



**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**  
**GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA**

*Trabajo de fin de grado*

TÍTULO

**MODELADO DE LAS CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE *E. COLI* EN  
BEBIDAS REFRESCANTES Y EN PREPARADOS LÁCTEOS (MODELO  
DE BARANYI)**

AUTOR

**Elisa Rojas Hernández**

TUTOR

**Emiliano Quinto Fernández**

Valladolid, 2016

## ÍNDICE

<b>1.-RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
2.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> SPP Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157:H7 .....	4
2.2 ZUMOS COMERCIALES, BEBIDAS REFRESCANTES Y PRODUCTOS LÁCTEOS.....	6
2.3 MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA.....	6
<b>3.- OBJETIVO</b> .....	<b>9</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
4.1 ALIMENTOS UTILIZADOS.....	10
4.2 CEPAS BACTERIANAS .....	10
4.3 ENUMERACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS Y CARACTERIZACIÓN DE SU CINÉTICA DE SUPERVIVENCIA .....	11
<b>5 .RESULTADOS</b> .....	<b>12</b>
5.1 SUPERVIVENCIA DE <i>E COLI</i> NO PATÓGENA (EC) Y <i>E COLI</i> O157:H7 (ECO) EN BEBIDAS REFRESCANTES COMERCIALES A 4 Y 20°C. ....	12
5.2 SUPERVIVENCIA DE <i>E. COLI</i> NO PATÓGENA (EC) Y <i>E. COLI</i> O157:H7 (ECO) EN PREPARADOS LÁCTEOS COMERCIALES PASTEURIZADOS A 4 Y 20°C .....	15
5.3 PARÁMETROS ESTIMADOS DE SUPERVIVENCIA DE EC Y ECO A 4 Y 20°C. .....	18
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>25</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>26</b>

## 1.-RESUMEN

*E. coli* O157:H7 es un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Forma parte de la flora normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente; está implicada en una serie de enfermedades transmitidas por los alimentos, causando brotes de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico.

Entre los alimentos implicados se incluyen carnes elaboradas y cocidas de manera insuficiente, frutas y hortalizas crudas, productos lácteos y zumos de frutas no pasteurizados.

Se ha aplicado el modelo matemático de Baranyi y Roberts (1994) para la estimación de los parámetros de supervivencia de *Escherichia coli* no patógeno CECT 516 (EC) y *Escherichia coli* O157:H7 CECT 4076 y CECT 4267 (ECO) en Bebidas refrescantes comerciales y Preparados lácteos comerciales pasteurizados a 4 y 20°C. El modelo permite estimar el tiempo de latencia, la velocidad máxima de decrecimiento y la población final.

A 20°C el tiempo necesario en no detectarse células viables fue de 3-5 días en el caso de las Bebidas refrescantes tipo A y B, y de 6-17 días en el caso de los Preparados lácteos tipo A y B. A 4°C el tiempo necesario fue de 7 días en el caso de las Bebidas refrescantes tipo A y B y de 11- 24 días en el caso de los Preparados lácteos Tipo A y B.

El tiempo necesario para no detectarse células viables es menor a 20°C que a 4°C; a su vez es menor en las Bebidas refrescantes que en los Preparados lácteos. Dentro de los distintos tipos de Bebidas refrescantes y Preparados lácteos la inactivación del microorganismo es más rápida en los Tipo A que en los Tipo B. En los Preparados lácteos el tiempo en inactivar EC fue menor que en inactivar ECO mientras que en las Bebidas refrescantes no hubo diferencias significativas en el tiempo empleado.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, microbiología predictiva, modelo de Baranyi.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 *ESCHERICHIA COLI* SPP Y *ESCHERICHIA COLI* O157:H7

En los últimos años se ha generado un aumento de los brotes producidos por *Escherichia coli* (*E. coli*), con un impacto significativo en los sistemas de salud y la producción agrícola.<sup>1</sup>

*E. coli* es un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y es el miembro más frecuente e importante del género *Escherichia*. Se caracteriza por ser bacilos gramnegativos, no esporulados, con flagelos peritricos o inmóviles, anaerobio facultativo, fermentador de glucosa, oxidasa- negativo.

Forma parte de la flora normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, constituyendo entre el 0,1-1% del total de la población microbiana normal del intestino y se las considera comensales inofensivos. Cuando se produce una perforación intestinal, las bacterias que acceden a la cavidad peritoneal se pueden comportar como patógenos oportunistas, aunque la mayor parte de las *E. coli* que causan enfermedad digestiva y extraintestinal se debe a que han adquirido factores de virulencia secundarios codificados en islotes de patogenicidad, plásmidos o en ADN de bacteriófagos.

La mayor parte de las infecciones exceptuando la meningitis y la gastroenteritis neonatal son endógenas, de tal manera que la *E. coli* que forma parte de la propia flora microbiana normal del paciente consigue ocasionar infección cuando sus defensas se alteran.<sup>2,3</sup>

En la actualidad se reconocen al menos cinco grupos de *E. coli* patógenas que pueden producir gastroenteritis: Enterotoxigénica (ECET), enteropatógena clásica (ECEP), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH) y enteroagregativa (ECEA); la mayoría producen infecciones en los países en vías de desarrollo, aunque ECEH es una causa importante de colitis hemorrágica (CH) y de síndrome hemolítico urémico (SHU) en EE.UU. La enfermedad extraintestinal incluye bacteriemia, meningitis neonatal, infecciones urinarias e infecciones intraabdominales.<sup>4</sup>

Las cepas de *E. coli* enterohemorrágicas son las que causan con mayor frecuencia enfermedad en los países desarrollados; se estima que producen 73.000 infecciones y

60 muertes al año en EE.UU, siendo la incidencia máxima en niños menores de 5 años.

La cepa más frecuente de ECEH es el serotipo O157:H7. Es un clon evolucionado a partir de ECEP y expresa actividad de anclaje y borrado. Además estas cepas han adquirido la toxina Shiga (es decir Stx-1, Stx-2 o ambas).

Se reconoció por primera vez como un patógeno humano en 1982 tras producir un brote de colitis hemorrágica (HC) en Estados Unidos y es considerada como un importante agente que causa HC y síndrome urémico hemolítico (SHU), que provoca insuficiencia renal en niños y un aumento de la morbimortalidad en adultos. También puede causar trombocitopenia, anemia hemolítica y defectos en la coagulación, pudiéndose dañar el sistema nervioso y el aparato digestivo.

Se han informado enfermedades causadas por *E. coli* O157:H7 en más de 30 países en seis continentes, en un período de 20 años se registraron 350 brotes en EE.UU., y el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) estima que la *E. coli* O157:H7 causa 73.480 enfermedades, 2168 hospitalizaciones y 61 muertos al año sólo en EE.UU.<sup>5</sup>

Presenta una dosis infectiva baja de alrededor de 10-100 UFC (unidades formadoras de colonias), y el principal mecanismo de transmisión es la ingesta de agua y alimentos contaminados.

Entre las fuentes más comunes de infecciones por *E. coli* transmitidas por los alimentos se incluyen carnes elaboradas y cocidas de manera insuficiente, frutas y hortalizas crudas, productos lácteos y zumos de frutas no pasteurizados, una manipulación y almacenamiento insalubre de los alimentos preparados.

