

# Variabilidad microbiana y vida útil de los alimentos I. Inactivación microbiana

GARCÍA DE FERNANDO, GONZALO<sup>1</sup>, AGUIRRE, JUAN<sup>2</sup> Y VELASCO, RAQUEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria (UCM).

<sup>2</sup> Departamento de Agroindustria y Enología. Universidad de Chile, Chile.

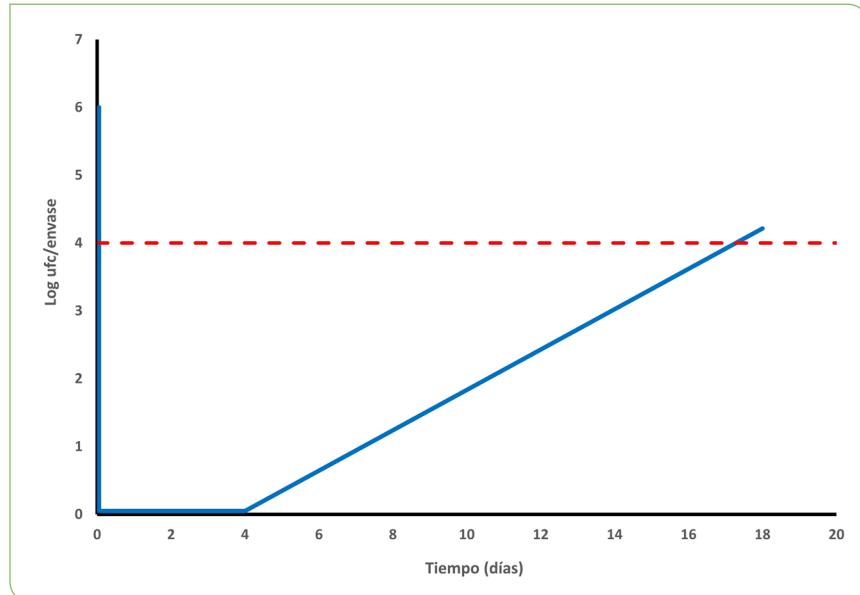
✉ mingui@ucm.es

La estimación de la vida útil de un alimento es ardua tarea. Deben considerarse muchos factores basados en los tres pilares de cualquier producto: valor nutritivo, seguridad alimentaria y atributos sensoriales. La fecha de consumo preferente o de caducidad debe establecerse dejando un margen de seguridad, de tal manera que el valor nutritivo se corresponda con el etiquetado del producto, se garantice la seguridad alimentaria y los atributos sensoriales no hayan sufrido un menoscabo que pueda provocar el rechazo por parte del consumidor o, quizás, solo cierta decepción.

En las siguientes líneas no va a abordarse en toda su extensión el establecimiento de la vida útil, solo vamos a considerar una de las facetas, en concreto, la carga microbiana que el productor considere admisible, bien por motivos de seguridad u organolépticos. Para ello, se ha diseñado un ejemplo en el que se contempla un tratamiento microbicida que reduce la carga microbiana y el posible desarrollo de los microorganismos que se mantienen viables tras dicho tratamiento.

Una industria fabrica un lote de 1 millón de envases de producto con una contaminación inicial de  $10^6$  ufc/ envase. Se aplica un tratamiento que consigue 6 reducciones decimales (6D). A continuación, el producto se almacena a una temperatura que, tras 4 días en fase de latencia, permite el desarrollo microbiano a razón de una generación cada 24 horas. ¿Qué vida útil puede darse a ese alimento si se considera que la carga microbiana no debe superar  $10^4$  ufc/ envase? La figura 1 ilustra esta pregunta.

