N.º 79 JUNIO 2025

# Variabilidad microbiana y vida útil de los alimentos y III. Establecimiento de la vida útil desde una perspectiva probabilística

**GARCÍA DE FERNANDO, GONZALO[1], AGUIRRE, JUAN[2] Y VELASCO, RAQUEL[1]**

[1]Tecnolog.a de los Alimentos. Facultad de Veterinaria (UCM).
[2]Departamento de Agroindustria y Enolog.a. Universidad de Chile, Chile.

*mingui@ucm.es*

La determinación de la vida útil de un alimento no es nada fácil. Cada alimento es un pequeño mundo en el que hay que considerar muchos y variados factores para que el producto, durante su vida comercial, sea sano, nutritivo y con unas características sensoriales acordes a las expectativas del consumidor. Son las tres bases de la calidad de un alimento. Valores nutritivo y sensorial y seguridad alimentaria. En definitiva, la estimación de la vida útil debe contemplar los tres aspectos y, en ningún caso, olvidar uno de ellos. En ciertos alimentos, puede ser más relevante la seguridad, en otros las características sensoriales, pero el consumidor espera, de todos ellos, que la calidad del producto cumpla con sus expectativas, desde cualquier punto de vista. Las fechas de consumo preferente o de caducidad han de establecerse dejando un margen de seguridad de tal manera que el valor nutritivo corresponda al que aparece en el etiquetado, la seguridad alimentaria esté garantizada y los atributos sensoriales no hayan sufrido un menoscabo que pueda llamar al rechazo por parte del consumidor, pero siempre alargándolas lo más posible para evitar pérdidas económicas innecesarias y un desperdicio alimentario injustificado.

Cuando los parámetros de calidad de un alimento pueden verse comprometidos por la proliferación de microorganismos patógenos o alterantes se aplican métodos de conservación para su control. Como ya se ha visto en el primer artículo de esta serie, la inactivación microbiana es variable y la distribución de frecuencias del número de supervivientes tiende hacia una normal (Aguirre y col., 2009; Aguirre y col., 2011; Aspridou y Koutsumanis, 2020 García de Fernando y col., 2024a). Es decir, al aplicar un tratamiento XD a un producto con una carga microbiana de $10^X$ por envase, la media de los supervivientes será 1 ufc/envase, pero la probabilidad de que en todos los envases en los que se aplique el tratamiento de forma simultánea haya un *único* microorganismo en todos y cada uno de ellos es ínfima y completamente despreciable. Al aplicar el tratamiento conservante antedicho a un número determinado de muestras (pueden ser envases de alimentos tratados térmicamente) con idéntica carga microbiana, si determináramos el recuento de supervivientes más probable por muestra, nos daría algo similar a una curva de Gauss, como se muestra en la figura 1. La realidad es que habría envases con supervivientes y envases estériles y, entre los envases con microorganismos, habr*ía* muchos con uno solo, algunos menos con 2, menos todavía con 3, 4, 5, etc. Las matemáticas predicen el número de envases con cada una de las cargas (García de Fernando y col., 2024a).