Ya que en las últimas décadas se ha producido en España, al igual que en Estados Unidos y el resto de Europa, un aumento importante del consumo de zumos y bebidas refrescantes, resulta interesante estudiar el comportamiento del microorganismo en este tipo de productos para determinar su capacidad de adaptación y supervivencia en relación con distintas variables que pudieran estar involucradas, tales como temperatura, pH y flora microbiana presente.<sup>6</sup>

## 2.2 ZUMOS COMERCIALES, BEBIDAS REFRESCANTES Y PRODUCTOS LÁCTEOS

El término «zumo de frutas» designa el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por el frío, de una o varias especies, que posea el color, el aroma y el sabor característicos de los zumos de la fruta de la que procede. Se podrá reincorporar al zumo el aroma, la pulpa y las celdillas que haya perdido con la extracción.<sup>7</sup>

Se entiende por bebida refrescante las bebidas analcohólicas, carbonatadas o no, preparadas con agua de consumo humano, aguas preparadas, agua mineral natural o de manantial (en lo sucesivo agua), que contengan uno o más de los siguientes ingredientes: anhídrido carbónico, azúcares, zumos, purés, disgregados de frutas y/o vegetales, extractos vegetales, vitaminas y minerales, aromas, aditivos autorizados u otros ingredientes alimenticios.<sup>8</sup>

Se entiende por productos lácteos los elaborados a base de leche, es decir, los derivados exclusivamente de la leche, teniendo en cuenta que se pueden añadir sustancias necesarias para su elaboración, siempre y cuando estas sustancias no se utilicen para sustituir, total o parcialmente, alguno de los componentes de la leche y los productos compuestos de leche, en los que la leche o un producto lácteo es la parte esencial, ya sea por su cantidad o por el efecto que caracteriza a dichos productos y en los que ningún elemento sustituye ni tiende a sustituir a ningún componente de la leche.<sup>9</sup>

## 2.3 MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

La microbiología predictiva es la ciencia que parte de la premisa de que el comportamiento microbiano (crecimiento, supervivencia e inactivación) puede cuantificarse y expresarse con ecuaciones matemáticas que permiten predecir tal comportamiento en unas determinadas condiciones ambientales.<sup>10</sup>

Se reconoce como una herramienta útil en el ámbito de la gestión de la seguridad de los alimentos, tanto por parte de los diferentes sectores alimentarios como para las autoridades reguladoras.

La microbiología predictiva utiliza modelos predictivos; un modelo es un esquema teórico, generalmente en forma matemática, de un sistema o de una realidad compleja.

No existe un criterio único de clasificación de los modelos predictivos. Pueden clasificarse según su fundamento matemático (empírico y mecanicista), según su finalidad (cinéticos y probabilísticos) o según la clasificación más aceptada por la comunidad científica en modelos primarios, secundarios y terciarios.<sup>11</sup>

Los modelos primarios estiman los parámetros cinéticos de los microorganismos, es decir, describen la evolución del número de viables en función del tiempo (crecimiento, supervivencia e inactivación) en un ambiente determinado.

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

Los modelos terciarios se obtienen por integración de los modelos primarios y secundarios implementados mediante una herramienta informática a nivel de usuario.<sup>12</sup>

ComBase<sup>13</sup> es un ejemplo de modelo terciario, es un repositorio de datos online que describe la supervivencia y el crecimiento de microorganismos patógenos en distintas condiciones ambientales y un conjunto de herramientas de software predictivo basado en estos datos. Contiene miles de curvas de crecimiento microbiano y supervivencia que describen el efecto de las distintas condiciones de procesamiento y almacenamiento de alimentos en el crecimiento de las bacterias y aporta información sobre cómo las bacterias responden a cambios de pH, temperatura, actividad de agua, etc., en distintos ambientes alimenticios. Estas curvas bacterianas se ajustan al modelo dinámico de Baranyi y Roberts.

El modelo dinámico de Baranyi y Roberts (1994)<sup>14</sup> es un modelo matemático con parte mecanicista que se basa en el principio de que existen sustancias que limitan el crecimiento bacteriano. Asume que el estado de una población homogénea de bacterias se puede caracterizar por los factores fisicoquímicos, el medio extracelular y las condiciones intracelulares.

Este modelo describe una curva bacteriana sigmoidea. Presenta 4 parámetros principales: valor inicial, fase de latencia o retraso/interfase, tasa máxima, valor final y 2 parámetros de curvatura: mCurv y nCurv, los cuales describen la curvatura de la curva sigmoidea respectivamente al principio y al final de la fase de crecimiento.

Permite cuantificar la cinética de crecimiento microbiano y obtener, por ejemplo, la tasa máxima específica de crecimiento.

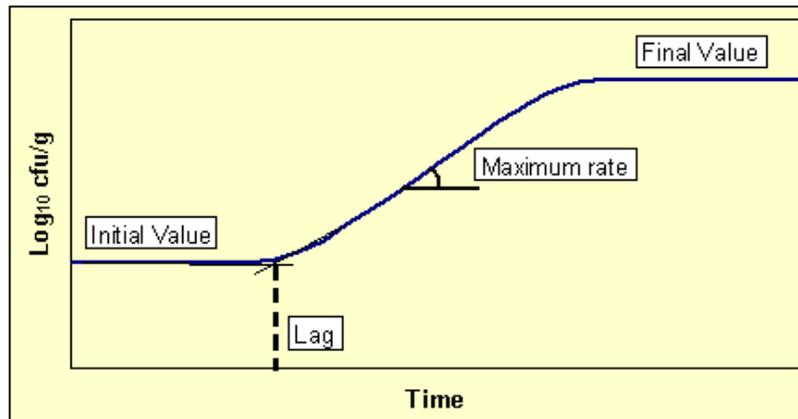


Figura. 1 Curva de crecimiento ajustada al Modelo de Baranyi y Roberts completo: fase de latencia/ interfase, fase exponencial/interfase, fase estacionaria.

### **3.- OBJETIVO**

Aplicación de un modelo matemático para la estimación de los parámetros de supervivencia de *Escherichia coli* no patógeno CECT 516 y *Escherichia coli* O157:H7 CECT 4076 Y CECT 4267 en Bebidas refrescantes comerciales y Preparados lácteos comerciales pasteurizados a 4 y 20°C.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 ALIMENTOS UTILIZADOS

-Bebidas refrescantes comerciales:

Tipo A cuya composición se basa en:

- Agua mineral natural
- 11,5% de zumo de naranja
- 4,5% de zumo de mandarina
- 4% de zumo de limón

Tipo B cuya composición se basa en:

- Agua mineral natural
- 10% Leche desnatada
- 25% Zumo: naranja, zanahoria, piña, maracuyá, mango, guayaba, albaricoque y papaya, procedentes de zumo concentrado.

-Preparados lácteos comerciales pasteurizados:

Tipo A cuya composición se basa en:

- Agua mineral
- 10% Leche desnatada
- 33,7% Zumo de manzana, kiwi, lima y limón a base de zumos concentrados.

Tipo B cuya composición se basa en:

- Agua mineral
- 10% Leche desnatada
- 7% Zumo de mango y piña a base de zumos concentrados

### 4.2 CEPAS BACTERIANAS

- *Escherichia coli* no patógeno CECT 516(EC)

- *Escherichia coli* O157:H7 CECT 4076 Y CECT 4267 (ECO): estas dos cepas bacterianas se introdujeron juntas en los alimentos utilizados.

#### 4.3 ENUMERACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS Y CARACTERIZACIÓN DE SU CINÉTICA DE SUPERVIVENCIA

Las poblaciones enumeradas a continuación se expresaron como log cfu/ml. Los datos laboratoriales fueron obtenidos previamente en el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona. Dichos datos fueron introducidos manualmente en Excel.

Los parámetros cinéticos de muerte de cada una de las pruebas bacterianas realizadas en cada uno de los alimentos utilizados (bebidas refrescantes tipo A y B y preparados lácteos tipo A y B) se caracterizaron utilizando DMFit, que forma parte del sistema utilizado en el Instituto de Investigación Alimentaria (IFR); ajusta las poblaciones enumeradas en el modelo desarrollado por Baranyi y Roberts (1994).

Este modelo permite calcular el tiempo de latencia, la velocidad máxima de decrecimiento y la población final para cada tipo de bacteria y en cada medio de cultivo.