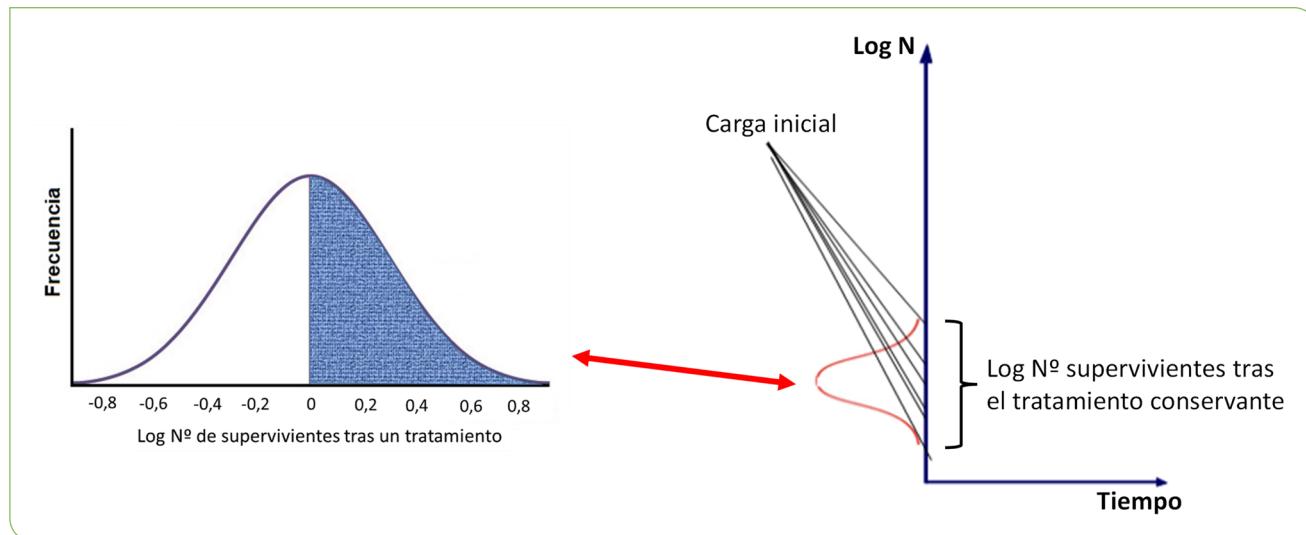
De acuerdo con la microbiología convencional, en las condiciones especificadas, la vida útil sería de 17 días; 4 para concluir



**Figura 1.** Evolución de la concentración microbiana de un envase con una carga inicial de  $10^6$  ufc/ envase y que, después de aplicar un tratamiento 6D, se almacena en condiciones que permiten la proliferación del microorganismo tras 4 días de fase de latencia con un tiempo de duplicación (valor g) de 24 horas.

la fase de latencia más 13 de multiplicación a razón de una generación por día, ya que 1 bacteria en un envase necesitaría 14 generaciones, o sea, 2 semanas, para alcanzar una tasa por encima de  $10^4$  ufc/ envase, es decir,  $2^{14}$ , que es igual a 16 384 ufc/ envase. Esto sería cierto y útil si asumimos que, en cada uno de los envases del lote, ha sobrevivido y se mantiene viable un único microorganismo y que, además, todos los supervivientes de los distintos envases tienen la misma fase de latencia. ¿Cree el lector posible que, en un lote de 1 000 000 envases, con una carga inicial de  $10^6$  ufc/ envase, tras aplicar un tratamiento 6D, en cada uno haya sobrevivido una bacteria? ¡Ojalá! La experiencia

nos echa por tierra ese deseo. En realidad, la inactivación microbiana se asume y puede modelarse de acuerdo a una curva de Gauss (Aguirre y col., 2012), caracterizada por su simetría, con un máximo coincidente con la media de la distribución de los datos y una anchura y altura dependientes de la desviación estándar (SD), o sea, de la mayor o menor variabilidad de los datos. Así, cuando sobreviven microorganismos tras un tratamiento conservante, se espera que el número de supervivientes por envase siga una distribución normal de frecuencias, similar a la que se muestra en la figura 2. En suma, lo esperado, de acuerdo con la distribución normal, es que en un millón de envases se mantengan via-



