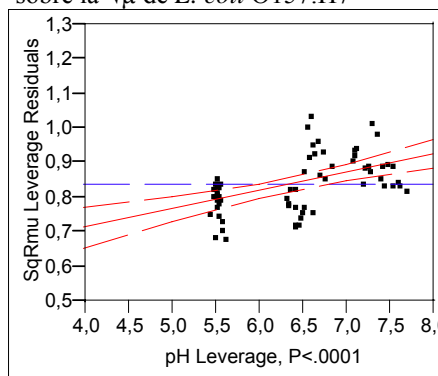
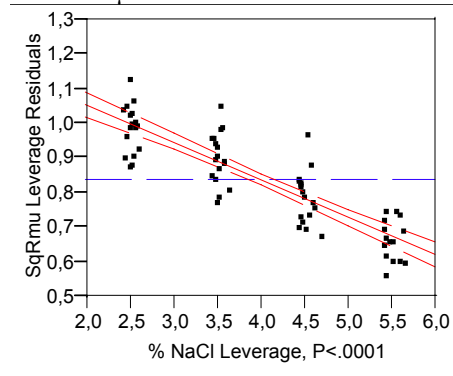
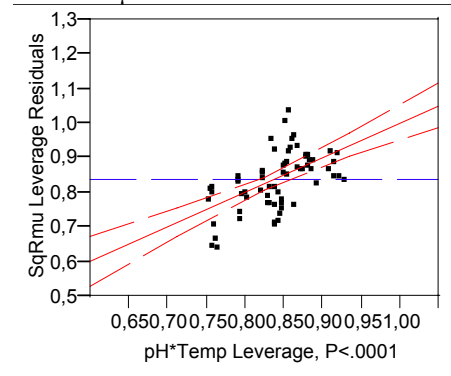
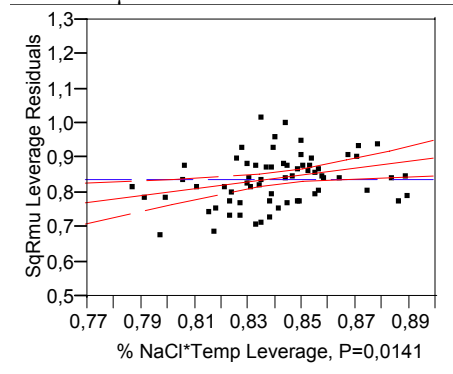
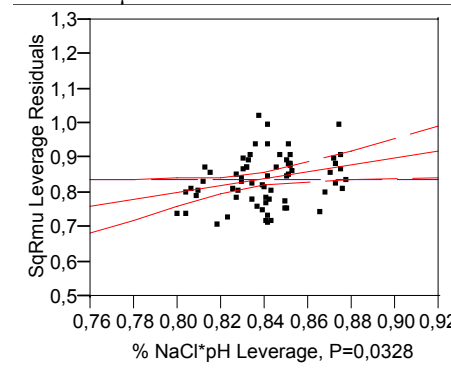


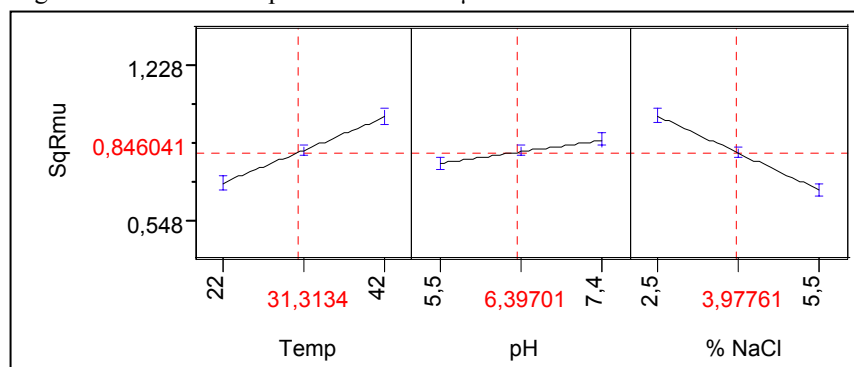
Figura 44. – Influencia de NaCl sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* O157:H7Figura 45. – Influencia de pH x Temp sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* O157:H7Figura 46. – Influencia de NaCl x Temp sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* O157:H7Figura 47. – Influencia de NaCl x pH sobre la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* O157:H7

En las Figuras 42, 43 y 44 se presentan, respectivamente, la influencia de la temperatura, del pH y del cloruro sódico sobre la velocidad de crecimiento. Los efectos combinados del pH con la temperatura, del cloruro sódico con la temperatura y del cloruro sódico con el pH se muestran en las Figuras 45, 46 y 47, respectivamente. Tal y como se comentó en el caso de *E. coli* CECT 516, este tipo de figuras muestran cuál sería el residuo o error de cada punto tanto con como sin ese efecto en el modelo. La distancia desde un punto hasta la línea de ajuste muestra el residuo o error actual de ese punto. Y la distancia desde ese punto hasta la línea horizontal de la media muestra cuál sería el error residual si quitáramos ese efecto del modelo. Es decir, la línea media en esta gráfica representa el modelo cuando el valor hipotetizado del parámetro o efecto es disminuido hasta cero. Así, la fuerza del efecto considerado (temperatura, pH y sal) se muestra según cuan lejos los puntos

desplacen la línea de ajuste con respecto a la línea horizontal. También se muestran los intervalos de confianza al 95%. Si las curvas que muestran estos intervalos cortan la línea horizontal, el efecto es significativo. Si no es así, no es significativo (a un nivel del 5%). Por lo tanto, de acuerdo con Sall (1990), en las Figuras 40, 43, 44, 45, 46 y 47 se aprecia que son significativos los efectos aislados de la temperatura, del pH y del % NaCl, así como los efectos combinados del pH con la temperatura, del cloruro sódico con la temperatura y del cloruro sódico con el pH sobre la velocidad de crecimiento.

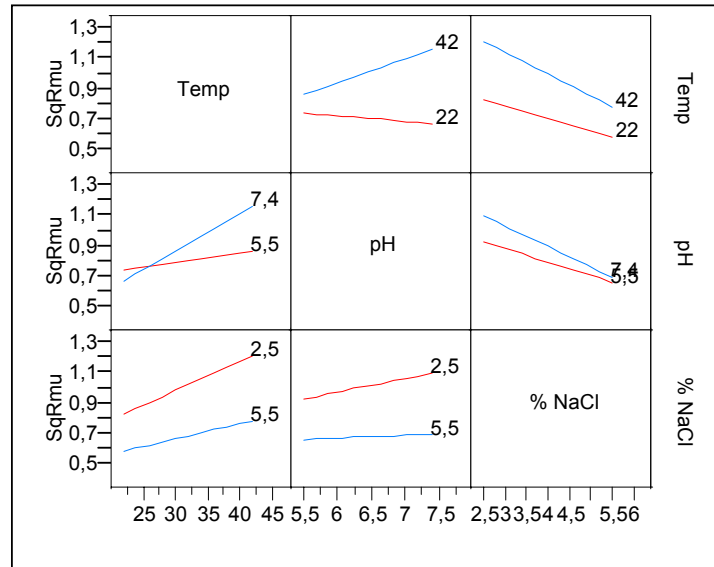
Tal como se ha explicado para el caso de *Escherichia coli* CECT 516, con respecto al modelo de la μ , en la Figura 48 se observa que en el modelo no hay interacción no lineal de variables o efectos, respecto a la temperatura, pH y el % NaCl puesto que los trazados de predicción no cambian su pendiente y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X.

Figura 48. – Perfiles de predicción de la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* O157:H7



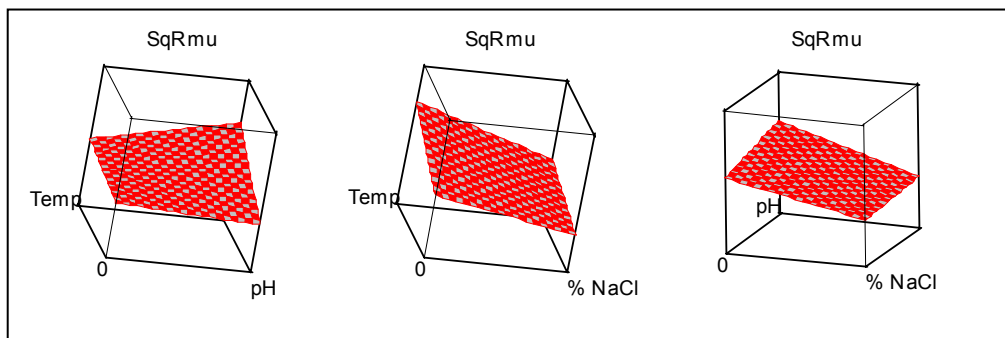
En el modelo de la velocidad de crecimiento, se ha producido interacción de efectos como lo indican las líneas no paralelas en la matriz que muestra la Figura 49.

Figura 49. – Perfiles de interacciones de la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* O157:H7



La Figura 50 muestra la respuesta de superficie del efecto de la temperatura, del pH y del % NaCl sobre la variable μ , combinándolos de dos en dos.

Figura 50. – Perfiles de superficie respuesta de predicción de la $\sqrt{\mu}$ de *E. coli* O157:H7



2.2 – Modelado del tiempo de generación de *Escherichia coli* O157:H7

De acuerdo con la Tabla 23, entre las tres hipótesis de cálculo, han sido seleccionados los resultados obtenidos con la transformación de los datos del tiempo de generación a la raíz cuadrada por presentar un mayor coeficiente de determinación (R^2) y una menor dispersión del error RMSE.

Tabla 23. – Modelos para cálculo del GT de *E. coli* O157:H7 (P<0,0001)

Fórmula	GT	√GT	LnGT
Intercept	0,352	0,775	-0,223
Temp	-0,014	-0,011	-0,033
pH	–	-0,027*	-0,101*
% NaCl	0,124	0,093	0,273
pH x Temp	–	-0,007	-0,023
% NaCl x Temp	–	–	–
% NaCl x pH	–	–	–
Temp ²	0,001*	0,0004*	–
pH ²	–	–	–
% NaCl ²	0,037*	0,023*	–
R ²	0,78	0,86	0,85
RMSE	0,09	0,06	0,17

* = P<0,05

Para la validación del modelo, la Figura 51 presenta linealidad de los valores actuales y predichos del modelo completo de la raíz cuadrada del tiempo de generación, siendo la R² de 0,86 y la RMSE de aproximadamente 0,06.

La relación de los valores residuales por predichos de la variable √GT en el modelo no presenta sesgo (Figura 52). Por tanto, en ella se observa una distribución uniforme de los valores residuales por los predichos. Eso significa que los valores residuales (o errores, es decir, obtenidos de restar los valores predichos de los obtenidos o actuales) se distribuyen uniformemente tanto en los valores positivos como en los negativos en todos los valores √GT predichos.

Figura 51. – Modelo Completo de la √GT de *E. coli* O157:H7

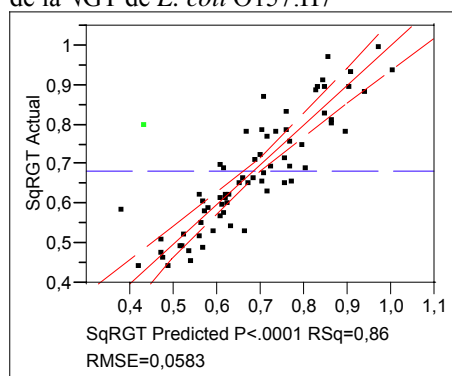


Figura 52. – Residuales por Predichos de la √GT de *E. coli* O157:H7

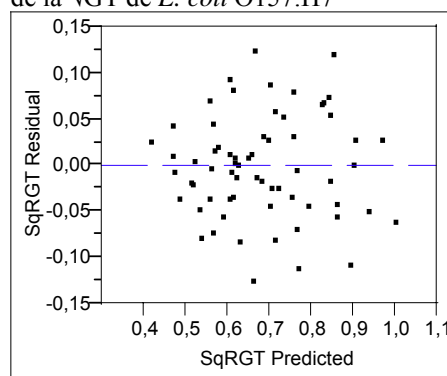


Figura 53. – Influencia de la Temperatura sobre la \sqrt{GT} de *E. coli* O157:H7

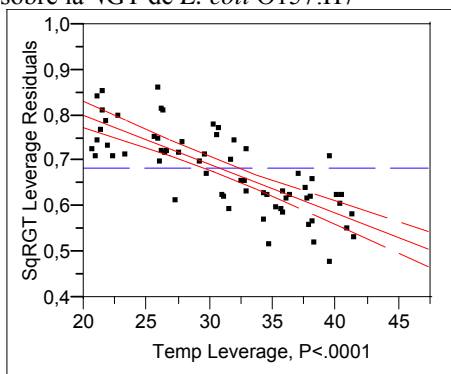
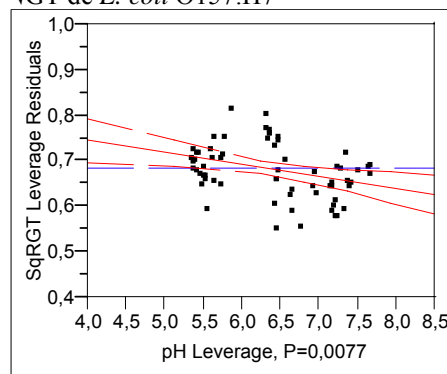


Figura 54. – Influencia de pH sobre la \sqrt{GT} de *E. coli* O157:H7



En las Figuras 53, 54 y 55 se presentan la influencia de la temperatura, del pH y del % NaCl, respectivamente, sobre la \sqrt{GT} . Los efectos combinados del pH con la temperatura, de la temperatura al cuadrado y del cloruro sódico al cuadrado se muestran en las Figuras 56, 57 y 58. Tal y como se ha indicado anteriormente, este tipo de figura muestra cuál sería el residuo o error de cada punto tanto con como sin ese efecto en el modelo. También se muestran los intervalos de confianza al 95%. Puesto que las curvas que muestran estos intervalos cortan la línea horizontal, el efecto es significativo. Por lo tanto, de acuerdo con Sall (1990), son significativos los efectos aislados de la temperatura, del pH y del % NaCl, así como los efectos combinados del pH con la temperatura, de la temperatura al cuadrado y del cloruro sódico al cuadrado.

Figura 55. – Influencia de NaCl sobre la \sqrt{GT} de *E. coli* O157:H7

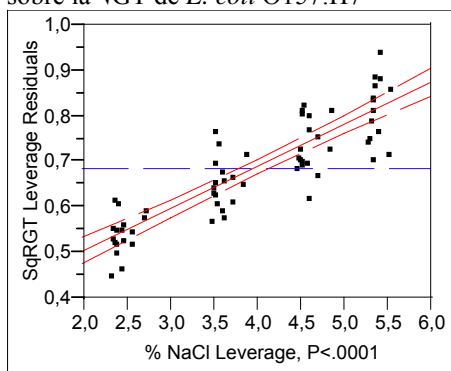


Figura 56. – Influencia de pH x Temp sobre la \sqrt{GT} de *E. coli* O157:H7

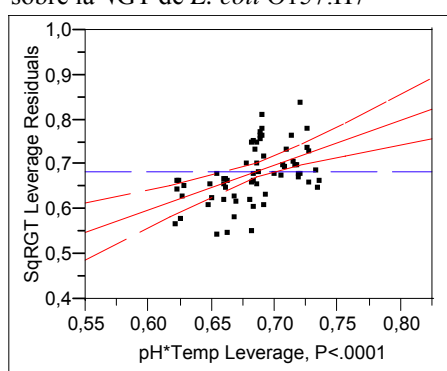


Figura 57. – Influencia de Temp² sobre la \sqrt{GT} de *E. coli* O157:H7

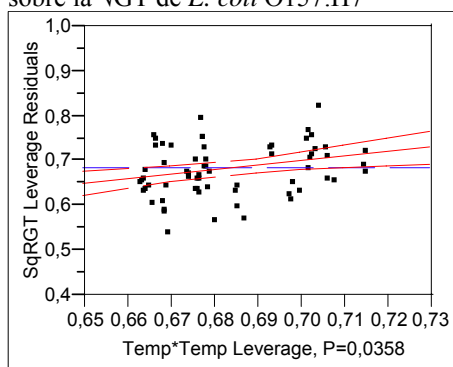
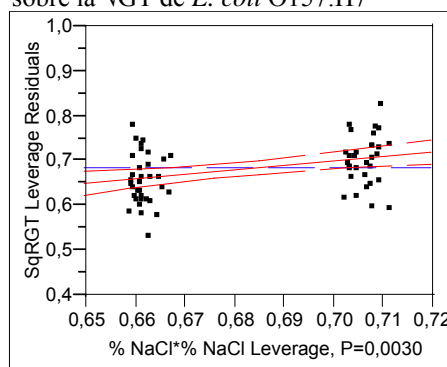
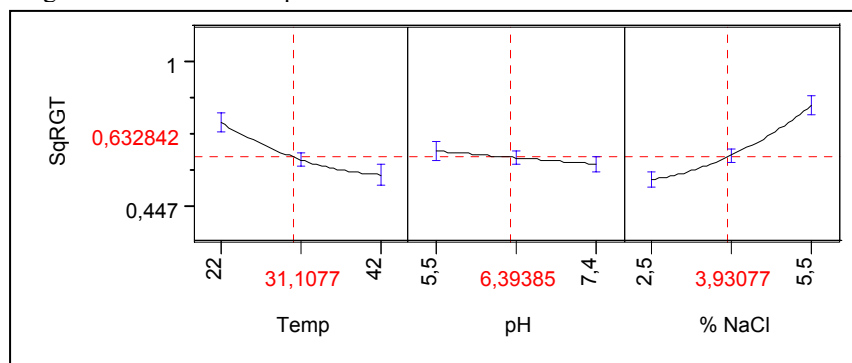


Figura 58. – Influencia de NaCl² sobre la \sqrt{GT} de *E. coli* O157:H7



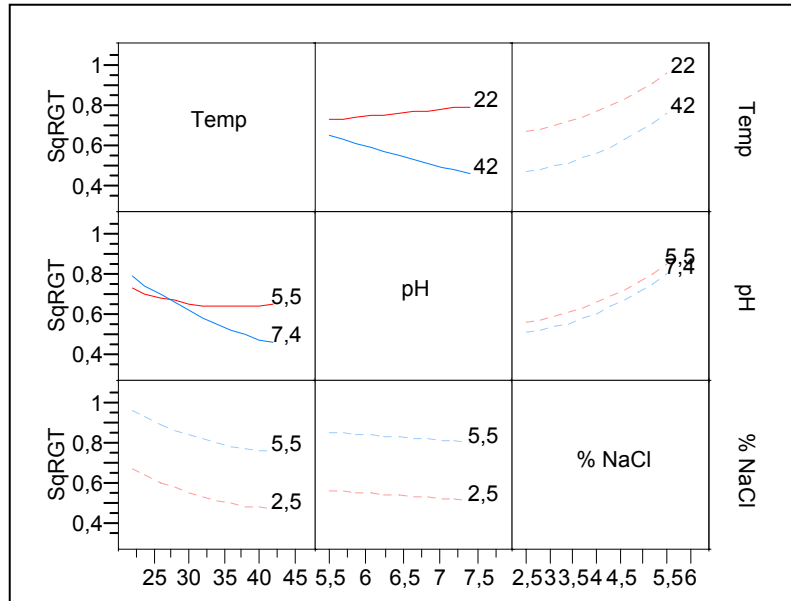
En la Figura 59 se muestra cómo cambian los valores predichos con respecto al cambio de un factor cada vez. De acuerdo con lo que se refirió para el caso del modelo de la μ , en esta figura se observa que en el modelo hay interacción de variables o efectos no lineales con respecto a la temperatura y el % NaCl, puesto que los trazados de predicción cambian su pendiente y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X. En el caso del pH la relación parece ser más lineal.

Figura 59. – Perfiles de predicción de la \sqrt{GT} de *E. coli* O157:H7



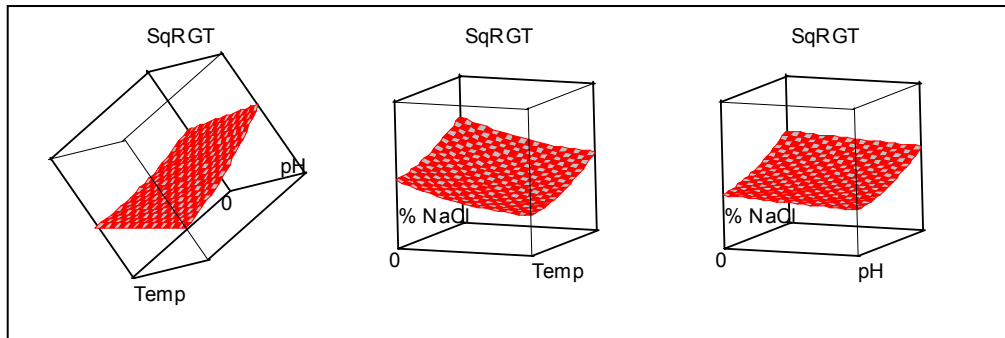
La interacción de efectos entre la temperatura y el pH se evidencia por las líneas no paralelas en la matriz de interacciones de la Figura 60.

Figura 60. – Perfiles de interacciones de la \sqrt{GT} de *E. coli* O157:H7



La Figura 61 muestra la respuesta superficie en las combinaciones de temperatura, pH y NaCl sobre la variable \sqrt{GT} .

Figura 61. – Perfiles de superficie respuesta de predicción de la \sqrt{GT} de *E. coli* O157:H7



2.3 – Modelado del tiempo de latencia de *Escherichia coli* O157:H7

Tal como se puede observar en la Tabla 24, entre las tres hipótesis de cálculo han sido seleccionados los resultados obtenidos mediante el uso de la raíz cuadrada del tiempo de latencia por ser el que aporta una mejor linealidad en la validación del modelo.

Tabla 24. – Modelos para cálculo del LT de *E. coli* O157:H7 (P<0,0001)

Fórmula	LT	√LT	LnLT
Intercept	11,296	3,453	2,510
Temp	-0,347	-0,056	-0,036
pH	-0,683	-0,134	-0,093
% NaCl	3,065	0,498	0,334
pH x Temp	–	–	–
% NaCl x Temp	-0,108*	-0,007*	–
% NaCl x pH	–	–	0,030*
Temp ²	–	0,001*	0,001*
pH ²	1,238	0,130*	0,067*
% NaCl ²	0,651	0,073	–
R ²	0,93	0,97	0,97
RMSE	1,27	0,13	0,08

* = P<0,05

Las Figuras 62 y 63 presentan los indicadores generales de la validación del modelo completo de la raíz cuadrada del tiempo de latencia. La correlación de los valores actuales por los predichos tuvo un coeficiente de determinación (R²) de 0,97 y una RMSE aproximada a 0,13. También se observa linealidad en la Figura 62. Otro factor importante tenido en cuenta en la validación del modelo fue la ausencia de sesgo en la Figura 63, que presenta el cuadro de los valores residuales y predichos del √LT, observándose en ella una distribución uniforme de los valores residuales por los predichos. Eso significa que los valores residuales (o errores, es decir, obtenidos de restar los valores predichos de los obtenidos o actuales) se distribuyen uniformemente tanto en los valores positivos como en los negativos en todos los √LT predichos.

Figura 62. – Modelo completo de la √LT de *E. coli* O157:H7

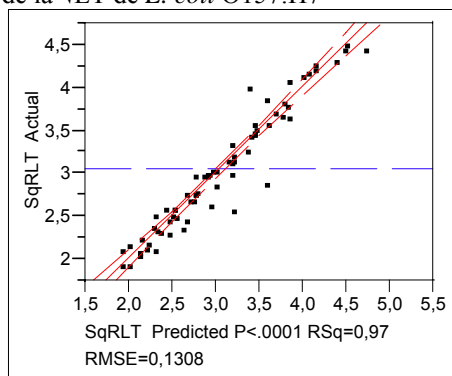


Figura 63. – Residuales por Predichos de la √LT de *E. coli* O157:H7

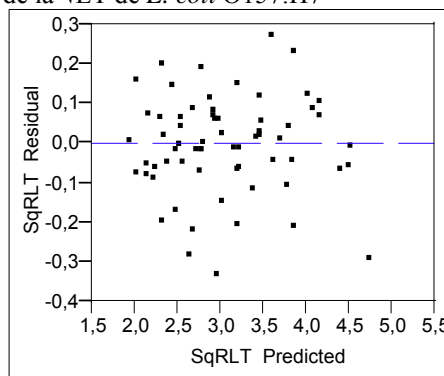


Figura 64. – Influencia de Temperatura sobre la \sqrt{LT} de *E. coli* O157:H7

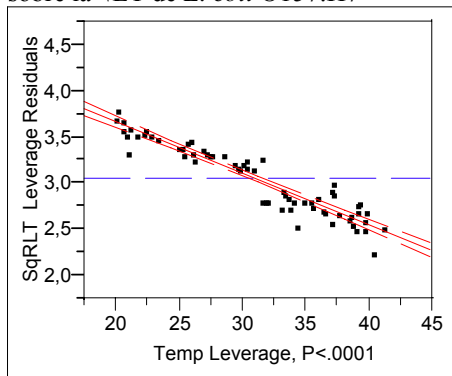


Figura 65. – Influencia de pH sobre la \sqrt{LT} de *E. coli* O157:H7

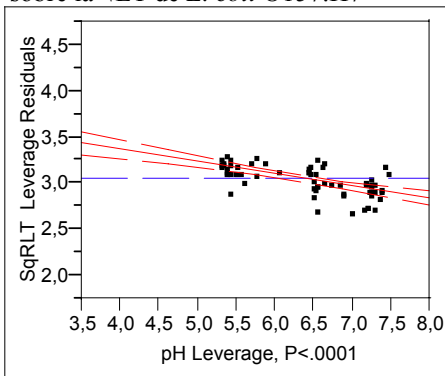


Figura 66. – Influencia de NaCl sobre la \sqrt{LT} de *E. coli* O157:H7

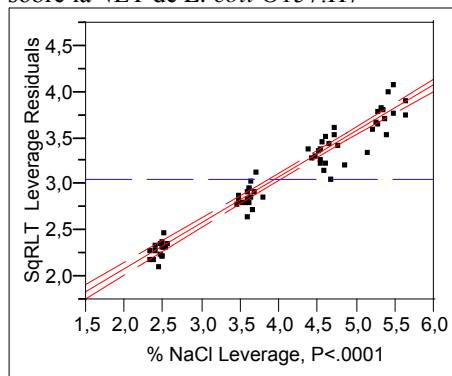
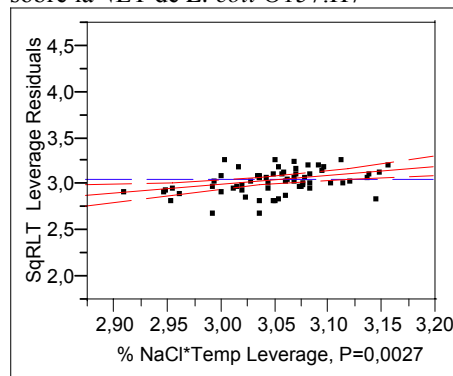


Figura 67. – Influencia de NaCl x Temp sobre la \sqrt{LT} de *E. coli* O157:H7



En las Figuras 64, 65 y 66 se presentan la influencia de la temperatura, del pH y del % NaCl sobre la \sqrt{LT} , respectivamente. Y las Figuras 67, 68 y 69 presentan los efectos combinados del % NaCl con la temperatura, de la temperatura al cuadrado y el pH al cuadrado, respectivamente. En dichas figuras, de acuerdo con Sall (1990), son significativos los efectos aislados y combinados de los diferentes factores.

Figura 68. – Influencia de Temp² sobre la \sqrt{LT} de *E. coli* O157:H7

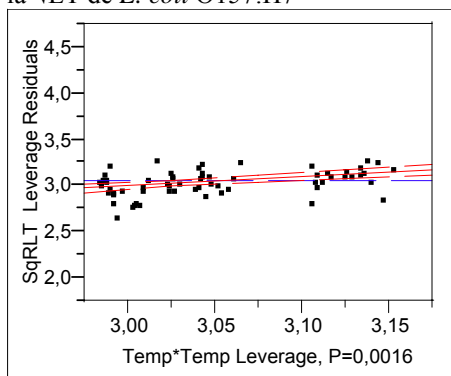
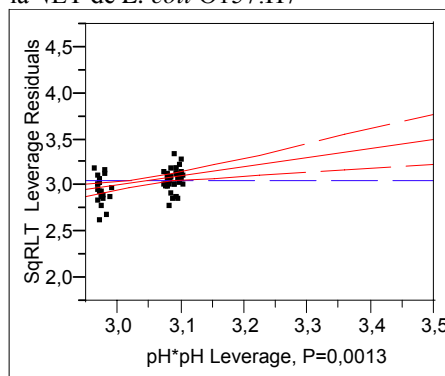
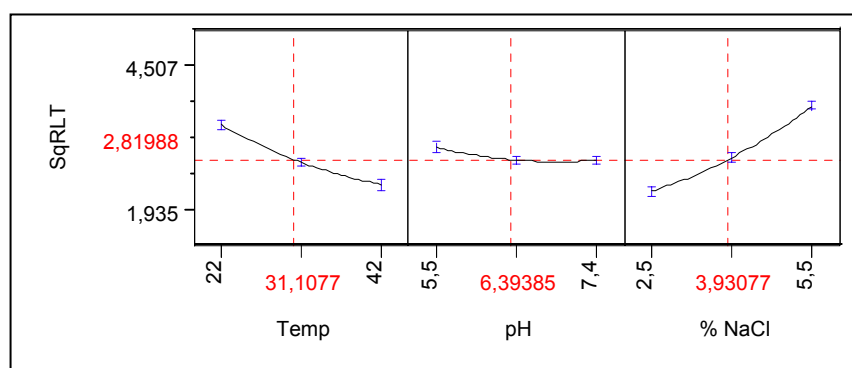


Figura 69. – Influencia de pH² sobre la \sqrt{LT} de *E. coli* O157:H7



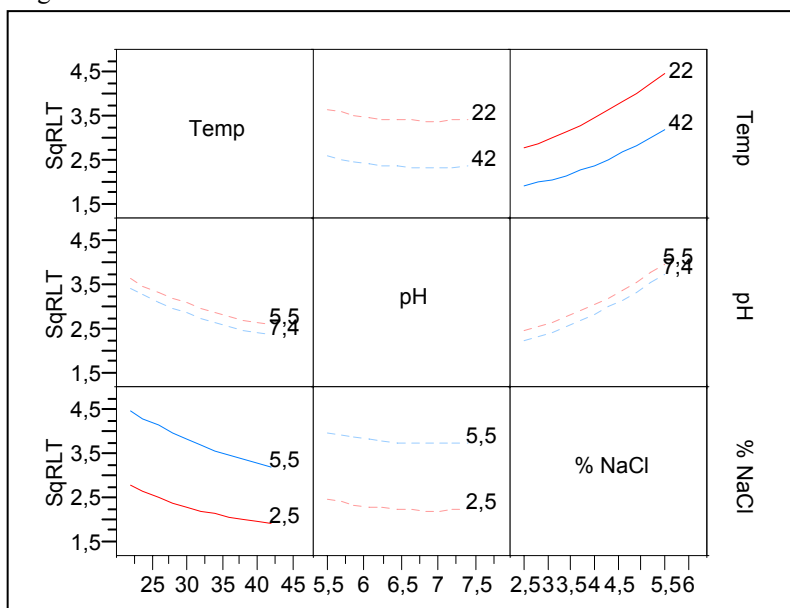
En la Figura 70 se muestra cómo cambian los valores predichos con respecto al cambio de un factor cada vez. De acuerdo con lo que se indicó en el modelo anterior, en ese tipo de figura se observa que hay una relativa interacción no lineal de variables o efectos, respecto a la temperatura, al pH y al % NaCl, ya que los trazados de predicción experimentan un relativo ($P < 0,05$) cambio en su pendiente y grado de curvatura que cambia el valor de la variable X.

Figura 70. – Perfiles de predicción de la \sqrt{LT} de *E. coli* O157:H7



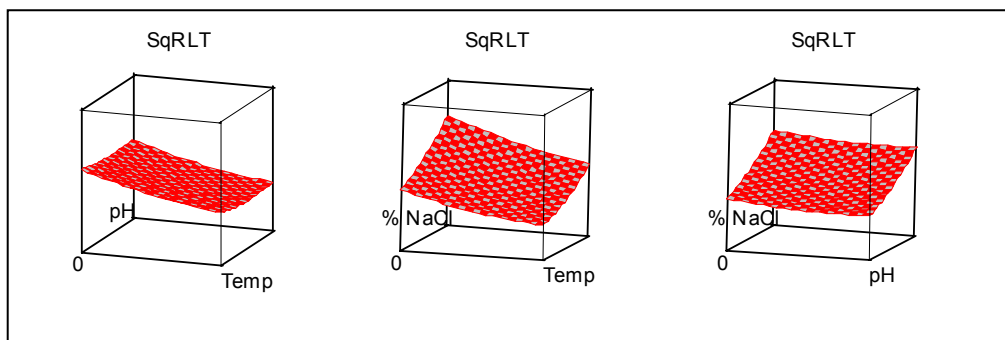
Tal como ha sucedido en el modelado de la velocidad de crecimiento y del tiempo de generación, en este modelo del tiempo de latencia se ha elaborado una matriz de figuras de interacción debido a que las variables han presentado efectos de interacción entre ellas (Figura 71). En esta grafica los efectos de interacción no son tan evidentes, ya que las líneas son aparentemente paralelas, debido a que tales interacciones de variables ocurren con una $P < 0,05$, es decir, no son significativas con una $P < 0,0001$ (véanse Figuras 64 a 69).

Figura 71. – Perfiles de interacciones de la \sqrt{LT} de *E. coli* O157:H7



En combinaciones de dos en dos factores, la superficie respuesta de la temperatura, del pH y del % NaCl sobre la variable \sqrt{LT} se muestra en la Figura 72.

Figura 72. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción de la \sqrt{LT} de *E. coli* O157:H7



3 – *Salmonella typhimurium*

El carácter multifactorial del experimento, según Robinson y col. (1998) implica hacer un análisis de los efectos combinados de los factores estudiados. En las Tablas 25, 26, 27, 28, 29 y 30 se presentan los resultados de las variables del crecimiento cinético modeladas a través del análisis de superficie respuesta utilizando los datos de la densidad óptica (DO) ajustados con la ecuación de Gompertz. Estos resultados, de modo general, indican que a una misma temperatura, la velocidad de crecimiento disminuye con la reducción del pH y con el incremento de la concentración de sal.

En las condiciones en las que no se ha registrado alteración de la DO se supone que no se ha producido crecimiento del microorganismo, por lo que los parámetros cinéticos no fueron calculados.

A la misma temperatura y pH, la velocidad de crecimiento ha disminuido con el incremento de la concentración de NaCl, mientras que los tiempos de generación y de latencia han aumentado significativamente, confirmando el efecto bacteriostático del estrés osmótico. Este comportamiento es similar al publicado por Robinson y col. (1998), quienes han descrito una disminución de la tasa de crecimiento aproximadamente lineal con el aumento de la osmolaridad. A una misma temperatura y concentración de cloruro sódico, la velocidad de crecimiento disminuyó con el incremento de la acidez del medio.