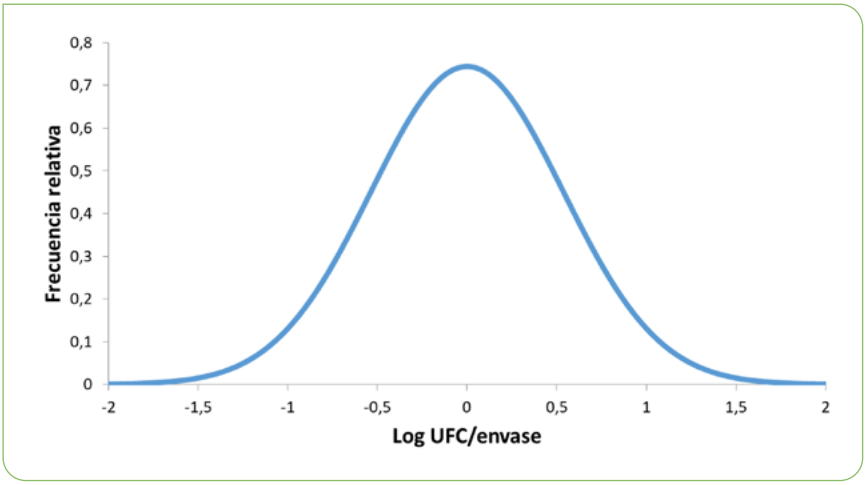


**Figura 1.** *Distribución normal de frecuencias del número de supervivientes (log ufc/envase) tras un tratamiento conservante. En este caso, se predice que la mitrad de las muestras serán estériles y la otra mitad contendrán microorganismos.*

También está demostrado que la fase de latencia de los microorganismos está sujeta a variabilidad (Robinson y col., 2001; Aguirre y col., 2011, 2013; García de Fernando y col., 2024b). Recordemos que la fase de latencia, ese periodo de adaptación de los microorganismos al medio antes de su multiplicación, depende de muchos factores, tanto extrínsecos, como temperatura, actividad de agua, nutrientes, pH circundante, etc., como propios de la célula –estado fisiológico– que va a multiplicarse, si es que puede; es decir, si su estado fisiológico le permite dividirse en las condiciones en que se encuentre. El estado fisiológico, aparte de los genes propios de la cepa que se trate, es función de la "historia" del microorganismo, de dónde viene, en qué condiciones ha crecido, a qué tratamientos microbicidas ha sobrevivido y, en suma, cualquier suceso que haya podido "sufrir" (Mackey y Karridge, 1988; Robinson y col., 2001) o "disfrutar". Estos sucesos pueden, entre otras consecuencias, causar daños moleculares

que haya que reparar (Aguirre y col., 2013), o sobrexpresar unos determinados genes o inhibir otros, etc. En suma, a un microorganismo que se encuentra en un alimento se le abre un amplio abanico de posibilidades, dependiendo de dónde venga (estado fisiológico, factores intrínsecos) y lo que se encuentre (extrínsecos). Lo puede tener muy fácil, más o menos difícil para multiplicarse, o imposible. Cuanto más alejadas de las idóneas sean las condiciones del entorno y peor sea el estado fisiológico de la célula, más larga será la fase de latencia (de los viables) porque más adaptaciones necesitará esa célula para estar en condiciones de multiplicarse. Diversos autores (entre otros Pin y Baranyi, 2006; García de Fernando y col., 2024b) afirman que la variabilidad de la fase de latencia de las células microbianas cobra su máxima importancia cuando han sufrido daños, es decir, han sobrevivido a tratamientos microbicidas (figura 2) y cuando la concentración microbiana es escasa (figura 3). Estos hechos, trasladados a los alimentos, nos dicen que cuando un producto se trata mediante cualquier operación de inactivación microbiana, la fase de latencia de las células supervivientes tenderá a ser más larga y más variable porque habrán padecido daños y, probablemente, su concentración sea escasa.