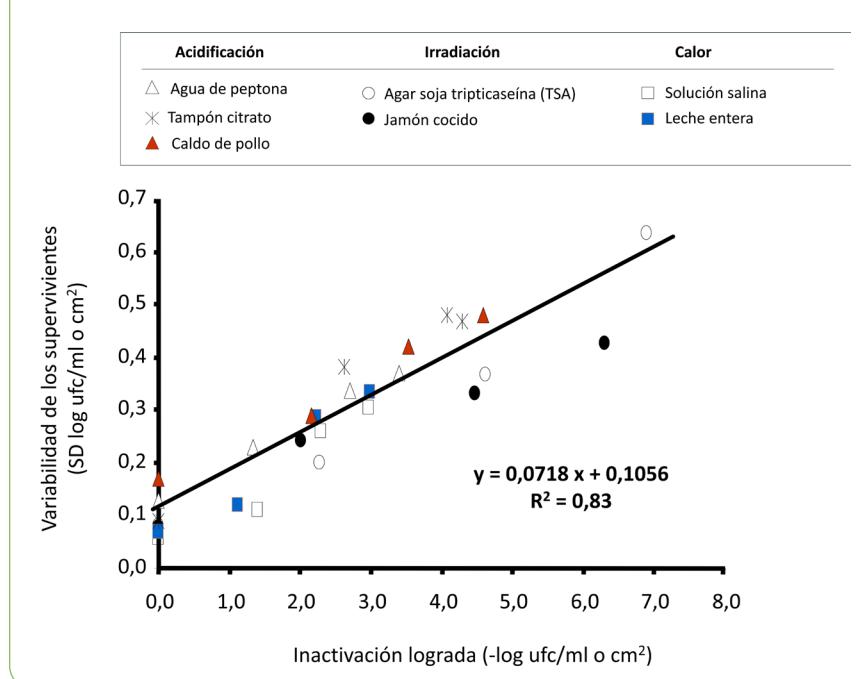
**Figura 2.** Distribución normal de frecuencias del número de supervivientes ( $\log N$ ) tras un tratamiento conservante. En el caso que nos ocupa, dada la simetría de esta distribución, y como la media es que se mantenga viable 1 microorganismo por envase, lo esperable es que la mitad del lote sea estéril, mientras que la otra mitad, contendrá viables (zona sombreada).

bles un millón de microorganismos, pero aproximadamente la mitad de los envases quedarán estériles y en los otros 500 000 habrá uno o más viables.

Por otra parte, Aguirre y col. (2009) demostraron que cuanto más intenso es el tratamiento inactivante, en este caso térmico, menos bacterias se mantienen viables, pero habrá una cantidad de envases con  $n$  viables, otros con  $n+1$ , otros con  $n+2$  viables, etc., denotando una variabilidad en el número de viables por envase. Estos hallazgos se han demostrado no solo con tratamientos térmicos, sino también con irradiación y acidificación y en diferentes sustratos, como se muestra en la figura 3 (Aguirre y col., 2011).

Esto viene a significar que cuanto más intenso es el tratamiento conservante, mayor grado de inactivación, y la distribución de frecuencias del número de supervivientes para cada tratamiento va ensanchándose y las cifras extremas estarán más alejadas.

Entonces, llegados a este punto, ¿mantenemos la vida útil en 17 días o, asumiendo que habrá envases en el lote con más de 1 viable, la reconsideramos? Además, la predicción de que exactamente la mitad de los envases sean estériles y la otra mitad no, es demasiado simplista. Las matemáticas nos permiten dar un paso más allá y predecir cuál es el escenario más probable mediante la distribución de



**Figura 3.** Efecto de la inactivación mediante irradiación, tratamientos térmicos y acidificación en diferentes matrices de *Salmonella Enteritidis* ( $-\log \text{ufc/ml o cm}^2$ ) en la variabilidad del número de supervivientes. Se muestra la regresión lineal de todo el conjunto de datos (Aguirre y col., 2011).