Con el pH 4,5 no se ha observado alteración de los valores iniciales de la DO con la concentración de 5,5% NaCl en todas las temperaturas por la acción bacteriostática de la combinación de acidez y de la de la presión osmótica sobre el microorganismo, indicando aparentemente que no se ha producido crecimiento del microorganismo durante las 24 horas del estudio de la cepa de *Salmonella typhimurium*. Por ese motivo, no fueron calculados los parámetros cinéticos en dichas condiciones. Esta acción inhibidora se ha observado también a 3,5 y 4,5% NaCl con la temperatura de 42 °C, lo cual indica la sinergia del incremento de la temperatura sobre la inhibición de la sal en medio ácido. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Eifert y col. (1996), Prescott y col. (1999) y Montville (2000).

De las 96 combinaciones de temperatura, pH y NaCl que hemos realizado, la mayor velocidad de crecimiento ($\mu = 1,90 \text{ h}^{-1}$), y los menores tiempos de latencia ($LT = 4,35 \text{ h}$) y de generación ($GT = 0,16 \text{ h}$) han sido obtenidos a 38 °C con un pH de 7,4 a una concentración de 2,5% de NaCl (Tabla 29). En todas las temperaturas estudiadas, la mayor velocidad de crecimiento se ha registrado con el pH 7,4.

Con una temperatura de 26 °C, pH 5,5 y 4,5% de NaCl hemos obtenido una velocidad de crecimiento de $0,49 \text{ h}^{-1}$, un tiempo de generación de 0,62 h y un tiempo de latencia de 14,89 h. En condiciones similares a las del presente trabajo, y utilizando un pH de 5,99 y 4,5% NaCl, Gibson y col. (1988) calcularon, para tres

especies de *Salmonella* (*S. thompson*, *S. stanley* y *S. infantis*), una velocidad de crecimiento de $0,3 \text{ h}^{-1}$, un tiempo de generación de 1 h y unos tiempos de latencia de 10,3 y 13,2 h para 25 y 27 °C, respectivamente. Asimismo, utilizando una temperatura de 30 °C, pH 5,5 y 4,5% de NaCl se ha obtenido una velocidad de crecimiento de $0,51 \text{ h}^{-1}$, un tiempo de generación de 0,59 h y un tiempo de latencia de 11,65 h. Mientras que utilizando la misma temperatura y el mismo % de NaCl que en el presente estudio pero con un pH de 5,99, Gibson y col. (1988) obtuvieron una velocidad de crecimiento de $0,36 \text{ h}^{-1}$, un tiempo de generación de 0,8 h y un tiempo de latencia de 6,3 h a 30 °C. Con esta misma temperatura estos autores calcularon una velocidad de crecimiento de $0,52 \text{ h}^{-1}$, un tiempo de latencia 3,9 h, y un tiempo de generación de 0,6 h con un pH y un % NaCl de 5,64 y 2,62, respectivamente. Estos resultados tienen alguna semejanza con los obtenidos para la combinación de 2,5% de sal y pH 5,64, cuyos parámetros fueron $0,89 \text{ h}^{-1}$ de velocidad de crecimiento, 0,34 h de tiempo de generación y 6,7 h de tiempo de latencia.

Otra semejanza de nuestros resultados con los de Gibson y col. (1988) tiene que ver con una temperatura de 26 °C, un % de NaCl de 4,5 y unos valores de pH de 6,5 y 5,5. Bajo estos parámetros ambientales, en este trabajo se han calculado unas velocidades de crecimiento de $0,54$ y $0,49 \text{ h}^{-1}$, unos tiempos de generación de 0,56 y 0,62 h, y un tiempo de latencia de 11,2 y 14,9 h, respectivamente. Gibson y col. (1988), a 25 °C, 4,46% de NaCl y pH 6,65 y 5,66, calcularon velocidades de crecimiento de $0,26$ y $0,24 \text{ h}^{-1}$; tiempos de generación de 1,2 h, y tiempos de latencia de 11,1 y 11,6 h, respectivamente.

Entre otras razones, las diferencias entre nuestros resultados y los de Gibson y col. (1988) pueden estar relacionadas con el hecho de que las combinaciones de temperatura, pH y % NaCl no son totalmente coincidentes, así como las diferencias entre las cepas utilizadas y el medio de cultivo, puesto que dichos autores han utilizado el caldo de soja triptona.

Como se puede observar en las Tablas 25, 26, 27, 28, 29 y 30, los tiempos de latencia más cortos se han registrado con las temperaturas estudiadas más elevadas, asumiendo un aumento proporcional a la disminución de la temperatura. Siguiendo la misma lógica, los tiempos de generación han disminuido con el aumento de la

temperatura. Esto se obtuvo con las combinaciones de pH 7,4 con la concentración de sal estudiada más baja.

Con respecto al aumento de los tiempos de latencia y de generación cuando se incrementa la concentración de la sal, también se ha apreciado un comportamiento similar al señalado por Robinson y col. (1998). Asimismo, a semejanza de lo descrito en las cepas de *E. coli*, en el presente estudio también se ha observado la relación inversamente proporcional entre los tiempos de latencia y la velocidad de crecimiento, estando en concordancia con McMeekin y col. (1993) y Baranyi y Roberts (1994). Igualmente, se ha comprobado la relación de la mayor velocidad de crecimiento versus menor tiempo de generación citada por Delignette-Muller (1998).

En las Figuras 73, 74 y 75 se presentan las velocidades de crecimiento máximas y los tiempos de generación y de latencia mínimos de *Salmonella typhimurium*, respectivamente.

Tabla 25. – Parámetros cinéticos de *Salmonella typhimurium* a 22 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
22	4,5	2,5	0,273	10,598	1,104
		3,5	0,245	15,993	1,228
		4,5	0,238	22,027	1,263
		5,5	NC*	NC	NC
	5,5	2,5	0,784	8,206	0,384
		3,5	0,685	10,268	0,440
		4,5	0,500	14,280	0,602
		5,5	0,547	21,798	0,551
	6,5	2,5	1,078	7,556	0,279
		3,5	0,835	9,549	0,360
		4,5	0,517	14,387	0,583
		5,5	0,509	19,052	0,591
7,4	2,5	1,430	6,463	0,210	
	3,5	0,824	8,332	0,365	
	4,5	0,539	14,619	0,559	
	5,5	0,465	20,822	0,647	

*NC = No calculado

Tabla 26. – Parámetros cinéticos de *Salmonella typhimurium* a 26 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
26	4,5	2,5	0,179	9,970	1,683
		3,5	0,232	16,734	1,297
		4,5	0,150	19,000	2,007
		5,5	NC*	NC	NC
	5,5	2,5	0,629	7,395	0,479
		3,5	0,601	9,394	0,501
		4,5	0,487	14,888	0,618
		5,5	0,412	19,879	0,730
	6,5	2,5	1,010	6,967	0,298
		3,5	0,828	8,728	0,363
		4,5	0,540	11,197	0,558
		5,5	0,421	16,392	0,715
	7,4	2,5	1,230	7,336	0,245
		3,5	0,970	9,529	0,310
		4,5	0,702	12,969	0,429
		5,5	0,486	18,179	0,619

*NC = No calculado

Tabla 27. – Parámetros cinéticos de *Salmonella typhimurium* a 30 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
30	4,5	2,5	0,264	8,950	1,142
		3,5	0,245	12,762	1,227
		4,5	0,155	21,107	1,946
		5,5	NC*	NC	NC
	5,5	2,5	0,890	6,665	0,338
		3,5	0,684	8,321	0,440
		4,5	0,509	11,648	0,592
		5,5	0,390	16,778	0,772
	6,5	2,5	1,256	6,160	0,240
		3,5	0,881	8,121	0,342
		4,5	0,681	9,840	0,442
		5,5	0,491	14,401	0,614
	7,4	2,5	1,538	6,547	0,196
		3,5	1,024	8,350	0,294
		4,5	0,800	12,864	0,377
		5,5	0,598	17,961	0,504

*NC = No calculado

Tabla 28. – Parámetros cinéticos de *Salmonella typhimurium* a 34 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
34	4,5	2,5	0,233	7,803	1,292
		3,5	0,294	11,064	1,023
		4,5	0,183	18,029	1,643
		5,5	NC*	NC	NC
	5,5	2,5	1,084	5,228	0,278
		3,5	0,746	6,624	0,403
		4,5	0,566	9,448	0,532
		5,5	0,382	15,250	0,787
	6,5	2,5	1,319	4,498	0,228
		3,5	0,942	6,009	0,320
		4,5	0,491	8,953	0,613
		5,5	0,417	14,726	0,722
7,4	2,5	1,673	5,051	0,180	
	3,5	1,348	7,118	0,223	
	4,5	0,917	7,343	0,328	
	5,5	0,649	14,394	0,464	

*NC = No calculado

Tabla 29. – Parámetros cinéticos de *Salmonella typhimurium* a 38 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
38	4,5	2,5	0,287	8,007	1,049
		3,5	0,218	13,836	1,381
		4,5	0,330	23,124	0,912
		5,5	NC*	NC	NC
	5,5	2,5	1,099	4,799	0,274
		3,5	0,758	6,709	0,397
		4,5	0,684	9,305	0,440
		5,5	0,325	15,969	0,927
	6,5	2,5	1,625	4,247	0,185
		3,5	1,009	5,662	0,298
		4,5	0,884	7,499	0,341
		5,5	0,488	12,447	0,617
7,4	2,5	1,899	4,351	0,158	
	3,5	1,515	6,222	0,199	
	4,5	0,981	8,233	0,307	
	5,5	0,684	11,370	0,440	

*NC = No calculado

Tabla 30. – Parámetros cinéticos de *Salmonella typhimurium* a 42 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
42	4,5	2,5	0,313	15,809	0,963
		3,5	NC*	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
5,5	4,5	2,5	0,998	5,270	0,302
		3,5	0,699	7,619	0,430
		4,5	0,391	11,759	0,770
		5,5	0,274	25,075	1,099
6,5	4,5	2,5	1,310	4,412	0,230
		3,5	0,948	6,318	0,318
		4,5	0,756	8,719	0,398
		5,5	0,274	16,243	1,099
7,4	4,5	2,5	1,558	4,366	0,193
		3,5	1,448	6,277	0,208
		4,5	0,851	10,304	0,354
		5,5	0,366	19,610	0,823

*NC = No calculado

Figura 73. – Velocidades de crecimiento máximas

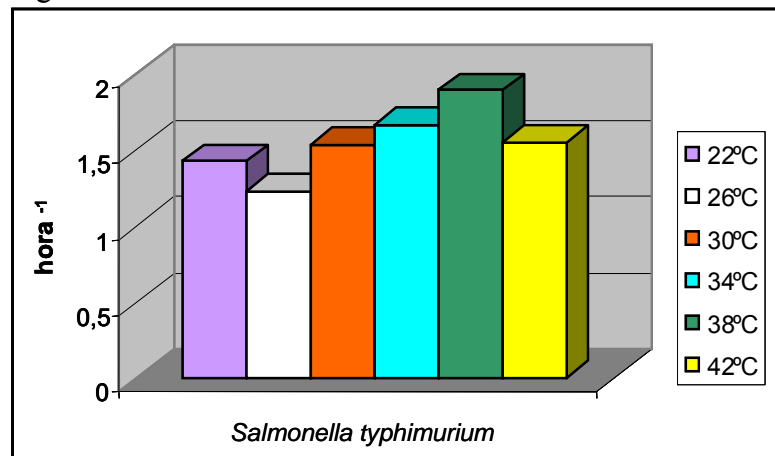


Figura 74. – Tiempos de generación mínimos

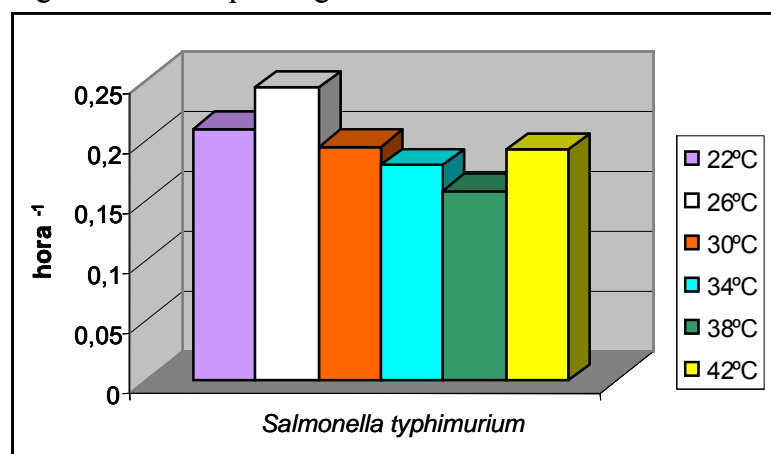
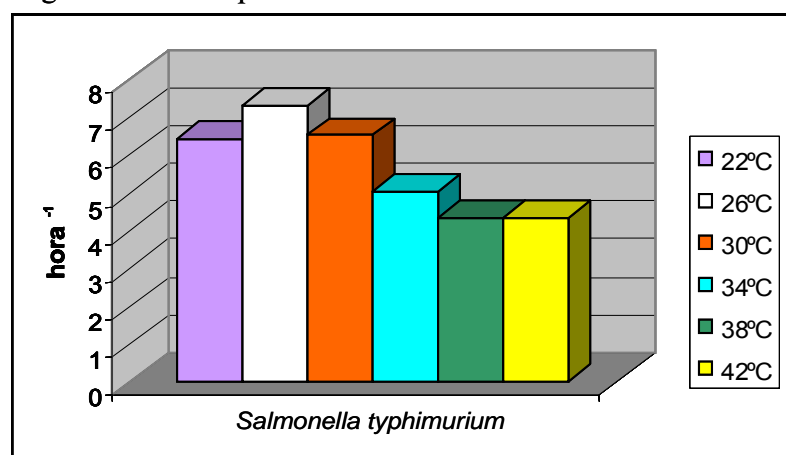


Figura 75. – Tiempos de latencia mínimos



3.1 – Modelado de la velocidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium*

La Tabla 31 expone los tres modelos de cálculo de la variable velocidad de crecimiento. Fue seleccionado el modelo con los resultados obtenidos sin ninguna transformación de los datos de la velocidad de crecimiento por ser el que ha tenido mejor coeficiente de determinación y una mejor linealidad en la validación.

Tabla 31. – Modelos para cálculo de la μ de *Salmonella typhimurium* ($P < 0,0001$)

Fórmula	μ	$\sqrt{\mu}$	$\ln\mu$
Intercept	-0,289	0,200	-1,986
Temp	0,011	0,005	0,009*
pH	0,267	0,166	0,423
% NaCl	-0,224	-0,124	-0,293
pH x Temp	0,012	0,005	0,008*
% NaCl x Temp	-0,012	-0,004	-0,009*
% NaCl x pH	-0,101	-0,045	-0,062*
Temp ²	–	–	–
pH ²	-0,068	-0,060	-0,223
% NaCl ²	–	–	–
R ²	0,95	0,94	0,92
RMSE	0,09	0,06	0,17

* = $P < 0,05$

La Figura 76 presenta el modelo completo de la μ con los valores actuales por los predichos. Han sido obtenidos una R^2 de 0,95 y una RMSE de 0,09.

La Figura 77 presenta el cuadro de los valores residuales por los predichos de la μ . La distribución de valores residuales por los predichos es uniforme tanto en los valores positivos como en los negativos en el modelo.

Las Figuras 78, 79 y 80 presentan, respectivamente, la influencia de la temperatura, del pH y del % NaCl sobre la μ . En las Figuras 81, 82 y 83 se muestra ese mismo efecto en las combinaciones del pH con la temperatura, del % NaCl con la temperatura, y del pH elevado al cuadrado, respectivamente. Según el criterio de Sall (1990), son significativos tanto los efectos aislados como los efectos combinados.

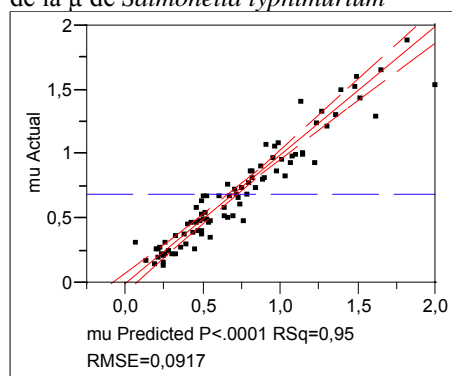
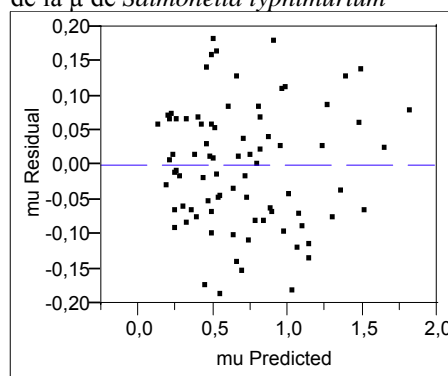
Figura 76. – Modelo completo de la μ de *Salmonella typhimurium*Figura 77. – Residuales por Predichos de la μ de *Salmonella typhimurium*

Figura 78. – Influencia de la Temperatura sobre la μ de *Salmonella typhimurium*

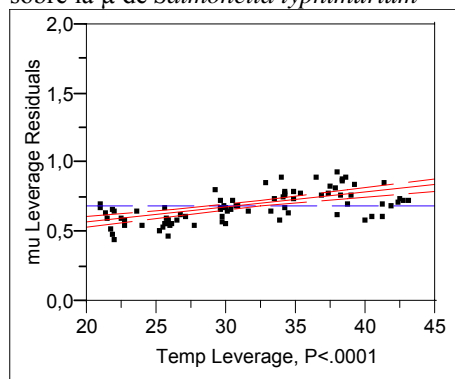


Figura 79. – Influencia del pH sobre la μ de *Salmonella typhimurium*

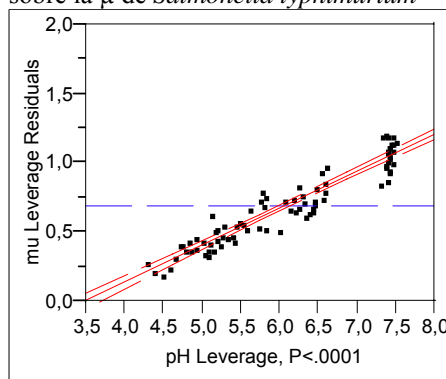


Figura 80. – Influencia de NaCl sobre la μ de *Salmonella typhimurium*

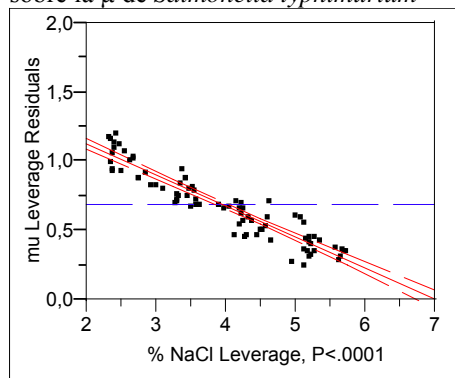


Figura 81. – Influencia de pH x Temp sobre la μ de *Salmonella typhimurium*

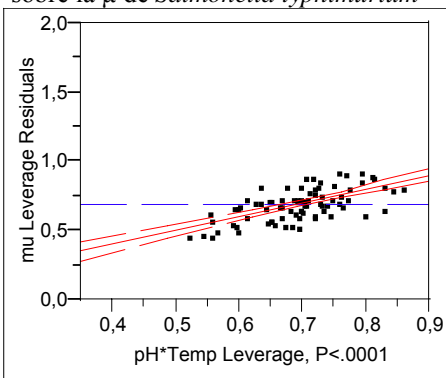


Figura 82. – Influencia de NaCl x Temp sobre la μ de *Salmonella typhimurium*

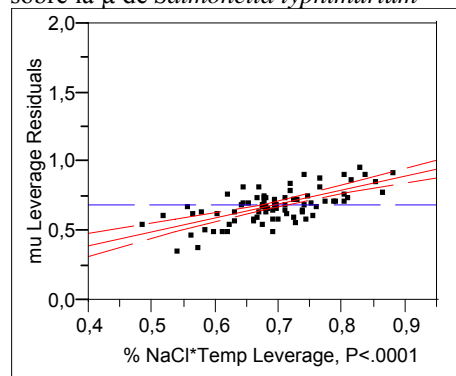
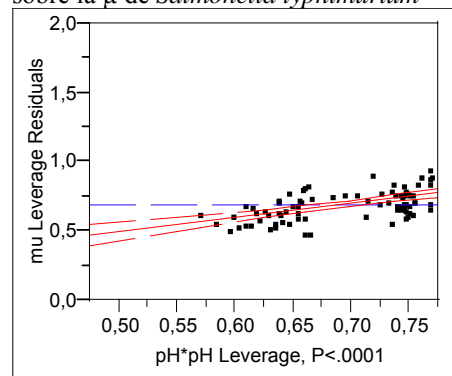
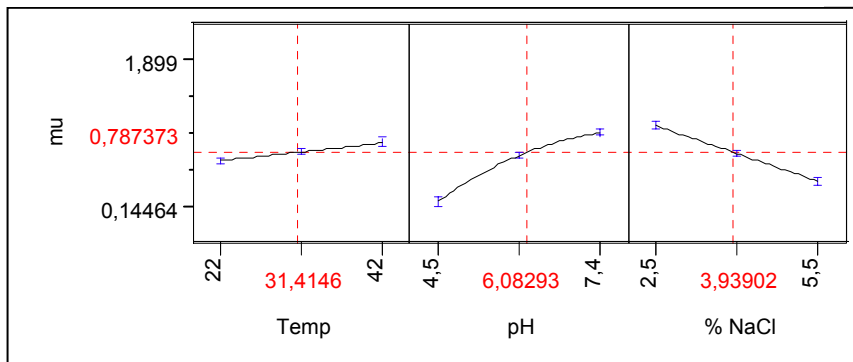


Figura 83. – Influencia de pH² sobre la μ de *Salmonella typhimurium*



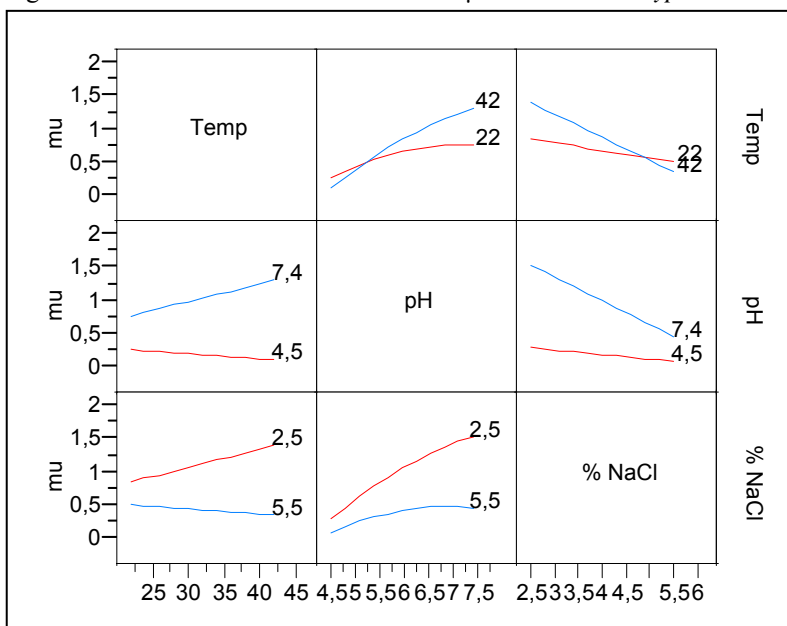
En la Figura 84 se muestra cómo cambian los valores predichos con respecto al cambio de un factor cada vez, observándose que en el modelo hay interacción no lineales de variables o efectos, respecto al pH puesto que los trazados de predicción cambian su pendiente y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X.

Figura 84. – Perfiles de predicción de la μ de *Salmonella typhimurium*



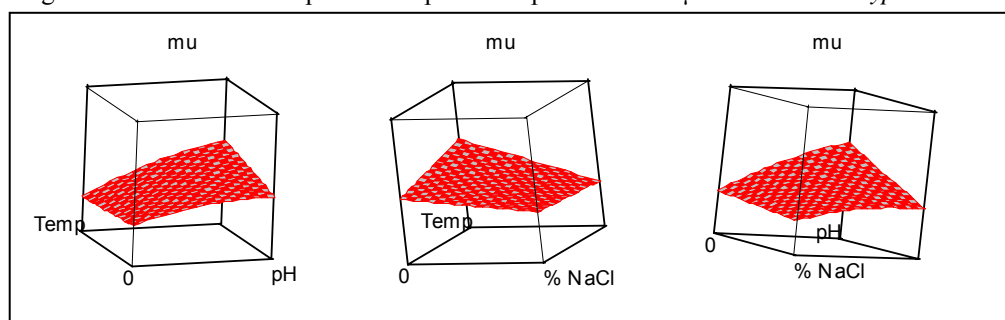
En la Figura 85 se muestran los efectos de las interacciones entre con los diferentes factores en el modelo, lo cual se puede evidenciar mediante las líneas no paralelas. Estas indican que la interacción es mayor a medida que aumenta el pH y la temperatura, y disminuye el % de NaCl.

Figura 85. – Perfiles de interacciones de la μ de *Salmonella typhimurium*



En la Figura 86 se muestra la superficie respuesta de la combinación de los efectos de la temperatura, del pH y del % NaCl, combinando dos factores cada vez para mostrar su efecto sobre la variable μ .

Figura 86. – Perfiles de superficie respuesta de predicción de μ de *Salmonella typhimurium*



3.2 – Modelado del tiempo de generación (GT) de *Salmonella typhimurium*

Como se muestra en la Tabla 32, entre las tres hipótesis de cálculo ha sido seleccionado el modelo obtenido con la transformación al logaritmo neperiano de los datos del tiempo de generación debido a su coeficiente de determinación y linealidad en la validación, lo cual ha permitido incluir más combinaciones de factores en el modelo.

Tabla 32. – Modelos para cálculo del GT de *Salmonella typhimurium* ($P < 0,0001$)

Fórmula	GT	\sqrt{GT}	LnGT
Intercept	1,118	1,269	0,993
Temp	–	-0,004*	-0,011*
pH	-0,199	-0,146	-0,436
% NaCl	0,126	0,096	0,276
pH x Temp	–	–	-0,009*
% NaCl x Temp	–	–	0,007*
% NaCl x pH	–	–	0,052*
Temp ²	–	–	–
pH ²	0,173	0,097	0,228
% NaCl ²	–	–	–
R ²	0,87	0,92	0,93
RMSE	0,12	0,06	0,17

* = $P < 0,05$

La Figura 87 presenta el modelo completo del logaritmo neperiano del tiempo de generación (LnGT) de *Salmonella typhimurium*, presentando en la correlación de los valores actuales por los predichos una R² de 0,93 y una RMSE de aproximadamente 0,17.

La distribución uniforme de los valores residuales y predichos, tanto los valores positivos como los negativos, en el modelo del tiempo de generación están presentados en la Figura 88.

Figura 87. – Modelo completo del LnGT de *Salmonella typhimurium*

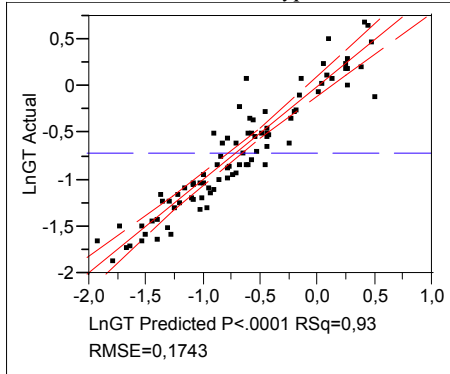


Figura 88. – Residuales por Predichos del LnGT de *Salmonella typhimurium*

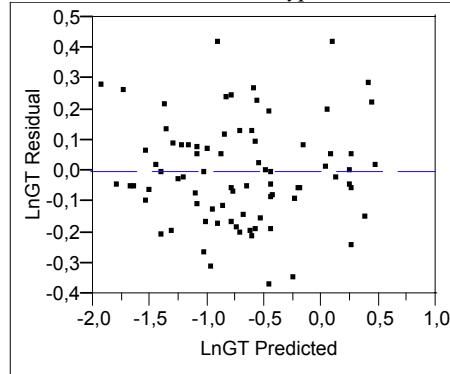


Figura 89. – Influencia de Temperatura sobre el LnGT de *Salmonella typhimurium*

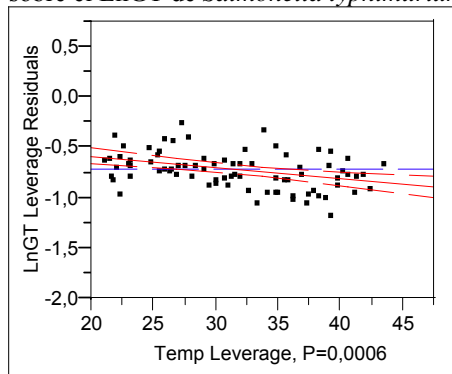


Figura 90. – Influencia de pH sobre el LnGT de *Salmonella typhimurium*

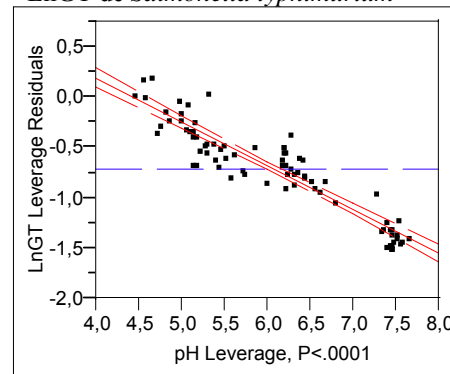


Figura 91. – Influencia de NaCl sobre el LnGT de *Salmonella typhimurium*

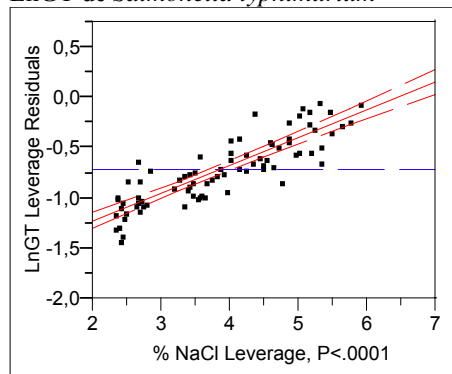
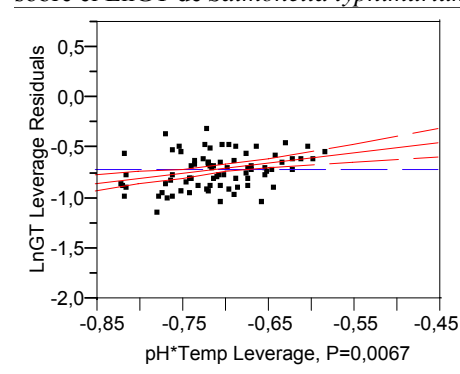


Figura 92. – Influencia de pH x Temp sobre el LnGT de *Salmonella typhimurium*



Las Figuras 89, 90 y 91 presentan, respectivamente, la influencia de la temperatura, del pH y del % NaCl sobre el tiempo de generación de *Salmonella typhimurium*. En las Figuras 92, 93, 94 y 95 se muestra ese mismo efecto en las combinaciones del pH con la temperatura, del cloruro sódico con la temperatura, del cloruro sódico con el pH, y del pH elevado al cuadrado, respectivamente. En las 6 figuras se puede observar que son significativos tanto los efectos de los factores aislados como de los combinados.

Figura 93. – Influencia de NaCl x Temp sobre el LnGT de *Salmonella typhimurium*

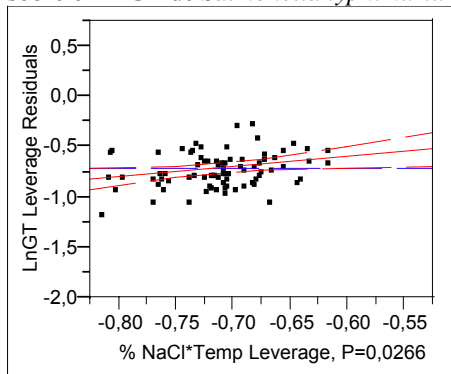


Figura 94. – Influencia de NaCl x pH sobre el LnGT de *Salmonella typhimurium*

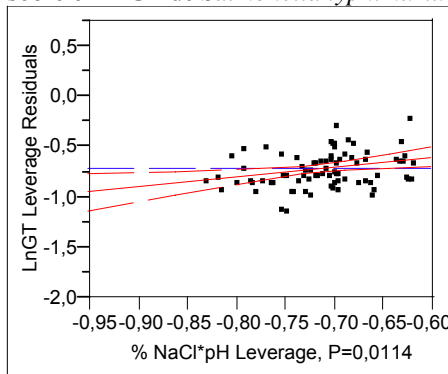
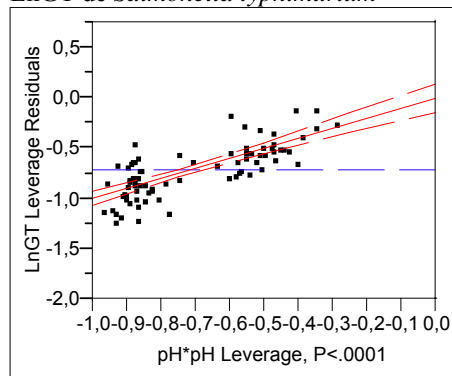
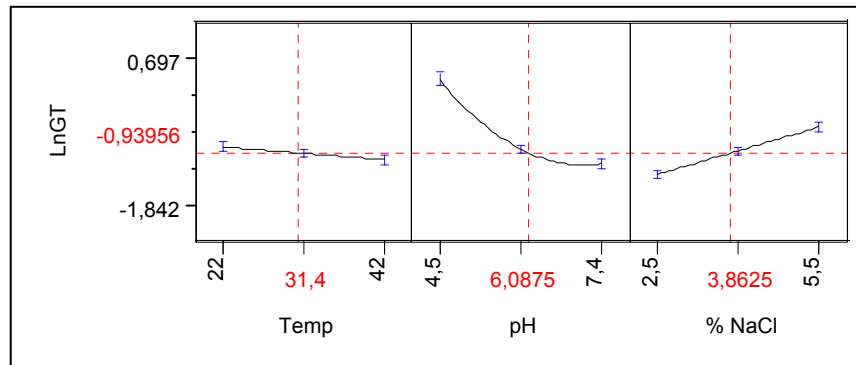


Figura 95. – Influencia de pH² sobre el LnGT de *Salmonella typhimurium*



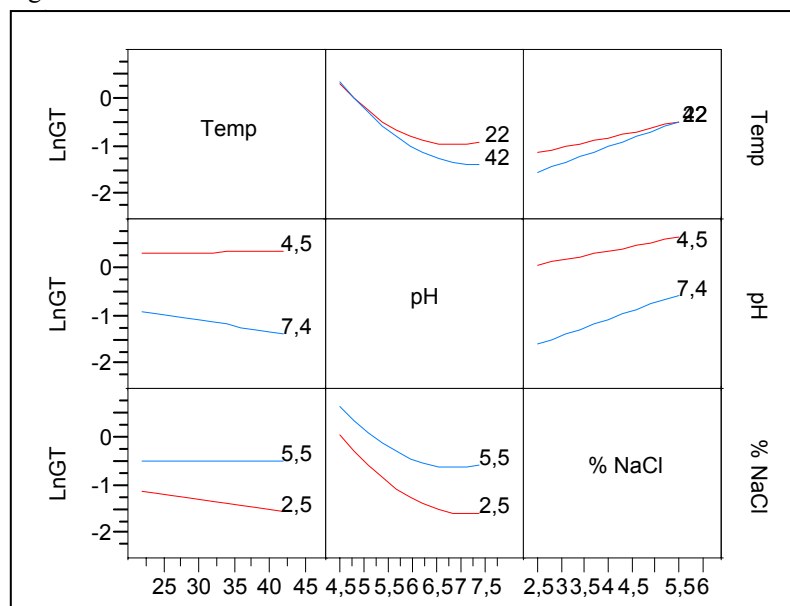
En la Figura 96 se muestra cómo cambian los valores predichos con respecto al cambio de un factor cada vez. En esta Figura se observa que en el modelo hay interacción no lineales de variables o efectos, respecto al pH puesto que los trazados de predicción cambian su pendiente y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X.