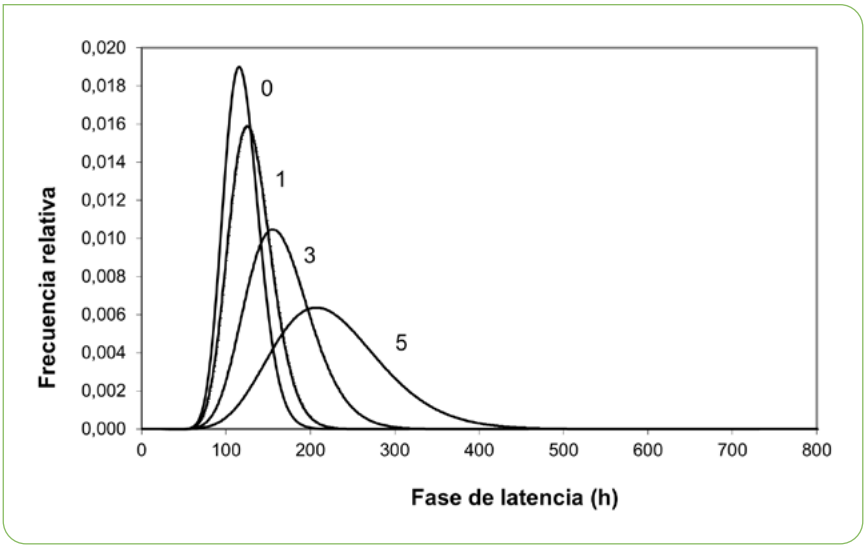


**Figura 2.** *Distribuciones de las fases de latencia predichas de una micropoblación de 10 células/ml de* Listeria innocua *superviviente a diferentes tratamientos desde 0 hasta 5D (Aguirre y col., 2013).*

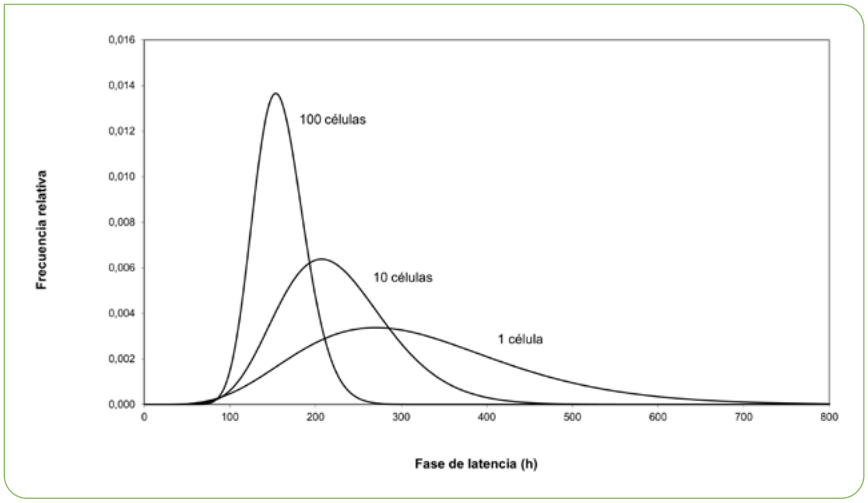


**Figura 3.** *Distribuciones de las fases de latencia predichas de poblaciones de 1, 10 ó 100 células/ml de* Listeria innocua *viables tras la aplicación de un tratamiento bactericida 5D (Aguirre y col., 2013).*

Es bien sabido que este escenario se presenta en muchos alimentos. En el proceso de elaboración, un producto puede someterse a tratamientos microbicidas no necesariamente esterilizantes, por lo que unos pocos microorganismos sobreviven y el alimento así tratado se mantiene posteriormente en condiciones que permiten el crecimiento microbiano. Obviamente, en todos ellos hay que establecer una vida útil, ya sea fecha de caducidad o de consumo preferente.

Consideremos un alimento en el que su vida útil depende exclusivamente de cuándo se alcanza una determinada carga microbiana. ¿Cómo debemos establecerla en los casos que acabamos de exponer? Tendremos que saber la carga inicial de la materia prima, cuántas reducciones decimales ha logrado la operación conservante, la fase de latencia de los supervivientes y su tasa específica de crecimiento a la temperatura de almacenamiento (para facilitar la comprensión y el desarrollo de este trabajo vamos a considerar que esta temperatura se mantiene constante a lo largo de la vida comercial del alimento). Por otra parte, el fabricante deberá establecer el riesgo que quiera asumir. Es decir, cuántos envases por cada X miles o millones sobrepasarán el límite establecido.

Pongamos un ejemplo para ver el alcance de la utilización del cálculo probabilístico en el establecimiento de la vida útil. Se elabora un lote de productos de 1 000 000 de envases, cuya materia prima tiene una carga microbiana de $10^6$ ufc/envase. Tras aplicar un tratamiento microbicida 7D, el producto se almacenará a temperatura constante de 4 ºC. El límite que el fabricante quiere establecer para determinar la vida útil es de 100 ufc/envase. De acuerdo con lo expuesto por García de Fernando y col. (2024a), se puede estimar la variabilidad del número de supervivientes en función del grado de inactivación

microbiana mediante la siguiente expresión (obtenida experimentalmente con *Listeria innocua*):