Poisson (Robinson y col., 2001; Aguirre y col., 2012):

$$f(k, \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^k}{k!}$$

donde  $f(k, \lambda)$  es la probabilidad de que haya  $k$  microorganismos viables en un

envase cuando la media es  $\lambda$ ; en nuestro caso, la probabilidad de que haya 0, 1, 2, 3, etc. viables por envase cuando la media del lote es 1 superviviente por envase. Sustituyendo  $\lambda$  por 1 y  $k$  por el número de supervivientes que pudiera haber (0, 1, 2, 3, etc.) en la ecuación, se tiene una estima-

ción de la probabilidad de que quede un número determinado de supervivientes; los resultados se recogen en la tabla 1.

El hecho de que haya 2 supervivientes en vez de 1 en un envase implica que es necesaria una generación microbiana menos para alcanzar la misma tasa microbiana, es decir, 24 horas menos. Si tenemos 3 viables, ya serán en torno a día y medio, y con 4 u 8 viables, 48 horas o 3 días menos, respectivamente. Las probabilidades de que queden más de 6 viables por envase parecen muy pequeñas, y lo son, pero en un lote de 1 000 000 de envases, la predicción es que, siendo la media de 1 por envase, habrá 9 envases que contengan 8 microorganismos viables.

La figura 4, en realidad una continuación de la figura 2, ilustra la evolución de las

cargas microbianas que han sobrevivido al tratamiento y, tras una fase de latencia que consideramos constante, han crecido con idéntica velocidad. De la distribución de frecuencias de ufc/envase en un tiempo dado que se muestra en la figura 4 se deduce que habrá muy pocos envases en los que se alcance esa tasa muy pronto, pero esos pocos envases van a ser los que determinen el establecimiento de la vida útil del producto.

Siguiendo con el ejemplo propuesto, en la tabla 2 se expone la evolución de los logaritmos del número de viables a lo largo del tiempo dependiendo del número de supervivientes (entre 1 y 10 por envase) tras el tratamiento conservante, asumiendo de nuevo que, en todos los casos, la fase de latencia será de 4 horas y el tiempo de generación de 1 día. Fijemos nuestra

atención en los datos de dicha tabla. Si la vida útil se calcula considerando que no debe sobrepasarse una determinada tasa (en nuestro caso, 10 000 ufc por envase), y si mantuviéramos los 17 días de vida útil, es muy probable que en torno a la cuarta parte del lote (las sumas de los porcentajes de que haya 2 o más viables por envase), sobrepasase la barrera de  $10^4$  ufc/envase antes de llegar a los 17 días de almacenamiento. Entonces, ¿qué vida útil dar a nuestro alimento? Pues va a depender del riesgo que quiera asumirse. Si nos parece adecuado correr el riesgo de que 1 envase de cada 100 000 sobreponga la tasa de  $10^4$  ufc/envase durante la vigencia de la vida útil, entonces, esta debería cifrarse en 14 días porque es probable que 9 envases del millón contengan 8 microorganismos y requieren de algo menos de 15 días para sobreponer la tasa límite. Si queremos asumir más o menos riesgos, la vida útil se fijará entre 12 y 16 días como puede observarse en la tabla 3, ya que los 17 serían una absoluta temeridad.

Lo expuesto hasta aquí sería muy útil si pudiéramos garantizar que la fase de latencia de los microorganismos es constante. Pero esto no es cierto. Los microorganismos viables tras un tratamiento conservante estarán más o menos dañados y necesitarán repararse para iniciar la multiplicación, lo que conlleva una fase de latencia variable (Mackey y Kerridge, 1988). Todas esas reparaciones, junto con el resto de adaptaciones que puedan precisar, van a conformar la fase de latencia. No va a ser igual la fase de latencia de una bacteria cuando pasa de estar en su temperatura óptima de crecimiento (establecida en el confort) a una temperatura de refrigeración que, a la inversa, de unas condiciones más disigenéticas (viviendo en el estrés) a unas más favorables para su desarrollo (Aguirre y col., 2013). La fase de latencia será más larga cuando las reparaciones de la bacteria sean mayores, o más cortas cuando haya poco o nada que reparar; más larga cuando las condiciones imperantes sean peores que las precedentes o más corta cuando mejoren. También se ha comprobado que la fase de latencia varía con el tamaño del inóculo (Augustin y col., 2000; Robinson y col., 2001; Pin y Baranyi, 2006). Cuando hay muy pocas bacterias viables, las fases de latencia tienden a ser más largas y son más variables. En cambio, cuando las poblaciones son relativamente numerosas, de un par de cientos por mililitro, las fases dejan de depender prácticamente del tamaño del inóculo. El estudio de la fase de latencia y su

