



GRADO NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

Facultad de Medicina

Universidad de Valladolid

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Supervivencia y parámetros cinéticos de *Escherichia coli* en zumos de frutas naturales

Autora: Ana Jiménez García

Tutor: Emiliano J. Quinto Fernández

Valladolid, Junio de 2016

(Curso académico 2015-2016)



Universidad de Valladolid

Dr. Emiliano José Quinto Fernández, Profesor Titular del Área de Nutrición y Bromatología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid

Hace constar:

Que Dña. Ana Jiménez García ha realizado, bajo su dirección, el Trabajo de Fin de Grado titulado "Supervivencia y parámetros cinéticos de *Escherichia coli* en zumos de frutas naturales", que presenta, tras su autorización, para optar al Grado en Nutrición Humana y Dietética.

Y, para que conste donde corresponda, firmo la presente en Valladolid a catorce de Junio de dos mil dieciséis.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Emiliano J. Quinto Fernández", written over a horizontal line.

Dr. Emiliano J. Quinto Fernández

Índice

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. <i>Escherichia coli</i>	6
1.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	7
1.2. Definición zumo de frutas:.....	7
1.3. Microbiología predictiva.....	8
2. OBJETIVO.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
3.1. Zumos naturales de frutas.....	9
3.2. Cepas bacterianas.....	10
3.3. Condiciones de cultivo.....	10
3.4. Modelo trilineal.....	10
4. RESULTADOS.....	12
5. DISCUSIÓN.....	24
6. CONCLUSIONES.....	27
7. BIBLIOGRAFÍA.....	28

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Escherichia coli se encuentra en el sistema digestivo de animales y seres humanos. Aunque generalmente este microorganismo es inofensivo, puede causar diversas patologías, algunas de ellas graves. En los últimos años ha habido un aumento de los brotes, con un impacto significativo en los sistemas de salud y producción agrícola. Entre las fuentes más comunes de infecciones transmitidas por los alimentos se incluyen los zumos de frutas no pasteurizados, las frutas y las hortalizas crudas.

El objetivo del presente trabajo de investigación es estudiar el crecimiento/supervivencia de *Escherichia coli* no patógeno y *Escherichia coli* O157:H7 a lo largo del tiempo en distintos zumos naturales de frutas a temperatura de refrigeración (4°C) y a temperatura ambiente (20°C). Para ello se ha utilizado un modelo predictivo de crecimiento bacteriano denominado modelo lineal trifásico o modelo trilineal con el que se han obtenido gráficas de supervivencia que reflejan la densidad de población del microorganismo expresada en log ufc/ml frente al tiempo expresado en días. Con estas graficas se ha analizado el comportamiento de cada serotipo estudiado, relacionando la tasa de supervivencia o muerte con la temperatura y el pH.

Los resultados muestran que existe mayor supervivencia de ambos serotipos cuanto mayor es el pH del zumo y que, cuando se trata de un pH más bajo, el almacenamiento a temperaturas bajas aumenta la supervivencia de *E. coli* y *E. coli* O157:H7. Por otra parte, *E. coli* tiene menor tasa de supervivencia a 20°C que *E. coli* O157:H7, es decir, muerte antes. Por lo tanto, la temperatura y el pH son factores que condicionan el crecimiento de *E. coli* y *E. coli* O157:H7.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, Zumos naturales de frutas, temperatura, pH, supervivencia.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Escherichia coli*

Desde 1885, año en el que fue aislado por primera vez en heces de niños y descrito por el bacteriólogo alemán Theodor Escherich, el estudio científico sobre *Escherichia coli* ha sido prodigado en tal medida que en la actualidad probablemente sea el organismo de vida libre que mejor se conoce (Adams M.R. y Moss M.O., 1995)

Las bacterias de la especie *Escherichia coli* pertenecen al género *Escherichia*, de la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo corto, Gram-negativo, catalasa-positivo, oxidasa negativo, anaerobio facultativo. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar. La especie es rojo metilo positiva y Voges-Proskauer negativa, y no crece en el medio de citrato de Simmons, produciendo Indol la mayoría de las cepas. (ICMSF, 1996)

Es un microorganismo mesófilo que crece a temperatura desde 7-10°C hasta 50°C, siendo su temperatura óptima de crecimiento en torno a 37°C. El pH óptimo para su crecimiento es casi neutro aunque puede crecer a pH inferior a 4,4. Su a_w mínima de crecimiento es 0,95 (Adams M.R. y Moss M.O., 1995).