$$y = 0{,}0718x + 0{,}1056 \qquad (1)$$

donde *x* es el grado de inactivación alcanzado e *y* la desviación estándar predicha. De esta manera, una vez obtenidos los parámetros que definen una distribución normal (media y desviación estándar), se pueden calcular las frecuencias relativas de cada número de supervivientes. La distribución de tales frecuencias se muestra en la figura 4, en la que se aprecia claramente que, si bien la media se cifra en -1 Log ufc/envase, es decir, 1 de cada 10 envases contendría 1 microorganismo, la realidad es que no hay 1 microorganismo viable en el 10% de los envases (García de Fernando *et al.*, 2024b). La distribución de los viables, recogida en la tabla 1, se corresponde con el área coloreada en la figura 4. Si se suman las frecuencias relativas correspondientes a dicha área y se relativiza al área total encerrada entre la curva y el eje de las X, se predice que 50 141 envases del millón contendrán, al menos, 1 microorganismo. Es decir, aunque la media indica que el 10% de envases contienen 1 viable, la predicción es que el porcentaje de envases con microorganismos supervivientes es algo más del 5% y que no habría un solo viable por envase, sino entre 1, (lo más frecuente, 3,4% del total de envases) y más de 30 (unos 10 por millón).

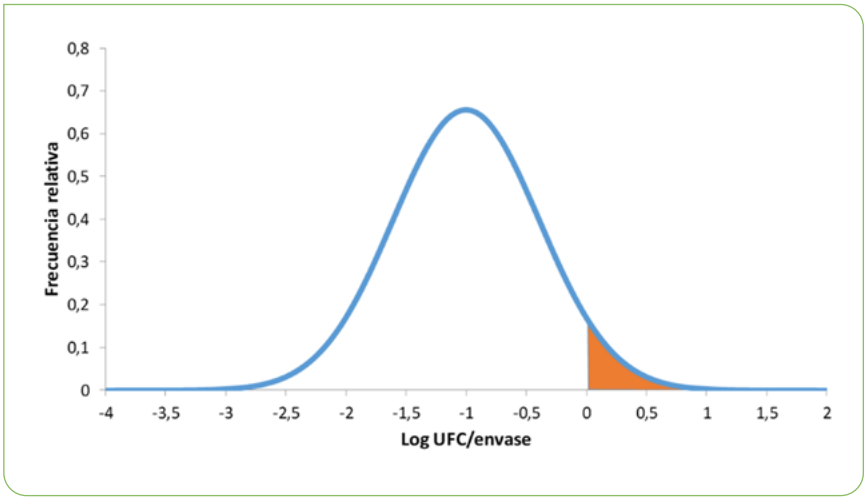


**Figura 4.** *Distribución de frecuencias del número de supervivientes (log UFC/envase) tras un tratamiento 7D aplicado a envases con una carga de $10^6$ ufc/envase, asumiendo una desviación estándar (variabilidad de inactivación) de 0,6082 ufc/envase, predicha por la ecuación (1). Está resaltada el área (aproximadamente un 5% del total) que corresponde a envases con microorganismos viables.*

En todos esos envases podrán multiplicarse los microorganismos, pero, como ya se ha visto, el tiempo que transcurre entre el tratamiento microbicida y el inicio del crecimiento (fase de latencia) no es ni mucho menos constante (Robinson y col., 2001; Aguirre y col., 2011, 2013; García de Fernando y col., 2024b). De acuerdo con estos autores y la ayuda de los ordenadores, pueden predecirse estas fases de latencia. Siguiendo el ejemplo que nos traemos entre manos, para cada carga microbiana (número de viables en un envase) puede predecirse una distribución de fases de latencia y puede adjudicarse una probabilidad a cada una de ellas tal y como se resume en la figura 5, en la que se indica la probabilidad de que los envases con una determinada carga microbiana (se muestran las distribuciones predichas para envases con 1, 5, 10, 20 y 30 viables) tengan una fase de latencia más larga o más corta. Fijémonos en las curvas de la distribución de frecuencias de las fases de latencia de los envases con un único viable. Si bien la moda está cerca de las 600 horas, la fase de latencia más corta, aunque poco probable, es de menos de 100 h. A partir de esa curva puede predecirse el número de envases que contienen una única célula viable con una determinada fase de latencia (tabla 2). De los casi 40 000 envases (tabla 1) únicamente se predice que 4 tendrán una fase de latencia muy corta, menor de 100 h. Fijémonos ahora en los envases con 10 células. De los 111 predichos habrá 2 con una fase de latencia entre 151 y 200 h (tabla 2).