TABLA 1

PREDICCIÓNES DEL PORCENTAJE DE ENVASES QUE CONTIENEN K CÉLULAS VIABLES TRAS UN TRATAMIENTO CONSERVANTE QUE REDUCE LA CARGA MICROBIANA INICIAL ( $10^6$  UFC/ENVASE) EN 6 CICLOS LOGARÍTMICOS.

Nº de viables por envase, k	Porcentaje de envases con k viables	Envases por lote <sup>1</sup> con k viables
0	36,8	367 879
1	36,8	367 879
2	18,4	183 940
3	6,1	61 313
4	1,5	15 328
5	0,3	3 066
6	0,05	511
7	0,007	73
8	0,0009	9
9	0,0001	1
10	0,00007	0

<sup>1</sup> Lote compuesto por 1 000 000 de envases

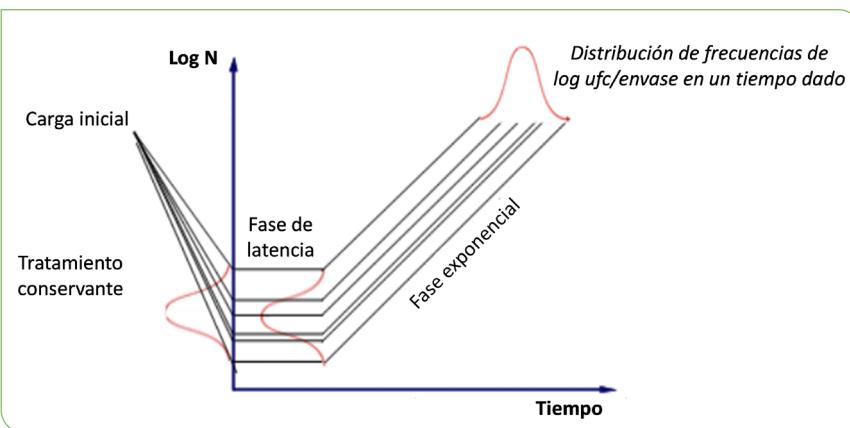


Figura 4. Posible evolución de los supervivientes a un tratamiento conservante. Se asume una fase de latencia y una velocidad de crecimiento constante. Nótense las distribuciones de frecuencias.

TABLA 2

EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MICROBIANA (LOG UFC/ENVASE) TRAS UN TRATAMIENTO CONSERVANTE QUE DEJA ENTRE 0 Y 10 CÉLULAS VIABLES POR ENVASE. SE CONSIDERA QUE LA FASE DE LATENCIA (4 DÍAS) ES CONSTANTE E IGUAL PARA TODOS LOS CASOS Y QUE EL TIEMPO DE GENERACIÓN ES DE 1 DÍA. SE RESALTA EL LOG DE VIABLES JUSTO POR DEBAJO DEL LÍMITE DE 10<sup>4</sup> UFC/ENVASE.