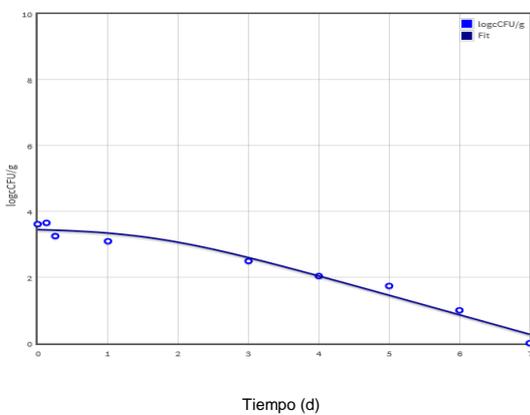
## 5 .RESULTADOS

### 5.1 SUPERVIVENCIA DE *E COLI* NO PATÓGENA (EC) Y *E COLI* O157:H7 (ECO) EN BEBIDAS REFRESCANTES COMERCIALES A 4 Y 20°C.

Las curvas de supervivencia de EC y ECO en Bebidas refrescantes de tipo comercial tras someterse a un tratamiento a temperaturas de 4 y 20°C se presentan en las Figuras 2, 3, 4 y 5.

“Tipo A”

A



B

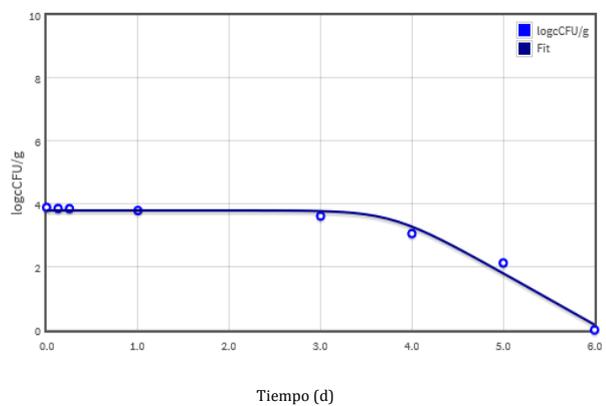
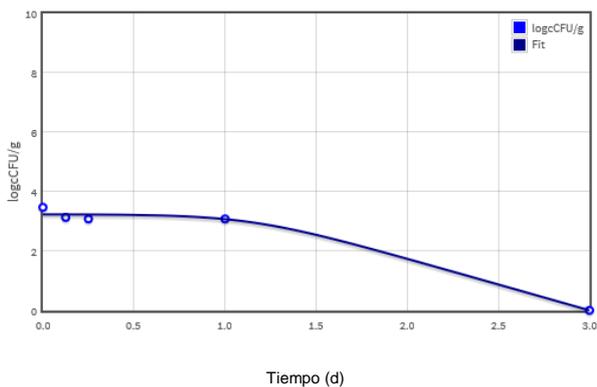


Fig.2 Supervivencia de EC y ECO en Bebidas refrescantes comerciales de zumos de frutas Tipo A, a temperaturas de 4°C y con un pH de 3-4, se muestra en A y B respectivamente.

A



B

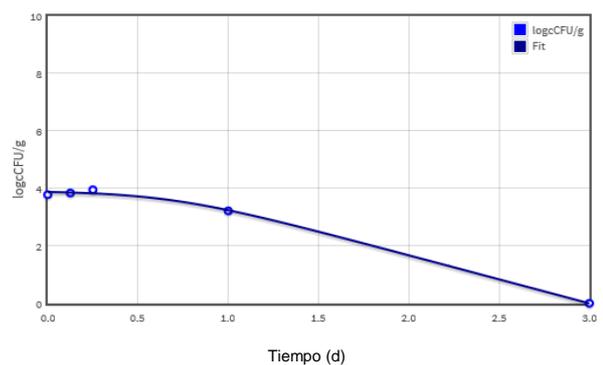


Fig.3 Supervivencia de EC y ECO en Bebidas refrescantes comerciales de zumos de frutas Tipo A, a temperaturas de 20°C y con un pH en torno a 3-4, se muestra en A y B respectivamente.

En la Fig.2.A se observa como durante todo el proceso de incubación a 4°C la población de EC muestra un descenso continuo, siendo 7 días el tiempo empleado en pasar de un nivel inicial de 3,62 log cfu/ml hasta no detectarse. A esta misma temperatura la población de ECO se mantuvo estable (3,89 log cfu/ml) hasta el 3º día, para después descender, no detectándose a los 7 días, como se observa en la Fig.2.B.

A temperaturas de 20°C la Fig.3.A muestra un descenso continuo de la población de EC; partiendo de un nivel inicial de 3,47 log cfu/ml la población deja de detectarse en 3 días. En la Fig.3.B la población de ECO mostró un descenso continuo, pasando en 3 días de un nivel inicial de 3,78 log cfu/ml hasta no detectarse.

“Tipo B”

A

B

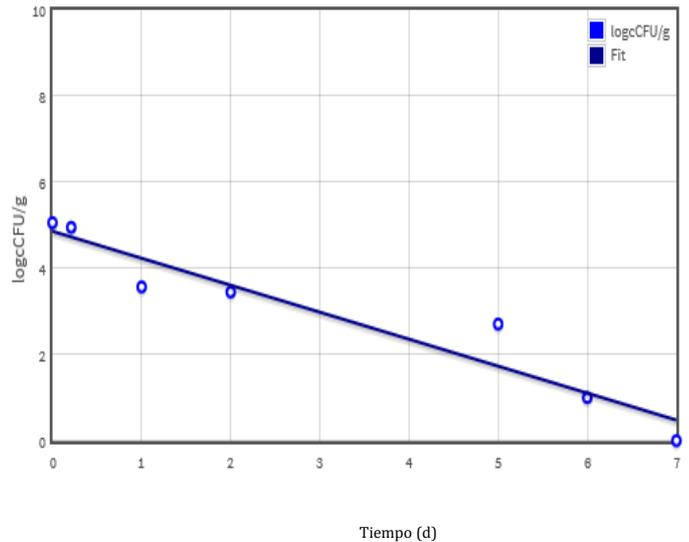
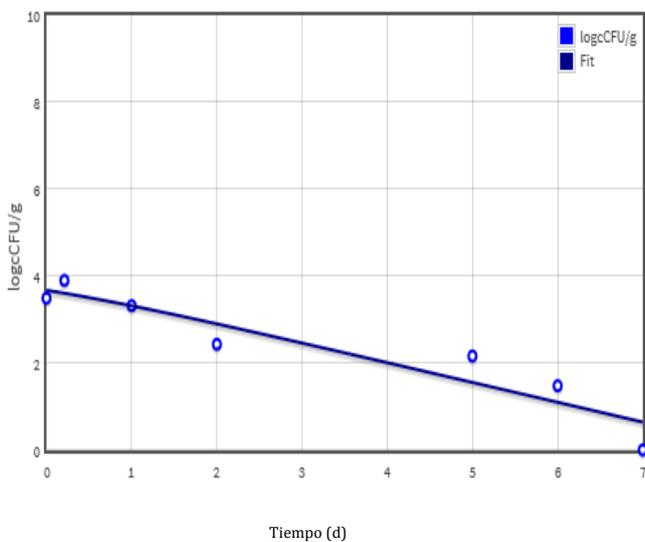


Fig.4 Supervivencia de EC y ECO en Bebidas refrescantes comerciales de zumos de frutas Tipo B a temperaturas de 4°C y con un pH en torno a 3-4, se muestra en A y B respectivamente.