Figura 96. – Perfiles de predicción del LnGT de *Salmonella typhimurium*



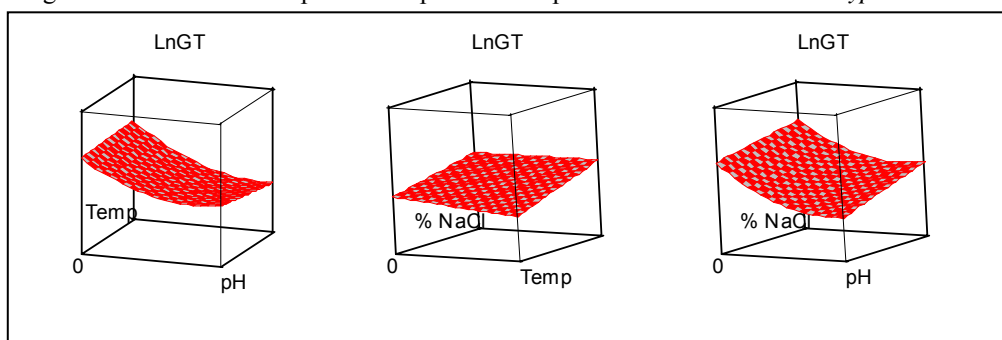
La Figura 97 muestra cómo los factores temperatura, pH y % NaCl tienen efectos de interacción entre ellos en el modelo, hecho que se puede observar en una matriz de gráficas de interacción mediante las líneas no paralelas. A semejanza de lo que se comentó para el modelo de la velocidad de crecimiento de este microorganismo, a medida que aumenta el pH y la temperatura aumenta la interacción, mientras que el efecto interactivo se reduce con el aumento del % de NaCl.

Figura 97. – Perfiles de interacciones del LnGT de *Salmonella*



En la Figura 98 se muestran las superficies respuesta en la combinación de los efectos de la temperatura, del pH y del % NaCl sobre la variable del tiempo de generación.

Figura 98. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción del LnGT de *S. typhimurium*



3.3 – Modelado del tiempo de latencia (LT) de *Salmonella typhimurium*

En la Tabla 33 se pueden observar las tres hipótesis de modelo para el cálculo de la variable tiempo de latencia. Entre ellos ha sido seleccionado el modelo obtenido mediante el uso de los datos transformados al logaritmo neperiano del tiempo de latencia (LnLT) por ser el que ha ofrecido un mejor coeficiente de determinación y una menor dispersión del error durante la validación del modelo.

Tabla 33. – Modelos para cálculo de la μ de *Salmonella typhimurium* ($P < 0,0001$)

Fórmula	LT	\sqrt{LT}	LnLT
Intercept	11,604	3,311	2,353
Temp	-0,282	-0,039	-0,025
pH	-1,402	-0,218	-0,128
% NaCl	3,518	0,540	0,341
pH x Temp	–	–	-0,007
% NaCl x Temp	-0,070*	-0,006*	0,003*
% NaCl x pH	-0,558	-0,052*	-0,020*
Temp ²	0,015	0,002*	0,001
pH ²	1,568	0,220	0,146
% NaCl ²	0,662	0,063*	–
R ²	0,95	0,95	0,97
RMSE	1,08	0,17	0,08

* = $P < 0,05$

La Figura 99 presenta la linealidad de los valores actuales por los predichos del modelo completo del tiempo de latencia de *Salmonella typhimurium*, en los cuales se obtuvo una R^2 de 0,97 y una RMSE de 0,08.

Como se ha comprobado en los anteriores modelos, en la validación del modelo del logaritmo neperiano del tiempo de latencia también ha habido una distribución

uniforme de valores residuales por los predichos tanto en los valores positivos como en los negativos, tal y como se observa en la Figura 100.

Las Figuras 101, 102 y 103, muestran, respectivamente, la influencia de la temperatura, del pH y del % NaCl sobre el tiempo de latencia de *Salmonella typhimurium*, mientras que las Figuras 104, 105, 106, 107 y 108 presentan ese mismo efecto para las combinaciones del pH con la temperatura, del cloruro sódico con la temperatura, del cloruro sódico con el pH, de la temperatura elevada al cuadrado y del pH elevado al cuadrado, respectivamente. En las figuras mencionadas, de acuerdo con Sall (1990), tanto los efectos aislados como combinados de los factores (temperatura, pH y % NaCl) son significativos.

Figura 99. – Modelo completo del LnLT de *Salmonella typhimurium*

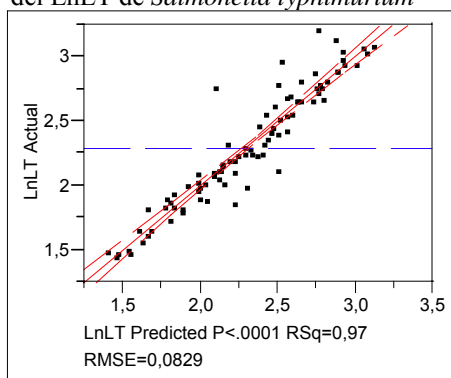


Figura 100. – Residuales por Predichos del LnLT de *Salmonella typhimurium*

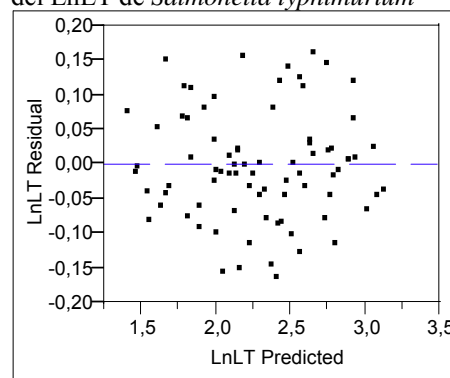


Figura 101. – Influencia de la Temperatura sobre el LnLT de *Salmonella typhimurium*

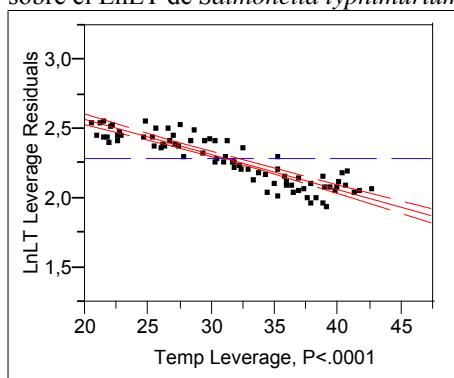


Figura 102. – Influencia del pH sobre el LnLT de *Salmonella typhimurium*

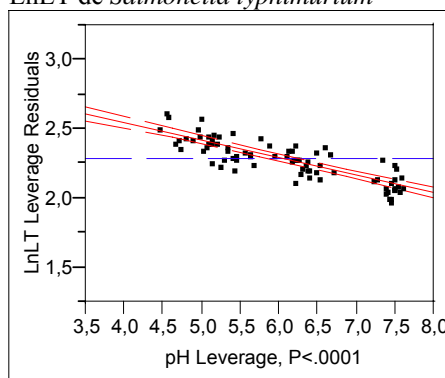


Figura 103. – Influencia de NaCl sobre el LnLT de *Salmonella typhimurium* sobre

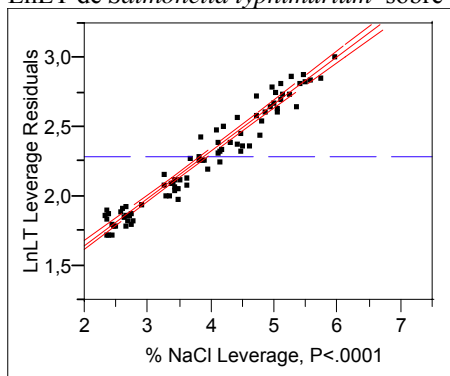


Figura 104. – Influencia de pH x Temp el LnLT de *Salmonella typhimurium*

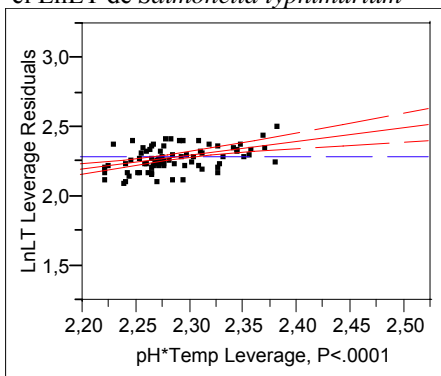


Figura 105. – Influencia de NaCl x Temp sobre el LnLT de *Salmonella typhimurium*

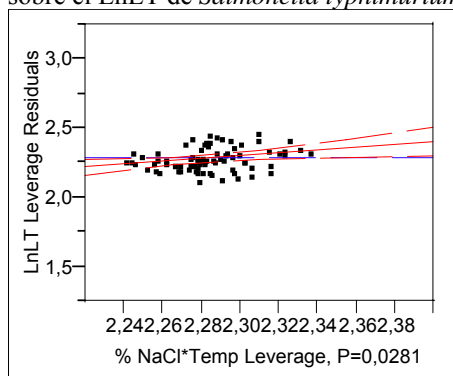


Figura 106. – Influencia de NaCl x pH sobre el LnLT de *S. typhimurium*

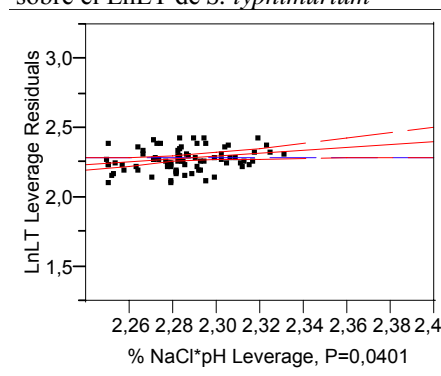


Figura 107. – Influencia de Temp² sobre el LnLT de *Salmonella typhimurium*

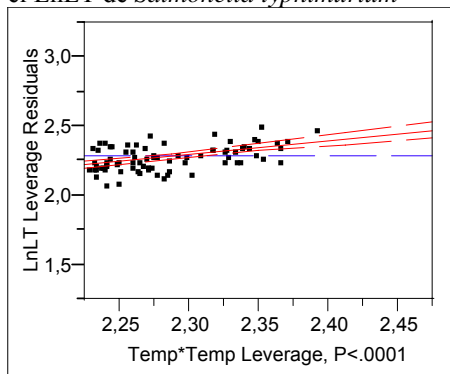
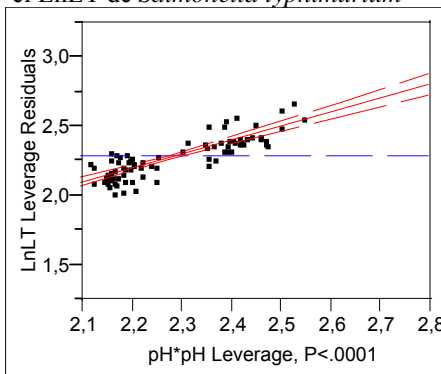
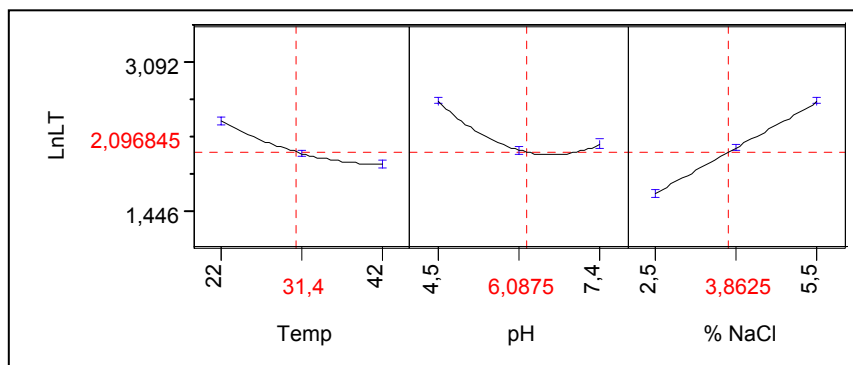


Figura 108. – Influencia de pH² sobre el LnLT de *Salmonella typhimurium*



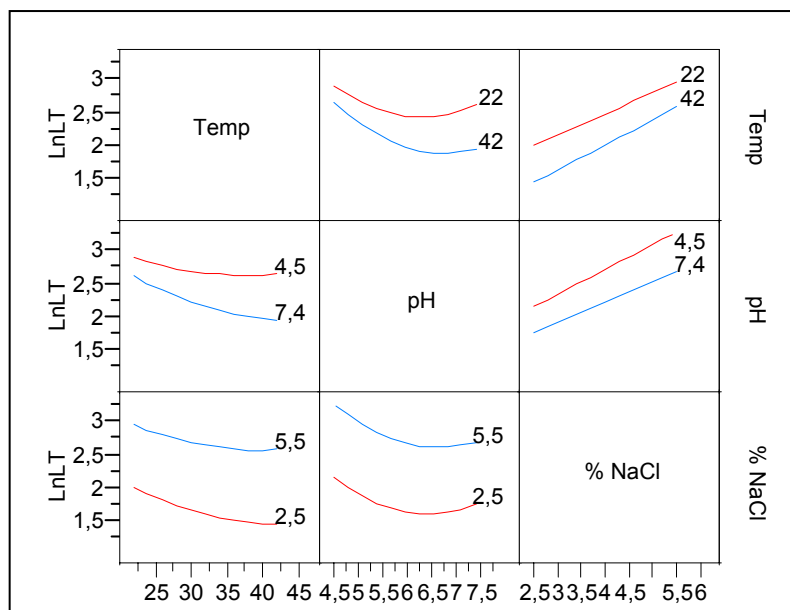
En la Figura 109 se muestra cómo cambian los valores predichos con respecto al cambio de un factor cada vez. En esta figura se observa que en el modelo hay interacción no lineales de variables o efectos, respecto la temperatura y el pH, puesto que los trazados de predicción cambian su pendiente y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X.

Figura 109. – Perfiles de predicción del LnLT de *Salmonella typhimurium*



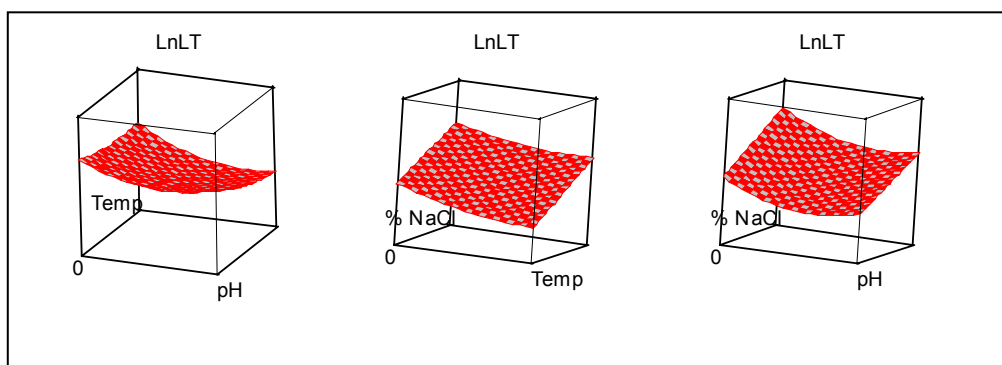
En la Figura 110 se muestra cómo interactúan los tres factores de crecimiento estudiados (la temperatura, el pH y el % NaCl). La interacción se evidenciaría mediante líneas no paralelas. En la matriz se puede ver que las líneas de la interacción del % NaCl con el pH y con la temperatura parecen ser paralelas, puesto que dichas interacciones ocurren a una probabilidad $P < 0,05$ en vez de $P < 0,0001$, como ocurre en los otros casos (compárense las Figuras 102 a 106).

Figura 110. – Perfiles de interacciones del LnLT *Salmonella typhimurium*



En la Figura 111 se presentan la superficies de respuesta de la combinación de los efectos de la temperatura, del pH y del % NaCl, combinando dos factores cada vez, para mostrar sus efectos sobre la variable del tiempo de latencia.

Figura 111. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción del LnLT de *S. typhimurium*



4 – *Listeria monocytogenes*

A semejanza de lo referido en el caso de los anteriores microorganismos, tal como ha sido afirmado por Robinson y col. (1998), el hecho de tratarse de un experimento multifactorial hace difícil discernir de manera precisa la respuesta del microorganismo a los factores utilizados (sal, temperatura y pH). Por ello, los resultados en las Tablas 34, 35, 36, 37, 38 y 39 reflejan el efecto combinado de los tres factores juntos sobre los parámetros cinéticos calculados en las diferentes combinaciones de temperatura, pH y cloruro sódico. No están representados los valores de las correspondientes transformaciones a la raíz cuadrada y al logaritmo neperiano.

De una manera general, la velocidad de crecimiento ha disminuido con el incremento de la concentración de sal en todas las combinaciones de temperatura y de pH. Este comportamiento es similar al publicado por Robinson y col. (1998), quienes han descrito una disminución de la tasa de crecimiento aproximadamente lineal con el aumento de la osmolaridad. A una misma temperatura y concentración de cloruro sódico, la velocidad de crecimiento disminuyó con el incremento de acidez del medio.

Los tiempos de latencia y de generación calculados han sido directamente proporcionales a la concentración de cloruro sódico e inversamente proporcionales al pH.

El incremento en la densidad óptica (DO) ha sido muy escaso a pH 4,5, lo que indica un crecimiento reducido del microorganismo por el efecto inhibitor del carácter ácido del medio. Esta inhibición ha sido mucho más clara con el aumento de la concentración de sal (5,5%) a todas las temperaturas. Además, el incremento de la temperatura parece tener un efecto sinérgico de inhibición, puesto que no se ha podido comprobar crecimiento a 38 °C con 4,5% NaCl, y hasta a 3,5% NaCl cuando la temperatura fue de 42 °C. Por eso, al no haber sido detectado cambios en los valores de la DO inicial, no fueron calculados los parámetros cinéticos en dichas condiciones.

La combinación que mejor ha permitido el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ha sido la de 38 °C, pH 7,4 y 2,5% NaCl, la cual ha dado como resultado una velocidad de crecimiento más elevada (1,87 h⁻¹), y unos tiempos de latencia (4,36 h) y de generación (0,16 h) más bajos.

El tiempo de latencia ha aumentado con el incremento de la concentración del cloruro sódico, tal y como fue descrito por Robinson y col. (1998).

Los resultados obtenidos por Vialette y col. (2003) fueron de 2,01 h como tiempo de generación y 1,8 h como tiempo de latencia, al estudiar 8 cepas de *Listeria monocytogenes* en 20 °C, pH 7 y 4% NaCl. Estos valores difieren mucho de los obtenidos en el presente estudio en condiciones muy similares, es decir, un tiempo de generación de 0,60 h y un tiempo de latencia de 14,95 h (22 °C, pH 7,4 y 4,5% NaCl). Probablemente tales diferencias tengan que ver con el hecho de que dichos autores hayan utilizado el medio BHI suplementado con 3 g/l de extracto de levadura, 2 g/l de glucosa y taponado con 0,1 mol/l de la solución K₂HPO₄ – KH₂PO₄ en la proporción de 1:1 (v/v) al pH 7.0.

Fernández y col. (1997), utilizando como medio de cultivo el caldo triptona de soja con 3 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de glucosa, calcularon para *Listeria monocytogenes* una velocidad de crecimiento de 0,11 h⁻¹ a 20 °C, pH 5 y 4% NaCl. En el presente estudio se ha obtenido una velocidad de crecimiento de 0,52 h⁻¹ a 22 °C, pH 5,5 y 4,5% NaCl. Estas diferencias son obviamente debidas a las diferentes condiciones utilizadas ya sea del medio de cultivo, de las técnicas de ajuste y

monitorización/recuento, y del ambiente de crecimiento (valores de temperatura, sal y pH).

Robinson y col. (1998), indican haber encontrado una fase de latencia proporcionalmente más corta a 15 °C que a 20 °C ó 25 °C, y consideran que en términos relativos la sal es más inhibitora a temperaturas superiores cercanas a los 20 °C. En nuestro caso este efecto se ha confirmado en cierta medida por el hecho de que el efecto inhibitor del pH 4,5 fue observado al no haber sido detectado crecimiento en todas las temperaturas con 5,5% de sal, a 38 °C con 4,5% de sal, y en las restantes concentraciones de sal a 42 °C. Sin embargo, lo postulado por estos autores, según nuestro trabajo, no debería ser considerado como una regla uniforme para todos los valores de pH. Es decir, solamente en medios marcadamente ácidos (a partir de 4,5) el efecto inhibitor de la sal es mayor en temperaturas superiores a los 20 °C, lo cual resulta del sinergismo que se crea entre las altas temperaturas y el bajo pH.

Farber y col. (1992) consideraron que en un intervalo de 4-40 °C la temperatura óptima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en altas concentraciones de sal es de 15 °C. En nuestro caso, tal como se indicó anteriormente, en un intervalo de 22-42 °C la temperatura óptima en términos generales fue de 38 °C, pero para el caso específico del pH 4,5 fue de 42 °C. Este comportamiento se debe a la influencia del pH en cada temperatura.

La osmotolerancia de *L. monocytogenes* se debe a la presencia de aminoácidos osmoprotectores en el medio de cultivo. Esto fue confirmado por Beumer y col. (1994), quienes observaron que en ausencia de osmoprotectores en un medio de crecimiento suplementado con un mínimo de 3% de NaCl no hubo incremento de la densidad óptica a 660 nm. Pero el crecimiento fue significativamente estimulado cuando se añadió al medio 1mM de betaína o carnitina, lo que sugiere la función efectiva de estos aminoácidos como osmoprotectores en células de *L. monocytogenes* estresadas osmóticamente.

Los tiempos de latencia más cortos se han registrado con las temperaturas más elevadas estudiadas, asumiendo un aumento proporcional a la disminución de la

temperatura. Siguiendo la misma lógica, los tiempos de generación han disminuido con el aumento de la temperatura. Todo esto ha sido obtenido con las combinaciones del pH más alto (7,4) y con la concentración más baja de cloruro sódico (2,5%), como se presenta en las Tablas 34-39.

En esta cepa también se ha observado el comportamiento similar al señalado por Robinson y col. (1998) en cuanto al aumento de los tiempos de latencia y de generación cuando se incrementa la concentración de la sal. Asimismo, a semejanza de lo indicado en las cepas de *E. coli*, también se ha observado, en los resultados de nuestro trabajo, la relación inversamente proporcional entre los tiempos de latencia y la velocidad de crecimiento, tal y como indicaron McMeekin y col. (1993) y Baranyi y Roberts (1994). Igualmente, se ha comprobado la relación de la mayor velocidad de crecimiento versus menor tiempo de generación referida por Delignette-Muller (1998).

En las Figuras 112, 113 y 114 se presentan las velocidades de crecimiento máximas y los tiempos de generación y de latencia mínimos de *Listeria monocytogenes*, respectivamente.

Tabla 34. – Parámetros cinéticos de *L. monocytogenes* a 22 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
22	4,5	2,5	0,280	11,196	1,073
		3,5	0,286	16,037	1,051
		4,5	0,281	24,319	1,072
		5,5	NC*	NC	NC
	5,5	2,5	0,723	8,053	0,416
		3,5	0,635	10,105	0,474
		4,5	0,520	14,474	0,579
		5,5	0,646	20,768	0,466
	6,5	2,5	1,016	7,168	0,296
		3,5	0,866	8,964	0,348
		4,5	0,524	13,367	0,575
		5,5	0,436	18,037	0,690
7,4	2,5	1,623	6,474	0,185	
	3,5	0,874	8,547	0,344	
	4,5	0,499	14,946	0,604	
	5,5	0,636	20,311	0,473	

*NC = No calculado

Tabla 35. – Parámetros cinéticos de *L. monocytogenes* a 26 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
26	4,5	2,5	0,202	10,004	1,488
		3,5	0,179	14,850	1,682
		4,5	0,255	25,159	1,183
		5,5	NC*	NC	NC
	5,5	2,5	0,661	7,479	0,455
		3,5	0,589	9,485	0,511
		4,5	0,453	13,304	0,664
		5,5	0,424	19,903	0,710
	6,5	2,5	0,969	6,463	0,311
		3,5	0,805	8,431	0,374
		4,5	0,526	11,501	0,572
		5,5	0,395	16,499	0,762
	7,4	2,5	1,315	7,219	0,229
		3,5	0,956	9,520	0,315
		4,5	0,702	12,790	0,429
		5,5	0,538	17,609	0,560

*NC = No calculado

Tabla 36. – Parámetros cinéticos de *L. monocytogenes* a 30 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
30	4,5	2,5	0,224	9,444	1,341
		3,5	0,322	12,968	0,934
		4,5	0,277	21,537	1,088
		5,5	NC*	NC	NC
	5,5	2,5	0,866	6,431	0,348
		3,5	0,648	7,927	0,464
		4,5	0,595	10,771	0,506
		5,5	0,460	15,813	0,654
	6,5	2,5	1,229	6,440	0,245
		3,5	0,923	8,029	0,326
		4,5	0,680	9,857	0,443
		5,5	0,475	13,914	0,634
	7,4	2,5	1,508	6,171	0,200
		3,5	1,018	8,196	0,296
		4,5	0,711	12,865	0,423
		5,5	0,609	16,719	0,495

*NC = No calculado

Tabla 37. – Parámetros cinéticos de *L. monocytogenes* a 34 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
34	4,5	2,5	0,240	7,723	1,256
		3,5	0,208	10,985	1,448
		4,5	0,263	21,498	1,143
		5,5	NC*	NC	NC
	5,5	2,5	0,955	5,237	0,315
		3,5	0,810	6,523	0,372
		4,5	0,615	9,506	0,490
		5,5	0,417	13,410	0,722
	6,5	2,5	1,293	4,604	0,233
		3,5	1,073	6,233	0,280
		4,5	0,491	9,447	0,614
		5,5	0,448	14,051	0,672
	7,4	2,5	1,538	5,010	0,196
		3,5	1,461	7,055	0,206
		4,5	0,820	10,610	0,367
		5,5	0,743	13,667	0,405

*NC = No calculado

Tabla 38. – Parámetros cinéticos de *L. monocytogenes* a 38 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
38	4,5	2,5	0,289	8,368	1,043
		3,5	0,223	13,190	1,353
		4,5	NC*	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	0,957	4,655	0,315
		3,5	0,739	6,150	0,407
		4,5	0,621	9,426	0,485
		5,5	0,415	13,837	0,725
	6,5	2,5	1,674	4,292	0,180
		3,5	1,239	5,470	0,243
		4,5	0,795	7,935	0,379
		5,5	0,589	11,650	0,511
	7,4	2,5	1,869	4,357	0,161
		3,5	1,802	6,310	0,167
		4,5	0,904	8,406	0,333
		5,5	0,804	11,560	0,375

*NC = No calculado

Tabla 39. – Parámetros cinéticos de *L. monocytogenes* a 42 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
42	4,5	2,5	0,316	15,450	0,953
		3,5	NC*	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
5,5	5,5	2,5	0,903	5,127	0,333
		3,5	0,668	6,477	0,450
		4,5	0,311	12,819	0,967
		5,5	0,294	21,729	1,024
6,5	6,5	2,5	1,068	4,358	0,282
		3,5	0,909	6,118	0,331
		4,5	0,669	8,415	0,450
		5,5	0,427	13,462	0,705
7,4	7,4	2,5	1,573	4,298	0,191
		3,5	1,450	6,631	0,208
		4,5	0,728	10,312	0,414
		5,5	0,616	15,621	0,489

*NC = No calculado

Figura 112. – Velocidades de crecimiento máximas

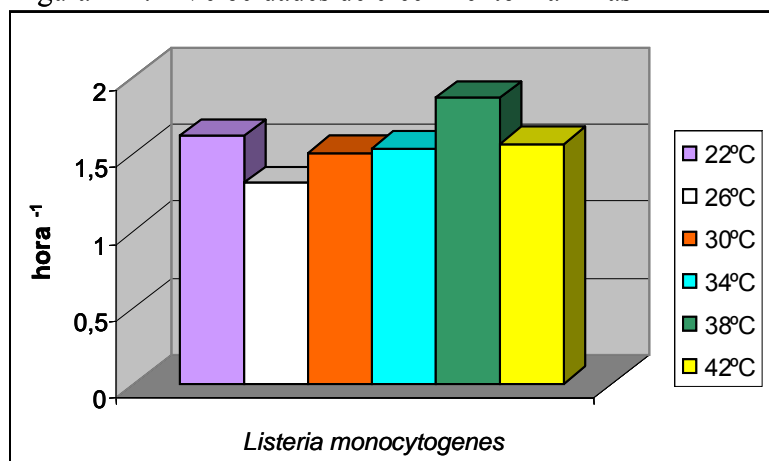


Figura 113. – Tiempos de generación mínimos

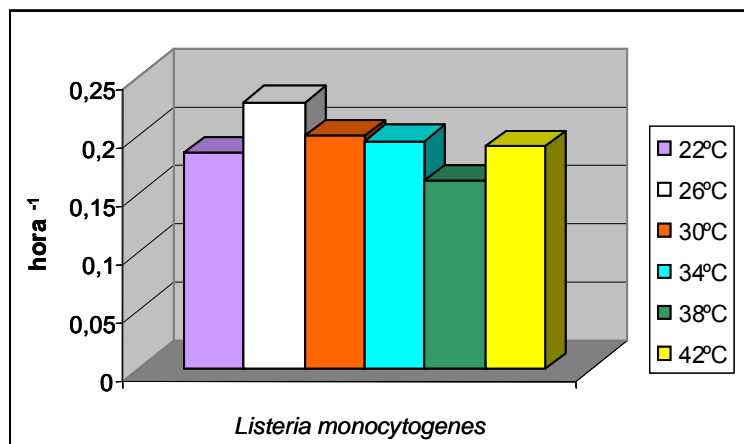
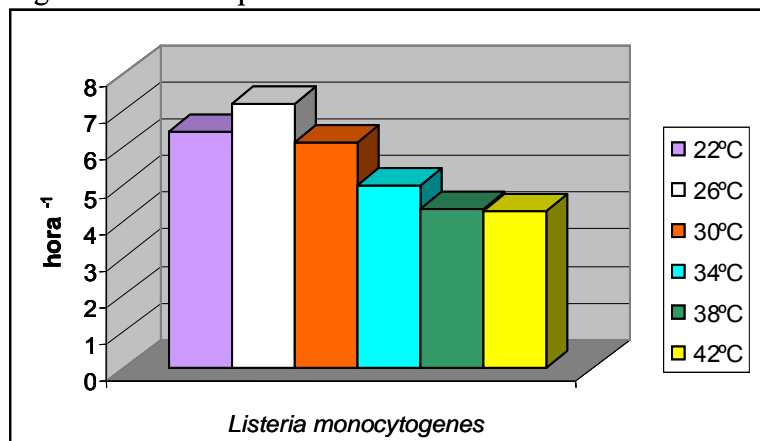


Figura 114. – Tiempos de latencia mínimos



4.1 – Modelado de la velocidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes*

Como se puede verificar en la Tabla 40, ha sido seleccionado el modelo obtenido con los datos de la velocidad de crecimiento sin cualquier tipo de transformación. Dicho modelo ha tenido una R^2 mayor y una menor dispersión del error.

Tabla 40. – Modelos para cálculo de la μ de *Listeria monocytogenes* ($P < 0,0001$)

Fórmula	μ	$\sqrt{\mu}$	$\text{Ln}\mu$
Intercept	-0,284	2,292	-1,823
Temp	0,008	–	
pH	0,250	-0,279	0,405
% NaCl	-0,187	0,146	-0,242
pH x Temp	0,010	–	
% NaCl x Temp	-0,008	–	
% NaCl x pH	-0,102	–	-0,100
Temp ²	-0,001*	–	
pH ²	-0,046*	0,159	-0,160
% NaCl ²	0,031*	–	–
R ²	0,93	0,84	0,87
RMSE	0,11	0,16	0,21

* = $P < 0,05$

La Figura 115 presenta el modelo completo de μ en el cuál se exponen los valores actuales por los predichos junto con los valores obtenidos de la R² (0,93) y la RMSE (0,11).

La Figura 116 presenta el cuadro de los valores residuales por los predichos de la μ , observándose en ella una distribución uniforme de los valores residuales por los predichos.

En las Figuras 117, 118 y 119 se presenta, respectivamente, la influencia aislada de la temperatura, del pH, y del cloruro sódico sobre la velocidad de crecimiento. Ese mismo efecto en las combinaciones del pH con la temperatura, del cloruro sódico con la temperatura, del cloruro sódico con el pH, de la temperatura elevada al cuadrado, del pH elevado al cuadrado y del cloruro sódico elevado al cuadrado, se muestra, respectivamente, en las Figuras 120, 121, 122, 123, 124 y 125. En dichas figuras, de acuerdo con Sall (1990), se aprecia que los efectos aislados y combinados de los factores estudiados sobre la velocidad de crecimiento son significativos.