**TABLA 1. PREDICCIONES DEL NÚMERO DE ENVASES POR MILLÓN (Nº ENV) QUE CONTIENEN UN NÚMERO DE VIABLES /ENVASE (VIAB)**

| Viab | Nº Env | Viab | Nº Env | Viab | Nº Env | Viab | Nº Env |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 33906 | 10 | 111 | 19 | 13 | 28 | 3 |
| 2 | 8683 | 11 | 80 | 20 | 10 | 29 | 3 |
| 3 | 3314 | 12 | 59 | 21 | 8 | 30 | 2 |
| 4 | 1636 | 13 | 47 | 22 | 7 | 31 | 2 |
| 5 | 887 | 14 | 36 | 23 | 6 | 32 | 2 |
| 6 | 521 | 15 | 28 | 24 | 5 | 33 | 2 |
| 7 | 330 | 16 | 22 | 25 | 4 | 34 | 1 |
| 8 | 219 | 17 | 18 | 26 | 4 | 35 | 1 |
| 9 | 150 | 18 | 15 | 27 | 3 | 36 | 1 |

**TABLA 2. PREDICCIÓN DEL NÚMERO DE ENVASES CON UNA Y CON DIEZ CÉLULAS SUPERVIVIENTES Y SUS FASES DE LATENCIA**

| Fase latencia (h) | Nº env. 1 cél | Nª env. 10 cél | Fase latencia (h) | Nº env. 1 cél | Nª env. 10 cél |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 - 50 | 0 | 0 | 501 - 550 | 3287 | 11 |
| 51 - 100 | 4 | 0 | 551 - 600 | 3271 | 7 |
| 101 - 150 | 46 | 0 | 601 - 650 | 3103 | 5 |
| 151 - 200 | 198 | 2 | 651 - 700 | 2828 | 3 |
| 201 - 250 | 523 | 5 | 701 - 750 | 2490 | 1 |
| 251 - 300 | 1022 | 11 | 751 - 800 | 2127 | 1 |
| 301 - 350 | 1630 | 16 | 801 - 850 | 1770 | 0 |
| 351 - 400 | 2243 | 18 | 851 - 900 | 1439 | 0 |
| 401 - 450 | 2762 | 17 | 901 - 950 | 1146 | 0 |
| 451 - 500 | 3120 | 14 | > 951 | 3319 | 0 |

Es decir, los envases con una sola célula, pero con fase de latencia corta, pueden ser significativos a la hora de establecer la vida útil porque comienzan a multiplicarse más rápidamente que otros envases con un número mayor de células. Al fin y al cabo, se trata de una cuestión de probabilidades. La predicción es que, al haber casi 40 000 envases con una sola célula, es más probable que una célula de esas 40 000 comience a multiplicarse antes que las 1.110 distribuidas en los 111 envases con 10 células cada uno.

Para simplificar este artículo y los cálculos que finalmente estimarán la vida útil, va a considerarse que la temperatura de almacenamiento y comercialización de nuestros envases es constante, 4ºC, y la tasa específica máxima de crecimiento a esa temperatura es de 0.042 $h^{-1}$ (datos verídicos de *Listeria innocua* en TSB). No obstante, se dispone de modelos que contemplan fluctuaciones de temperatura, que podrían utilizarse para estas predicciones, aunque no resulta muy verosímil predecir realmente qué abuso de temperatura y durante cuánto tiempo va a producirse durante el transporte, la exposición para la venta y el almacenamiento en los hogares, con lo que no es del todo cierto que las predicciones puedan ser más precisas, aunque puedan ser más seguras.