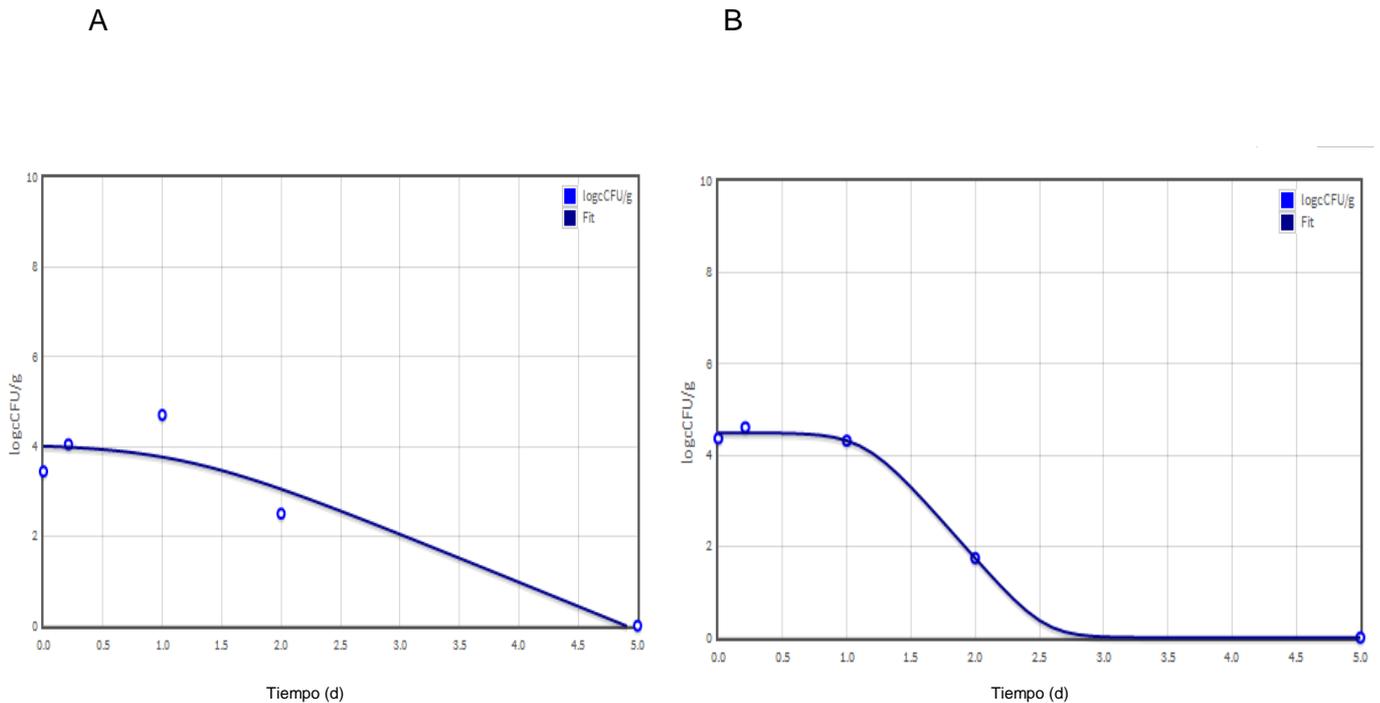


Fig.5 Supervivencia de EC y ECO en Bebidas refrescantes comerciales de zumos de frutas Tipo B a temperaturas de 20°C y con un pH en torno a 3-4, se muestra en A y B respectivamente.

Cuando se somete a las Bebidas refrescantes tipo B a temperaturas de 4°C, obtenemos que la población de EC y ECO descienden de manera continua y lineal durante todo el proceso, siendo 7 días el tiempo empleado en no detectarse en ambos casos, partiendo de un nivel inicial de 3,49 log cfu/ml en el caso de EC y de 5,06 log cfu/ml en el caso de ECO, como se observa en las Fig.4.A y 4.B

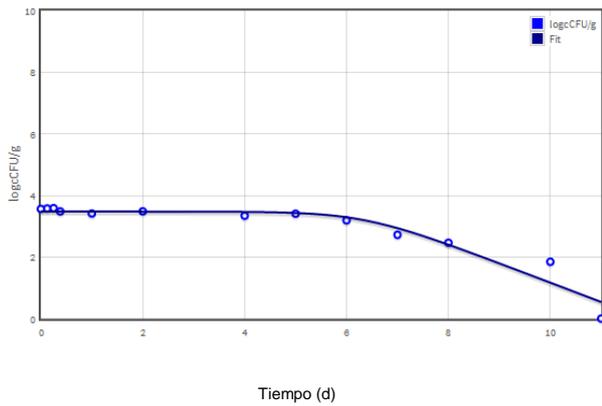
A temperaturas de 20°C la población de EC muestra un descenso continuo, pasando en 5 días de un nivel inicial de 3,44 log cfu/ml a no detectarse, como muestra la Fig. 5.A. A esta misma temperatura como se observa en la Fig.5.B la población de ECO se mantuvo estable (4,36 log cfu/ml) hasta el 1º día, para después descender, no siendo detectable a los 3,2 días.

## 5.2 SUPERVIVENCIA DE *E. COLI* NO PATÓGENA (EC) Y *E. COLI* O157:H7 (ECO) EN PREPARADOS LÁCTEOS COMERCIALES PASTEURIZADOS A 4 Y 20°C

Las curvas de supervivencia de EC y ECO en Preparados lácteos comerciales pasteurizados se presentan en las Figuras 6, 7, 8 y 9.

Tipo A

A



B

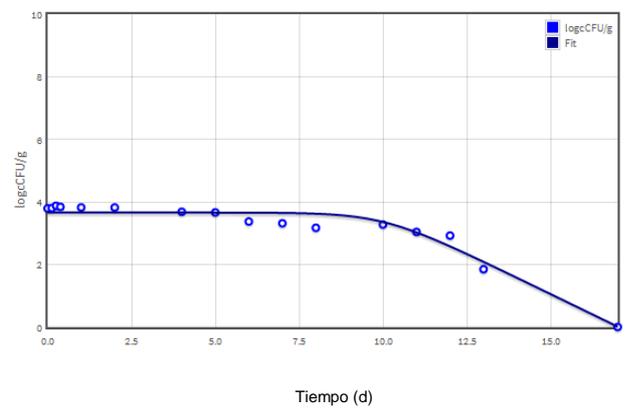
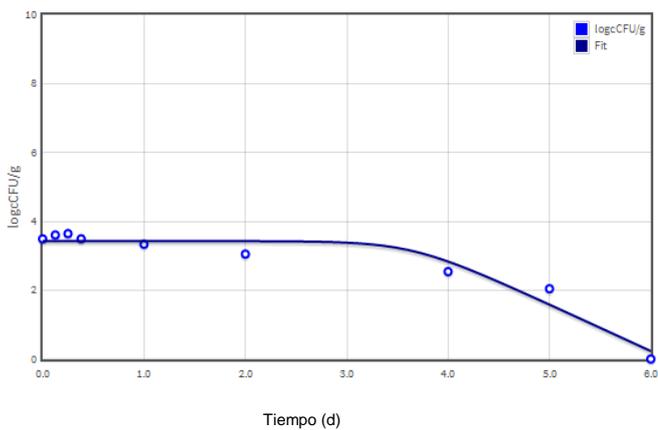


Fig.6 Supervivencia de EC y ECO en Preparados lácteos comerciales pasteurizados de zumos de frutas Tipo A, a temperaturas de 4°C y con un pH en torno a 3-4, se muestra en A y B respectivamente.

A



B

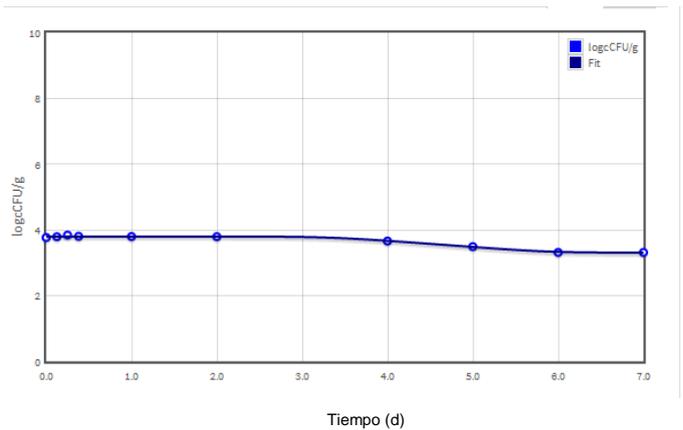


Fig.7 Supervivencia de EC y ECO en Preparados lácteos comerciales pasteurizados de zumos de frutas Tipo A, a temperaturas de 20°C y con un pH en torno a 3-4, se muestra en A y B respectivamente.