Figura 115. – Modelo completo de la μ de *Listeria monocytogenes*

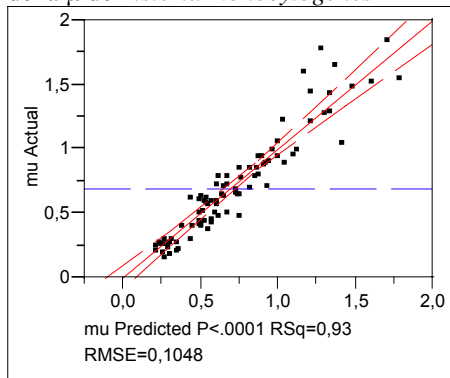


Figura 116. – Residuales por Predichos de la μ de *Listeria monocytogenes*

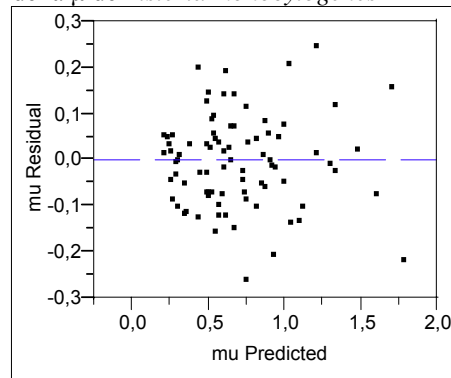


Figura 117. – Influencia de Temperatura sobre la μ de *Listeria monocytogenes*

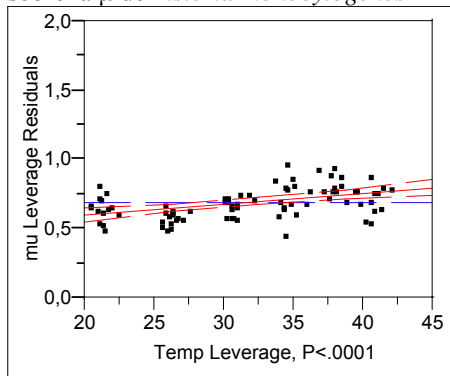


Figura 118. – Influencia de pH sobre la μ de *Listeria monocytogenes*

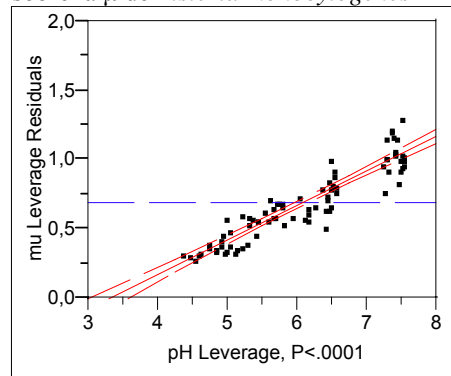


Figura 119. – Influencia de NaCl sobre la μ de *Listeria monocytogenes*

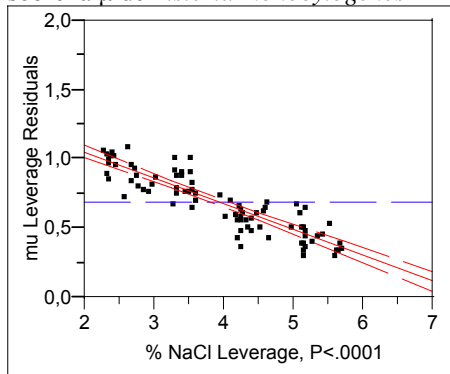


Figura 120. – Influencia de pH x Temp sobre la μ de *Listeria monocytogenes*

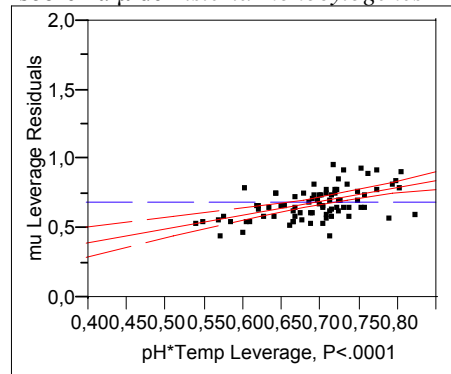


Figura 121. – Influencia de NaCl x Temp sobre la μ de *Listeria monocytogenes*

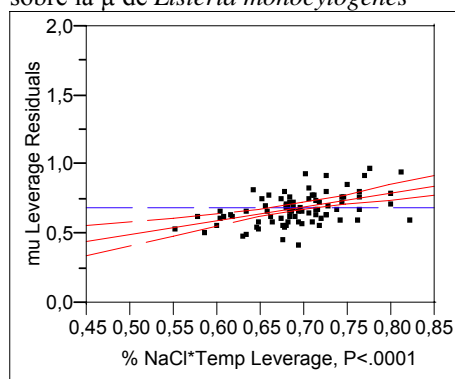


Figura 122. – Influencia de NaCl x pH sobre la μ de *Listeria monocytogenes*

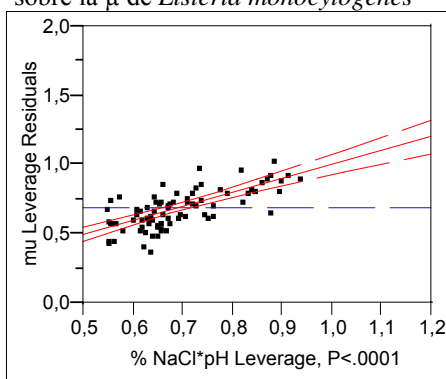


Figura 123. – Influencia de Temp² sobre la μ de *Listeria monocytogenes*

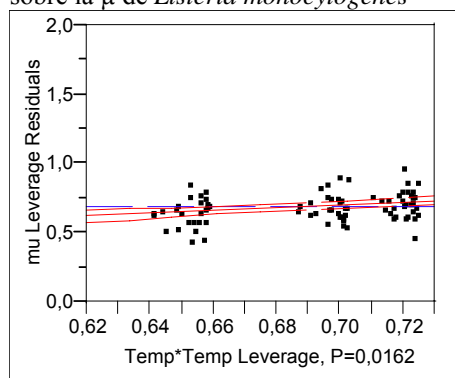


Figura 124. – Influencia de pH² sobre la μ de *Listeria monocytogenes*

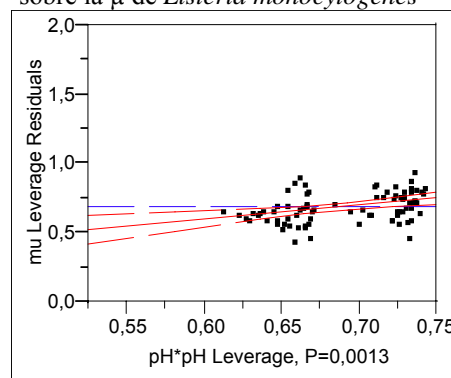
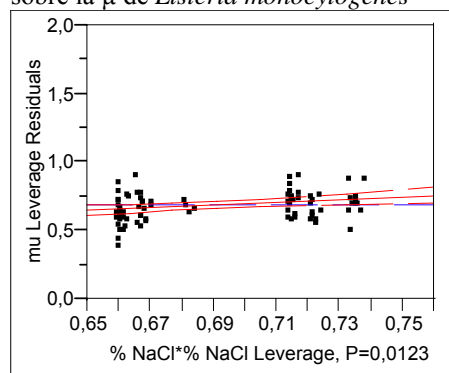
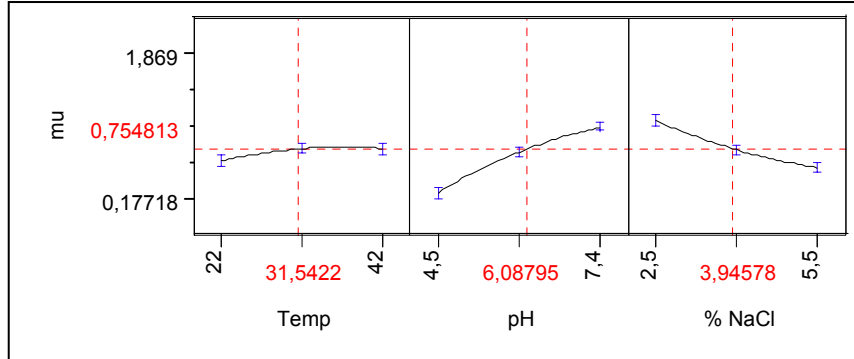


Figura 125. – Influencia de NaCl² sobre la μ de *Listeria monocytogenes*



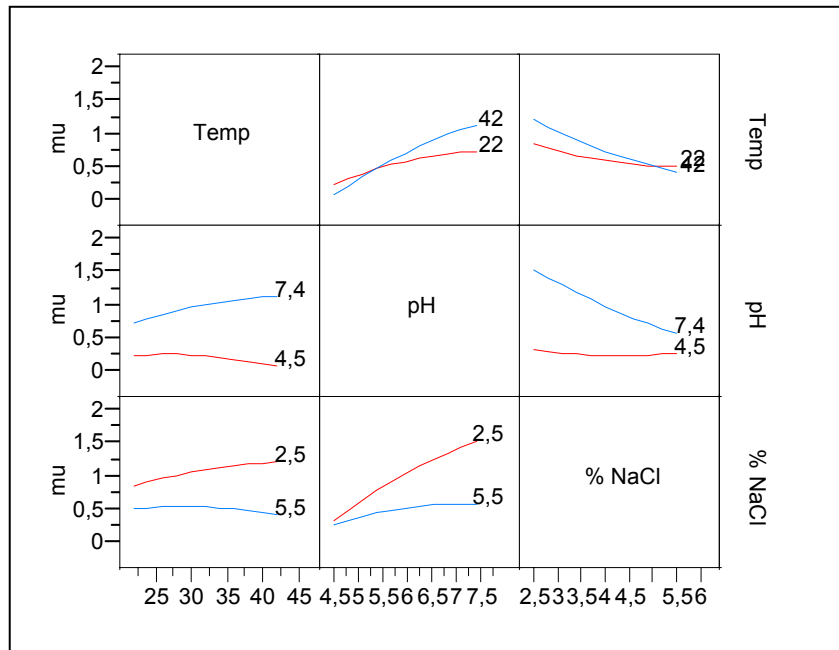
Tal y como se ha explicado en modelos anteriores, en la Figura 126 se observa que en el modelo hay interacción no lineales de variables o efectos respecto la temperatura, pH, y cloruro sódico, puesto que los trazados de predicción muestran un ligero cambio en sus pendientes y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X.

Figura 126. – Perfiles de predicción de la μ de *Listeria monocytogenes*



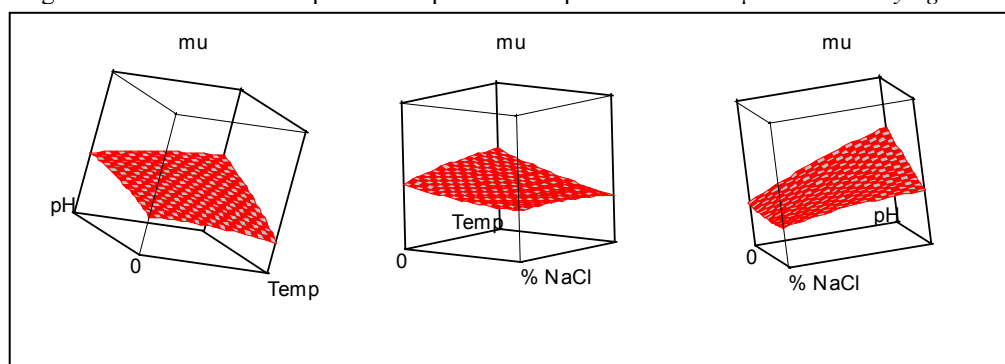
En la matriz de gráficas de la Figura 127 se muestra la interacción de efectos, la cual se evidencia y se puede observar mediante las líneas no paralelas. Por tanto, la interacción de los efectos de la temperatura, del pH y del cloruro sódico afecta el modelo. La interacción de dichos efectos es más evidente en el caso del pH y el % de NaCl.

Figura 127. – Perfiles de interacciones de la μ de *Listeria monocytogenes*



En la Figura 128 la gráfica presenta la respuesta superficie de las combinaciones de los efectos de dos en dos sobre la variable μ .

Figura 128. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción de la μ de *L. monocytogenes*



4.2 – Modelado del tiempo de generación de *Listeria monocytogenes*

Para el cálculo del tiempo de generación se escogió el modelo elaborado con los datos transformados con el logaritmo neperiano (Tabla 41). Ese modelo mostró el más alto coeficiente de determinación y una buena linealidad en su validación.

Tabla 41. – Modelos para cálculo del GT de *Listeria monocytogenes* ($P < 0,0001$)

Fórmula	GT	\sqrt{GT}	LnGT
Intercept	1,232	1,189	0,811
Temp	–	-0,003*	-0,014
pH	-0,202	-0,125	-0,365
% NaCl	0,106	0,080	0,236
pH x Temp	–	–	–
% NaCl x Temp	–	–	–
% NaCl x pH	–	0,023*	0,105
Temp ²	–	–	–
pH ²	0,137	0,085	0,151
% NaCl ²	–	–	–
R²	0,83	0,86	0,90
RMSE	0,13	0,07	0,18

* = $P < 0,05$

Las Figuras 129 y 130 indican la validación del modelo. En la primera se puede observar la linealidad de los valores actuales por los predichos del modelo completo de LnGT con los correspondientes valores de la R^2 y de la RMSE. En la última se aprecia una distribución uniforme de los valores residuales por los predichos de la variable LnGT.

En las Figuras 131, 132 y 133, respectivamente, se presenta la influencia aislada de la temperatura, del pH y del cloruro sódico sobre la variable LnGT. Y en las Figuras 134 y 135, respectivamente, se aprecian los efectos combinados del % NaCl con el pH y del pH elevado al cuadrado sobre el LnGT de *Listeria monocytogenes*. Tal y como se refirió en los casos anteriores, y de acuerdo con Sall (1990), en dichas figuras se observa que son significativos tanto los efectos aislados como los efectos combinados de los factores analizados sobre el tiempo de generación.

Figura 129. – Modelo completo del LnGT de *Listeria monocytogenes*

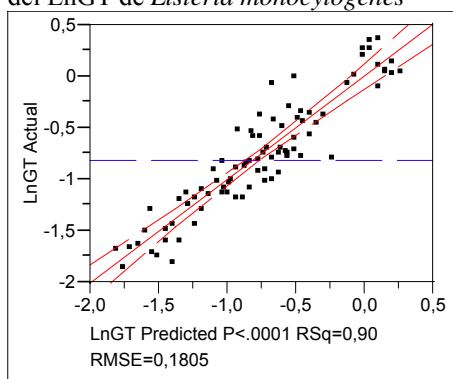


Figura 130. – Residuales por Predichos del LnGT de *Listeria monocytogenes*

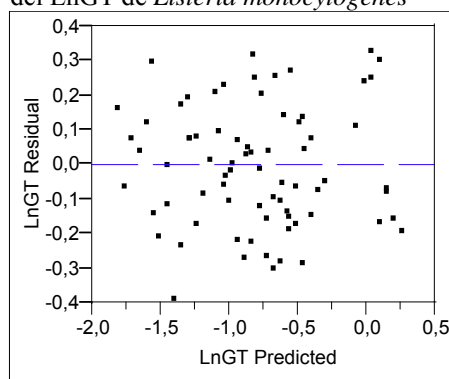


Figura 131. – Influencia de Temperatura sobre el LnGT de *Listeria monocytogenes*

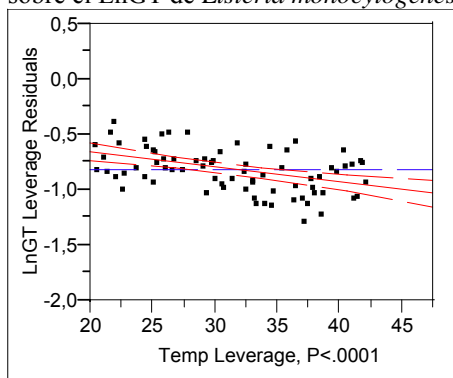


Figura 132. – Influencia de pH sobre el LnGT de *Listeria monocytogenes*

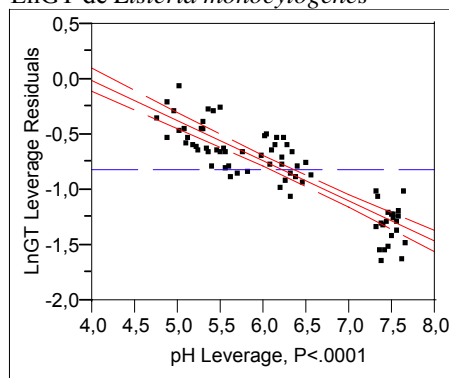


Figura 133. – Influencia de NaCl sobre el LnGT de *Listeria monocytogenes*

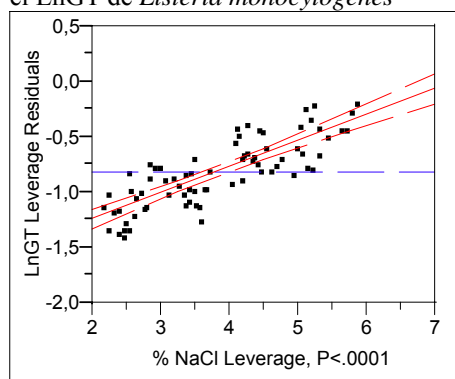


Figura 134. – Influencia de NaCl x pH sobre el LnGT de *Listeria monocytogenes*

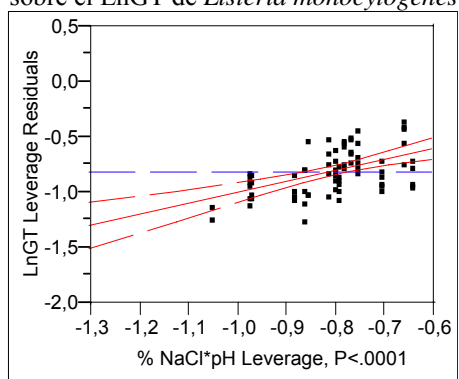
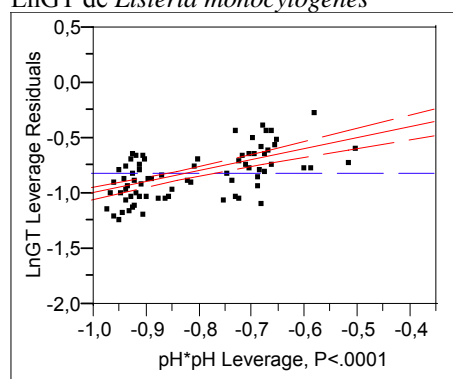
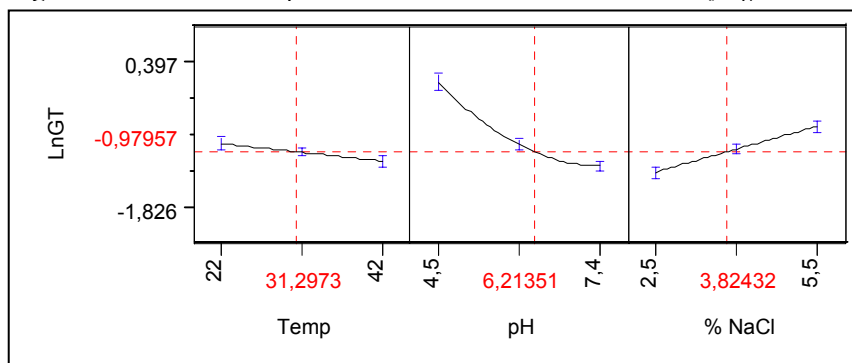


Figura 135. – Influencia de pH² sobre el LnGT de *Listeria monocytogenes*



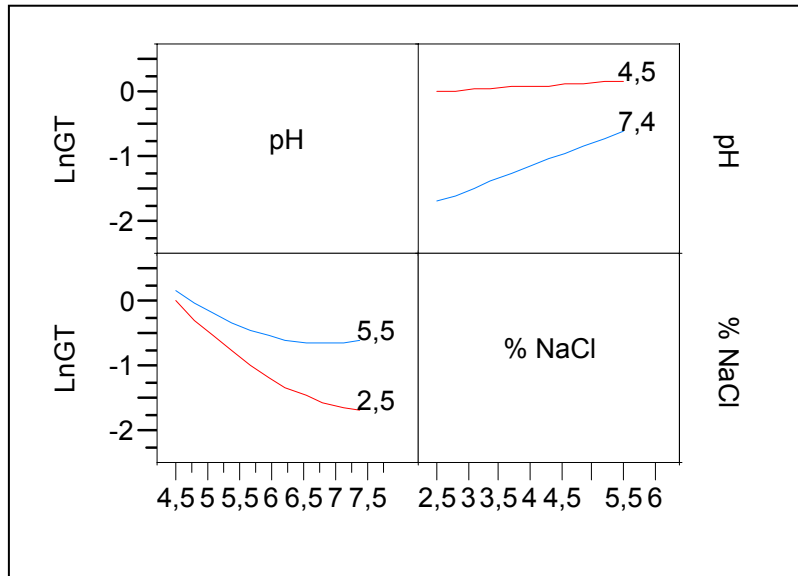
Tal y como se ha explicado en los casos de los modelos previos, en la Figura 136 se observa que en el modelo del LnGT existe una interacción no lineal de variables o efectos respecto al pH, puesto que el trazado de predicción cambia su pendiente y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X.

Figura 136. – Perfiles de predicción del LnGT de *Listeria monocytogenes*



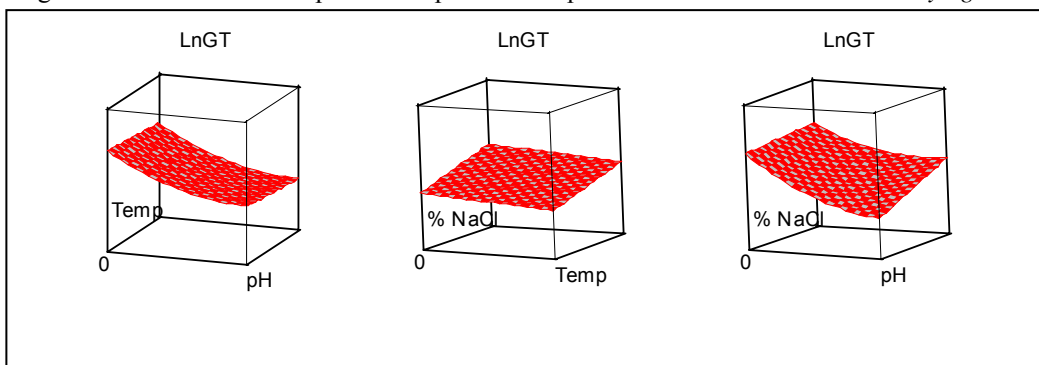
A semejanza de lo observado para el caso de la velocidad de crecimiento, en la matriz de gráficas de la Figura 137 se muestra la interacción de efectos, la cual se evidencia y se puede cuantificar mediante las líneas no paralelas. Por tanto, la interacción de los efectos del pH y del cloruro sódico afecta al modelo.

Figura 137. – Perfiles de interacciones del LnGT de *L. monocytogenes*



En la Figura 138 las gráficas presentan la superficie respuesta de las combinaciones de efectos de los factores estudiados sobre la variable LnGT.

Figura 138. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción del LnGT de *L. monocytogenes*



4.3 – Modelado del tiempo de latencia de *Listeria monocytogenes*

Tal como se muestra en la Tabla 42 entre las tres hipótesis de cálculo ha sido seleccionado el modelo con resultados obtenidos mediante el uso de la raíz cuadrada del tiempo de latencia (\sqrt{LT}). Este modelo presentó buena linealidad en la validación.

La Figura 139 presenta la linealidad en la validación del modelo junto con los respectivos indicadores generales de validación: R^2 de 0,95 y RMSE de 0,14. Por otro lado, la Figura 140 muestra ausencia de sesgo mediante la distribución uniforme de los valores residuales por los predichos tanto en los valores positivos como en los negativos.

Tabla 42. – Modelos para cálculo de LT de *Listeria monocytogenes* (P<0,0001)

Fórmula	LT	\sqrt{LT}	LnLT
Intercept	7,476	2,587	2,128
Temp	-0,240	-0,036	-0,027
pH	-0,788	-0,096	-0,081
% NaCl	3,274	0,502	0,333
pH x Temp	–	–	–
% NaCl x Temp	-0,050*	–	–
% NaCl x pH	–	–	–
Temp ²	0,014	0,002*	0,001*
pH ²	1,335	0,207	0,144
% NaCl ²	0,533	0,056*	–
R^2	0,94	0,95	0,97
RMSE	1,02	0,14	0,07

* = P<0,05

En las Figuras 141, 142 y 143, respectivamente, se presenta la influencia aislada de la temperatura, del pH, y del cloruro sódico sobre la variable \sqrt{LT} . Por otro lado, el efecto de las combinaciones de la temperatura elevada al cuadrado, del % de cloruro sódico elevada al cuadrado y del pH elevado al cuadrado sobre la \sqrt{LT} son presentados, respectivamente, en las Figuras 144, 145 y 146. Siguiendo el criterio explicado en los casos previos, en estas gráficas, de acuerdo con Sall (1990), se aprecia que son significativos los efectos aislados y combinados en las correspondientes probabilidades.

Figura 139. – Modelo completo de la \sqrt{LT} de *Listeria monocytogenes*

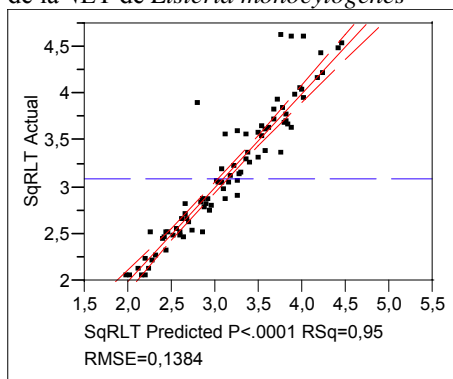


Figura 140. – Residuales por Predichos de de la \sqrt{LT} de *Listeria monocytogenes*

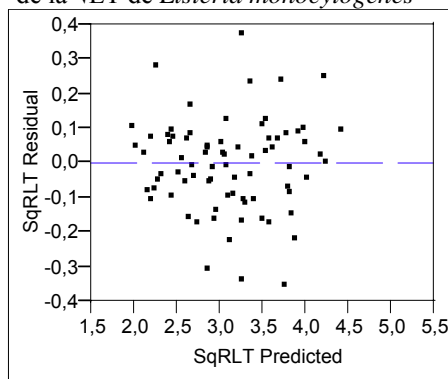


Figura 141. – Influencia de Temperatura sobre la \sqrt{LT} de *Listeria monocytogenes*

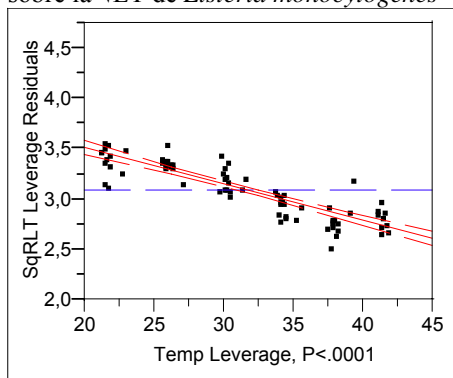


Figura 142. – Influencia de pH sobre la \sqrt{LT} de *Listeria monocytogenes*

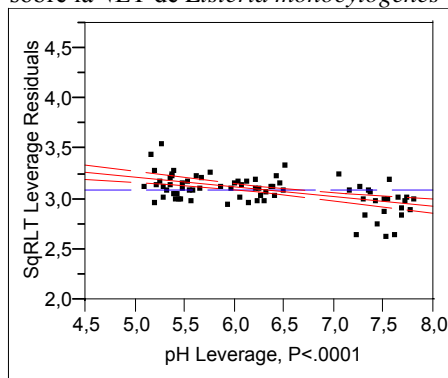


Figura 143. – Influencia de NaCl sobre la \sqrt{LT} de *Listeria monocytogenes*

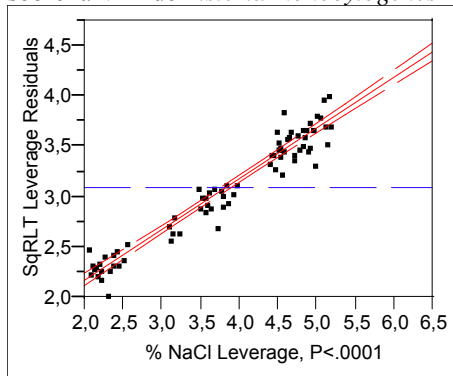
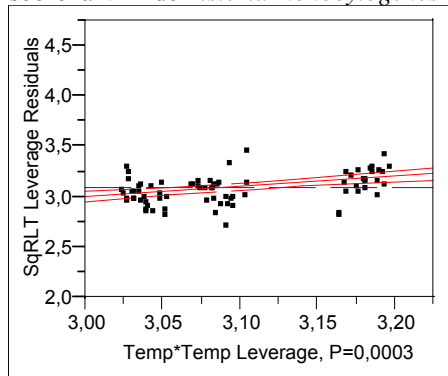


Figura 144. – Influencia de $Temp^2$ sobre la \sqrt{LT} de *Listeria monocytogenes*



En la Figura 147 se observa que en el modelo los trazados de predicción experimentan un cierto cambio en su pendiente y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X, indicando la existencia de interacciones no lineales de variables o efectos respecto a los factores estudiados.

Figura 145. – Influencia de NaCl² sobre la \sqrt{LT} de *Listeria monocytogenes*

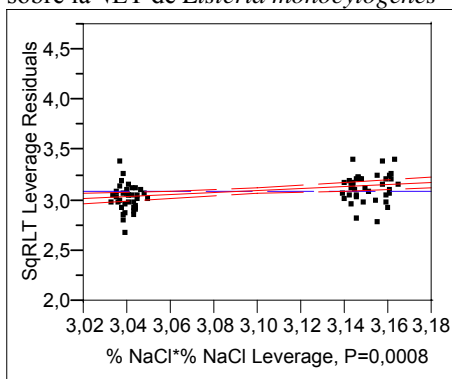


Figura 146. – Influencia de pH² sobre la \sqrt{LT} de *Listeria monocytogenes*

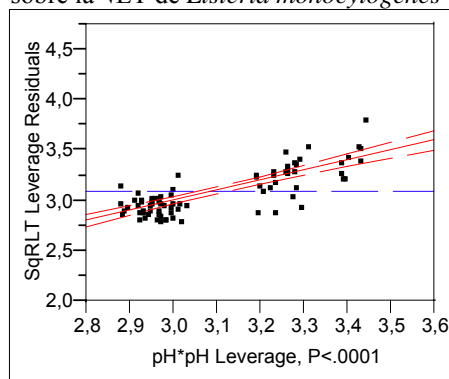
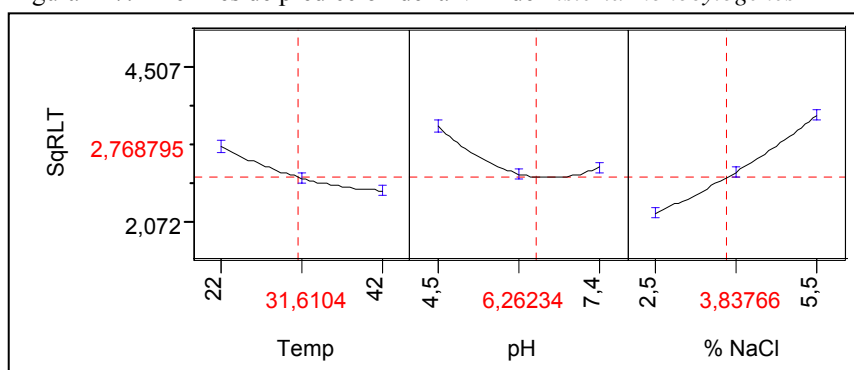
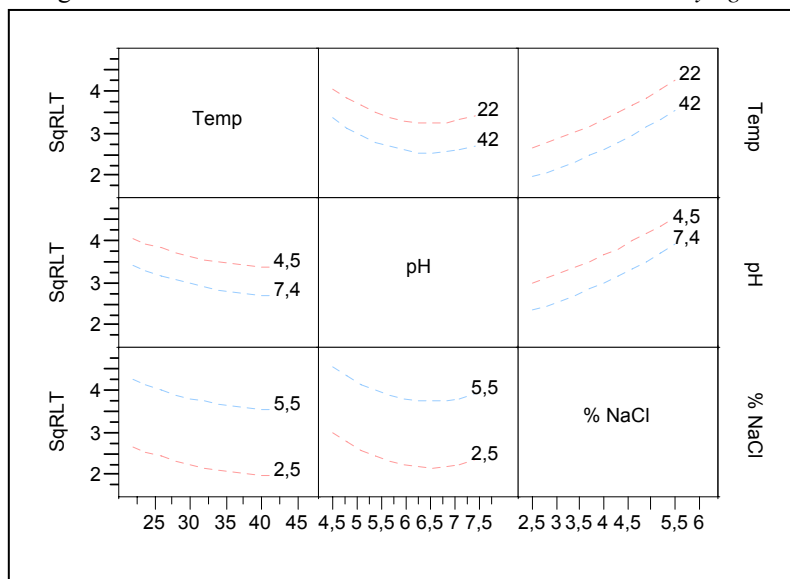


Figura 147. – Perfiles de predicción de la \sqrt{LT} de *Listeria monocytogenes*



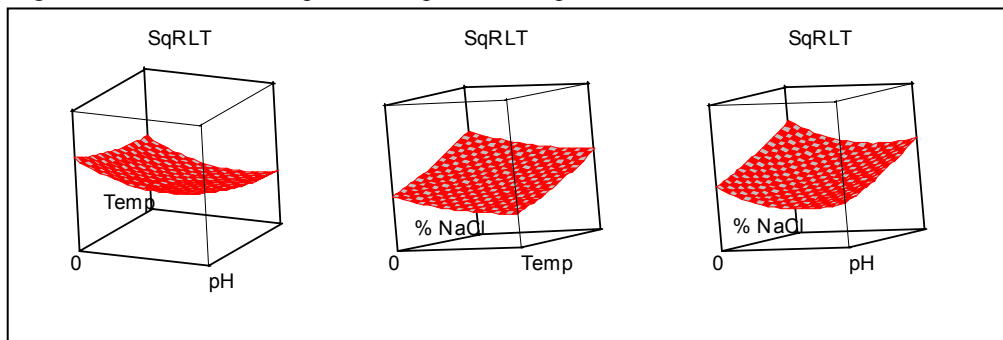
En la matriz de gráficas de la Figura 148 se muestra la interacción de efectos de los factores, evidenciándose mediante las líneas no paralelas. Por tanto, la interacción de los efectos de la temperatura, del pH y del cloruro sódico afecta al modelo.

Figura 148. – Perfiles de interacciones de la \sqrt{LT} de *L. monocytogenes*



En la Figura 149, se representa la superficie de respuesta en la combinación de los efectos de la temperatura, del pH y del % NaCl, combinando dos factores a la vez sobre la variable \sqrt{LT} .

Figura 149. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción de la \sqrt{LT} de *L*.



5 – *Staphylococcus aureus*

En las Tablas 43, 44, 45, 46, 47 y 48 se presentan los resultados de los parámetros cinéticos de *Staphylococcus aureus* calculados en las diferentes combinaciones de temperatura, de pH y de cloruro sódico.

Tal y como se ha observado en el caso de *Listeria monocytogenes* y de las anteriores bacterias estudiadas, de una manera general, la velocidad de crecimiento ha disminuido con el incremento de la concentración de sal en todas las combinaciones de temperatura y de pH. Este comportamiento es similar al publicado por Robinson y col. (1998), quienes han descrito una disminución de la tasa de crecimiento aproximadamente lineal con el aumento de la osmolaridad. A una misma temperatura y concentración de cloruro sódico, la velocidad de crecimiento disminuyó con el incremento de acidez del medio. Theys y col. (2007) reportaron un comportamiento parecido al observar que la velocidad de crecimiento de *Salmonella typhimurium* experimentó una reducción con la disminución del pH y de la actividad del agua.

No se ha observado incremento en la densidad óptica (DO) a pH 4,5, lo cual indica un fuerte efecto inhibitor del crecimiento del microorganismo por parte del carácter ácido del medio. Sin embargo, a 2,5% de NaCl a 30, 34 y 38 °C, y a 3,5% de NaCl a

30 °C, dicha inhibición no ha sido tan evidente como para impedir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Esto puede justificar la posibilidad de que *S. aureus* sea capaz de crecer a pH inferiores a 4,3 (ICMSF, 1998). En el presente estudio no se ha detectado crecimiento del microorganismo a pH 4,5 durante las 24 horas de estudio. El tipo de medio y el ácido utilizado para ajustar el pH del medio pueden justificar la imposibilidad de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en dichas condiciones, puesto que algunos autores (Sutherland y col., 1994) han publicado crecimiento de este microorganismo en mayonesa con 2% NaCl y pH 4,72 ajustado con ácido acético, y también en carne curada a 30 °C, con pH 4,72 y 3,2% NaCl.