Recordemos que el límite establecido para la determinación de la vida útil en nuestro ejemplo es de 100 ufc/envase; el modelo desarrollado debe contemplar cuántas generaciones, es decir, duplicaciones de los viables en cada envase, son necesarias para llegar a ese límite. Los envases que contienen un solo viable, necesitan 7 generaciones para sobrepasarlo; en cambio, los envases que contienen de inicio 30 viables solo precisarían de dos generaciones. El tiempo necesario para llegar a las 100 ufc/envase se calcula con la siguiente ecuación:

$$T_N = \text{Fase de latencia} + \\ + (\text{Log N} - \text{Log N}_0) / \mu_{máx} \qquad (2)$$

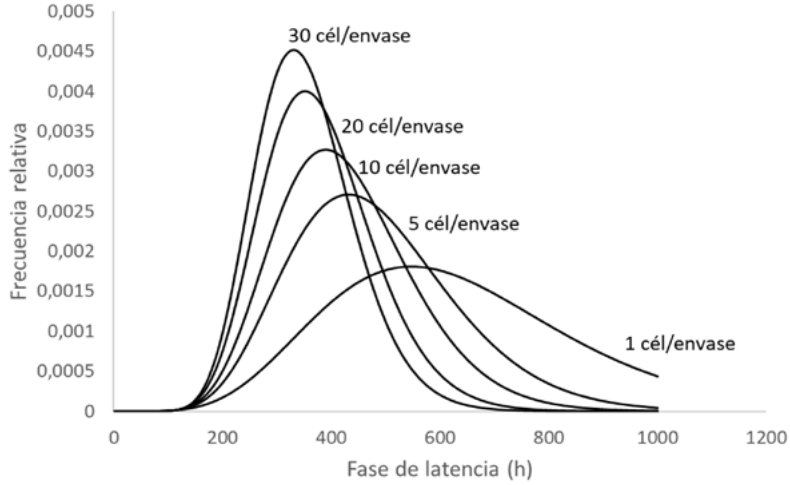


**Figura 5.** *Distribución de frecuencias de las fases de latencia de los supervivientes de la figura 4. Solo se incluyen las esperadas para los envases en que haya 1, 5, 10, 20 ó 30 microorganismos viables.*

donde $T_N$ es el tiempo necesario para llegar a N células/envase, en este caso 100, LogN es el logaritmo de 100, es decir, 2, $N_0$ es el número de viables por envase antes de multiplicarse y $m_{máx}$ es la tasa específica máxima de crecimiento, es decir, 0.042 $h^{-1}$. Con lo que nos queda:

$$T_{100} = \text{Fase de latencia} + \\ + (2 - \text{Log N}_0) / 0{,}042 \qquad (3)$$

En definitiva, "solo" queda calcular para cada inóculo y cada fase de latencia, el tiempo que tardan los microorganismos

N.º 79 JUNIO 2025

de cada envase en llegar a las 100 ufc/envase. Este cálculo pueden hacerlo los ordenadores con facilidad, aunque sean miles de posibles combinaciones.

Atendamos ahora a las figuras 6 y 7 que muestran las distribuciones de frecuencia de las fases de latencia de una carga microbiana única (figura 6) y varias (figura 7). Debe considerarse que la tasa especifica de crecimiento a una determinada temperatura es bastante constante. Expliquemos este adverbio, bastante, de cantidad. Cuando una bacteria se multiplica por primera, segunda, tercera vez, los tiempos de duplicación de "sus hijas y nietas" son variables, pero conforme aumenta el número de bacterias, esas diferencias desaparecen y los tiempos de duplicación de la población se homogeneizan (Koutsoumnais y Lianou, 2013). Por tanto, a la hora de predecir la velocidad de crecimiento de una célula, y con más motivo de una población, no es erróneo considerar que es constante. Por consiguiente, el tiempo que precisa un determinado inóculo (por ejemplo, 1 bacteria por envase) para alcanzar 100 ufc/envase depende, sobre todo, de la fase de latencia porque, una vez iniciado el crecimiento, todas las células van a tardar prácticamente lo mismo en llegar a las 100 ufc (figura 6).