En la Fig.6.A se observa que al someter a los Preparados lácteos tipo A a temperaturas de 4°C, la población de EC desciende de manera continua y leve desde un valor inicial de 3,56 log ufc/ml hasta un valor de 2,72 log ufc/ml; a partir del 7º día este descenso se hace más pronunciado no detectándose a los 11 días. En estas mismas condiciones de temperatura observamos en la Fig.6.B que la población de ECO se mantuvo estable (3,8 log cfu/ml) durante los 4 primeros días, para después descender hasta no detectarse a los 17 días.

Como muestra la Fig.7.A, durante los 2 primeros días de incubación a 20°C la población de EC mostró un descenso leve desde un valor inicial de 3,48 log ufc/ml hasta un valor de 3,04 log ufc/ml. A partir del 2º día el descenso es más pronunciado hasta no detectarse al 6º día. La población de ECO a penas muestra cambios durante todo el proceso de incubación a esta temperatura, pasando de un valor inicial de 3,76 log ufc/ml a un valor de 3,31 log ufc/ml a los 6 días, manteniéndose estable como muestra la Fig.7.B.

### Tipo B

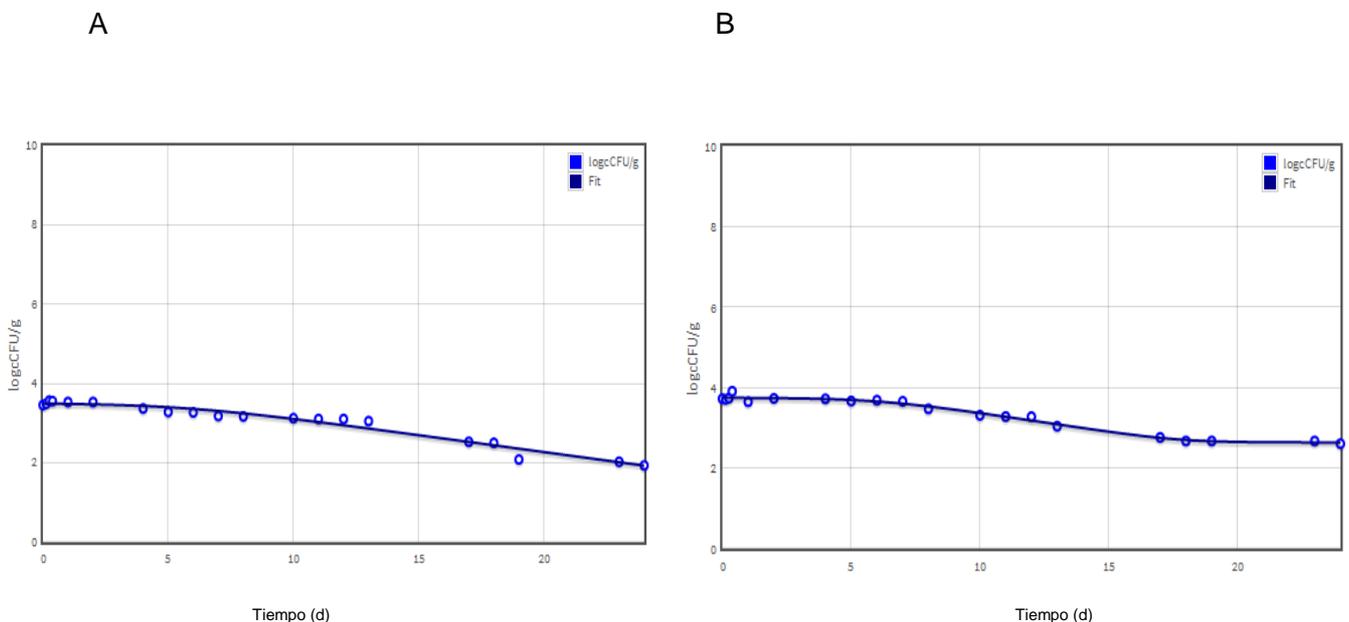


Fig.8 Supervivencia de EC y ECO en Preparados lácteos comerciales pasteurizados de zumos de frutas Tipo B a temperaturas de 4°C y con un pH en torno a 3-4, se muestra en A y B respectivamente.

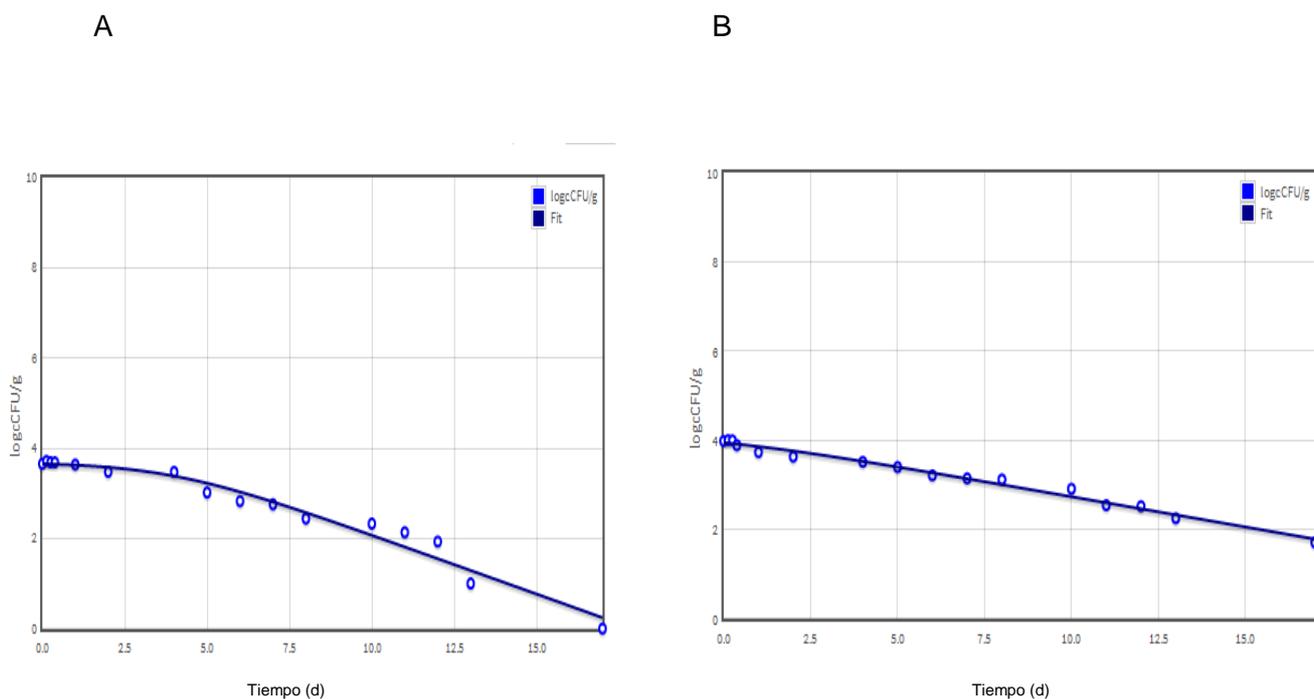


Fig.9 Supervivencia de EC y ECO en Preparados lácteos comerciales pasteurizados de zumos de frutas Tipo B a temperaturas de 20°C y con un pH en torno a 3-4, se muestra en A y B respectivamente.