La literatura describe que el crecimiento óptimo se produce a temperaturas entre 35 y 40 °C (ICMSF, 1998). En el presente trabajo la combinación que mejor ha permitido el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ha sido la de 22 °C, con pH 7,4 y 2,5% NaCl, obteniéndose una velocidad de crecimiento más elevada ($0,35 \text{ h}^{-1}$) y un tiempo de generación (0,86 h) más bajo. En este caso, es evidente que las condiciones de crecimiento óptimo dependen del efecto de los otros factores, tal y como ha sido descrito por autores como Sutherland y col. (1994) y Eifert y col. (1996).

Los tiempos de latencia más cortos han sido observados con otras combinaciones de parámetros ambientales, lo que indica que una fase de latencia corta no proporciona necesariamente una mayor velocidad de crecimiento. Los tiempos de latencia más cortos se han registrado con las temperaturas estudiadas más elevadas, asumiendo un aumento proporcional a la disminución de la temperatura. Pero los tiempos de generación más cortos no han tenido variaciones considerables entre las temperaturas de 30 a 38 °C. Por otro lado, el pH óptimo ha variado de 6,5 a 7,4 según la temperatura, y considerando la concentración más baja de cloruro sódico (2,5%), tal y como se puede observar en las Tablas 43-48.

A las temperaturas de 26, 30 y 38 °C las velocidades de crecimiento más altas han sido obtenidas con pH 6,5. A 42 °C no se registro modificación de la DO cuando se utilizaron las concentraciones más elevadas de % de NaCl (4,5 y 5,5), debido a la sinergia inhibidora de la sal con el pH.

Sutherland y col. (1994), utilizando la ecuación de Gompertz y trabajando con unidades formadoras de colonias (ufc), obtuvieron un tiempo de generación de 1,12 h para *Staphylococcus aureus* mediante el uso de una temperatura de 30 °C, un pH de 7,4, y un 0,5% de NaCl; mientras que Niskanen (1977) ha publicado tiempos de generación de 1,27 h en cultivos sometidos a unas condiciones ambientales iguales a las citadas. En el presente trabajo, y en condiciones similares pero con 2,5% de NaCl se ha obtenido un valor aproximado a 2,1 h. Las diferencias podrían ser atribuidas en parte a las proporciones de sal utilizadas.

Respecto al incremento de la concentración de cloruro sódico, se detectó un aumento de los tiempos de generación y de latencia. Resultados similares fueron obtenidos por Robinson y col. (1998). Y, en cierta medida, se ha registrado un progresivo aumento de los tiempos de generación y de latencia, tal y como publicaron Duffy y col. (1994).

La relación inversamente proporcional entre los tiempos de latencia y la velocidad de crecimiento obtenida en el presente estudio concuerda con los resultados de estudios de otros autores como McMeekin y col. (1993) y Baranyi y Roberts (1994). Asimismo, se observó la relación inversamente proporcional entre la velocidad de crecimiento y los tiempos de generación, también descrita por Delignette-Muller (1998).

En las Figuras 150, 151 y 152 se presentan las velocidades de crecimiento máximas y los tiempos de generación y de latencia mínimos de *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Tabla 43. – Parámetros cinéticos de *Staphylococcus aureus* a 22 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
22	4,5	2,5	NC*	NC	NC
		3,5	NC	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	0,050	12,038	5,974
		3,5	0,039	14,029	7,679
		4,5	0,037	16,046	8,228
		5,5	0,029	12,064	10,342
	6,5	2,5	0,093	5,566	3,245
		3,5	0,080	8,089	3,780
		4,5	0,054	7,041	5,552
		5,5	0,039	5,050	7,640
	7,4	2,5	0,349	6,283	0,863
		3,5	0,112	6,164	2,690
		4,5	0,067	6,096	4,494
		5,5	0,042	6,061	7,164

*NC = No calculado

Tabla 44. – Parámetros cinéticos de *Staphylococcus aureus* a 26 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
26	4,5	2,5	NC*	NC	NC
		3,5	NC	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	0,054	21,004	5,530
		3,5	0,032	7,000	9,498
		4,5	0,027	21,024	11,198
		5,5	0,011	21,013	26,430
	6,5	2,5	0,145	6,095	2,083
		3,5	0,114	6,045	2,642
		4,5	0,077	7,127	3,920
		5,5	0,061	7,060	4,949
	7,4	2,5	0,099	5,121	3,035
		3,5	0,059	5,044	5,126
		4,5	0,055	5,125	5,490
		5,5	0,050	6,074	6,055

*NC = No calculado

Tabla 45. – Parámetros cinéticos de *Staphylococcus aureus* a 30 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
30	4,5	2,5	0,042	21,050	7,176
		3,5	0,015	9,038	19,656
		4,5	NC*	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	0,132	15,023	2,277
		3,5	0,085	16,060	3,545
		4,5	0,053	5,000	5,639
		5,5	0,020	16,970	15,404
	6,5	2,5	0,287	5,110	1,049
		3,5	0,171	5,135	1,763
		4,5	0,065	5,216	4,604
		5,5	0,043	4,038	6,995
7,4	2,5	0,144	4,107	2,095	
	3,5	0,135	6,012	2,235	
	4,5	0,082	4,073	3,688	
	5,5	0,076	3,084	3,954	

*NC = No calculado

Tabla 46. – Parámetros cinéticos de *Staphylococcus aureus* a 34 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
34	4,5	2,5	0,044	62,140	6,768
		3,5	NC*	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	0,123	10,104	2,446
		3,5	0,045	11,034	6,633
		4,5	0,034	11,063	8,815
		5,5	0,017	70,000	18,030
	6,5	2,5	0,120	3,070	2,516
		3,5	0,118	5,030	2,552
		4,5	0,082	6,066	3,653
		5,5	0,055	2,042	5,464
7,4	2,5	0,253	4,065	1,188	
	3,5	0,125	4,121	2,400	
	4,5	0,088	4,207	3,427	
	5,5	0,080	4,076	3,765	

*NC = No calculado

Tabla 47. – Parámetros cinéticos de *Staphylococcus aureus* a 38 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
38	4,5	2,5	0,060	57,547	5,058
		3,5	NC*	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	0,049	8,025	6,107
		3,5	0,028	8,058	10,817
		4,5	0,024	10,021	12,788
		5,5	0,018	12,014	16,593
	6,5	2,5	0,314	4,089	0,959
		3,5	0,135	3,576	2,234
		4,5	0,113	4,035	2,654
		5,5	0,060	5,047	4,978
7,4	2,5	0,296	4,137	1,016	
	3,5	0,117	4,108	2,568	
	4,5	0,084	3,069	3,595	
	5,5	0,061	2,047	4,896	

*NC = No calculado

Tabla 48. – Parámetros cinéticos de *Staphylococcus aureus* a 42 °C

Temp.(°C)	pH	NaCl (%)	μ (h ⁻¹)	LT (h)	GT (h)
42	4,5	2,5	NC*	NC	NC
		3,5	NC	NC	NC
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	5,5	2,5	0,144	12,126	2,089
		3,5	0,044	18,004	6,794
		4,5	NC	NC	NC
		5,5	NC	NC	NC
	6,5	2,5	0,200	4,114	1,506
		3,5	0,094	4,037	3,192
		4,5	0,082	5,029	3,682
		5,5	0,056	4,011	5,343
7,4	2,5	0,245	4,095	1,230	
	3,5	0,097	3,039	3,111	
	4,5	0,083	3,036	3,632	
	5,5	0,076	3,564	3,945	

*NC = No calculado

Figura 150. – Velocidades de crecimiento máximas

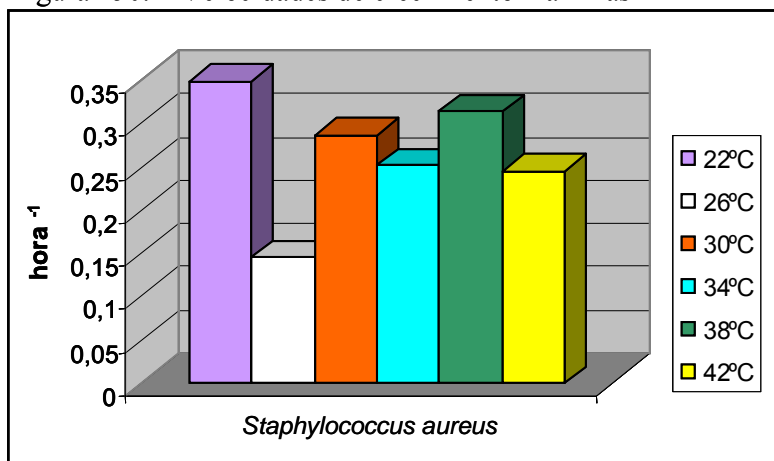


Figura 151. – Tiempos de generación mínimos

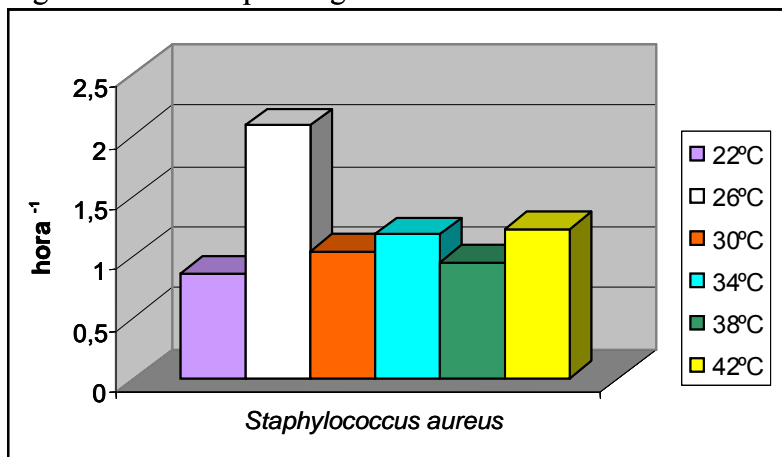
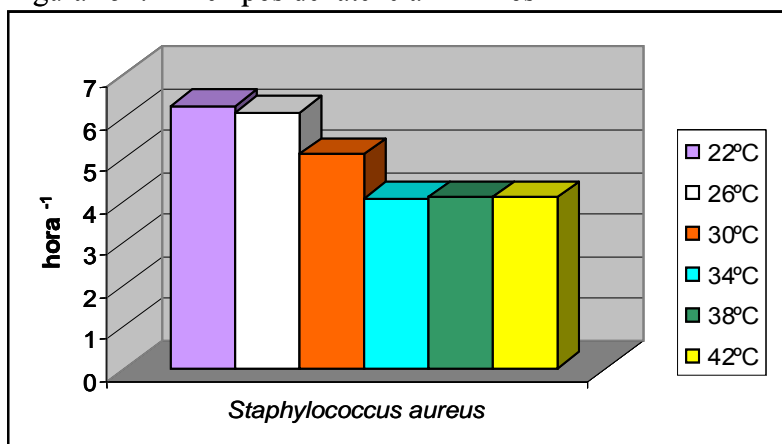


Figura 152. – Tiempos de latencia mínimos



5.1 – Modelado de la velocidad de crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Como se puede observar en la Tabla 49, entre las tres hipótesis de cálculo, ha sido seleccionado el modelo obtenido sin ninguna transformación de los datos de la velocidad de crecimiento, ya que son los que han ofrecido un RMSE más bajo y la R² más elevada.

Tabla 49. – Modelos para cálculo de la μ *Staphylococcus aureus* (P<0,0001)

Fórmula	μ	$\sqrt{\mu}$	$\ln\mu$
Intercept	-0,016	0,126	-4,399
Temp	0,001*	–	0,018*
pH	0,028	0,065	0,474
% NaCl	-0,026	-0,065	-0,406
pH x Temp	–	–	–
% NaCl x Temp	–	–	–
% NaCl x pH	–	–	–
Temp ²	-0,001*	–	-0,002*
pH ²	-0,013	-0,027*	-0,212*
% NaCl ²	–	0,018*	–
R ²	0,81	0,73	0,78
RMSE	0,02	0,06	0,4

* = P<0,05

La Figura 153 presenta el modelo completo de la velocidad de crecimiento con los valores actuales por los predichos. Han sido obtenidos una R² de 0,81 y una RMSE de 0,02.

Para la validación del modelo, la Figura 154 presenta los valores residuales y predichos de la μ , pudiendo observarse una distribución uniforme de los valores residuales por los predichos.

Figura 153. – Modelo completo de la μ de *Staphylococcus aureus*

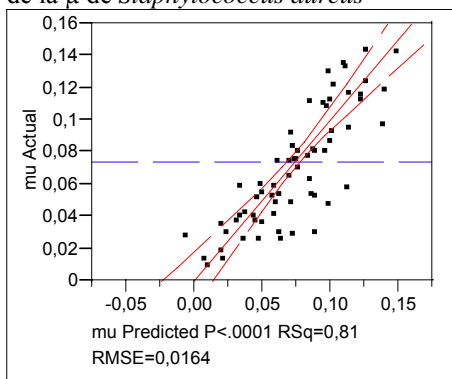


Figura 154. – Residuales por Predichos de la μ de *Staphylococcus aureus*

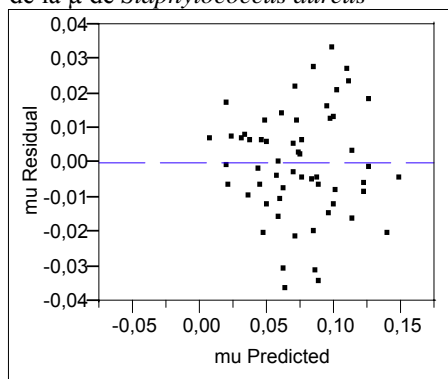


Figura 155. – Influencia de Temperatura sobre la μ de *Staphylococcus aureus*

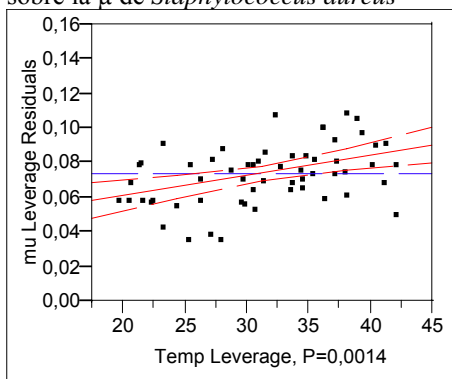


Figura 156. – Influencia de pH sobre la μ de *Staphylococcus aureus*

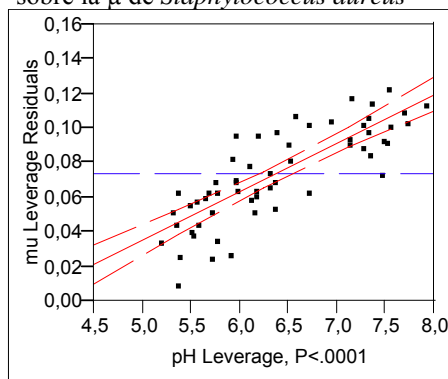


Figura 157. – Influencia de NaCl sobre la μ de *Staphylococcus aureus*

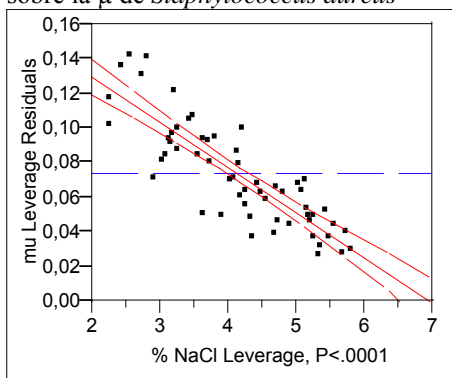


Figura 158. – Influencia de Temp² sobre la μ de *Staphylococcus aureus*

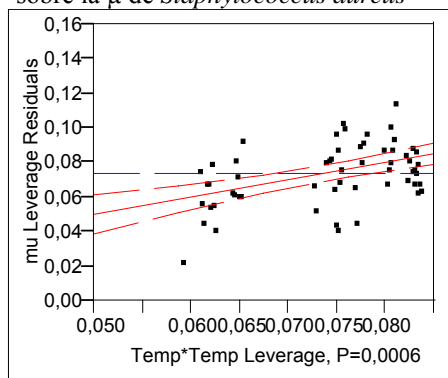
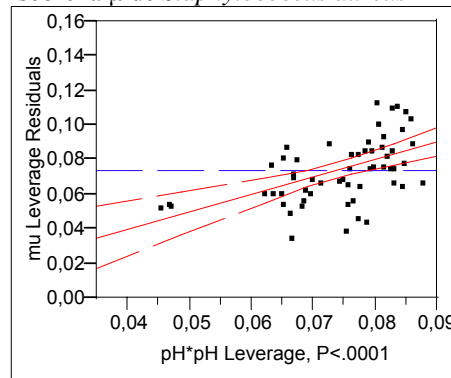


Figura 159. – Influencia de pH^2 sobre la μ de *Staphylococcus aureus*



En las Figuras 155, 156 y 157 se presenta la dispersión de los valores residuales de la influencia de la temperatura, del pH y del % de NaCl, respectivamente, sobre la velocidad de crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Las combinaciones de la temperatura elevada al cuadrado y del pH elevado al cuadrado, se aprecian en las Figuras 158 y 159, respectivamente. También se muestran las respectivas probabilidades en las cuales, de acuerdo con Sall (1990), los efectos aislados y combinados son significativos.

En la Figura 160 se muestra cómo cambian los valores predichos con respecto al cambio de un factor cada vez. En este caso, debido a que los trazados cambian en altura, en pendiente y en su forma, la temperatura y el pH tienen interacciones o efecto de variables no lineales sobre el modelo de la μ .

La Figura 161 muestra la matriz de gráficas que indican la interacción de los efectos del pH con el cloruro sódico.

Figura 160. – Perfiles de predicción de la μ de *Staphylococcus aureus*

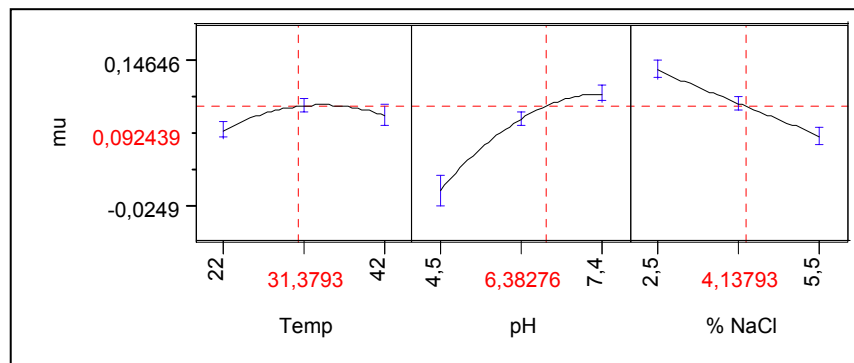
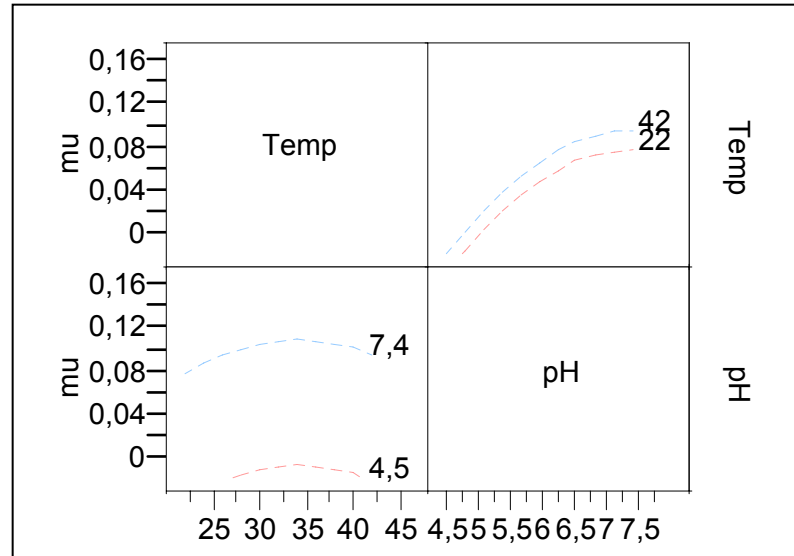
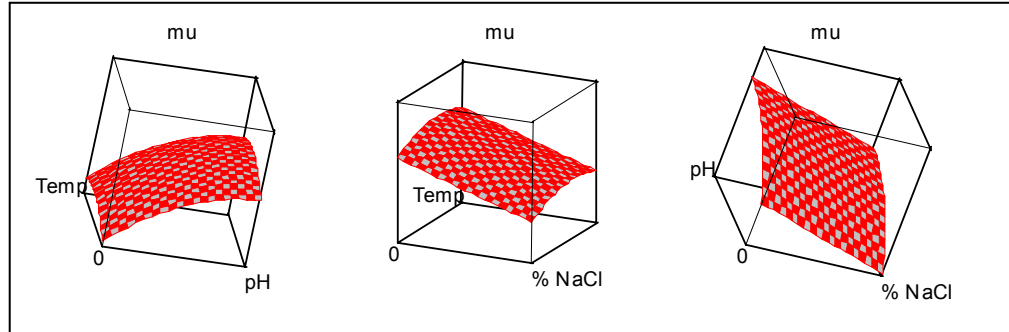


Figura 161. – Perfiles de predicción de la μ de *Staphylococcus aureus*

En la Figura 162 la gráfica muestra la superficie de respuesta de los tres factores, combinados de dos en dos sobre la variable μ .

Figura 162. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción de la μ de *S. aureus*

5.2 – Modelado del tiempo de generación (GT) de *Staphylococcus aureus*

Tal y como se observa en la Tabla 50, entre las tres hipótesis de cálculo ha sido seleccionado el modelo con los resultados del tiempo de generación transformados con el logaritmo neperiano ($\ln GT$). En la validación de este modelo se obtuvo el mayor coeficiente de determinación y la menor dispersión del error, cuyos valores de los indicadores generales se muestran en la Figura 163.

Tabla 50. – Modelos para cálculo de la GT de *Staphylococcus aureus* (P<0,0001)

Fórmula	GT	√GT	LnGT
Intercept	11,353	3,675	2,722
Temp	-0,103	-0,021*	-0,026
pH	-1,561	-0,406	-0,368
% NaCl	1,404	0,385	0,424
pH x Temp	–	–	–
% NaCl x Temp	–	–	–
% NaCl x pH	-0,509*	-0,114*	-0,121*
Temp ²	0,008*	–	–
pH ²	0,995	0,235*	0,283
% NaCl ²	–	–	–
R ²	0,78	0,78	0,83
RMSE	1,12	0,31	0,30

* = P<0,05

La Figura 164 presenta el cuadro de los valores residuales por los predichos del LnGT. La distribución de valores residuales por los predichos es uniforme tanto en los valores positivos como en los negativos en el modelo.

Las Figuras 165, 166 y 167 presentan, respectivamente, la influencia de la temperatura, del pH y del % de NaCl sobre la variable LnGT. De modo similar, los efectos combinados del % de NaCl con el pH y del pH elevado al cuadrado se muestran en las Figuras 168 y 169, respectivamente. Tal y como se ha comentado en los modelos anteriores en tipo de gráfico (Sall, 1990), los efectos de los factores tanto aislados como combinados son significativos.

Figura 163. – Modelo completo del LnGT de *Staphylococcus aureus*

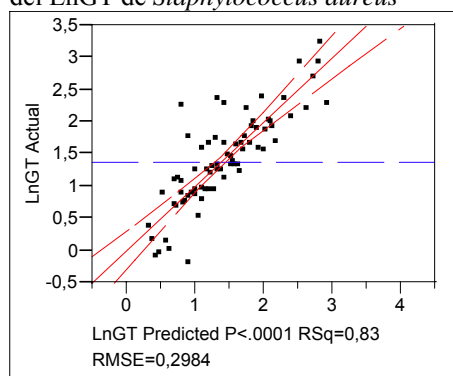


Figura 164. – Residuales por Predichos del LnGT de *Staphylococcus aureus*

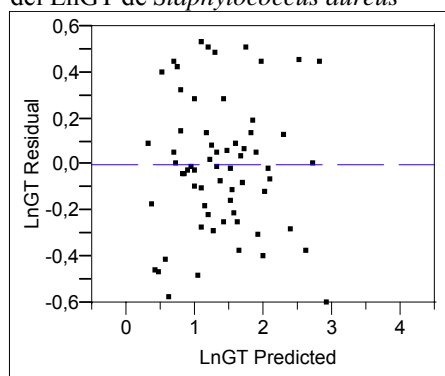


Figura 165. – Influencia de la Temperatura sobre el LnGT de *Staphylococcus aureus*

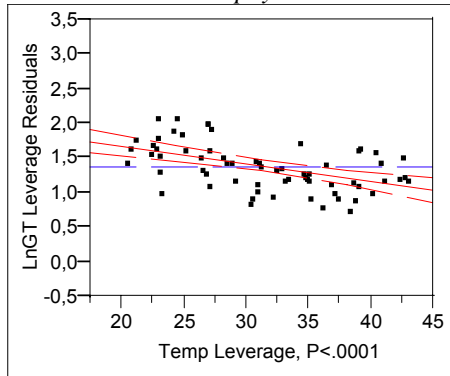


Figura 166. – Influencia de pH sobre el LnGT de *Staphylococcus aureus*

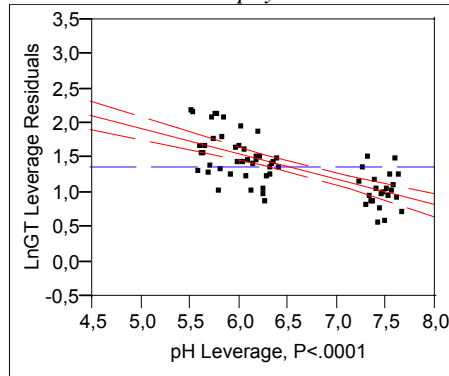


Figura 167. – Influencia de % NaCl sobre el LnGT de *Staphylococcus aureus*

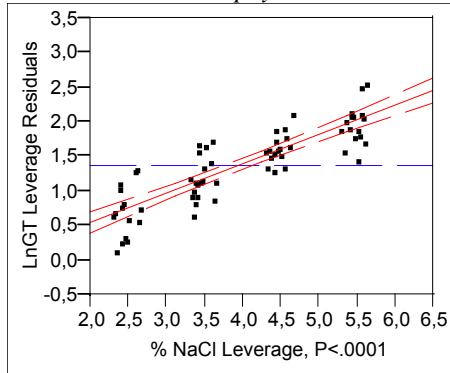


Figura 168. – Influencia de % NaCl x pH sobre el LnGT de *Staphylococcus aureus*

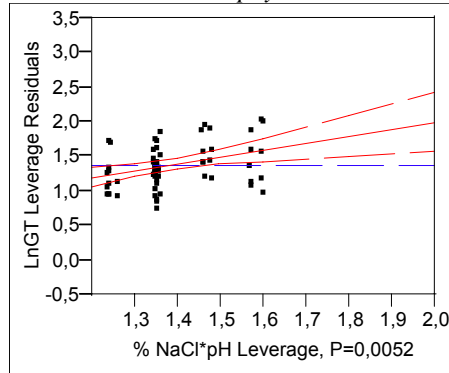
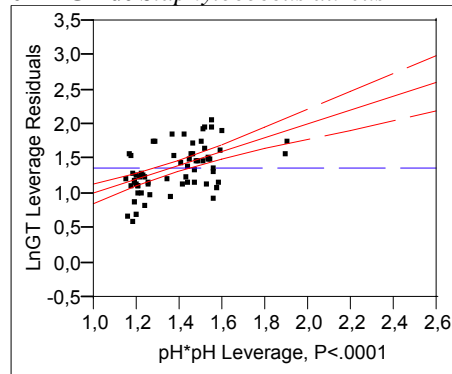
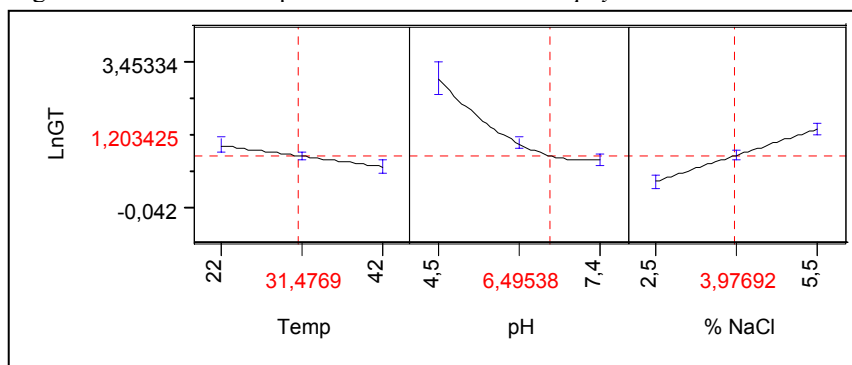


Figura 169. – Influencia de pH² sobre el LnGT de *Staphylococcus aureus*



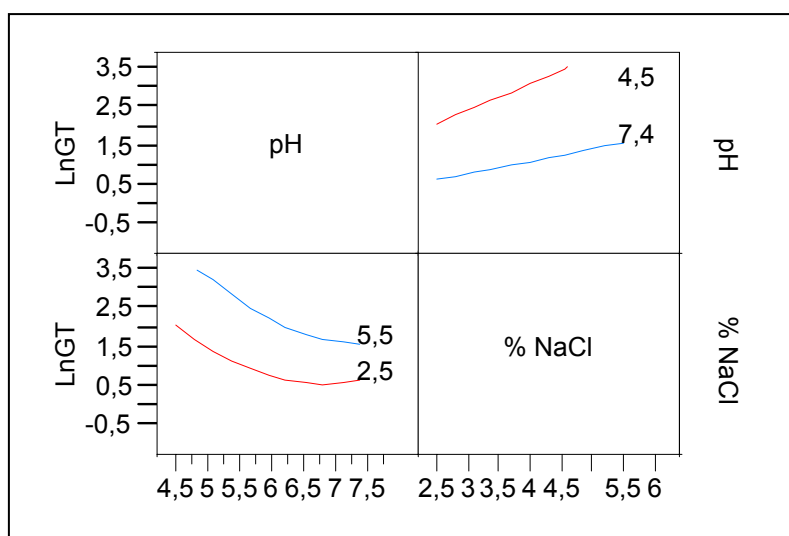
En la Figura 170 se muestra cómo el tiempo de generación disminuye con el incremento de la temperatura y del pH, y aumenta de manera proporcional a la concentración de la sal. Además, se puede observar que en el modelo hay interacción de variables o efectos no lineales respecto al pH, puesto que los trazados de predicción cambian su pendiente y grado de curvatura a medida que cambia el valor de la variable X.

Figura 170. – Perfiles de predicción del LnGT de *Staphylococcus aureus*

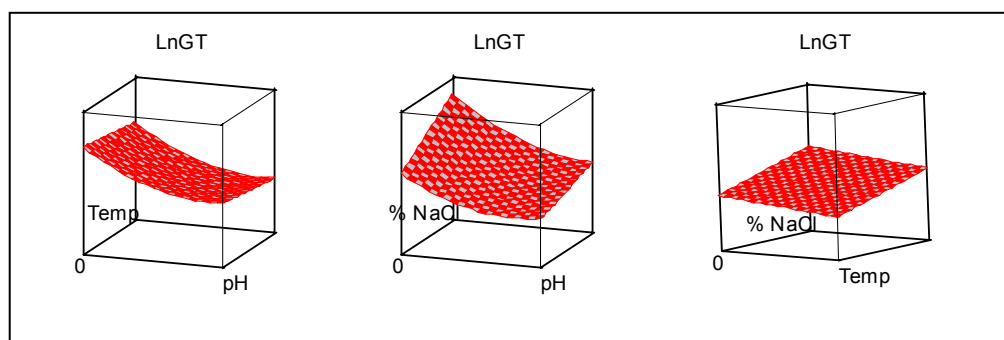


La Figura 171 muestra una matriz de gráficas con líneas no paralelas que indican la interacción de los efectos del pH con el cloruro sódico sobre el LnGT. Dicha interacción parece ser mayor con el incremento del cloruro sódico y la disminución del pH.

Figura 171. – Perfiles de interacciones del LnGT de *S. aureus*



En la Figura 172 se muestra la superficie de respuesta de los parámetros ambientales combinados de dos en dos sobre la variable LnGT.

Figura 172. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción del LnGT de *S. aureus*

5.3 – Modelado del tiempo de latencia (LT) de *Staphylococcus aureus*

Tal y como se puede observar en la Tabla 51, entre las tres hipótesis de cálculo han sido seleccionados los resultados obtenidos mediante el logaritmo neperiano de los datos del tiempo de latencia (LnLT) por ser el que ha ofrecido una R^2 (0,90) más elevada y un RMSE menor (0,22).

Tabla 51. – Modelos para cálculo de la μ de *Staphylococcus aureus* ($P < 0,0001$)

Fórmula	LT	\sqrt{LT}	LnLT
Intercept	30,276	8,380	6,031
Temp	-0,108*	-0,025*	-0,023
pH	-3,386	-0,834	-0,564
% NaCl	–	–	–
pH x Temp	–	–	–
% NaCl x Temp	–	–	–
% NaCl x pH	–	–	–
Temp ²	0,0127*	–	–
pH ²	2,730	0,742	0,386
% NaCl ²	–	–	–
R^2	0,81	0,82	0,90
RMSE	1,89	0,51	0,22

* = $P < 0,05$

La Figura 174 presenta el cuadro de los valores residuales por los predichos del LnLT. La distribución de valores residuales por los predichos es uniforme tanto en los valores positivos como en los negativos en el modelo.

Las Figuras 175 y 176 presentan, respectivamente, la influencia de la temperatura y del pH sobre la variable LnLT. De modo similar, el efecto combinado del pH

elevado al cuadrado se muestra en la Figura 177. Son significativos los efectos de los factores tanto aislados como combinados (Sall, 1990).