Concentración microbiana en el envase (log ufc/envase)										
Tiempo (días)	1 cél.	2 cél.	3 cél.	4 cél.	5 cél.	6 cél.	7 cél.	8 cél.	9 cél.	10 cél.
0 <sup>1</sup>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0 <sup>2</sup>	0	0,30	0,48	0,60	0,70	0,78	0,85	0,90	0,95	1,00
4	0	0,30	0,48	0,60	0,70	0,78	0,85	0,90	0,95	1,00
5	0,30	0,60	0,78	0,90	1,00	1,08	1,15	1,20	1,26	1,30
6	0,60	0,90	1,08	1,20	1,30	1,38	1,45	1,51	1,56	1,60
7	0,90	1,20	1,38	1,51	1,60	1,68	1,75	1,81	1,86	1,90
8	1,20	1,51	1,68	1,81	1,90	1,98	2,05	2,11	2,16	2,20
9	1,51	1,81	1,98	2,11	2,20	2,28	2,35	2,41	2,46	2,51
10	1,81	2,11	2,28	2,41	2,51	2,58	2,65	2,71	2,76	2,81
11	2,11	2,41	2,58	2,71	2,81	2,89	2,95	3,01	3,06	3,11
12	2,41	2,71	2,89	3,01	3,11	3,19	3,25	3,31	3,36	3,41
13	2,71	3,01	3,19	3,31	3,41	3,49	3,55	3,61	3,66	3,71
14	3,01	3,31	3,49	3,61	3,71	3,79	3,86	3,91	3,96	4,01
15	3,31	3,61	3,79	3,91	4,01	4,09	4,16	4,21	4,27	4,31
16	3,61	3,91	4,09	4,21	4,31	4,39	4,46	4,52	4,57	4,61
17	3,91	4,21	4,39	4,52	4,61	4,69	4,76	4,82	4,87	4,91
18	4,21	4,52	4,69	4,82	4,91	4,99	5,06	5,12	5,17	5,21

<sup>1</sup> Antes del tratamiento<sup>2</sup> Inicio del almacenamiento (t=0) después del tratamiento

variabilidad es prolífico y merece la pena otro artículo que complementará el presente y que servirá para establecer con una sólida base científica, y menos arbitrariedades, la vida útil de los alimentos.

## Referencias

➤ Aguirre JS, Pin C, Rodríguez MR, García de Fernando GD (2009) Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. Appl Environ Microbiol 75: 6992-6997. <https://doi.org/10.1128/AEM.00452-09>

➤ Aguirre JS, Rodríguez MR, García de Fernando GD (2011) Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de microorganismos supervivientes a tratamientos conservantes de los alimentos. En: Ordóñez JA, Córdoba JJ, Ventanas J. (eds.) Productos cárnicos para el siglo xxi. Seguros, nutritivos y saludables. Universidad de Extremadura. pp. 215-220. ISBN: 978-84-7723-949-9.

➤ Aguirre J, Bravo MC, Ordóñez JA, García de Fernando GD (2012) The Poisson distribution is applied to

improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. Adv Microbiol 2: 146-161. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2012.22020>

➤ Aguirre J, González A, Özçelik N, Rodríguez MR, García de Fernando GD (2013) Modelling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. Int J Food Microbiol 164: 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.003>

➤ Augustin JC, Brouillaud-Delattre A, Rosso L, Carlier V (2000) Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 66: 1706-1710. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1706-1710.2000>

➤ Mackey BM, Kerridge AL (1988) The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of *Salmonellae* in minced beef. Int J Food Microbiol 6: 57-65. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90085-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90085-2)

➤ Pin C, Baranyi J (2006) Kinetics of single cells: observation and modelling of a stochastic process. Appl Environ Microbiol

TABLA 3  
RIESGO ASUMIDO EN FUNCIÓN DE LA VIDA ÚTIL ASIGNADA DE ACUERDO CON LOS DATOS DE LA TABLA 2.

Vida útil (días)	Riesgo asumido (envases con más de 10 <sup>4</sup> ufc)
12	<1/10 <sup>7</sup>
13	<1/10 <sup>6</sup>
14	1/10 <sup>6</sup>
15	0,36%
16	7,86%
17	26,25%

72: 2163-2169. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2163-2169.2006>

➤ Robinson T, Aboaba O, Kaloti A, Ocio MJ, Baranyi J, Mackey B (2001) The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol 70: 163-173. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00541-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00541-4)