Al someter a los Preparados lácteos tipo B a temperaturas de 4°C las poblaciones de EC y ECO descienden de manera leve y continua, siendo 24 días el tiempo necesario para pasar de un nivel inicial de 3,45 log cfu/ml a 1,92 log cfu/ml en el caso de EC y de 3,471 log cfu/ml a 2,59 log cfu/ml en el caso de ECO, como muestran las Fig.8.A. y Fig.8.B

En las Fig.9 A y Fig.9.B se observa que a temperaturas de 20°C la población de EC y ECO descienden de manera continua (y lineal en el caso de ECO) durante todo el periodo de incubación. En 17 días la población de EC pasó de un nivel inicial de 3,65 log cfu/ml a no detectarse y la población de ECO descendió desde un nivel inicial de 3,97 log cfu/ml a 1,69 log cfu/ml.

### 5.3 PARÁMETROS ESTIMADOS DE SUPERVIVENCIA DE EC Y ECO A 4 Y 20°C.

Los parámetros estimados de inactivación de EC y ECO obtenidos tras someter a las Bebidas refrescantes A y B a temperaturas de 4°C y 20°C se muestran en la Tabla 1.

Los resultados muestran que el tiempo máximo de latencia encontrado es de 3,78 días que se produce cuando se somete a la ECO de la Bebida refrescante “tipo A” a 4°C, por el contrario el tiempo mínimo de latencia obtenido es de 0,36 días que se genera cuando se somete a la EC de las Bebidas refrescantes “tipo B” a 4°C.

No se obtiene tiempo de latencia cuando se somete a la ECO de las Bebidas refrescantes “tipo B” a temperaturas de 4°C.

La mayor velocidad máxima de decrecimiento encontrada es de -3,23 días<sup>-1</sup> que se obtiene al someter a la ECO de las Bebidas refrescantes “tipo B” a 20°C mientras que la menor velocidad máxima de decrecimiento encontrada es de -0,46 días<sup>-1</sup> que se produce al someter a la EC de las Bebidas refrescantes “tipo B” a 4°C.

El mayor tiempo de disminución encontrado es de -1,52 días, se produce cuando se somete a la EC de las Bebidas refrescantes “tipo B” a 4°C mientras que el menor tiempo de disminución es de -0,21 días y se produce cuando se somete a la ECO de las Bebidas refrescantes “tipo B” a temperaturas de 20°C.

Se obtienen buenos valores de R<sup>2</sup> (0,77- 0,99) y SE (0,11- 0,87).

Bebidas refrescantes	Microorganismo	Temperatura	Parámetros estimados			R <sup>2</sup>	SE
			λ (d)	-μ (d <sup>-1</sup> )	Td (d)		
Bebidas refrescantes tipo A	EC (log cfu/ml)	4°C	1,651 ± 0,587	-0,595 ± 0,0795	-1,165	0,963	0,241
		20°C	1,146 ± 0,396	-1,742 ± 0,357	-0,39	0,978	0,211
	ECO (log cfu/ml)	4°C	3,781 ± 0,198	-1,636 ± 0,183	-0,424	0,976	0,213
		20°C	0,685 ± 0,123	-1,676 ± 0,094	-0,41	0,996	0,111
Bebidas refrescantes tipo B	EC (log cfu/ml)	4°C	0,36 ± 2,288	-0,457 ± 0,158	-1,52	0,827	0,562
		20°C	1,185 ± 1,441	-1,0778 ± 0,425	-0,64	0,774	0,87
	ECO (log cfu/ml)	4°C		-0,626 ± 0,083	-1,11	0,903	0,592
		20°C	1,147 ± 0,201	-3,225 ± 0,706	-0,21	0,993	0,171

Tabla 1. Parámetros estimados de inactivación de EC y ECO en Bebidas refrescantes, donde λ es el tiempo de latencia, -μ la velocidad máxima de decrecimiento, Td el tiempo de disminución (tiempo que tarda en disminuir por dos la población) y SE el error estándar.

Los parámetros estimados de inactivación de EC y ECO obtenidos tras someter a los Preparados lácteos comerciales pasteurizados de tipo A y B a temperaturas de 4°C y 20°C se muestran en la Tabla 2.

El tiempo máximo de latencia encontrado es de 9,99 días, que se obtiene cuando se somete a la ECO de los Preparados lácteos “tipo A” a 4°C mientras que el tiempo de latencia mínimo obtenido es de 1,09 días que se produce cuando se somete a la ECO de los Preparados lácteos tipo B a 20°C.

La mayor velocidad máxima de decrecimiento encontrada es de -1,35 días<sup>-1</sup> que se produce cuando se somete a la EC de los Preparados lácteos “tipo A” a 20°C, por el contrario el menor valor de velocidad máxima de decrecimiento obtenido es de -0,09 días<sup>-1</sup> que se produce al someter a la EC de los Preparados lácteos “tipo B” a una temperatura de 4°C.

El valor más alto obtenido de tiempo de disminución es de -8,09 días que se produce cuando se somete a la EC de los Preparados lácteos “tipo B” a temperaturas de 4°C, por otro lado el menor valor de tiempo de disminución encontrado es de -0,51 días que se produce cuando se somete a la EC de los Preparados lácteos “tipo A” a una temperatura de 20°C.

Se obtienen buenos valores de R<sup>2</sup> (0,92- 0,99) y SE (0,02- 0,31)

Las condiciones de pH se mantienen durante todos los procedimientos en un rango entre 3-4 tanto en las Bebidas refrescantes como en los Preparados lácteos.

Preparados lácteos	Microorganismo	Temperatura	Parámetros estimados			R <sup>2</sup>	SE
			λ (d)	-μ (d <sup>-1</sup> )	Td (d)		
Preparados lácteos tipo A	EC (log cfu/ml)	4°C	6,335 ± 0,571	-0,63 ± 0,0978	-1,1	0,918	0,293
		20°C	3,641 ± 0,342	-1,354 ± 0,255	-0,51	0,929	0,313
	ECO (log cfu/ml)	4°C	9,997 ± 0,46	-0,521 ± 0,0524	-1,33	0,943	0,24
		20°C	3,35 ± 0,223	-0,194 ± 0,0297	-3,57	0,987	0,0239
Preparados lácteos tipo B	EC (log cfu/ml)	4°C	5,717 ± 1,146	-0,0856 ± 0,00658	-8,09	0,956	0,111
		20°C	3,978 ± 0,801	-0,262 ± 0,022	-2,64	0,961	0,213
	ECO (log cfu/ml)	4°C	6,156 ± 0,696	-0,0963 ± 0,00943	-7,19	0,98	0,0631
		20°C	1,0937 ± 0,734	-0,136 ± 0,00808	-5,09	0,982	0,0921

Tabla 2. Parámetros estimados de inactivación de EC y ECO en Preparados lácteos comerciales pasteurizados. Ver leyenda en Tabla 1.

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que el tiempo necesario para no detectarse células viables de EC y ECO en las Bebidas refrescantes y en los Preparados lácteos es menor a temperaturas de 20°C (entre 3-5 días en el caso de las Bebidas refrescantes tipo A y B, 6-17 días en el caso de los Preparados lácteos tipo A y B) que a temperaturas de 4°C (7 días en el caso de las Bebidas Refrescantes tipo A y B, 11- 24 días en el caso de los Preparados lácteos Tipo A y B), lo que concuerda con los datos obtenidos por otros investigadores en condiciones de pH y temperaturas similares.

Según un estudio realizado por Cheng y Chou <sup>15</sup> en el que se inoculan distintos tipos de zumos comerciales (mango y espárragos) y productos lácteos (Yakult y un yogur bajo en grasa) con dos tipos de cepas de *E. coli* O175:H7 adaptadas y no adaptadas previamente en medios ácidos, tras ser sometidas a temperaturas de almacenamiento de 7 y 25°C se obtiene que el tiempo necesario para reducir el número de células en los zumos de mango es menor a temperaturas de 25°C que a temperatura de 7°C.