Figura 173. – Modelo completo del LnLT de *Staphylococcus aureus*

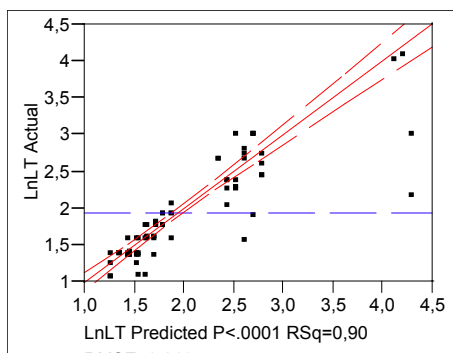


Figura 174. – Residuales por Predichos del LnLT *Staphylococcus aureus*

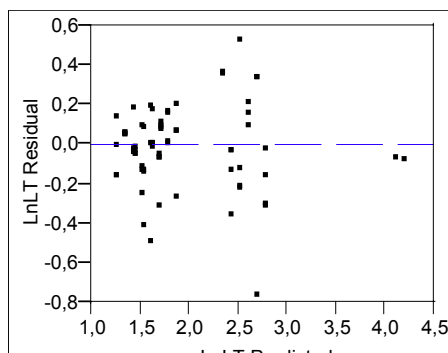


Figura 175. – Influencia de Temperatura sobre el LnGT de *Staphylococcus aureus*

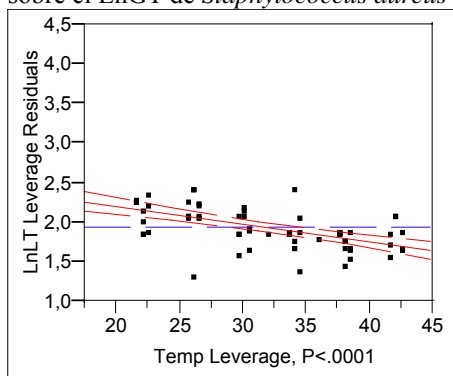


Figura 176. – Influencia de pH sobre el LnGT *Staphylococcus aureus*

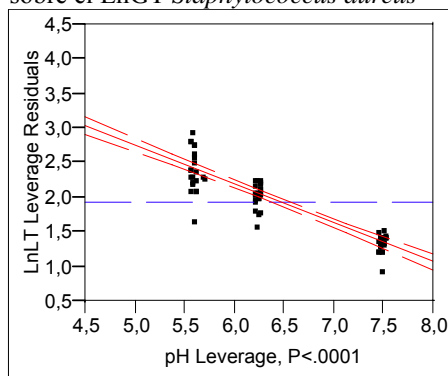
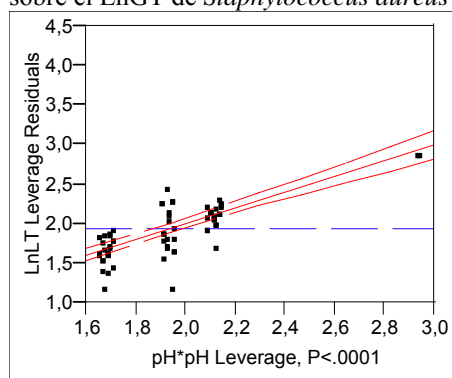
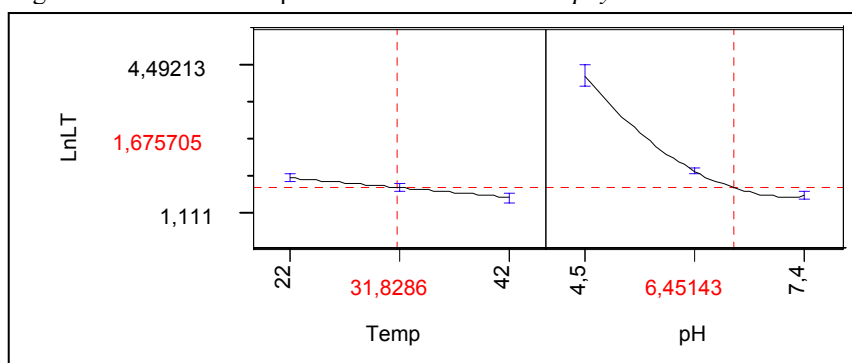


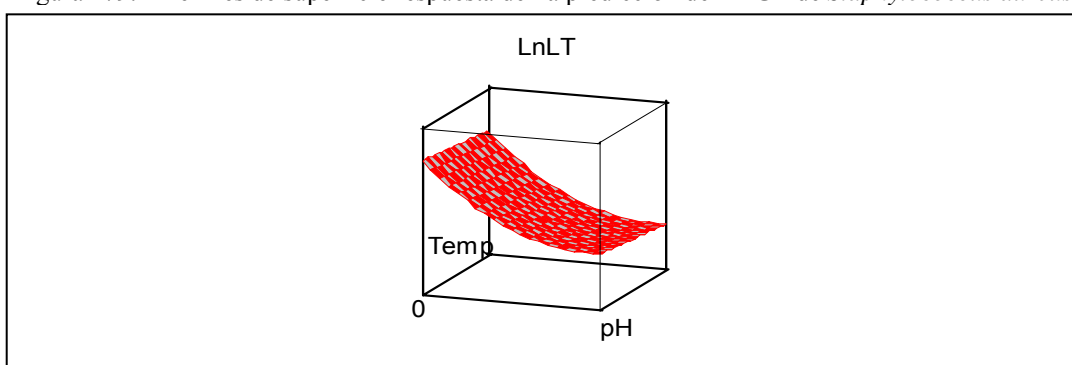
Figura 177. – Influencia de pH² sobre el LnGT de *Staphylococcus aureus*



En este modelo solamente el pH presentó un efecto no lineal significativo, como se observa en la Figura 178, de acuerdo con el criterio de Sall (1990).

Figura 178. – Perfiles de predicción del LnLT de *Staphylococcus aureus*

En el modelado del tiempo de latencia de *Staphylococcus aureus*, la superficie respuesta del efecto de la combinación de la temperatura con el pH sobre la variable LnLT se presenta en la Figura 179.

Figura 179. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción del LnGT de *Staphylococcus aureus*

6 – Análisis estadístico

6.1– Análisis del comportamiento cinético de *E. coli* no patógeno respecto al *E. coli* patógeno

Se han comparado las cepas *E. coli* CECT 516 y *E. coli* O157:H7, es decir, no patógena y patógena, respectivamente, según la temperatura de incubación (Anexo I.1). En las dos temperaturas más bajas (22 y 26 °C) se han encontrado diferencias estadísticas significativas tanto entre las velocidades de crecimiento como entre los tiempos de latencia, siendo la cepa no patógena la que mejor desarrollo ha

experimentado (Tablas 7, 8, 16 y 17). Esto significa que la cepa patógena ha tenido una relativa dificultad para crecer en temperaturas más bajas. Pero en las demás temperaturas ambas cepas han tenido un comportamiento similar. Asimismo, las dos cepas mostraron tiempos de generación similares en todas las temperaturas, lo cual parece indicar, que la patogenicidad no ha condicionado la cinética de ambas bacterias respecto a la temperatura, excepto en las dos temperaturas más bajas.

Teniendo en cuenta el pH del medio, ambas cepas han mostrado comportamientos distintos (Anexo I.2). En todas las condiciones se obtuvieron diferencias estadísticas significativas tanto entre las velocidades de crecimiento como entre los tiempos de latencia. Para los tiempos de generación las diferencias fueron significativas en las condiciones de pH de 4,5 y 6,5. Debido a las diferencias registradas respecto al pH, se comprende que este factor ha sido el que más influencia ha tenido sobre la cinética de los dos microorganismos. Los resultados indicaron una incapacidad de la cepa patógena para crecer en el medio con mayor acidez, mientras que la cepa no patógena no creció sólo en algunas condiciones debido a la inhibición sinérgica, es decir, a la combinación del pH ácido con la temperatura y el cloruro sódico, ambos aumentados. Por tanto, y dados los resultados obtenidos, la cepa no patógena podrá tener una habilidad relativa mayor a la hora de accionar los mecanismos de compensación a los daños provocados por el medio ácido. Esta cuestión coincide con varios estudios publicados sobre la tolerancia al ácido (Duché y col., 2002). Por otro lado, nuestros resultados, con respecto a la incapacidad para crecer de la cepa patógena en el medio ácido, pueden tener sentido, ya que algunos estudios indican que la resistencia de *E. coli* O157:H7 a los ácidos se basa en la inducción de los mecanismos acidoprotectores mediante una adaptación previa, proceso no realizado en nuestro caso (O'Driscoll y col. 1996).

Basando la comparación entre las cepas de *E. coli* estudiadas, de acuerdo con la concentración de cloruro sódico en el medio (Anexo I.3), se observó que ambas cepas han tenido comportamientos no coincidentes con diferentes concentraciones de sal. Fueron encontradas diferencias estadísticas significativas entre las velocidades de crecimiento en casi todas las concentraciones de sal, excepto a 4,5%. A su vez sólo fueron estadísticamente significativas las diferencias entre los tiempos de

latencia a 5,5% de sal, y entre los tiempos de generación a 2,5%. Por lo tanto, en prácticamente todas las concentraciones de sal los dos microorganismos han tenido tiempos de latencia y de generación similares. Estos resultados, obtenidos tras la comparación de los parámetros cinéticos de las dos cepas de *E. coli*, tienen correlación con los publicados por Salter y col. (1998). Estos autores describieron diferencias en las respuestas de diferentes cepas de *E. coli*, incluyendo cepas patógenas y no patógenas. No obstante, y tal como han indicado dichos autores, la similitud entre ambas cepas hace posible que un modelo genérico para cepas de *E. coli* no patógena sea suficiente para describir el comportamiento de cepas patógenas de *E. coli*. Este resultado tiene gran utilidad práctica, ya que muchos grupos de investigación no disponen de instalaciones laborales apropiadas para trabajar con *E. coli* O157:H7.

6.2 – Análisis del comportamiento cinético de las cepas patógenas respecto a la coloración Gram

6.2.1 – Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas patógenas Gram negativas

Comparando las cepas patógenas Gram negativas (*E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium*) según la temperatura de incubación, no han sido encontradas diferencias estadísticas significativas tanto entre las velocidades de crecimiento como entre los tiempos de latencia y de generación, en todas las temperaturas, lo cual indica que ambas cepas han tenido un comportamiento idéntico (Anexo II.1).

Teniendo en cuenta el pH del medio (Anexo II.2), las dos cepas patógenas Gram negativas han tenido un comportamiento parecido en el intervalo de pH de 5,5 a 7,4, multiplicándose a una velocidad prácticamente similar, puesto que entre ellas no han sido verificadas diferencias estadísticas significativas tanto entre las velocidades de crecimiento como entre los tiempos de latencia y de generación. Sin embargo, en la condición del medio marcadamente ácido (pH 4,5) sí se observaron diferencias estadísticas significativas en todos los parámetros cinéticos de las dos cepas. Igualmente fueron observadas diferencias significativas entre las velocidades de crecimiento con el pH más elevado (7,4). Dichas diferencias podrían ser atribuidas a la capacidad y rapidez que cada una de las especies tenga para adaptarse a las

adversidades del medio ácido, que según nuestros resultados, y en concordancia con los mecanismos señalados por Prescott y col. (1999), la más resistente a dichas condiciones fue, en cierta medida, la cepa de *Salmonella typhimurium* (Tablas 16-21 y 25-30)

Fijando la comparación entre las cepas patógenas Gram negativas de acuerdo con la concentración de cloruro sódico (Anexo II.3) en el medio, se observó que ambas cepas han tenido velocidades de crecimiento y tiempos de latencia similares en todas las concentraciones de sal estudiadas. Prácticamente solo se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tiempos de generación entre las concentraciones de sal del intervalo de 2,5 a 4,5%.

6.2.2 – Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas patógenas Gram positivas

Analizando estadísticamente las cepas patógenas Gram positivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) en todas las temperaturas de incubación (Anexo III.1), no han sido observadas diferencias significativas en los tiempos de latencia. Esto indica que, al tratarse de temperaturas óptimas, ambas especies han tenido prácticamente el mismo tiempo de adaptación. Sin embargo, el desarrollo de las cepas a dichas temperaturas se produjo a velocidades de crecimiento completamente diferentes, cuestión explicada por las diferencias estadísticas significativas verificadas entre ellas. Por tanto, en todas las temperaturas la cepa de *Listeria monocytogenes* creció mucho más rápido, llegando a una velocidad de crecimiento máxima ($\mu = 1,9 \text{ h}^{-1}$) cerca de 5 veces superior a la correspondiente a *Staphylococcus aureus* ($\mu = 0,35 \text{ h}^{-1}$). En este microorganismo dicho valor fue obtenido con la temperatura más baja, lo cual puede estar relacionado con su sensibilidad al aumento de las temperaturas (ICMSF, 1998). Los tiempos de generación tuvieron diferencias significativas en el intervalo de 22 a 34 °C.

En relación con el pH del medio las dos cepas patógenas Gram positivas han tenido un comportamiento muy distinto en todas las condiciones. Por tanto, han sido verificadas diferencias estadísticas significativas tanto entre las velocidades de crecimiento como entre los tiempos de latencia y de generación (Anexo III.2). Y en

todos los casos, los parámetros cinéticos de *Listeria monocytogenes* indicaron una mayor facilidad de desarrollo del microorganismo, es decir, velocidad de crecimiento más elevadas y tiempos de generación y latencia más cortos (Tablas 34-39 y 43-48). Dicha facilidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes* podría estar relacionada con una mayor rapidez y capacidad de activación de los sistemas de transporte (Na^+ K^+) para corregir las pequeñas variaciones de pH, o bien con la síntesis de proteínas de shock ácido que actúan como protectoras, en concordancia con lo descrito por Prescott y col. (1999). Todo ello podría explicar, eventualmente, la presencia ubicua de *Listeria monocytogenes*, así como su capacidad de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en muchos medios diferentes (Rocourt y Cossart, 2000).

Por lo que se refiere a la comparación entre las cepas patógenas Gram positivas, de acuerdo con la concentración de cloruro sódico en el medio (Anexo III.3), se observó que ambas cepas han reaccionado de una manera diferente ante la sal, ya que se encontraron diferencias estadísticas significativas tanto entre las velocidades de crecimiento como entre los tiempos de generación en las cuatro condiciones de sal estudiadas. Pero en cuanto a los tiempos de latencia, la sal ha afectado de manera distinta a los dos microorganismos, con la concentración más baja, indicando que *Listeria monocytogenes* ha necesitado menos tiempo para adaptarse que *Staphylococcus aureus*, por lo que se detectaron diferencias estadísticas significativas entre las dos cepas. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos microorganismos en las tres concentraciones de sal más elevadas. En este caso, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* han demostrado su capacidad osmotolerante. Esta circunstancia está descrita como posible gracias a la acumulación intracelular de solutos compatibles, llamados osmolitos, como la glicina betaína (Csonka, 1989; Csonka y Hanson, 1991; Smith, 1996). Los resultados del presente estudio concuerdan con los de Ko y col. (1994), según los cuales las células transportan betaína 200 veces más rápido a altas concentraciones de sal (4% NaCl) que en ausencia de la misma.

6.3 – Análisis de los parámetros cinéticos de cada cepa estudiada entre las diferentes condiciones de temperatura, pH y cloruro sódico

Analizando individualmente cada cepa estudiada respecto al efecto de las temperaturas de incubación (Anexos IV.1-3), no se han observado diferencias significativas en los cinco microorganismos, tanto en la velocidad de crecimiento como en los tiempos de generación y de latencia. Esto da a entender que la temperatura no ha tenido un efecto determinante en la variación del comportamiento individual de los microorganismos a lo largo del estudio, lo cual se justifica por el hecho de que todas las temperaturas utilizadas se encuentran en un intervalo muy cercano a la temperatura óptima. En ese intervalo se proporciona una buena condición de temperatura para el funcionamiento de las reacciones metabólicas a nivel intracelular de los microorganismos mesófilos estudiados (ICMSF, 1983; Madigan y col., 1997).

Pero, observando en todas las condiciones el efecto del pH en cada uno de los cinco microorganismos estudiados individualmente (Anexos IV.1-3), se apreciaron diferencias significativas en todos los parámetros cinéticos: velocidad de crecimiento, y tiempos de generación y de latencia. Esto significa que el pH ha tenido un efecto más determinante en la cinética de cada una de la cepas individualmente, mientras que la temperatura y la sal han actuado por sinergia (Eifert y col., 1996).

Con respecto al efecto del cloruro sódico sobre las bacterias estudiadas individualmente, se registraron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de los cinco microorganismos (Anexos IV.1). No fueron significativas las diferencias estadísticas de los tiempos de generación entre concentraciones de sal para las cepas de *E. coli* patógena y no patógena (Anexos IV.2). Y respecto al tiempo de latencia, las diferencias fueron significativas entre concentraciones de cloruro sódico en todas las cepas, excepto la de *Staphylococcus aureus* (Anexos IV.3).

VI – CONCLUSIONES

VI – CONCLUSIONES

Primera

Las cepas de *E. coli* O157:H7, *E. coli* CECT 516, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, individualmente han tenido comportamientos diferentes en todas las combinaciones de temperatura, pH y cloruro sódico. No obstante, todos ellos presentaron una reducción de la velocidad de crecimiento, y un aumento de los tiempos de latencia y de generación cuando se incrementaron la concentración de sal y la acidez del medio.

Segunda

Los tres factores estudiados (temperatura, pH y cloruro sódico) pueden afectar de manera distinta a las respuestas de superficie de los modelos para predecir los parámetros cinéticos. Es decir, la velocidad de crecimiento, y los tiempos de generación y de latencia de los microorganismos estudiados pueden verse significativamente afectados por uno o por la combinación de dos o más factores del medio. En todas las cepas se ha confirmado el efecto bacteriostático del cloruro sódico. Asimismo, se verificó el efecto sinérgico de la inhibición microbiana mediante la combinación de la acidez con la presión osmótica, y de ésta con el incremento de la temperatura.

Tercera

El pH fue el factor que más condicionó el comportamiento cinético de cada uno de los microorganismos.

Cuarta

Las cepas de *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* son las que mejor han tolerado el pH más ácido en todas las combinaciones de temperatura y cloruro sódico.

Quinta

Una concentración mínima de 2,5 % de NaCl es suficiente para impedir el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 durante 24 horas en medio BHI con pH 4,5, a temperatura de incubación de 22 a 42 °C. En los microorganismos estudiados restantes fueron necesarias concentraciones de sal más elevadas para impedir el crecimiento bacteriano, lo cuál también dependió de la temperatura de incubación.

Sexta

Distintas cepas de la especie *Escherichia coli* pueden presentar variaciones en las respuestas a las condiciones del medio relacionadas con la patogenicidad y no patogenicidad de las mismas. Además, la cepa *E. coli* CECT 516 mostró una buena adaptación de crecimiento en todas las condiciones estudiadas, lo cual hace creer que sería un buen indicador de la calidad higiénica, principalmente en estudios en los cuales no hay posibilidades de utilización segura de microorganismos patógenos como el serotipo O157:H7.

Séptima

No se ha podido atribuir ningún comportamiento derivado de los microorganismos Gram positivos o negativos, puesto que se han observado diferencias entre las cepas del mismo grupo y similitudes entre las cepas de los dos grupos.

Octava

La cepa de *Staphylococcus aureus* es la que más dificultades de adaptación ha tenido en todas las condiciones estudiadas. Esto se confirmó, con respecto a las otras especies estudiadas, por las velocidades de crecimiento bajas y los tiempos de generación y de latencias elevados.

Novena

El uso de la densidad óptica constituye una herramienta rápida y de bajo coste para monitorizar de manera indirecta la cinética microbiana.

VII – BIBLIOGRAFIA

VII – BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Raouf, U. M., Beuchat, L. R. and Ammar, M. S. (1993). 'Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables'. Applied and Environmental Microbiology. 59:1999 – 2006.
- Adair, C., Kilsby, D. C., and Whittall, P. C., (1989). Comparison of the schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the square root model for predicting bacterial growth in foods. Food Microbiology. 6:7 – 18.
- Ahamad, N., and Marth, E. H. (1989). Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35 °C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. Journal of Food Protection 52:688 – 695.
- Airoldi, A. A., and Zottola, E. A. (1988). Growth and survival of *Salmonella typhimurium* at low temperature in nutrient deficient media. Journal of Food Science. 53:1511–1513.
- Angelotti, R., Foter, M. J., and Lewis, K. H. (1961). Time-temperature effects on salmonellae and staphylococci in foods. American Journal of Public Health. 51:76 – 88.
- Anónimo (1986). Microbiological safety vacuumpacked, high SALT food questioned. Food Chem. News 28:30 – 31.
- Anónimo (1992). Foodborne Pathogenic Microorganisms and natural toxins. Center for Food Safety and Applied Nutrition, U. S. Food and Drug Administration, Rockville, Md.
- Anónimo (1996). Preventing foodborne illness: *Escherichia coli* O157:H7. CDC. EE. UU. En: *Escherichia coli* O157:H7. Aspectos Generales. Reporte Técnico de Vigilancia 2, N°. 9, Octubre 1997. Unidad de Análisis y Tendencias en Salud. Ministerio de Salud Pública. Cuba.
- Anónimo (1997). European collaboration identifies an outbreak of *Escherichia coli* O157 infection in visitors to Fuerteventura, Canary Islands. CDR Weekly 15:129 – 130.
- Anónimo (2001).Brote de gastroenteritis por *E. coli* O157:H7 en diferentes escuelas de Cataluña. Boletín Epidemiológico Semanal 9:213 – 220.
- Arbuthnott, J. P., Coleman, D. C. and Azavedo, J. S. (1990). Staphylococcal toxins in human disease', Journal of Applied Bacteriology, Symposium Suppl.:101S – 107S.
- Augustin, J.-C., Rosso, L., and Carlier, V., (1999). Estimation of the temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk. Journal of food Protection 62:170 – 176.
- Augustin, J.-C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., and Carlier, V., (2000a). Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 66:1706 – 1710.

- Augustin, J.-C., Rosso, L., and Carlier, V., (2000b). A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 57:169 – 181.
- Bajaj, V. K., Rai, T., and Kanawjia, S. K. (1991). Biotechnological applications for analysis of food and food additives. *Indian-Dairyman*, 43 505 – 513.
- Banwart, J. G. (1982). *Microbiología Básica de los Alimentos*. Ediciones Bellaterra, S.A., Barcelona, España.
- Baird-Parker, A. C. (1990). ‘The staphylococci – an introduction’, *Journal of Applied Bacteriology*, Symposium Suppl.: 1S – 8S.
- Baranyi, J. (1997). Simple is good as long as it enough. *Food Microbiology* 14:189 – 192.
- Baranyi, J. (1998). Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. *Journal of Theoretical Biology* 192:403 – 405.
- Baranyi, J. and Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23:277 – 294.
- Baranyi, J. and Roberts, T. A. (1995). Mathematics of predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 26:199 – 218.
- Baranyi, J., Ross, T., McMeekin, T. A., and Roberts, T. A. (1996). Effect of parameterization on the performance of empirical models used in ‘predictive microbiology’. *Food Microbiology* 13:83 – 91.
- Baranyi, J. and Pin, C. (1999). Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Applied and Environmental Microbiology* 65:732 – 736.
- Baranyi, J., Pin, C. and Ross, T. (1999). Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology* 48:159 – 166.
- Baty, F., and Delignette-Muller, M. L. (2004). Estimating the bacterial lag time: which model, which precision?. *International Journal of Food Microbiology* 91:261 – 277.
- Baty, F., Flandrois, J. P., and Delignette-Muller, M. L. (2002). Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5816 – 5825.
- Baumgart, J. (1992). Rapid detection of microorganisms in factory laborories (Schellnachweis von Mikroorganismen im Betrieslabor). *Mitteilungen-aus-dem-Gebiete-der-Lebensmitteluntersuchung-und-Hygiene* 82:579 – 588.
- Becker, B., Huber, H., and Holzapfel, W. H. (1998). Comparative studies on the growth of some food associated pathogenic bacteria in selected media using turbidimetric measurement. *Archiv-für-Lebensmittelhygiene* 49:51 – 54.
- Begot C., Desnier, I., Daudin J. D., Labadie, J. C. and Lebert, A. (1996). Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods* 25:225 – 232.

- Begot C., Lebert, I., and Lebert, A. (1997). Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiology* 14:403 – 412.
- Begue, R. E., Neill, M. A., Papa, E. F., and Dennehy, P. H. (1994). A prospective study of Shiga-like toxin-associated diarrhea in a pediatric population. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 19:164 – 169.
- Benjamin, M. M. and Datta, A. R. (1995). Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 4:1669 – 1672.
- Bergdoll, M. S. (1979). ‘Staphylococcal intoxications’, in Riemann, H. and Bryan, F. L. (eds.) *Food-borne infections and intoxications* (2nd ed.), New York: Academic Press 444 – 90.
- Bergdoll, M. S. (1989). ‘Staphylococcus aureus’, in Doyle, M. P. (ed.) *Food-borne Bacterial Pathogens*, New York: Marcel Dekker. 464 – 525.
- Bergis, H., Pourmeyrol, G. and Beaufort, A. (1994). Etude de développement de la flore saprophyte et de *Salmonella* dans les viandes hachées conditionnés sous atmosphère modifiée. *Sciences des Aliments* 14:217 – 228.
- Berry, E. D., and Foegeding, P. M. (1997). Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *Journal of Food Protection* 60:1583 – 1594.
- BES, Boletín Epidemiológico Semanal (2005). Resultados de las principales identificaciones bacterianas declaradas al sistema de información microbiológica en la semana 52 que terminó el 31 de Diciembre. 14 (5):49 – 60.
- BES, Boletín Epidemiológico Semanal (2006). Resultados de las principales identificaciones bacterianas declaradas al sistema de información microbiológica en la semana 10 que terminó el 11 de Marzo. 14 (5):49 – 60.
- Besse, N.G., Audinet, N., Bare, L., Cauquil, A., Cornu, M. and Colin, P. (2006) Effects of the inoculum size of *Listeria monocytogenes* growth in structured media. *International Journal of Food Microbiology* 110:43 – 51.
- Besser, R. E., Lett, S. M., Weber, J. T., Doyle, M. P., Barrett, T. J., Well, T. G. and Griffin, P. M. (1993) An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh pressed apple cider. *JAMA* 269:217 – 222.
- Best, M., Kennedy, M. E., and Coates, F. (1990). Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 56(2):377 – 380.
- Beuchat, L. R. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection* 59:204 – 216.
- Beumer, R. R., Te Giffel, M. C., Cox, L. J., Rombouts, F. M., and Abee, T. (1994). Effect of exogenous proline, betaína, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in minimal medium. *Applied and Environmental Microbiology* 60(4):1359 – 1363.

- Blumberg, H. H., Rimland, D., Kiehlbauch, J. A., Terry, P. M. and Wachsmuth, I. K. (1992). 'Epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* by DNA restriction fragment length polymorphisms of rRNA genes', *Journal of Clinical Microbiology* 30:362 – 369.
- Bolton, K. J., Dodd, C. E. R., Mead, G. C., and Waites, W. M. (1988). Chlorine resistance of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants. *Letters in Applied Microbiology* 6:31 – 34.
- Brackett, R. E., Hao, Y.-Y., and Doyle, M. P. (1994). Ineffectiveness of hot acid sprays to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Journal of Food Protection* 57:198 – 203.
- Brandao-Areal, H., Charbonneau, R. and Thibault, Ch. (1995). Effect of ionization on *Listeria monocytogenes* in contaminated shrimps. *Sciences des Aliments* 15:261–272.
- Bratchell, N., Gibson, A. M., Truman, M., Kelly, T. M., and Roberts, T. A. (1989). Predicting microbial growth: the consequences of quantity of data. *International Journal of Food Microbiology* 8:47 – 58.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J. P., Rosso, L., and Tomassone, R. (1997). A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. *International Journal of Food Microbiology* 38:157 – 167.
- Brenner, D. J. (1984). 'Facultatively anaerobic gram-negative rods', in Krieg, N. R. and Holt, J. C. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (1), Baltimore: Williams and Wilkins (408 – 516).
- Bryan, F. L. (1976). 'Staphylococcus aureus', in Defigueiro, M. P. and Splittstoesser, D. F. (eds.) *Food Microbiology: Public Health Aspects*, Westport: AVI Publishing Co.
- Buchanan, R. L. (1991). Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. *Journal of Food Safety* 11:123 – 134.
- Buchanan, R. L. (1993). Predictive microbiology. *Trends in Food Science and Technology* 4:6 – 11.
- Buchanan, R. L. (1997). Identifying and controlling emerging food borne pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 3:517 – 522.
- Buchanan, R. L. and Cygnarowicz, M. L. (1990). A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. *Food Microbiology* 7:237 – 240.
- Buchanan, R. L. and Klawitter, L. A. (1991). Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 12:235 – 246.
- Buchanan, R. L. and Klawitter, L. A. (1992). Effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* 9:185 – 196.
- Buchanan, R. L. and Phillips, J. G. (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite

- concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 53:370 – 376.
- Buchanan, R. L. and Bagi, L. K. (1994). Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *International Journal of Food Microbiology* 23:317 – 332.
- Buchanan, R. L. and Bagi, L. K. (1997). Effect of water activity and humectant identity on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* 14:413 – 423.
- Buchanan, R. L. and Solberg, M. (1972). Interaction of sodium nitrite, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection* 53:370 – 376.
- Buchanan, R. L., Whiting, R. C., and Damert, W. C. (1997). When is simple good enough: Comparison of the Gompertz, Baranyi and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology* 14:313 – 326.
- Cameron, S., Walker, C., Walker, C., Beers, M., and Aneer, E. (1995). 'Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* outbreak in South Australia associated with the consumption of Mettwurst', *Communicable Diseases Intelligence* 19:70 – 71.
- Carrasco, E., Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., García-Gimeno, R. M and Zurera, G. (2007). Management of microbiological safety of ready-to-eat met products by mathematical modelling: *Listeria monocytogenes* as an example. *International Journal of Food Microbiology* 114:221 – 226.
- CDCP, Centers for Disease Control and Prevention (1995). *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami – Washington and California, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 44:157 – 160.
- CDCP, Centers for Disease Control and Prevention (1996). Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice-October (1996). *Morbidity and Mortality Weekly Report* 45:975.
- CDCP, Centers for Disease Control and Prevention (1997). Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider – Connecticut and New York. October 1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 46:4 – 8.
- Cevallos, C, Hernández-Pezzi, G., Torres, A., Ordóñez, P. and Villarrubia, S. (2005). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España. 2003. (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal*. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo. España. 13 n° 3/25 –36.
- Cheroutre-Vialette, M., Lebert I., Hebraud, M. Labadie, J. C. and Lebert, A. (1998). Effects of pH or a_w stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 42:71 – 77.

- Cheroutre-Vialette, M. and Lebert, A. (2000). Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in dynamic conditions. *International Journal of Food Microbiology* 55:201 – 207.
- Chorin, E., Thuault, D., Cleret, J. J., Bourgeois, C. M. (1997). Modelling *Bacillus cereus* growth. *International Journal of Food Microbiology* 38:229 – 234.
- Coleman, M. E. and Marks, H. M. (1999). Qualitative and quantitative risk assessment. *Food Control* 10:289 – 297.
- Conner, D. E. and Kotrola, J. S. (1995). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 61:382 – 385.
- Corry, J. E. L. (1976). The safety of intermediate moisture food with respect to *Salmonella*. 215 – 238. In Davies, G. G. Birch, and K. J. Parker (Ed.). *Intermediate moisture foods*. Applied Science Publishers Ltd., London.
- Cossins, A. R., and Sinensky, M. (1984). Adaption of membranes to temperature, pressure and exogenous lipids, p. 1 – 20. In: M. Shinitzky (Ed.), *Physiology of Membrane Fluidity*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Csonka, L. N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews* 53:121 – 147.
- Csonka, L. N., and Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology* 45:569–606.
- Cuno, Y. M. (2000). Estudio del Comportamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en Distintos Tipos de Zumos. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Cuno, Y. M. (2002). Estudio del Comportamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en Distintos Tipos de Leche UHT. Memoria de Magíster, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Cuppers, H. G. A. M., and Smelt, J. P. P. M. (1993). Time to turbidity measurement as a tool for modelling spoilage by *Lactobacillus*. *Journal of Industrial Microbiology* 12:168 – 171.
- Dalgaard, P., Ross, T. Kamperman, L., Neumeyer, K., and McMeekin, T. A. (1994). Estimation of bacterial growth from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology* 23:391 – 404.
- Dalgaard, P. and Koutsoumanis, K. (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag time estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods* 43:183 – 196.
- Dalgaard, P., Buch, P., and Silberg, S. (2002). Seafood Spoilage Predictor – Development and distribution of a product specific application software. *International Journal of Food Microbiology* 73:343 – 349.
- Davies, E. A., and Adams, M. R. (1994). Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisin. *International Journal of Food Microbiology* 21:341 – 347.

- D'Aoust, J. Y. (1989). *Salmonella*, p. 327 – 445. In: M. P. Doyle (Ed.). Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York.
- D'Aoust, J. Y. (1991). Pathogenicity of foodborne *Salmonella*'. International Journal of Food Microbiology 12:17 – 40.
- D'Aoust, J. Y. (1991a). 'Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*'. International Journal of Food Microbiology 13:207 – 216.
- D'Aoust, J. Y. (2000). Especies de *Salmonella*. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L.R.; and Montville, T. J. (2000). Microbiología de los Alimentos. Fundamentos and Fronteras. Editorial Acribia, SA. Zaragoza (España).133 – 163.
- D'Aoust, J. Y., Warburton, D. W., and Sewell, A. M. (1985). *Salmonella typhimurium* phage-type 10 from cheddar cheese implicated in a major Canadian foodborne outbreak. Journal of Food Protection 48:1062 – 1066.
- D'Aoust, J. Y., Park, C. E., Szabo, R. A., Todd, E. C. D., Emmons, D. B., and McKellar, R. C. (1988). Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica*, and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. Journal of Food Dairy Science 71:3230 – 3236.
- De Roever, C. (1998). Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. Food Control 9:321 – 347.
- Delignette-Muller, M. L. (1998). Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. International Journal of Food Microbiology 43:97 – 104.
- Delignette-Muller, M. L., Rosso, L., and Flandrois, J. P. (1995). Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. International Journal of Food Microbiology 27, 139 – 146.
- Devriese, L. A. (1984). 'Simplified system for the detection of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species', Journal of Applied Bacteriology 56:215 – 220.
- Dijkstra, R. G. (1989). Prophylactic measures to prevent listeriosis in animal and in consequence to man. Microbiology Aliments Nutrition. 7:361 – 366.
- Domingo, M., Marco, A. J., Prats, N., and Altimira, J. (1992). Patogenia y patología comparada de la listeriosis. En: *Listeria* en alimentos. Conferencia consenso. Ministerio de Sanidad y Consumo. España. 157 – 162.
- Donnelly, C. W. (1988). Historical perspectives on methodology of detect *Listeria monocytogenes*. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 71:644 – 646.
- Doyle, M. P., (1988). Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. Food Technology 42:169 – 171.
- Doyle, M. P. (1991). *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. International Journal of Food Microbiology 12:289 – 302.
- Doyle, M. P. and Padhye, V. V. (1989). *Escherichia coli*. In: Foodborne Bacterial Pathogens, M. P. Doyle (ed.). New York: Marcel Dekker. EE. UU.

- Doyle, M. P., and Schoeni, J. L. (1984). Survival and growth of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology* 48:855 – 856.
- Doyle, M. P., Zhao, T., Meng, J., and Zhao, S. in: Doyle, M. P.; Beuchat, L.R.; and Montville, T. J. (1997). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. ASM Press. Washington DC. 171 – 191.
- Doyle, M. P., Zhao, T., Meng, J., and Zhao, S. in: Doyle, M. P.; Beuchat, L.R.; and Montville, T. J. (2000). *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos and Fronteras*. Editorial Acribia, SA. Zaragoza (España). 171 – 199.
- Droffner, M. L., and Yamamoto, N. (1992). Procedure for isolation of *Escherichia*, *Salmonella*, and *Pseudomonas* mutants; capable of growth at the refractory temperature of 54°C. *Journal of Microbiological Methods* 14: 201 – 206.
- Duché, O., Trémoulet, F., Glaser, P. and Labadie, J. (2002). Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1491 – 1498.
- Duffy, L. L., Vanderlinde, P. B., and Grau, F. H. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, a_w , nitrite and ascorbate. *International Journal of Food Microbiology* 23:377 – 390.
- Dufrenne, J., Defgou, E., Ritmeester, W., and Notermans, S. (1997). The effect of previous growth conditions on the lag time of some foodborne pathogenic micro-organisms. *International Journal of Food Microbiology* 34:89 – 94.
- Duh, Y.-H., and Schaffner, D. W. (1993). Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 56:205 – 210.
- Dykes, G. A.; Geornaras, I.; Papathanasopoulos, M. A. and Von Holy, A. (1994). Plasmid profiles *Listeria* species associated with poultry processing. *Food Microbiology*, 11:519 – 523.
- EC (1999). European Commission. Opinion of Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on the evaluation of microbiological criteria for food animal origin for human consumption. [//europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out26_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out26_en.html).
- Eduardo, A. J. S. (1996). Contribuição para a Elaboração de um Plano HACCP Aplicável à Produção Industrial do Chouriço de Carne. Relatório de Estágio de Fim de Curso de Licenciatura em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. Portugal.
- Eklund, M. W., Poysky, F. T., Paranjpye, R. N., Lashbrook, L. C., Peterson, M. E. and Pelroy, G. A. (1995). Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. *Journal of Food Protection* 58:502 – 508.