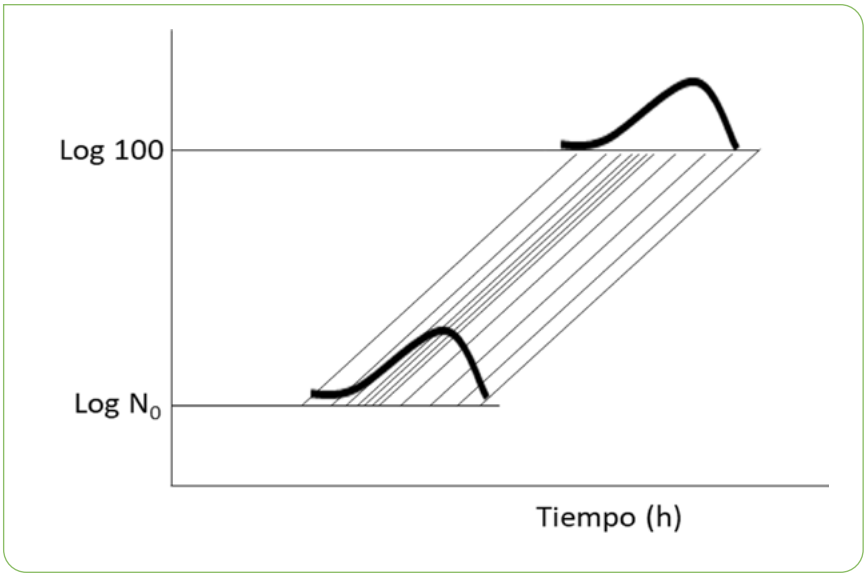


**Figura 6.** *Distribución de frecuencias de las fases de latencia de una determinada carga microbiana por envase ($N_0$) y del tiempo necesario para llegar a 100 ufc/envase.*

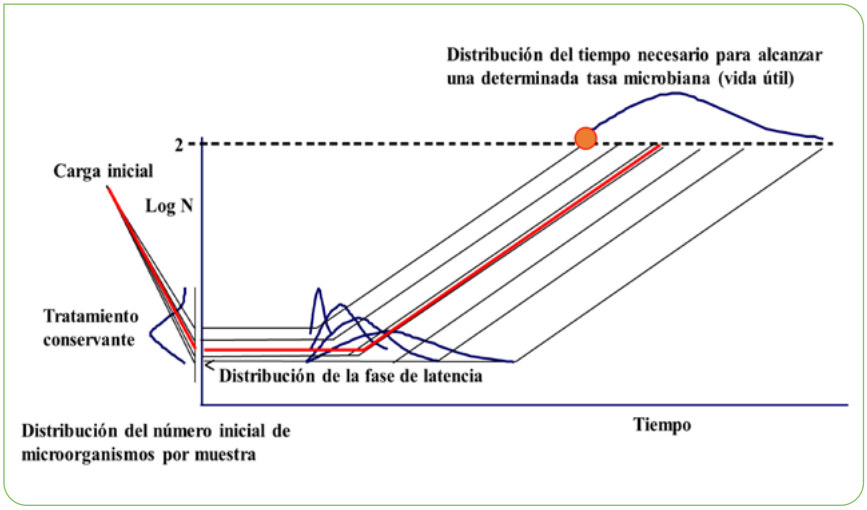


**Figura 7.** *Simulación de la evolución microbiana tras un tratamiento microbicida que deja una media de 1 viable cada 10 envases. Se muestran varias posibilidades de distribuciones de frecuencias de las fases de latencia (más anchas cuanto menor es el número de viables por envase) y la distribución de frecuencias del tiempo necesario para llegar al límite de 100 ufc/envase. Las líneas rojas indican los valores medios. El punto naranja nos indica el tiempo menor para alcanzar dicho límite.*

Pero como ya se ha visto que en todos los envases no habrá el mismo número de supervivientes, la figura 7 se acerca mucho más a la realidad. Para cada carga inicial por envase, le corresponderá una distribución de frecuencias de fases de latencia.