Por otro lado cuando se somete a los zumos de mango a temperaturas de 7°C, el tiempo necesario para pasar de 6 log CFU/ml a 3.7 log CFU/ml es de 8 días; mientras que en nuestro estudio obtenemos que en las Bebidas refrescantes tipo B, que contienen zumo de mango, a temperaturas un poco menores (4°C), el tiempo necesario para pasar de un nivel inicial de 5,06 log cfu/ml a no detectarse es mucho menor (7 días).

En este estudio se obtuvo también que el tiempo necesario para pasar de 6 log cfu/ml a 1.2 log cfu/ml cuando se sometía un producto lácteo fermentado a temperaturas de 7°C era de 6 días, lo que difiere mucho de los datos obtenidos en nuestro estudio ya que a temperaturas de 4°C en los Preparados lácteos tipo A el tiempo en pasar de un valor inicial de 3.8 log cfu/ml a no detectarse es de 17 días y en los Preparados lácteos Tipo B el tiempo empleado para pasar de un valor inicial de 3,47 log cfu/ml a 2,59 log cfu/ml es de 24 días, manteniéndose estable a partir de ese valor.

En un estudio realizado por Gabriel <sup>16</sup> en el que se introducen distintas cepas de *E. coli* O157:H7 en zumos de manzana y naranja con pHs entre 3-4, se observa que a medida que se aumenta la temperatura a la que se somete a los distintos zumos (45, 50, 52, 55 y 60°C), disminuye el tiempo necesario para inactivar el microorganismo. Esto es debido a que se hace menos resistente a medida que aumenta la temperatura.

De esta forma, mientras que en nuestro estudio el tiempo mínimo necesario para pasar de un nivel inicial de *E. coli* O157:H7 de 3.78 log ufc/ml a no ser detectado en Bebidas refrescantes tras someterla a una temperatura de 20°C fue de 3 días, en este estudio el tiempo necesario para pasar de un nivel inicial de 5 log CFU/ml a un nivel de 1 log CFU/ml cuando se sometía a una temperatura de 60°C es de 8 minutos. Sin embargo hay que tener en cuenta que el tratamiento con calor afecta a la calidad de los alimentos, especialmente a los productos más lábiles a las temperaturas como los zumos de frutas. Es por esto que cada vez hay nuevas técnicas para inactivar los posibles microorganismos patógenos.

La acidificación es una importante medida comúnmente utilizada para controlar el deterioro, el crecimiento y la supervivencia de microorganismos patógenos en los alimentos.<sup>15</sup> Sin embargo estudios anteriores muestran que *E. coli* es capaz de crecer en condiciones ácidas<sup>17,18</sup>; esto podría deberse a una respuesta de adaptación al ácido. Es un fenómeno por el cual el microorganismo muestra un aumento de la resistencia frente al estrés ambiental tras haber estado expuesto a unas condiciones moderadamente ácidas.

En el estudio realizado por Cheng y Chou<sup>15</sup> mencionado anteriormente, se observa que cuando las cepas adaptadas a medios ácidos introducidas en los alimentos se sometían a bajas temperaturas, mejoraba la supervivencia de *E. coli* O157:H7, tanto en los zumos comerciales de mango como de espárragos. Por el contrario, se obtuvo que esta adaptación al ácido en los productos lácteos fermentados utilizados en el estudio, cuando se sometían a temperaturas de 7°C, reducía la supervivencia del microorganismo.

En nuestro estudio, sometiendo a las distintas cepas a un pH bajo (entre 3-4) y a temperaturas de 4 y 20°C, no se observó crecimiento en las concentraciones de manera notable, lo que concuerda con los resultados obtenidos en estudios realizados por Conner y Kotrola<sup>19</sup> y Gabriel y Nakano<sup>20</sup>.

El estudio llevado a cabo por Conner y Kotrola<sup>19</sup> tiene como objetivo determinar el pH necesario para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 a diferentes temperaturas. Para ello utiliza un medio líquido al que se le añaden diferentes ácidos cuantificándose los cambios en la población. Los ácidos utilizados son ácido acético, cítrico, láctico y tartárico; el medio líquido es un caldo de triptosa y soja inoculado con 3 tipos de cepas de *E. coli* O157:H7; el pH se encuentra entre 4-7 y se incuba a temperaturas de 4, 10, 25, 37°C.

Estos autores mostraron que a 4°C y a pHs de entre 4-7 no hubo crecimiento mientras que a temperaturas de 10°C con un pH de 5.5 y de 7 sí que se producía crecimiento. A temperaturas mayores (25 y 37°C), dependiendo del ácido añadido, se observa crecimiento con un pH de 4 (ácido tartárico), aumentando a pHs de 5-7.

En el estudio realizado por Gabriel y Nakano<sup>20</sup> se somete a un tipo de *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* ½ c y *Salmonella enteritidis* a diferentes combinaciones de pH (4-7), temperatura (15, 32.5, 50, 62°C) y actividad de agua (0,94-0,98) para comprobar su respuesta. Se obtiene que con un pH bajo, de 4, y una temperatura de 15°C todos los microorganismos se inactivan, siendo *E. coli* la que presenta la mayor tasa de inactivación (-0,108); que es a su vez mucho menor que la mayor tasa de decrecimiento encontrada en nuestro estudio (-3,225), obtenida al someter a la ECO de las Bebidas refrescantes “tipo B” a 20°C. Por el contrario, el tiempo de latencia en estas condiciones es de 1,14 días mientras que en el estudio de Gabriel y Nakano es de 15,02h.

También hay que tener en cuenta a parte de la temperatura y del pH, la actividad de agua presente en el medio de cultivo o en el alimento a estudiar, ya que en condiciones iguales de temperatura y pH (15°C,7) con una actividad de agua de 0,94 estos autores no obtuvieron crecimiento de *E. coli* ni de *S. enteritidis*, aunque sí de *L.monocytogenes*. Con una actividad de agua de 0,98 encontraron crecimiento de los tres microorganismos, con unas tasas de crecimiento de 0,07 en *E. coli*, 0,08 en *L. Monocytogenes*, 0,12 en *S. enteritidis*.

Estudios anteriores realizados en carne picada de cerdo<sup>21</sup> y zumo de melón<sup>22</sup> muestran que la bacteria *L. Monocytogenes* puede resistir temperaturas más bajas en comparación con *E. coli* y *Salmonella spp* y es capaz de crecer en alimentos ácidos como zumos de tomate<sup>23</sup>, zumos no pasteurizados de manzana y zumos de manzana y frambruesa<sup>24</sup>.

En el estudio de Gabriel y Nakano<sup>20</sup> con unas condiciones de temperatura de 15°C, un pH de 4 y una actividad de agua de 0,94, se muestra que *Listeria monocytogenes* presenta una tasa de inactivación menor (-0,02) en comparación con los otros dos patógenos estudiados (-0,11 en el caso de *E. coli* y de 0,07 en el caso de *S. enteritidis*); lo que concuerda con los datos obtenidos en otros estudios y en el nuestro; ya que su tasa de inactivación es más baja que la menor tasa de decrecimiento encontrada (-0,08), que se produce cuando se somete a la EC de los Preparados lácteos “tipo B” a temperaturas de 4°C.

La combinación de temperatura con sustancias como los ácidos orgánicos, el carvacrol, o en combinación con impulsos de campo eléctrico (PEF) puede suponer una mejora en la inactivación de microorganismos transmitidos por los alimentos. Esto es debido a un efecto sinérgico en el que la inactivación total supera la suma de los efectos de cada método por separado, como muestran diferentes estudios.