- El-Shenawy, M. A., Yousef, A. E., and Marth, E. H. (1989). 'Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* in broth or ground beef'. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 22:387 – 390.
- Eifert, J. D., Gennings C., Carter Jr., W. H. C, Duncan, S. E., and Hackney, C. R. (1996). Predictive Model with Improved Statistical Analysis of Interactive factors Affecting the Growth of *Staphylococcus aureus* 196E. *Journal of Food Protection* 59:608 – 614.
- Escobar, M. D. F., and Serra, M. de S. (1992). *Listeria monocytogenes* en alimentos frescos y elaborados en la ciudad de Barcelona. En: *Listeria en alimentos*. Conferencia consenso. Ministerio de Sanidad y consumo. España. 121.
- Esty, J. R. and Meyer, K. F. (1922). The heat resistance of the spore spore of *B. botulinum* and allied anaerobes XI. *Journal of Infectious Diseases*. 31:650 – 663.
- Evans, D. J., Evans, D.G. and Dupont, H.L. (1979). Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined in human, bovine, chicken and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infect. Immun.* 23:336 – 346.
- Everson, M. L., Hinds, M. W., Bernstein, R. S., and Bergdoll, M. S. (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology* 7:311 – 316.
- Ewing, W. H. (1986) 'The taxonomy of Enterobacteriaceae, isolation of Enterobacteriaceae and preliminary identification. The genus *Salmonella*', in Edwards, P. and Ewing, W. H. (eds.) *Identification of Enterobacteriaceae* (4th ed.), New York: Elsevier: 1 – 91, 181 – 318.
- Fain, A. R., Line, J. E., Moran, A. B., Martin, L. M., Lechowich, R.V., Carosella, J. M., and Brown, W. L. (1991). Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott: D-value and Z-value determinations in ground beef and turkey. *Journal of Food Protection* 54:756 – 761.
- Farber, J. M., and Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes* a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55:476 – 511.
- Farber, J. M., Coates, y Daley, E. (1992). Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes* . *Letters in Applied Microbiology* ,15:103 – 105.
- Farber, J. M., Cai, Y., and Ross, W. H. (1996). Predictive modelling on the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. *International Journal of Food Microbiology* 32:133 – 144.
- Farber, J. M., Daley, E., Holley, R., and Osborne, W. R. (1993). Survival of during the production of uncooked German, American and Italian-style fermented sausages. *Food Microbiology*, 10:123 – 132.
- Feachem, R. G., Bradley, D. J., Garelick, H. and Mara, D. D. (1983). '*Salmonella*, enteric fevers and salmonellosis', in Feachem, R. G., Bradley, D. J.,

- Garelick, H. and Mara, D. D. (eds.) *Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management*, Chichester: John Wiley and Sons: 251 – 286.
- Fehlhaber, K., and Kruger, G. (1998). The study of *Salmonella enteritidis* growth kinetics using a rapid automated bacterial impedance technique. *Journal of Applied Microbiology* 84: 945.
- Fernández, P. S.; George, S. M.; Sills, C. C. and Peck, M. W. (1997). Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 37:37 – 55.
- Ferreira, M. A. S. S., and Lund, B. M. (1987). The influence of pH and temperatura on initiation of growth of *Salmonella* spp. *Letters in Applied Microbiology* 5:67 – 70.
- Ferri, E. F. R. (1992). El problema de la listeriosis. En: *Listeria en alimentos*. Conferencia consenso. Ministerio de Sanidad y Consumo. España. 23 – 27.
- Firstenberg-Eden, R., and Eden, G. (1984). *Impedance Microbiology*. John Wiley & Sons, New York. Pp. 170.
- Foster, J. W., and Bearson, B. (1994). Acid-sensitive mutants of *Salmonella typhimurium* identified through a dinitrophenol lethal screening strategy. *J. Bacterial*. 176:2595 – 2602.
- Foster, J. W., and Hall, H. K. (1991). Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* *J. Bacterial*. 173:5129 – 5135.
- Francis, G. A., Thomas, C. and O’Beirne, D. (1999). The microbiological safety of minimally processed vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol.* 34:1 – 22.
- Franco, C.M.; Quinto, E.J.; Fente, C.; Rodriguez-Otero, J.L.; Domínguez, L. and Cepada, A. (1995). Determination of the principal sources of *Listeria* spp. Contamination in poultry meat and a poultry processing plant. *Journal of Food Protection* 58:1320 – 1325.
- François, K., Devlieghere, F., Standaert, A. R., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., and Debevere, J. (2003a). Modelling the individual cell lag phase. Isolating single cells: protocol development. *Letters in Applied Microbiology* 37:26 – 30.
- François, K., Devlieghere, F., Standaert, A. R., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., and Debevere, J. (2003b). Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. In: Van Impe, J. F. M., Geeraerd, A. H., Leguérinel, I., Mafart. (Eds.), *Predictive Modelling in Foods-Conference Proceedings*. Katholieke Universiteit Leuven/BioTeC, Belgium, pp. 200 – 202. ISBN 90-5682-400-7.
- François, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A. R., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., and Debevere, J. (2005). Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution

- of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 100, 41 – 53.
- François, K., Valero, A., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., Debevere, J., García-Gimeno, R. M., Zurera, G. and Devlieghere, F. (2007). Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*, cultured at refrigeration temperatures. Food Microbiology 24, 32 – 43.
- Frazier, W. C. and Westhoff, D. C (1985). Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- García-del Portillo, F. and Finlay, B. B. (1994). Invasion and intracellular proliferation of *Salmonella* within monophagocytic cells. Microbiología SEM 10:229 – 238.
- García-Gimeno, R. M., and Cosano G. Z., (1994). Modelamiento predictivo del crecimiento microbiano en los alimentos. Alimentaria. Octubre. 85 – 88.
- García-Gimeno, R. M., Hervás-Martínez, C., and de Silóniz, M. I. (2002). Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. International Journal of Food Microbiology 72:19 – 30.
- Garayzabal, J. F. F., and Blanco, M. M. (1992). Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en diversos tipos de alimentos. En: *Listeria* en alimentos. Conferencia consenso. Ministerio de Sanidad y Consumo. España. 127 – 134.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., Cenens, C., and Van Impe, J. F (1998). Application of artificial neural networks as a non-linear modular modelling technique to describe bacterial growth in chilled food products. International Journal of Food Microbiology 44:49 – 68.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., and Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. International Journal of Food Microbiology 59, 185 – 209.
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J. and Van Impe, J. F (2004). Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. International Journal of Food Microbiology 91:229 – 244.
- Genigeorgis, C. A. (1981). Factors affecting the probability of growth of pathogenic microorganisms in foods. Journal of American Veterinary Medicine Association. 179:1410 – 1417.
- Genigeorgis, C. A., Martin, S., Frantti, C. E. and Riemann, H. (1971). Initiation of *Staphylococcal* growth in laboratory media. Applied Microbiology 21:934 – 939.
- George, S. M., Richardson, L. C. C., Peck, M. W. (1996). Predictive models of the effect of temperature, pH, and acetic and lactic acids on the growth of

- Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 32:73 – 90.
- Gibson, A. M., Bratchell, N., and Roberts, A. (1988). Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. International Journal of Food Microbiology 6:155 – 178.
- Giffel, M. C. and Zwietering, M. H. (1999). Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes* International Journal of Food Microbiology 46:135 – 149.
- Gilbert, R. J., and Wieneke, A. A. (1973). Staphylococcal food poisoning with special reference to the detection of enterotoxina in food, p. 273 – 285. In B. C. Hobbs and J. H. B. Christian (ed.), The Microbiological Safety of Food. Academic Press, Inc., New York.
- Gill, C. O., Harrison, J. C. L., and Phillips, D. M. (1991). Use of temperature function integration technique to assess the hygienic efficiency of a beef carcass cooling process. Food Microbiology 8:83 – 94.
- Gilmour, A., and Harvey, J. (1990). Staphylococci in milk and milk products. Journal of Applied Bacteriology, Symposium Suppl. 147S – 166S.
- Glass, K. A. Loeffelholz, J. M., Ford, J. P. and Doyle, M. P. (1992). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. Applied and Environmental Microbiology 58:2513 – 2516.
- Glynn, J. R. and Palmer, S. R. (1992). Incubation period, severity of disease, and infecting dose: evidence of a *Salmonella* outbreak. Am. J. Epidemiol. 136:1396 – 1377.
- Gobat, P. F. and Jemmi, T. (1990). Epidemiological studies on *Listeria* spp. In slaughterhouses. Fleischwirtsch, 70(12): 1448 – 1450.
- Goepfert, J. M., Iskander, I. K., and Amundson, C. H. (1970). Relation of the heat resistance of salmonellae to the water activity of the environment. Appl. Microbiol. 19:429 – 433.
- Gonzalez, F. D., and Russell, J. B. (1999). Factors affecting the extreme acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7. Food Microbiology 16:367 – 374.
- Gould, G. W. (1995). Homeostatic mechanisms during food preservation by combined methods, p. 397 – 410. In: G. V. Barbosa-Cánovas and J. Welti-Chanes (Ed.), Food Preservation by Moisture Control. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.
- Guraya, R., Frank, J. F., and Hassan, A. N. (1998). Effectiveness of salt, pH and diacetyl as inhibitors for *Escherichia coli* O157:H7 in Foods Stored at Refrigeration Temperatures. Journal of Food Protection 61:1098-1102.
- Grau, F. H., and Vanderlinde, P. B. (1993). Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue: equations describing the effects of temperature and pH. Journal of Food Protection 56:96 – 101.

- Gray, M. L., and Killinger, A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological Reviews* 30:309 – 382.
- Griffin, P. M., Bell, B. P., Cieslak, P. R., Tuttle, P., Barret, T. J., Doyle, M. P., McNamara, A. M., Shefer, A. M., and Wells, J. G. (1994). Large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in western United States: the big picture, p. 7-12. In: M. A. Karmali and A.G. Goglio (Ed.), Recent advances in verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* infections. Proceedings of the 2nd International Symposium and Workshop on verotoxin (Shiga-Like Toxin)-Producing *Escherichia coli* infections. Elsevier, Amsterdam.
- Grijpspeerdt, K. and Vanrolleghem, P. (1999). Estimating parameters of the Baranyi model for bacterial growth. *Food Microbiology* 16:593 – 605.
- Hall, H. E.; Brown, D. F., and Bordner, R. H. (1967). Examination of Market Foods for Coliforms Organisms. *Applied Microbiology*, 15:1062 – 1069.
- Hans, J. S. (1981). Introducción a la Higiene de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España
- Hashisaka, A. E., Weagant, S. D., and Dong, F. M. (1989). 'Survival of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese and ice cream exposed to gamma irradiation'. *Journal of Food Protection* 52:490 – 492.
- Henry, B. S. (1933). Dissociation in the genus *Brucella*. *Journal of Infectious Diseases* 52:374 – 402.
- Hernández-Pezzi, G., Torres, A., Ordóñez, P. and Cevallos, C. (2004). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España 1993–2002. (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal*. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo. España. 12 n° 26/289 – 296.
- Hill, C. (2004). Bacterial responses to stress: pressure, pH and salt. Libro de resúmenes del XIV Congreso de Microbiología de los Alimentos. Girona, 19 – 22 septiembre 2004. pp. 33 – 35.
- Hills, B. P. and Wright, K. M. (1994). A new model for bacterial growth in heterogeneous systems. *Journal of Theoretical Biology* 168:31 – 41.
- Holmberg, S. D., and Blake, P. A. (1984). Staphylococcal food poisoning in the United States. *JAMA* 251:487 – 489.
- Huchet, V., Thuault, D., and Bourgeois, C. M. (1995). Development of a model predicting the effects of pH, lactic acid, glycerol and sodium chloride content on the growth of vegetative cells of *Clostridium tyrobutyricum* in a culture medium. *Lait* 75:585 – 593.
- Hudson, J. A. (1993). Effect of pre-incubation temperature on the lag time of *Aeromonas hydrophila*. *Letters in Applied Microbiology* 16:274 – 276.
- Hudson, J. A. and Mott, S. J. (1994). Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of *Pseudomonas fragi*. *Journal of Food Safety* 14:329 – 339.

- Huhtanen, C. N. (1975). Use of pH gradient plates for increasing the acid tolerance of salmonellae. *Applied Microbiology* 29:309 – 312.
- Huhtanen, C. N., Naghski, J., Custer, C. S., and Russel, R. W. (1976). Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in moldy tomato juice. *Applied and Environmental Microbiology* 32:711 – 715.
- Huss, H. H., Jorgensen, L. V., and Vogel, B. F., 2000. Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology* 62:267 – 274.
- ICMSF (1980). *Microorganisms in Foods 3. Microbial Ecology of Foods. Volume I: factors affecting life and death of microorganisms*, New Cork: Academic Press.
- ICMSF (1980a). Injury and its effect on recovery, pp. 205 – 214. In: *Microbial Ecology of Foods*, vol. 1. *Factors Affecting Life and Death of Microorganisms*. Academic Press, Inc., New York.
- ICMSF (1983). *Ecología Microbiana de los Alimentos 1. Factores que afectan a la supervivencia de los Microorganismos en los Alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza España.
- ICMSF (1998). *Microbiología de los Alimentos. Características de los patógenos microbianos*. Editorial Acribia, S.A.
- ICMSF (2001). *Microorganismos de los Alimentos 6. Ecología Microbiana de los Productos Alimentarios*. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Ingham, S. C., Escude, J. M. and McCown, P. (1990). Comparative growth rates of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked chicken loaf stored under air and two modified atmospheres. *Journal of Food Protection* 53:289 – 291.
- Ingham, S. C., Alford, R. A., and McCown, A. P. (1990a). Comparative growth rates of *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas fragi* on cooked chicken loaf stored under air and undermodified atmospheres. *Journal of Food Protection* 53:566 – 567.
- Isigidi, B. K., Mathieu, A.-M., Devriese, L. A, Godard, C. and van Hoof, J. (1992) 'Enterotoxin production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plants'. *Journal of Applied Bacteriology* 72:16 – 20.
- Jakob, R; Lippert, S; y Baumgart, J. (1989). Automated turbidimetry for rapid differentiation and enumeration of bacteria in food. *Zeitschrift-fuer-Lebensmittel-Untersuchung-und-Forschung*, 189 (2) 147-148.
- Johnson, J. L., Doyle, M. P., and Cassens, R. G. (1990). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in meat products – a review. *Journal of Food Protection* 53:81 – 91.
- Jones, D. (1991). 'Foodborne listeriosis', in W. M. Waites and J. P. Arbuthnott (eds) *Foodborne Illness*, London: Edward Arnold: 68 – 76.

- Kapperud, G., Gustavsen, S., Hellesnes, I., Hansen, A. H., Lassen, J., Hirn, J., Jahkola, M., Montenegro, M. A., and Helmuth, R. (1990). Outbreak of *Salmonella typhimurium* infection traced to contaminated chocolate and caused by strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 2597:2601.
- Ko, R., Smith, L. T. and Smith, G. M. (1994). Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 176(2):426 – 431.
- Kokal, D. and Thorpe, D. W. (1969). Occurrence Of *Escherichia coli* in Almonds of Nonpareil Variety. *Food Technology* 23:227 – 232.
- Koutsoumanis, K., Tassou, C. C., Taoukis, P. S., and Nychas, G. J. E. (1998). Modelling of the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. *Journal of Applied Microbiology* 84:981.
- Kovacs, M. J., Roddy, J., Gregoire, S., Cameron, W., Eidus, L., and Drouin, J. (1990). Thrombotic thrombocytopenic purpura following hemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. *American Journal of Medicine* 88:177 – 179.
- Krist, K. A., Ross, T., and McMeekin, T. A. (1998) Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. *International Journal of Food Microbiology* 43:195 – 203.
- Kroll, R. G. and Patchett, R. A. (1992). Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 14:224 – 227.
- Lammerding, A. M. and Fazil, A. (2000). Hazard identification and exposure assessment for microbial food risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 58:147 – 158.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C. M., Guyonnet, J. P., Mafart, P., and Thuault, D. (2002). Modelling the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* 73:219 – 237.
- Le Minor, L. (1988). 'Typing *Salmonella* species', *European Journal of Clinical Microbiology and infectious Diseases* 7:214 – 218.
- Le Minor, L. and Popoff, M. Y. (1987). 'Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*', *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:465 – 468.
- Lebepe, S., Molins, R. A., Farrar, IV, H. and Skowronski, R. P. (1990). Changes in microflora and other characteristics of vacuum-packaged pork loins irradiated at 3.0 kGy. *Journal of Food Science*. 55(4):918 – 924.
- Lederberg, J. (1997). Infectious disease as an evolutionary paradigm. *Emerging Infectious Diseases* 3:417 – 423.

- Levine, M. M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases* 155:377 – 389.
- Lewis, S. J. and Corry, J. E. I. (1991). Comparison of cold enrichment and the FDA method of isolating *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. From ready-to-eat food on retail sale in the UK. *International Journal of Food Microbiology* 12:281 – 286.
- Leyer, G. J., and Johnson, E. A. (1992). Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2075 – 2080.
- Leyer, G. J., and Johnson, E. A. (1993). Acid adaptation induces cross protection against environmental stress in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1842 – 1847.
- Leyer, G. J., Wang, L. L., and Johnson, E. A. (1995). Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3752 – 3755.
- Lindberg, C. W., and Borch, E. (1994) Predicting the aerobic growth of *Yersinia enterocolitica* O-3 at different pH-values, temperatures and L-lactate concentrations using conductance measurements. *International Journal of Food Microbiology* 22:141.
- Line, J. E., Fain, A. R., Jr. A., Moran, B., Martin, L. M., Lechowich, R. V., Carosella, J. M., and Brown, W. L. (1991). Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-value and z-value determinations in ground beef. *Journal of Food Protection* 54:762 – 766.
- Liu, S., Graham, J. E., Bigelow, L., Morse Li, P. D., and Wilkinson, B. J. (2002). Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1697 – 1705.
- Lund, B. M. (1992). Ecosystems in vegetables foods. *Journal of Applied Bacteriology* 73:115S – 126S.
- Lupski, J. R., and Feigin, R. D. (1988). Molecular Evolution of Pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Infectious Diseases*. 157:1120 – 1123.
- Mackey, B. M. and Kerridge, A. L. (1988). The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of *Salmonellae* in minced beef. *International Journal of Food Microbiology* 6:57 – 65.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (1997). *Brock Biology of Microorganisms*. Ed. Prentice Hall International, Inc. pp. 149 – 177.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (1999). *Brock Biología de los Microorganismos*. Ed. Prentice Hall Iberia. 8ª Ed. Revisada, Inc. pp. 149 – 177.
- Mañas, P., Pagan, R., Leguérinel, I., Condon, S., Mafart, P., and Sala, F. (2001). Effect of sodium chloride concentration on the heat resistance and

- recovery of *Salmonella thyphimurium*. International Journal of Food Microbiology 63:209-216.
- Marcus, K. A. and Amling, H. J. (1973). *Escherichia coli* Field Contamination of Pecan Nuts. Applied Microbiology, 26:279 – 281.
- Margall, N., Dominguez, A., Prats, G. and Salleras, L. (1997). *Escherichia coli* enterohemorrágico. Rev. Esp. Salud Pública 71:437 – 443.
- Mathieu, F., Michel, M., Lebrihi, A., and Lefebvre, G. (1994). Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk at various incubation temperature. International Journal of Food Microbiology 22:155 – 172.
- McLauchlin, J. (1994). Serendipitous microbiology and the epidemiology of Listeriosis. En: M. Sussman (ed.), London. The W. P. Pierce Memorial Symposium. 19 – 23.
- McLauchlin, J., Audurier, A., and Taylor, A. G. (1986). Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britain 1967–1984; the use of serotyping and phagetyping. Journal of Medical Microbiology 22:367 – 377.
- McClure, P. J., Roberts, T. A., and Oguru, P. O. (1989). Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of the *Listeria monocytogenes* on gradient plates and liquid medium. Letters in Applied Microbiology 9:95 – 99.
- McClure, P. J., Cole, M. B., Davies, K. W., and Anderson, W. A. (1993). The use of automated data for the construction of kinetic models. Journal of Industrial Microbiology, 12:277 – 285.
- McClure, P. J., Beaumont, A. L., Sutherland, J. P., and Roberts, T. A. (1997). Predictive modelling of the growth of *Listeria monocytogenes*. The effects on growth of NaCl, pH storage temperature and NaNO₂. International Journal of Food Microbiology 34, 221 – 232.
- McDonald, K., and Sun, D.-W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. International Journal of Food Microbiology 52:1 – 27.
- McKellar, R. C. (1997). Heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. International Journal of Food Microbiology 36:179 – 186.
- McKellar, R. C. (2001). Development of a dynamic continuous-discrete-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 54:171 – 180.
- McKellar, R. C. and Knight, K. (2000). A combined discrete-continuous model describing the lag phase of individual bacterial cells. Journal of Applied Microbiology 90:407 – 413.
- McMeekin, T. A., Olley, J., Ross T., and Ratkowsky, D. A. (1993). Predictive Microbiology: Theory and Application. Research Studies Press, Taunton, UK: 340.

- McMeekin, T. A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D. S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D. A., and Ross, T., Salter, M., and Soontranon, S. (1997). Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerging Infectious Diseases* 3(4):541 – 549.
- McMeekin, T. A. and Ross, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology* 78:133 – 153.
- McMeekin, T. A., Olley, J., Ratkowsky, D. A., and Ross, T. (2002). Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology* 73:395 – 407.
- Mead, G. C., Hudson, W. R., and Ariffin, R. (1990). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on irradiated poultry carcasses. *Lancet*, 28 April 1990.
- Mellefont, L., Neumeyer, K., McMeekin, T. A., and Ross, T. (2000). Induction and manipulation of bacterial lag times. In: Van Impe, J. F. M., Bernaerts, K. (Eds), *Predictive Modelling in Foods-Conference Proceedings*. KULeuven/BioTeC, Belgium, pp. 70 – 72. ISBN 90-804818-3-1.
- Merchant, I. A and Packer, R. A. (1980). *Bacteriología y Virología Veterinarias*. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Meynell, G. G. and Meynell, E. (1970). In: *Theory and practice in experimental bacteriology*, (Meynell, G. G. and Meynell eds.), pp. 1 – 19. Cambridge University Press, New Jersey.
- Métris, A., George, S. M., Peck, M. W., and Baranyi, J. (2003). Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal of Microbiological Methods* 55:821 – 827.
- Miles, D. W. and Ross, T. (1999). Identifying and quantifying risks in the food production chain. *Food Australia* 51:298 – 303.
- Minor, T. E. and Marth, E. H. (1972a). ‘*Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review. II Enterotoxins and Epidemiology’, *Journal of Milk and Food Technology* 35:21 – 29.
- Minor, T. E. and Marth, E. H. (1972b). ‘*Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review. III Staphylococci in dairy foods’. *Journal of Milk and Food Technology* 35:71 – 82.
- Minor, T. E. and Marth, E. H. (1972c). ‘*Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. A review. IV Staphylococci in meat, bakery products and other foods’. *Journal of Milk and Food Technology* 35:228 – 221.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology* 3:371 – 394.
- Montville, T. J. (1982). Metabiotic effect of *Bacillus licheniformis* on *Clostridium botulinum*: implications for home-canned tomatoes. *Applied and Environmental Microbiology* 44:334 – 338.

- Montville, T. J. (2000). Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L.R.; and Montville, T. J. (2000). Microbiología de los Alimentos. Fundamentos and Fronteras. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España).13 – 30.
- Moreno, L. S. (1982). Enciclopedia Sistemática de la Alimentación. Biblioteca Técnica AEDOS, Barcelona, España.
- Moreno, B. and García, M.C. (1993). *Listeria monocytogenes* en carne y productos cárnicos: posibles normas microbiológicas. En: Cárnica 2000 (Junio). 41:45.
- Mossel, D. A. A. and Garcia, B. M.(1985). Microbiología de los Alimentos. Fundamentos Ecológicos para Garantizar y Comprobar la Inocuidad de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Murphy, P. M., Rea, M. C., and Harrington, D. (1996). Development of a predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in a skim milk medium and validation studies in a range of dairy products. Journal of Applied Bacteriology 80:557 – 564.
- Murray, E. G. D., Webb, R. A. and Swarm, M. B. R. (1926). ‘A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undiscrised bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp)’. Journal of Pathological Bacteriology 29:407 – 439.
- Nauta, M. (2002). Modelling bacterial growth in quantitative microbial risk assessment. Is it possible? International Journal of Food Microbiology 73:297 – 304.
- Neumeyer, K., Ross, T. and McMeekin, T. A. (1997). Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage pseudomonads. International Journal of Food Microbiology 38:45 – 54.
- NFPA, National Food Processors Association. (1998). Factors to be considered in establishing good manufacturing practices for the production of refrigerated food. Dairy and Food Sanitation 8:288 – 291.
- Nguyen-The, C., and Carlin, F. (2000). Fresh and processed vegetables. In: Lund, B. M., Baird Parker, A.C. and Gould, G. W. (ed.). The microbiological safety and quality of food, 1. Aspen Publishing Gaithersburg, Maryland, USA.
- Nicholas, J. (1999). Higiene de los Alimentos. Directrices para Profesionales de Hostelería, Restauración y Catering. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Niskanen, A. (1997). Release of enterotoxin A and thermonuclease from growing and nongrowing cells of *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Safety 1: 119 – 128.
- Nixon, P. A. (1971). Temperature integration as a means of assessing storage conditions. Report on Quality in Fish Products, Seminar N° 3. Fishing Industry Board, Wellington, New Zeland. 34 – 44.

- Nychas, G. J. E., and Arkoudelos, J. S. (1990). Staphylococci: their role in fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*, Symposium Suppl. 167S – 188S.
- O'Driscoll, B., Gahan, C.G., and Hill, C. (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1693 – 1698.
- Olley, J., and Ratkowsky, D. A. (1973a). Temperature function integration and its importance in storage and distribution of flesh foods above the freezing point. *Food Technology in Australia* 25:66 – 73.
- Olley, J., and Ratkowsky, D. A. (1973b). The role of the temperature integration in monitoring fish spoilage. *Food Technology in New Zealand* 8:147 – 153.
- Ölmez, H. K. and Aran, N. (2005). Modeling the growth kinetics of *Bacillus cereus* as a function of temperature, pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations. *International Journal of Food Microbiology* 98:135 – 143.
- Olson, E. R. (1993). MicroReview. Influence of pH on bacterial gene expression. *Molecular Microbiology* 8:5 – 14.
- Palumbo, S. A. (1986). Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? *Journal of Food Protection* 49:1003 – 1009.
- Panoff, J. M., Thammavongs, B., Gueguen, M., and Boutibonnes, P. (1998). Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiology* 36:75 – 83.
- Pascual, M. R. (1989). *Microbiología Alimentaria: Detección de Bacterias con Significado Higiénico-Sanitario*. Ministerio de Sanidad y Consumo. Instituto de Salud “Carlos III”. Madrid. España.
- Pascual, M. R. and Calderon, V. (2000). *Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas (2ª Ed.)*. Díaz de Santos, S. A. Madrid. España.
- Patterson, M. F., Damaglou, A. P., Buick, R. K. (1993). Effects of irradiation dose and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on poultry meat. *Food Microbiology* 10:197 – 203.
- Patchett, R. A., Kelly, A. F., and Kroll, R. G. (1992). Effect of sodium chloride on the intracellular solute pools of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3959 – 3963.
- Peláez, C. (1990). *Listeria monocytogenes*. Interés para la industria láctea. *Ile*: 22 – 31.
- Pelczar, J. M; Reid, R. D.; and Can, E. C. S. (1988). *Microbiología*. Cuarta Edición. McGraw Hill.
- Perales, I. (1992). Listeriosis transmitida por alimentos. Presencia de *Listeria monocytogenes* en los alimentos. En: *Listeria en alimentos*. Conferencia consenso. Ministerio de Sanidad y consumo. España. 103 – 115.

- Phadtare, S., Yamanaka, K., and Inouye, M. (2000). The cold shock response, p.33 – 45. En: G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, D.C.
- Pinner, R. W., Schuchat, A., Swaminathan, B., Hayes, P. S., Deaver, K. A., Weaver, R. E., Plikaytis, B. D., Reeves, M., Broone, C. V., and Wenger, J. D. (1992). Role of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiology and epidemiologic investigation. JAMA 267:2046 – 2050.
- Pirie, J. H. H. (1940) 'Listeria: change of a name for a genus of bacteria'. Nature 154:264.
- Pochiecha, J. Z., Smith, K. R. and Manderson, G. J. (1991). Incidence of *Listeria monocytogenes* in meat production environments of a South Island (New Zealand) mutton slaughterhouse. International Journal of Food Microbiology, 13:321 – 328.
- Poschet, F., Bernaerts, K., Geeraerd, A. H., Scheerlink, N., Nicolai, J. F., and Van Impe, J. F. (2004). Sensitivity analysis of microbial growth parameter distribution with respect of data quality and quantity by using Monte Carlo analysis. Mathematics and Computers in Simulation 65:231 – 243.
- Potter, N. N., and Hotchkiss, J. H. (1999). Ciencia de los Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Powell, M. R, Tamplin, M., Marks, B., Campos, D. T. (2006). Bayesian synthesis of a pathogen growth model: *Listeria monocytogenes* under competition. International Journal of Food Microbiology 109:34 – 46.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (1999). Microbiología 4ª Edición., McGraw-Hill. Interamericana. 114 – 136.
- Presser, K. A., Ratkowsky D. A. and Ross, T. (1997). Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH, lactic acid concentration. Applied and Environmental Microbiology 63:2355-2360.
- Presser, K. A; Ross, T. and Ratkowsky (1998). Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, ph, lactic acid concentration and water activity. Applied and Environmental Microbiology 64:1773 – 1779.
- Radford, S. A., and Board, R. G (1995). The influence of sodium chloride and pH on the growth of *Salmonella enteritidis* PT 4. Letters in Applied Microbiology 20: 11 – 13.
- Raevuori, M. and Genigeorgis, C. (1975). Effect of pH and NaCl on the growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. Appl. Microbiol. 29:68 – 73.
- Rasch, M. (2004). Experimental design and data collection. In: R. C. McKellar and X. Lu (Ed.). Modelling microbial responses in food. CRC Series in Contemporary Food Science. CRC Press. 1 – 14.
- Ratkowsky, D. A., Ross, T., McMeekin, T. A., and Olley, J. (1991). Comparison of Arrhenius-type and Belehradek-type models for prediction of bacterial growth in foods. Journal of Applied Bacteriology 71:452 – 459.

- Ratkowsky, D. A., Ross, T., Macario, N., Dommett, T. W., and Kamperman, L. (1996). Choosing probability distributions for modelling generation time variability. *Journal of Applied Bacteriology* 80:131 – 137.
- Rattanasomboon, N., Bellara, S. R., Harding, C. L., Fryer, P. J., Thomas, C. R., Al-Rubeai, M., and McFarlane, C. M. (1999). Growth and enumeration of the meat spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology* 51:145
- Reida, P., Wolff, H., Pohls, H. W., Kuhlmann, W., Lehmacher, A., Aleksic, S., Karch, H., and Bockemuhl, J. (1994). An outbreak due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care center characterised by person-person transmission and environmental contamination. *Zentralblatt für Bakteriologie* 281:534–543.
- Roberts, D. (1982). Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970-1979. *Journal of Hygiene (Cambridge)* 89:491 – 498.
- Roberts, T. A., Gibson, A. M. and Robinson, A. (1981). Prediction of toxin production by *Clostridium botulinum* in pasteurised pork slurry. *Journal of Food Technology* 16:337 – 355.
- Robinson, T. P., Ocio, M. J., Kaloti, A., Mackey, B. M. (1998). The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 44:83 – 92.
- Rocourt, J., 1988. The recognition and identification of *Listeria* species by classical methods. *Turkish Journal of Infection* 2(4):471 – 485.
- Rocourt, J., and Brosch, R. 1992. *Human Listeriosis – 1990*. WHO/HPP/FOS/92.3. World Health Organization, Geneva.
- Rocourt, J., Wehmayer, U. and Stackebrandt, E. (1987). ‘Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov. as *Jonesia denitrificans* comb. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:266 – 270.
- Rocourt, J., and Cossart, P. In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., and Montville, T. J. (1997). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. ASM Press. 337 – 352.
- Rocourt, J., and Cossart, P. En: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., and Montville, T. J. (2000). *Microbiologia de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras*. Editorial Acribia, S. A..
- Rodriguez, E. F. (1992). El problema de la listeriosis. En: *Listeria en alimentos*. Conferencia Consenso. Ministerio de Sanidad y Consumo. España. 23 – 27.
- Rorvik, L.M., 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *International Journal of Food Microbiology* 62:183 – 190.
- Rosa, M. P. de la; Medina, L. M., and Jordano, R. (1998). Modern as opposed to traditional methods for microbiological analysis of foods. *Alimentación Equipos y Tecnología*, 16(7):107 – 113.

- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81:501 – 508.
- Ross, T. and McMeekin, T. A. (1994). Predictive microbiology – a review. *International Journal of Food Microbiology* 23:241 – 264.
- Ross, T. and McMeekin, T. A. (1997). Predictive microbiology and HACCP. In: Pearson, A. M., Duston, T. R. (Eds), *HACCP in Meat, Poultry and Fish Processing Advances in Meat Research*, 10. Blackie Academic and Professional, London, pp. 330 – 354.
- Ross, T., Ratkowsky, D. A., Mellefont, L. A. and McMeekin, T. A. (2003). Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 82:33 – 43.
- Sabanadesan, S., Lammerding, A. M., and Griffiths, M. W. 2000. Survival of *Listeria innocua* in salmon following cold-smoked application. *Journal of Food Protection* 63:715 – 720.
- Sall, J. P. (1990). Leverage plots for general linear hypothesis, *American Statistician* 44:303-315).
- Salmon, D. E. and Smith, T. (1885). 'Report on swine plague, 2nd Annual Report' Washington DC: US Department of Agriculture, Bureau of Animal Industries: 184-246.
- Salter, M. A., Ross, T., and McMeekin, T. A (1998). Applicability of a model for non-pathogenic *Escherichia coli* for predicting the growth of pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 85:357 – 364.
- Sarkiewicz, B. F. and col. (1975). Bacteriological Survey of Raw Beef Patties Produced at Establishments under Federal Inspection. *Applied Microbiology* 29:331–334. En: BANWART, J. G. (1982). *Microbiología Básica de los Alimentos*. Ediciones Bellaterra, S.A., Barcelona, España.
- Scanlan, Ch. M. (1991). *Introducción a la Bacteriología Veterinaria*. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Scheider, M. (1990). The occurrence of *Listeria* in slaughter-houses and sausage producing plants. Proc. 36th International Congress of Meat Science and Technology, Cuba. Vol II:518 – 522.
- Schuchat, A. Swaminathan, B., and Broome, C. V. (1991). 'Epidemiology of human listeriosis', *Clinical Microbiology Reviews* 4:169 – 183.
- Seeliger, H. P. R. and Jones, D. (1986). En Sneath P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. P. (ed.) *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. 8th ed. II. Ed.: Baltimore Williams and Wilkins. 1235 – 1245.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:522 – 525.