A la vista de estos resultados, ¿qué vida útil debemos establecer? Aplicando la ecuación (3) y considerando las distribuciones de frecuencia predichas para cada carga inicial de los envases con viables (figura 7) tendremos los tiempos predichos para alcanzar la tasa de 100 ufc/envase. Dependiendo del riesgo que quiera asumirse, podremos determinar la vida útil del lote con el que venimos trabajando; recuérdese que era de un millón de envases, de los cuales en algo más de 50 000 quedarían microorganismos supervivientes tras el tratamiento microbicida. La ecuación (3) nos dice que un envase del millón tarda 122 h en alcanzar dicha tasa (algo más de 5 días). Las 122 horas surgen de la suma de la fase de latencia de la célula más rápida en iniciar el crecimiento y el tiempo necesario para que se produzcan entre 6 y 7 generaciones que darán 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 células. Para que diez envases de cada millón, alcancen la tasa de 100 ufc/envase, son necesarias 162 h (casi 7 días), 232 h (casi 10 días) cien y 482 h (algo más de 20 días) mil envases. El fabricante puede asumir el riesgo que considere oportuno.

La utilidad de aplicar esta metodología predictiva no queda solo en el establecimiento de la vida útil. Puede predecirse,

por ejemplo, qué ocurre si la materia prima estuviera más o menos contaminada, si se aplica un tratamiento microbicida más o menos intenso, si se modifica la temperatura de almacenamiento o si se considera una diferente cantidad de microorganismos como límite para establecer la vida útil. Pero, desde el punto de vista de los autores, lo fundamental es que puede establecerse la vida útil, considerando el riesgo que el fabricante quiera asumir, aunque no debemos olvidar que todo lo tratado aquí son predicciones que se acercan mucho a la realidad, pero no son perfectas y que los datos usados son útiles para *Listeria innocua* y podrían serlo para *L. monocytogenes*, pero no para otros microorganismos No obstante, claro está, pueden obtenerse datos para cualquier otra bacteria y desarrollar toda esta metodología para el microorganismo diana de cualquier alimento y poder, así, predecir su vida útil con una base probabilística y no empírica.

## Referencias


- Aguirre, J., González A., Özçelik, N., Rodríguez, M.R. y García de Fernando, G.D. 2013. Modelling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. Int. J. Food Microbiol., **164**: 60-69.
- Aguirre, J.S., Pin C., Rodríguez, M.R. y García de Fernando G.D. 2009. Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. Appl. Environ. Microbiol., **75**: 6992-6997.
- Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R. y García de Fernando, G.D. 2011. Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de microorganismos supervivientes a tratamientos conservantes de los alimentos. En: Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables. Ordóñez, J.A., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (eds.). ISBN: 978-84-7723-949-9. Universidad de Extremadura. pp. 215-220.
- Aspridou, Z y Koutsumanis, K.P. 2020. Variability in microbial inactivation: From deterministic Bigelow model to probability distribution of single cell inactivation times. Food Research International., **137**: 1- 6. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109579
- García de Fernando, GD, Aguirre, J, Velasco, R. (2024a). Variabilidad microbiana y vida útil de los alimentos I. Inactivación microbiana. SEM@foro, nº 77, 18-21.
- García de Fernando, GD, Aguirre, J, Velasco, R. (2024b). Variabilidad microbiana y vida útil de los alimentos II. Cálculo de la fase de latencia de microorganismos individualizados. SEM@foro, nº 78, 13-17.
- Koutsoumanis, K.P. y Lianou, A. 2013. Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells. Appl. Environ. Microbiol., **79**: 2294-2301.
- Mackey, B.M. y Karridge, A.L. 1988. The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of salmonela on minced beef. Int. J. Food Microbiol., **6**: 57-65.
- Pin, C. y Baranyi, J. 2006. Kinetics of single cells: observation and modelling of a stochastic process. Appl. Environ. Microbiol., **72**: 2163-2169.
- Robinson, T., Aboaba, O., Kaloti, A., Ocio, M., Baranyi, J. y Mackey, B. 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., **70**: 163-173.