El carvacrol es un componente común de aceites esenciales (EO), presente en concentraciones significativas (>10%) en muchas plantas aromáticas como la menta poleo y se utiliza para dar sabor en productos dulces, horneados. Tiene una fuerte actividad antimicrobiana pero su aplicación está limitada debido a que se necesitan altas concentraciones para garantizar la seguridad del alimento; estas altas concentraciones se suelen asociar con sabores indeseables y cambios sensoriales.

La tecnología de impulsos de campo eléctrico (PEF) se está convirtiendo en un método para la conservación de alimentos líquidos y bebidas. Logra la inactivación microbiana por electroporación y es más eficaz en combinación con calor u otros tratamientos no térmicos.

En un estudio realizado por Ait-Ouazzou<sup>25</sup> llevado a cabo en zumos de manzana, mango, naranja y tomate, se sometió a *E. coli* O157:H7 a un tratamiento combinado de carvacrol con baja temperatura y con PEF.

Se obtuvo que cuando se combinaban temperaturas de 54°C y 60°C con 1,3 mMol de carvacrol el tiempo de inactivación de la *E. coli* disminuía, reduciendo el tiempo de tratamiento en un 84% en el zumo de naranja y de un 75% en los zumos de mango, manzana y tomate; cuando se combinaron estas mismas concentraciones de carvacrol con impulsos de campo eléctrico, se observa un fuerte sinergismo en el que se reduce el tiempo de inactivación del microorganismo.

En un estudio llevado a cabo por Espina et al.<sup>26</sup> se combinan temperaturas intermedias de 54°C con ácidos esenciales de frutas con la intención de mejorar el tratamiento con calor y disminuir la intensidad necesaria para conseguir una reducción de 5 log<sub>10</sub>. cuando se introdujeron 200 µL/L de EO de limón junto con el tratamiento de calor, se obtuvo una reducción de la temperatura de 4,5°C, y de la duración del tratamiento en 5,7 veces.

Estos estudios muestran que la combinación de distintas técnicas junto con la aplicación de calor puede suponer una mejora al reducir el tiempo de tratamiento así como la temperatura necesaria para inactivar los posibles microorganismos presentes

en los alimentos, sin producir cambios en las características sensoriales y organolépticas. Hay que tener en cuenta que estos estudios emplean temperaturas superiores a las utilizadas en nuestro estudio por lo que serían necesarios más estudios para comprobar el efecto de estas técnicas con temperaturas de 4 y 20°C.

## 7. CONCLUSIONES

- El tiempo necesario para no detectarse células viables de EC y ECO en las Bebidas refrescantes y en los Preparados lácteos es menor a temperaturas de 20°C que a temperaturas de 4°C.
- En las Bebidas refrescantes el tiempo que se necesita para no detectarse células viables tanto de EC como de ECO es menor que en los Preparados lácteos.
- El tiempo empleado en no detectarse células viables de EC y ECO es menor en las Bebidas refrescantes tipo A que en las tipo B, al igual que en los Preparados lácteos.
- No hubo diferencias significativas en el tiempo empleado para inactivar EC y en el empleado para inactivar ECO dentro de las Bebidas refrescantes; en los Preparados lácteos el tiempo empleado en no detectar células viables de EC fue menor que el empleado con ECO.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Rojas, T., Castillo, Z. Supervivencia de un aislado de *Escherichia coli* O157H:7 en jugos de naranja no pasteurizados de expendio comercial. *Rev. Soc. Ven. Microbiol* 2003; 23 (1):16-20.
- 2.-López-Álvarez, J. *Escherichia coli*: mecanismo de patogenicidad. *Ciencia Veterinaria* 1981; 3:1-39.
- 3.- Murray, PR., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. *Microbiología médica*. 6ª ed. Barcelona: Elsevier; 2009.
- 4.- Barreto, G, Sedrés, M., Ortiz, A., Ricardo, M. Categorías enteropatógenas de *E. coli* en alimentos. *Rev. Prod. Anim.* 2000; 12: 87-90.
- 5.- Rahal, E.A., Kazzi, N., Nassar, F.J., Matar, G.M. *Escherichia coli* O157:H7 - Clinical aspects and novel treatment approaches. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2:138.
- 6.-Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. Consumo de zumos de frutas y de bebidas refrescantes por niños y adolescentes en España. Implicaciones para la salud de su mal uso y abuso. *An Pediatr* 2003; 58: 584-93.
- 7.- Real Decreto 781/2013, de 11 de octubre, por el que se establecen normas relativas a la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana. *Boletín Oficial del Estado*, 12 de octubre del 2013. 245: 83295- 83303. [https://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOE-A-2013-10611](https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2013-10611). (Último acceso 6 de marzo 2016).
- 8.- Real Decreto 650/2011, de 9 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria en materia de bebidas refrescantes. *Boletín Oficial del Estado*, 19 de Mayo del 2011. 119: 50089- 50093. [https://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOE-A-2011-8687](https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2011-8687). (último acceso 6 de marzo de 2016).
- 9.- Real Decreto 1679/1994, de 22 de julio, por el que se establece las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos. *Boletín Oficial del Estado*, 24 de Septiembre de 1994.229:29492-29511. [https://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOE-A-1994-20998](https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-1994-20998). (Último acceso 6 de marzo de 2016).

- 10.- Fratamico, P.M., Bhunia, A.K., y Smith, J.L. Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology. ed. C.A. Press. Norfolk, UK. Caister Academic Press; 2005.
- 11.- Whiting, R.C., Buchanan, R.L. A classification of models for predictive microbiology. Food Microbiol 1993; 10:175-177.
- 12.- Aguirre, J.S. Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a diferentes tratamientos conservantes de alimentos (tesis doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 2013.
- 13.- Baranyi J. and Tamplin M. ComBase: A Common Database on Microbial Responses to Food Environments. J. Food Prot. 2004; 67 (9): 1834- 1840.
- 14.- Baranyi, J., Roberts, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J Food Microbiol 1994; 23: 277–294.
- 15.- Cheng HY., Chou CC. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. Int J Food Microbiol 2001; 70:189–95.
- 16.- Alonzo, A.G. Combinations of selected physical and chemical hurdles to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in Apple and orange juices. Food Control 2015; 50: 722-728.
- 17.- Steele, B. T., N. Murphy, and C. P. Rance. An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. J Pediatr 1982; 101: 963-965.
- 18.- Zhao, T., M. P. Doyle, y R. E. Besser. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. Appl. Environ. Microbiol 1993; 59: 2526–2530.
- 19.- Conner, D. E., Kotrola, J.S. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions, Appl Environ Microbiol 1995; 61: 382–385.
- 20.- Alonzo, A.G., Hiroyuki, N. Responses of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 1/2 c and *Salmonella enteritidis* to pH,  $a_w$ , and temperatura stress combinations. Food Control 2010; 21: 644-650.
- 21.- Murphy, R. Y., Beard, B. L., Martin, E. M., Duncan, L. K., & Marcy, J. L. Comparative study of thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ground pork. J Food Sci 2004; 69: 97–101.

- 22.- Sharma, M., Adler, B. B., Harrison, M. D., & Beuchat, L. R. Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. *Letters in Applied Microbiology* 2005; 41:448–453.
- 23.- Beuchat, L. R., Brackett, R. E. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *App Environ Microbiol* 1991; 57:1367–1371.
- 24.- Sado, P. N., Jinneman, K. C., Busby, G. J., Sorg, S. M., & Omiecinski, C. J. Identification of *Listeria monocytogenes* from unpasteurized apple juice using rapid test kits. *J Food Prot* 1998; 59: 226–229.
- 25.- Ait- Ouazzou, A., Espina. L., García-Gonzalo, D y Pagán, R. Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in Apple, mango, orange, and tomato juices. *Food control* 2013; 32, 159-167.
- 26.- Espina, L., Somolinos, M., Ait- Ouazzou, A., Condón, S ., García-Gonzalo, D., Pegán, R. *Int. J Food Microbiol* 2012; 159: 9-16.