- Skinner, G. E., Larkin, J. W., and Rhodehamel, E. J. (1994). Mathematical modelling of microbial growth: a review. *Journal of Food Safety* 14, 175 – 217.
- Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E. and Slonczewski, J. L. (1994) Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpo S* and growth in acid. *Journal of Bacteriology* 176:1729 – 1737.
- Smith, L. T. (1996). Role of osmolytes in adaptation of osmotically stressed and chill-stressed *Listeria monocytogenes* grown in liquid media and on processed meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3088 – 3093.
- Smith, M. G. (1985). The generation time, lag time and minimum temperature growth of coliform organism on meat, and the implications for codes of practice in abattoirs. *Journal of Hygiene (Cambridge)*. 94: 289 – 300.
- Smith, J. L., and Palumbo, S. A. (1978) Injury to *Staphylococcus aureus* during sausages fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 36:857 – 860.
- Smith, J. L., Palumbo, S. A. and Walls, I. (1993) 'Relationships between foodborne bacterial pathogens and reactive arthritides'. *Journal of Food Safety* 13:209 – 236.
- Soler Crespo, P., Cano Portero, R., Usera Gonzalez, M. A., and de Mateo Ontañón, S. (1998). Especificidad de los sistemas de vigilancia de la salud pública: Diagnóstico de *Escherichia coli* verotoxigénico en España. *Boletín Epidemiológico Semanal* 6:37 – 48.
- Sørensen, B. B., and Jakobsen, M. (1997). Viability staining and flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods* 28:35 – 43.
- Spencer, R. and Baines, C. R. (1964). The effect of temperature on the spoilage of wet fish: I. Storage at constant temperature between – 1°C and 25 °C. *Food Technology Champaign* 18: 769 – 772.
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. and Painter, P. R. (1989). *Microbiología* 2 Ed. Ed. Reverté. pp. 195 – 209.
- Steele, B. T., Murphy, N., Arbus, G. S. and Rance, C. P (1982). An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. *J. Pediatr.* 101:963 – 965.
- Sutherland, J. P., Bayliss, A. J. y Roberts, T. A. (1994). Predictive modeling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH, and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology* 21: 217 – 236.
- Sutherland, J. P., Bayliss, A. J. and Braxton, D. S. (1995). Predictive modeling of growth of *Escherichia coli* O157:7: the effects of temperature, pH, and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology* 25:29 – 49.

- Swaminathan, B., Hayes, P. S., and Przybyszewski, A. (1988). Evaluation of enrichment and plating media for isolating *Listeria monocytogenes*. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 71:664 – 668.
- Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H., and Van Impe, J. F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:137 – 159.
- Thieringer, H. A., Jones, P. G. and Inouye, M. (1998). Cold shock and adaptation. *Bioassays* 20:49 – 57.
- Thomas, L. V., Wimpenny, J. W. T., and Peters, A. C. (1992). Testing multiple variables on the growth of a mixed inoculum of *Salmonella* strains using gradient plates. *International Journal of Food Microbiology* 15:165 – 175.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A., and Ross, T. (2000). Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, NaCl, pH, and lactic. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4979 – 4987.
- Toca, M. R. F. (1998). Identificación de riesgos e incidencia de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. Durante la producción de carne de pollo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona – Facultad de Veterinaria.
- Theys, T. E., Geeraerd, A. H., Devlieghere, F., Moldenaers, P., Wilson, D.R., Brocklehurst, T. F., Van Impe, J. F. (2007). Effect of pH, water activity and gel micro-structure on the growth kinetics of *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the Twelfth Conference on Food Microbiology*. 21– 22 June University of Liege. Belgium.
- Tsai, Y. and Ingham S. C. (1997). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. In acidic condiments. *Journal of Food Protection* 60:751 – 755.
- Valero, A., Hervás, C., García-Gimeno, and Zurera, G. (2007). Product unit neural network models for predicting the growth limits of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 24:452 – 464.
- Van Gerwen, S. J. C., and Zwietering, M. H. (1998). Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessment. *Journal of Food Protection* 61:1541 – 1549.
- Vialette, M. C., Pinon, A., Chasseignaux, E., and Lange, M. (2003). Growth kinetics comparison of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment. *International Journal of Food Microbiology* 82:121 – 131.
- Vives-Rego, J., Lebaron, P., and Nebe-von Caron, G. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiological Reviews* 24:429
- Walberg, M., Gaustad, P., and Steen, H. B. (1997). Rapid assessment of ceftazidime, ciprofloxacin, and gentamicin susceptibility in exponential-

- growing *Escherichia coli* cells by means of flow cytometry. *Cytometry* 27:169.
- Walls, I., and Scott, V. N. (1997). Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 36:97 – 102.
- Walker, S. J, Archer, P., and Banks, J.G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 68:157 – 162.
- Walker, S. J. and Jones, J. E. (1993). Protocols for data generation for predictive modelling. *Journal of Industrial Microbiology* 12:273 – 276.
- Waters, J. R., Sharp, J. C. M, and Dev., V. J. (1994). Infection caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Alberta, Canada, and in Scotland: a five-year review, 1987 –1991. *Clinical Infectious Diseases* 19:834 – 843.
- Weagant, S. D., Bryant, J. L., and Bark, D. H. (1994). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *Journal of Food Protection* 57:629 – 631.
- Whiting, R. C. (1995). Microbial modelling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35:467 – 494.
- Whiting, R. C. and Buchanan, R. L. (1993). A classification of models in predictive microbiology – a replay to K. R. Davey. *Food Microbiology* 10:175 – 177.
- Whiting, R. C. and Buchanan, R. L. (2001). Predictive microbiology and risk assessment. In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., and Montville, T. J. (1997). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology Press. Washington, D. C., 813 – 831.
- Whiting, R. C. and Bagi, L. K. (2002). Modelling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 73:291 – 295.
- Whiting, R. C. and Golden, M. H. (2002). Variation among *Escherichia coli* O157:H7 strains relative to their growth, survival, thermal inactivation, and toxin production in broth. *International Journal of Food Microbiology* 75:127 - 133.
- WHO – World Health Organization. (1988). *Food Listeriosis – Report of the WHO Informal Working Group*. WHO/EHE/FOS/88.5 World Health Organization, Geneva.
- Wouters, J. A., Rombouts, F. M., Kuipers, O. P., De Vos, W. M., and Abee, T. (2000). The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 23:165 – 173.
- Wu, Y. Griffiths, M. W., and McKellar, R. C. (2000). A comparison of the bioscreen method and microscopy for the determination of lag times of individual cells of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 30:468.

- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., and Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217:1214 – 1222.
- Zaika, L. L., Phillips, J. G., Fanelli, J. S., Scullen, O. J. (1998). Revised model for aerobic growth of *Shigella flexneri* to extend validity of predictions at temperatures between 10 and 19. *International Journal of Food Microbiology* 4:9 – 19.
- Zhao, T. and Doyle, M. P. (1994). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in commercial mayonnaise. *Journal of Food Protection* 57:780 – 783.
- Zhao, T., Doyle, M. P. and Wang, G. (1994). Emerging pathogens and rapid detection methods: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, p. 386 – 403. In *Proceedings of the 2nd Asian Conference of Food Safety*. International life Sciences Institute, Washington, D. C.
- Zhao, L., Montville, T. J. and Schaffner, D. W. (2002). Time-to-detection, percent-growth-positive and maximum growth rate models for *Clostridium botulinum* 56A at multiple temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 77:187 – 197.
- Zuccarelli, A. J., Roy, I., Harding, G. P. and Couperus, J. J. (1990) ‘Density and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin resistant ‘*Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 28:97 – 102.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., and Van’t Reit, K. (1990). Modeling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1875 – 1881.
- Zwietering, M. H., de Koos, J. T., Hasenack, B. E., de Wit, J. C., and Van’t Reit, K. (1991). Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 57:1094 – 1101.
- Zwietering, M. H., de Wit, J. C., Cuppers, H. G. A. M., and Van’t Reit, K. (1994). Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 60:204 – 213.
- Zwietering, M. H., de Wit, J. C., and Notermans, S. (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption temperature. *International Journal of Food Microbiology* 30:55 – 70.

VIII – ANEXOS

ANEXO I. – Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas de *Escherichia coli* patógena y no patógena

I.1 – Análisis estadístico del efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos de las cepas *E. coli* O157:H7 y CECT 516 (patógena y no patógena, respectivamente)

Temp. (°C)	Velocidad de crecimiento (μ)		Tiempo de Generación (GT)		Tiempo de Latencia (LT)	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
22	9.42	0.0045	0.90	0.3509	8.31	0.0072
26	8.55	0.0065	0.88	0.3568	5.95	0.0208
30	1.47	0.2348	0.19	0.6640	0.66	0.4244
34	0.64	0.4292	0.17	0.6826	0.47	0.4972
38	1.45	0.2374	0.18	0.6746	0.83	0.3686
42	1.43	0.2404	0.57	0.4559	1.04	0.3168

I.2 – Análisis estadístico del efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de las cepas *E. coli* O157:H7 y CECT 516 (patógena y no patógena, respectivamente)

pH	Velocidad de crecimiento (μ)		Tiempo de Generación (GT)		Tiempo de Latencia (LT)	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
4,5	8.58	0.0053	9.47	0.0035	9.27	0.0038
5,5	4.42	0.0409	2.88	0.0965	8.09	0.0066
6,5	6.83	0.0121	9.76	0.0031	5.76	0.0205
7,4	17.06	0.0002	2.51	0.1199	12.94	0.0008

I.3 – Análisis estadístico del % NaCl sobre los parámetros cinéticos de las cepas *E. coli* O157:H7 y CECT 516 (patógena y no patógena, respectivamente)

% NaCl	Velocidad de crecimiento (μ)		Tiempo de Generación (GT)		Tiempo de Latencia (LT)	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
2,5	5.52	0.0232	4.34	0.0428	4.05	0.0500
3,5	4.18	0.0466	0.52	0.4729	1.82	0.1838
4,5	2.82	0.0996	0.12	0.7302	1.92	0.1722
5,5	5.12	0.0284	0.14	0.7095	6.63	0.0133

ANEXO II. – Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas patógenas Gram negativas

II.1 – Análisis estadístico del efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos de los microorganismos Gram negativos (*E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium*)

Temp. (°C)	Velocidad de crecimiento (μ)		Tiempo de Generación (GT)		Tiempo de Latencia (LT)	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
22	3.59	0.0678	2.16	0.1518	0.89	0.3534
26	1.40	0.2466	2.01	0.1661	0.64	0.4305
30	0.83	0.3701	2.04	0.1638	0.38	0.5444
34	0.04	0.8435	1.96	0.1715	0.55	0.4658
38	0.22	0.6403	2.02	0.1651	0.48	0.4953
42	0.70	0.4085	1.32	0.2596	0.08	0.7843

II.2 – Análisis estadístico del efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de los microorganismos Gram negativos (*E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium*)

pH	Velocidad de crecimiento (μ)		Tiempo de Generación (GT)		Tiempo de Latencia (LT)	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
4,5	40.34	<.0001	45.97	<.0001	27.44	<.0001
5,5	0.19	0.6627	0.47	0.4950	0.28	0.5967
6,5	0.14	0.7069	0.28	0.5995	0.43	0.5157
7,4	6.91	0.0116	2.35	0.1322	0.54	0.4655

II.3 – Análisis estadístico del efecto del % de NaCl sobre los parámetros cinéticos de los microorganismos Gram negativos (*E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium*)

% NaCl	Velocidad de crecimiento (μ)		Tiempo de Generación (GT)		Tiempo de Latencia (LT)	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
2,5	2.72	0.1058	7.24	0.0099	3.72	0.0598
3,5	1.20	0.2794	4.18	0.0466	2.33	0.1339
4,5	0.85	0.3620	5.46	0.0239	0.48	0.4927
5,5	0.24	0.6282	0.11	0.7469	0.60	0.4436

ANEXO III. – Comparación de los parámetros cinéticos de las cepas patógenas Gram positivas

III.1 – Análisis estadístico del efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos de los microorganismos Gram positivos (*L. monocytogenes* y *S. aureus*)

Temp. (°C)	Velocidad de crecimiento (μ)		Tiempo de Generación (GT)		Tiempo de Latencia (LT)	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
22	33.44	<.0001	9.53	0.0043	0.34	0.5661
26	35.83	<.0001	10.68	0.0027	0.00	0.9538
30	33.91	<.0001	5.51	0.0257	0.33	0.5705
34	29.87	<.0001	6.35	0.0173	1.38	0.2500
38	23.29	<.0001	3.59	0.0677	0.31	0.5843
42	20.51	<.0001	3.06	0.0902	0.01	0.9191

III.2 – Análisis estadístico del efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de los microorganismos Gram positivos (*L. monocytogenes* y *S. aureus*)

pH	Velocidad de crecimiento (μ)		Tiempo de Generación (GT)		Tiempo de Latencia (LT)	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
4,5	32.41	<.0001	20.39	<.0001	10.71	0.0020
5,5	214.16	<.0001	46.62	<.0001	4.32	0.0433
6,5	99.58	<.0001	76.27	<.0001	25.78	<.0001
7,4	105.42	<.0001	85.78	<.0001	37.02	<.0001

III.3 – Análisis estadístico del efecto del % de NaCl sobre los parámetros cinéticos de los microorganismos Gram positivos (*L. monocytogenes* y *S. aureus*)

% NaCl	Velocidad de crecimiento (μ)		Tiempo de Generación (GT)		Tiempo de Latencia (LT)	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
2,5	59.39	<.0001	11.42	0.0015	5.45	0.0240
3,5	60.34	<.0001	13.44	0.0006	0.75	0.3904
4,5	86.70	<.0001	13.17	0.0007	0.71	0.4051
5,5	45.64	<.0001	5.72	0.0210	1.06	0.3090

ANEXO IV. – Análisis de los parámetros cinéticos de cada cepa estudiada entre las diferentes condiciones de temperatura, pH y cloruro sódico

IV.1 – Análisis estadístico del efecto de la temperatura, pH y % de NaCl sobre la velocidad de crecimiento (μ) de los diferentes microorganismos

Microorganismo	Temperatura		pH		% NaCl	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
<i>Escherichia coli</i> CECT 516	0,59	0,7075	53,89	<.0001	7,95	<.0001
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	1,58	0,1741	36,91	<.0001	5,73	0,0012
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,61	0,6962	34,15	<.0001	13,93	<.0001
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,60	0,6964	38,35	<.0001	11,09	<.0001
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,54	0,7437	20,63	<.0001	12,18	<.0001

IV.2 – Análisis estadístico del efecto de la temperatura, pH y % de NaCl sobre el tiempo de generación (GT) de los diferentes microorganismos

Microorganismo	Temperatura		pH		% NaCl	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
<i>Escherichia coli</i> CECT 516	0,23	0,9478	58,67	<.0001	1,66	0,1815
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0,2	0,9629	285,52	<.0001	0,1	0,9624
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,51	0,7708	14,16	<.0001	4,59	0,0049
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,47	0,8001	14,28	<.0001	3,74	0,0138
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,38	0,8607	78,79	<.0001	3,35	<.0001

IV.3 – Análisis estadístico del efecto de la temperatura, pH y % de NaCl sobre el tiempo de latencia (LT) de los diferentes microorganismos

Microorganismo	Temperatura		pH		% NaCl	
	F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
<i>Escherichia coli</i> CECT 516	0,23	0,9465	73,46	<.0001	4,52	0,0053
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0,68	0,6362	62,37	<.0001	4,42	0,0060
<i>Salmonella typhimurium</i>	1,13	0,3503	12,66	<.0001	36,22	<.0001
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,96	0,4451	16,80	<.0001	28,92	<.0001
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,44	0,8202	40,15	<.0001	0,49	0,6898

IX – ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Clasificación de microorganismos en función de la temperatura óptima.....	37
Figura 2. Diagrama del sistema óptico utilizado.....	114
Figura 3. Velocidades de crecimiento máximas de <i>Escherichia coli</i> CECT 516.....	118
Figura 4. Tiempos de generación mínimos de <i>Escherichia coli</i> CECT 516.....	118
Figura 5. Tiempos de latencia mínimos de <i>Escherichia coli</i> CECT 516.....	119
Figura 6. – Modelo completo de $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	123
Figura 7. – Residuales por Predichos de $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	123
Figura 8. – Influencia de Temperatura sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	123
Figura 9. – Influencia de pH sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	123
Figura 10. – Influencia de NaCl sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	124
Figura 11. – Influencia de pH x Temp sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	124
Figura 12. – Influencia de NaCl x Temp sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	124
Figura 13. – Influencia de pH ² sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	124
Figura 14. – Perfiles de predicción de $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	126
Figura 15. – Perfiles de interacciones de $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	126
Figura 16. Perfiles de superficie respuesta de predicción de $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	127
Figura 17. – Modelo completo de \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	128
Figura 18. – Residuales por Predichos de \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	128
Figura 19. – Influencia de Temperatura sobre \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	128
Figura 20. – Influencia de pH sobre \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	128
Figura 21. – Influencia de NaCl sobre \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	129
Figura 22. – Influencia de pH x Temp sobre \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	129
Figura 23. – Influencia de pH ² sobre \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	129
Figura 24. – Perfiles de predicción de \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	130
Figura 25. – Perfiles de interacciones de \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	130
Figura 26. – Perfiles de superficie respuesta de predicción de \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	131
Figura 27. – Modelo completo de \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	132
Figura 28. – Residuales por Predichos de \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	132

Figura 29. – Influencia de Temperatura sobre \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	132
Figura 30. – Influencia de pH sobre \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	132
Figura 31. – Influencia de NaCl sobre \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	132
Figura 32. – Influencia de pH x Temp sobre $la\sqrt{LT}$ de <i>E. coli</i> CECT 516.....	132
Figura 33. – Influencia de pH ² sobre \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	133
Figura 34. – Perfiles de predicción de \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	133
Figura 35. – Perfiles de interacciones de \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	134
Figura 36. – Perfiles de superficie respuesta de predicción de \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> CECT 516.....	134
Figura 37. Velocidades de crecimiento máximas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7. ...	139
Figura 38. Tiempos de generación mínimos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.	139
Figura 39. Tiempos de latencia mínimos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.	140
Figura 40. – Modelo Completo de $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> O157:H7.....	144
Figura 41. – Residuales por Predichos de $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> O157:H7.....	144
Figura 42. – Influencia de la Temperatura sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> O157:H7.....	144
Figura 43. – Influencia de pH sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> O157:H7	144
Figura 44. – Influencia de NaCl sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> O157:H7.....	145
Figura 45. – Influencia de pH x Temp sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> O157:H7.....	145
Figura 46. – Influencia de NaCl x Temp sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> O157:H7.....	145
Figura 47. – Influencia de NaCl x pH sobre $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> O157:H7.....	145
Figura 48. – Perfiles de predicción de $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> O157:H7.....	146
Figura 49. – Perfiles de interacciones de $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> O157:H7.....	147
Figura 50. – Perfiles de superficie respuesta de predicción de $\sqrt{\mu}$ de <i>E. coli</i> O157:H7.....	147
Figura 51. – Modelo Completo de \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	148
Figura 52. – Residuales por Predichos de \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	148
Figura 53. – Influencia de la Temperatura sobre \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	149
Figura 54. – Influencia de pH sobre \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	149
Figura 55. – Influencia de NaCl sobre \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	149
Figura 56. – Influencia de pH x Temp sobre \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	149
Figura 57. – Influencia de Temp ² sobre \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	150
Figura 58. – Influencia de NaCl ² sobre \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	150
Figura 59. – Perfiles de predicción de \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> O157:H7	150
Figura 60. – Perfiles de interacciones de \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	151

Figura 61. – Perfiles de superficie respuesta de predicción de \sqrt{GT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	151
Figura 62. – Modelo completo de \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	152
Figura 63. – Residuales por Predichos de \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	152
Figura 64. – Influencia de Temperatura sobre \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	153
Figura 65. – Influencia de pH sobre \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	153
Figura 66. – Influencia de NaCl sobre \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	153
Figura 67. – Influencia de NaCl x Temp sobre \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	153
Figura 68. – Influencia de Temp ² sobre \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	154
Figura 69. – Influencia de pH ² sobre \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	154
Figura 70. – Perfiles de predicción de \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> O157:H7	154
Figura 71. – Perfiles de interacciones de \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	155
Figura 72. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción de \sqrt{LT} de <i>E. coli</i> O157:H7.....	155
Figura 73. Velocidades de crecimiento máximas de <i>Salmonella typhimurium</i>	161
Figura 74. Tiempos de generación mínimos de <i>Salmonella typhimurium</i>	162
Figura 75. Tiempos de latencia mínimos de <i>Salmonella typhimurium</i>	162
Figura 76. – Modelo completo de μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	163
Figura 77. – Residuales por Predichos de μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	163
Figura 78. – Influencia de la Temperatura sobre μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	164
Figura 79. – Influencia del pH sobre μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	164
Figura 80. – Influencia de NaCl sobre μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	164
Figura 81. – Influencia de pH x Temp sobre μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	164
Figura 82. – Influencia de NaCl x Temp sobre μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	164
Figura 83. – Influencia de pH ² sobre μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	164
Figura 84. – Perfiles de predicción de la μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	165
Figura 85. – Perfiles de interacciones de μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	165
Figura 86. – Perfiles de superficie respuesta dpredicción de μ de <i>S. typhimurium</i> ..	166
Figura 87. – Modelo completo de LnGT de <i>Salmonella typhimurium</i>	167
Figura 88. – Residuales por Predichos de LnGT de <i>Salmonella typhimurium</i>	167
Figura 89. – Influencia de Temperatura sobre LnGT de <i>Salmonella typhimurium</i> ..	167
Figura 90. – Influencia de pH sobre LnGT de <i>Salmonella typhimurium</i>	167
Figura 91. – Influencia de NaCl sobre LnGT de <i>Salmonella typhimurium</i>	167
Figura 92. – Influencia de pH x Temp sobre LnGT de <i>Salmonella typhimurium</i> ..	167

Figura 93. – Influencia de NaCl x Temp sobre LnGT de <i>Salmonella typhimurium</i> .	168
Figura 94. – Influencia de NaCl x pH sobre LnGT de <i>Salmonella typhimurium</i>	168
Figura 95. – Influencia de pH ² sobre LnGT de <i>Salmonella typhimurium</i>	168
Figura 96. – Perfiles de predicción de LnGT de <i>Salmonella typhimurium</i>	169
Figura 97. – Perfiles de interacciones de LnGT de <i>Salmonella typhimurium</i>	169
Figura 98. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción de LnGT de <i>S. typhimurium</i>	170
Figura 99. – Modelo completo de LnLT de <i>Salmonella typhimurium</i>	171
Figura 100. – Residuales por Predichos de LnLT de <i>Salmonella typhimurium</i>	171
Figura 101. – Influencia de la Temperatura sobre LnLT de <i>S. typhimurium</i>	171
Figura 102. – Influencia del pH sobre LnLT de <i>Salmonella typhimurium</i>	171
Figura 103. – Influencia de NaCl sobre LnLT de <i>Salmonella typhimurium</i>	172
Figura 104. – Influencia de pH x Temp sobre LnLT de <i>Salmonella typhimurium</i> ..	172
Figura 105. – Influencia de NaCl x Temp sobre LnLT de <i>S. typhimurium</i>	172
Figura 106. – Influencia de NaCl x pH sobre LnLT de <i>Salmonella typhimurium</i> ...	172
Figura 107. – Influencia de Temp ² sobre LnLT de <i>Salmonella typhimurium</i>	172
Figura 108. – Influencia de pH ² sobre LnLT de <i>Salmonella typhimurium</i>	172
Figura 109. – Perfiles de predicción de LnLT de <i>Salmonella typhimurium</i>	173
Figura 110. – Perfiles de interacciones de LnLT <i>Salmonella typhimurium</i>	173
Figura 111. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción de LnLT de <i>S. typhimurium</i>	174
Figura 112. Velocidades de crecimiento máximas de <i>Listeria monocytogenes</i>	180
Figura 113. Tiempos de generación mínimos de <i>Listeria monocytogenes</i>	181
Figura 114. Tiempos de latencia mínimos de <i>Listeria monocytogenes</i>	181
Figura 115. – Modelo completo de μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	183
Figura 116. – Residuales por Predichos de μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	183
Figura 117. – Influencia de Temperatura sobre μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	183
Figura 118. – Influencia de pH sobre μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	183
Figura 119. – Influencia de NaCl sobre μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	183
Figura 120. – Influencia de pH x Temp sobre μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	183
Figura 121. – Influencia de NaCl x Temp sobre μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	184
Figura 122. – Influencia de NaCl x pH sobre μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	184
Figura 123. – Influencia de Temp ² sobre μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	184
Figura 124. – Influencia de pH ² sobre μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	184

Figura 125. – Influencia de NaCl^2 sobre μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	184
Figura 126. – Perfiles de predicción de la μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	185
Figura 127. – Perfiles de interacciones de la μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	185
Figura 128. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción de la μ de <i>L. monocytogenes</i>	186
Figura 129. – Modelo completo de LnGT de <i>Listeria monocytogenes</i>	187
Figura 130. – Residuales por Predichos de LnGT de <i>Listeria monocytogenes</i>	187
Figura 131. – Influencia de Temperatura sobre LnGT de <i>L. monocytogenes</i>	187
Figura 132. – Influencia de pH sobre LnGT de <i>Listeria monocytogenes</i>	187
Figura 133. – Influencia de NaCl sobre LnGT de <i>Listeria monocytogenes</i>	188
Figura 134. – Influencia de NaCl x pH sobre LnGT de <i>L. monocytogenes</i>	188
Figura 135. – Influencia de pH^2 sobre LnGT de <i>Listeria monocytogenes</i>	188
Figura 136. – Perfiles de predicción de LnGT de <i>Listeria monocytogenes</i>	188
Figura 137. – Perfiles de interacciones de LnGT de <i>L. monocytogenes</i>	189
Figura 138. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción de LnGT de <i>L. monocytogenes</i>	189
Figura 139. – Modelo completo de $\sqrt{\text{LT}}$ de <i>Listeria monocytogenes</i>	191
Figura 140. – Residuales por Predichos de $\sqrt{\text{LT}}$ de <i>Listeria monocytogenes</i>	191
Figura 141. – Influencia de Temperatura sobre $\sqrt{\text{LT}}$ de <i>Listeria monocytogenes</i>	191
Figura 142. – Influencia de pH sobre $\sqrt{\text{LT}}$ de <i>Listeria monocytogenes</i>	191
Figura 143. – Influencia de NaCl sobre $\sqrt{\text{LT}}$ de <i>Listeria monocytogenes</i>	191
Figura 144. – Influencia de Temp^2 sobre $\sqrt{\text{LT}}$ de <i>Listeria monocytogenes</i>	191
Figura 145. – Influencia de NaCl^2 sobre $\sqrt{\text{LT}}$ de <i>Listeria monocytogenes</i>	182
Figura 146. – Influencia de pH^2 sobre $\sqrt{\text{LT}}$ de <i>Listeria monocytogenes</i>	192
Figura 147. – Perfiles de predicción de $\sqrt{\text{LT}}$ de <i>Listeria monocytogenes</i>	192
Figura 148. – Perfiles de interacciones de $\sqrt{\text{LT}}$ de <i>L. monocytogenes</i>	192
Figura 149. – Perfiles de superficie respuesta de la predicción de $\sqrt{\text{LT}}$ de <i>L. monocytogenes</i>	193
Figura 150. – Velocidades de crecimiento máximas de <i>Staphylococcus aureus</i>	199
Figura 151. – Tiempos de generación mínimos de <i>Staphylococcus aureus</i>	199
Figura 152. – Tiempos de latencia mínimos de <i>Staphylococcus aureus</i>	199
Figura 153. – Modelo completo de μ de <i>Staphylococcus aureus</i>	201
Figura 154. – Residuales por Predichos de μ <i>Staphylococcus aureus</i>	201
Figura 155. – Influencia de Temperatura sobre μ de <i>Staphylococcus aureus</i>	201

Figura 156. – Influencia de pH sobre μ de <i>Staphylococcus aureus</i>	201
Figura 157. – Influencia de NaCl sobre μ de <i>Staphylococcus aureus</i>	201
Figura 158. – Influencia de Temp ² sobre μ de <i>Staphylococcus aureus</i>	201
Figura 159. – Influencia de pH ² sobre μ de <i>Staphylococcus aureus</i>	202
Figura 160. – Perfiles de predicción de la μ de <i>Staphylococcus aureus</i>	202
Figura 161. – Perfiles de predicción de la μ de <i>Staphylococcus aureus</i>	203
Figura 162. – Perfiles de superficie respuesta de predicción de la μ de <i>S. aureus</i> ..	203
Figura 163. – Modelo completo de LnGT de <i>Staphylococcus aureus</i>	204
Figura 164. – Residuales por Predichos de LnGT de <i>Staphylococcus aureus</i>	204
Figura 165. – Influencia de la Temperatura sobre LnGT de <i>S. aureus</i>	205
Figura 166. – Influencia de pH sobre LnGT de <i>Staphylococcus aureus</i>	205
Figura 167. – Influencia de % NaCl sobre LnGT de <i>Staphylococcus aureus</i>	205
Figura 168. – Influencia de % NaCl x pH sobre LnGT de <i>Staphylococcus aureus</i>	205
Figura 169. – Influencia de pH ² sobre LnGT de <i>Staphylococcus aureus</i>	205
Figura 170. – Perfiles de predicción de LnGT de <i>Staphylococcus aureus</i>	205
Figura 171. – Perfiles de interacciones de LnGT de <i>S. aureus</i>	205
Figura 172. – Perfiles de superficie respuesta predicción de LnGT de <i>S. aureus</i>	207
Figura 173. – Modelo completo de LnLT de <i>Staphylococcus aureus</i>	208
Figura 174. – Residuales por Predichos de LnLT <i>Staphylococcus aureus</i>	207
Figura 175. – Influencia de Temperatura sobre LnGT de <i>Staphylococcus aureus</i> ...	208
Figura 176. – Influencia de pH sobre LnGT <i>Staphylococcus aureus</i>	208
Figura 177. – Influencia de pH ² sobre LnGT de <i>Staphylococcus aureus</i>	208
Figura 178. – Perfiles de predicción del LnLT de <i>Staphylococcus aureus</i>	209
Figura 179. – Perfiles superficie respuesta de predicción del LnGT de <i>S. aureus</i> ...	209

TABLAS

Tabla 1. – pH de algunos alimentos enlatados comerciales.	42
Tabla 2. – Características antigénicas de <i>Escherichia coli</i>	46
Tabla 3. – Condiciones límites para el crecimiento de <i>Salmonella</i>	68
Tabla 4. – Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en España de 1993-2003.....	74
Tabla 5. – Diferencias entre <i>Listeria monocytogenes</i> y otras <i>Listeria</i> spp.	78
Tabla 6. Formas clinicopatológicas de Listeriosis.	82

Tabla 7. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> CECT 516 a 22 °C.....	119
Tabla 8. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> CECT 516 a 26 °C.....	120
Tabla 9. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> CECT 516 a 30 °C.....	120
Tabla 10. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> CECT 516 a 34 °C.....	121
Tabla 11. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> CECT 516 a 38 °C.....	121
Tabla 12. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> CECT 516 a 42 °C.....	122
Tabla 13. – Modelos para cálculo de la μ de <i>E. coli</i> CECT 516	123
Tabla 14. – Modelos para cálculo del GT de <i>E. coli</i> CECT 516.....	127
Tabla 15. – Modelos para cálculo del LT de <i>E. coli</i> CECT 516.....	131
Tabla 16. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> O157:H7 a 22 °C.....	140
Tabla 17. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> O157:H7 a 26 °C.....	141
Tabla 18. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> O157:H7 a 30 °C.....	141
Tabla 19. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> O157:H7 a 34 °C.....	142
Tabla 20. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> O157:H7 a 38 °C.....	142
Tabla 21. – Parámetros cinéticos de <i>E. coli</i> O157:H7 a 42 °C.....	143
Tabla 22. – Modelos para cálculo de la μ de <i>E. coli</i> O157:H7	143
Tabla 23. – Modelos para cálculo del GT de <i>E. coli</i> O157:H7	148
Tabla 24. – Modelos para cálculo del LT de <i>E. coli</i> O157:H7.....	152
Tabla 25. – Parámetros cinéticos de <i>Salmonella typhimurium</i> a 22 °C.....	158
Tabla 26. – Parámetros cinéticos de <i>Salmonella typhimurium</i> a 26 °C.....	159
Tabla 27. – Parámetros cinéticos de <i>Salmonella typhimurium</i> a 30 °C.....	159
Tabla 28. – Parámetros cinéticos de <i>Salmonella typhimurium</i> a 34 °C.....	160
Tabla 29. – Parámetros cinéticos de <i>Salmonella typhimurium</i> a 38 °C.....	160
Tabla 30. – Parámetros cinéticos de <i>Salmonella typhimurium</i> a 42 °C.....	161
Tabla 31. – Modelos para cálculo de la μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	163
Tabla 32. – Modelos para cálculo del GT de <i>Salmonella typhimurium</i>	166
Tabla 33. – Modelos para cálculo de la μ de <i>Salmonella typhimurium</i>	170
Tabla 34. – Parámetros cinéticos de <i>L. monocytogenes</i> a 22 °C.....	177
Tabla 35. – Parámetros cinéticos de <i>L. monocytogenes</i> a 26 °C.....	178
Tabla 36. – Parámetros cinéticos de <i>L. monocytogenes</i> a 30 °C.....	178
Tabla 37. – Parámetros cinéticos de <i>L. monocytogenes</i> a 34 °C.....	179
Tabla 38. – Parámetros cinéticos de <i>L. monocytogenes</i> a 38 °C.....	179
Tabla 39. – Parámetros cinéticos de <i>L. monocytogenes</i> a 42 °C.....	180
Tabla 40. – Modelos para cálculo de la μ de <i>Listeria monocytogenes</i>	182

Tabla 41. – Modelos para cálculo de la GT de <i>Listeria monocytogenes</i>	186
Tabla 42. – Modelos para cálculo de LT de <i>Listeria monocytogenes</i>	190
Tabla 43. – Parámetros cinéticos de <i>Staphylococcus aureus</i> a 22 °C.....	196
Tabla 44. – Parámetros cinéticos de <i>Staphylococcus aureus</i> a 26 °C.....	196
Tabla 45. – Parámetros cinéticos de <i>Staphylococcus aureus</i> a 30 °C.....	197
Tabla 46. – Parámetros cinéticos de <i>Staphylococcus aureus</i> a 34 °C.....	197
Tabla 47. – Parámetros cinéticos de <i>Staphylococcus aureus</i> a 38 °C.....	198
Tabla 48. – Parámetros cinéticos de <i>Staphylococcus aureus</i> a 42 °C.....	198
Tabla 49. – Modelos para cálculo de la μ <i>Staphylococcus aureus</i>	200
Tabla 50. – Modelos para cálculo de la GT de <i>Staphylococcus aureus</i>	204
Tabla 51. – Modelos para cálculo de la LT de <i>Staphylococcus aureus</i>	207