E. coli forma parte del intestino de las personas y de animales de sangre caliente, encontrándose habitualmente en las heces. Por lo general es un comensal inofensivo, pero puede ser un patógeno oportunista que cause algunas infecciones en vías respiratorias, neumonías, en enfermos con inmunosupresión, meningitis en recién nacidos, sepsis (OMS, 2011).

La clínica de la enfermedad va a depender del tipo de *E. coli* patógeno intestinal que causa la infección. Se han relacionado con la enfermedad transmitida por alimentos cuatro tipos principales de *E. coli*: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) y *E. coli* enterohemorrágico (*E. coli* 0157:H7; EHEC) (OMS, 2011).

La bacteria se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados. Entre las fuentes más frecuentes se incluyen productos lácteos y zumos no pasteurizados, carne picada cruda o poco cocida, frutas, hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas (OMS, 2011).

1.2. *Escherichia coli* O157:H7

El primer aislamiento confirmado de *E. coli* O157:H7 en los Estados Unidos fue en 1975, pero no fue hasta 1982 cuando la bacteria se identificó por primera vez como patógeno humano, relacionándose con dos brotes de colitis hemorrágica producidos por alimentos (ICMSF, 1996).

La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas, sin embargo algunas como *E. coli* O157:H7 pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos (OMS, 2011). El mecanismo de patogenicidad de *E. coli* O157:H no ha sido aclarado del todo. Sin embargo, se han identificado varios factores de virulencia importantes (ICMSF, 1996). *E. coli* O157:H7 produce dos citotoxinas denominadas Verotoxinas o toxinas Shiga. Estas toxinas son citotóxicas para las células Vero (línea celular del riñón) (OMS, 2011).

E. coli O157:H7 es el agente causante de colitis hemorrágica, HUS (Síndrome Urémico Hemolítico) y púrpura trombótica trombocitopénica (púrpura thrombocytopenic thrombotic, TTP. En España, durante el año 2014, fueron notificados un total de 10 aislamientos de *Escherichia coli* O157 (Sistema de Información Microbiológica, 2015).

El análisis retrospectivo de alimentos relacionados con brotes de infección con *E. coli* O157:H7 reveló que la dosis infectiva es baja (< 100 ufc/g). La facultad del patógeno para tolerar los medios ácidos permite que sobreviva al medio ácido del estómago (OMS, 2011).

E. coli O157:H7 se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como carne picada cruda o poco cocida, leche cruda. La contaminación fecal del agua y de otros alimentos así como la contaminación cruzada durante la preparación de estos también causa infecciones (OMS, 2011).

1.2. Definición zumo de frutas:

Según el 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:

El zumo de frutas es el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de las partes comestibles de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por refrigeración o congelación, de una o varias especies mezcladas, que posea el color, el aroma y el sabor característicos del zumo de la fruta de la que

procede. Se podrán reincorporar al zumo el aroma, la pulpa y las células obtenidos por los medios físicos apropiados que procedan de la misma especie de fruta.

En el caso de los cítricos, el zumo de frutas procederá del endocarpio. No obstante, el zumo de lima podrá obtenerse a partir del fruto entero.

Cuando los zumos se obtengan a partir de frutas que incluyan pepitas, semillas y pieles, no se incorporarán en el zumo partes o componentes de las pepitas, las semillas o la piel. La presente disposición no se aplicará a los casos en que las partes o los componentes de las pepitas, las semillas o la piel no puedan eliminarse mediante las buenas prácticas de fabricación.

1.3. Microbiología predictiva

La microbiología predictiva consiste en el desarrollo de modelos matemáticos para predecir la velocidad de crecimiento o de declinación de los microorganismos en función del medio que le rodea, es decir, de las condiciones ambientales (Walls y Scot, 1997). Cada uno de los factores intrínsecos de un alimento influye sobre el desarrollo microbiano. Dentro de los factores determinantes que predominan en el crecimiento de microorganismos, destacan pH, a_w y temperatura (Pooni y Mead, 1984). El estudio de la respuesta de los microorganismos a estas variables nos ayudaría a estimar su desarrollo en los alimentos. La microbiología predictiva pretende relacionar cada factor determinante con el crecimiento o supervivencia de los microorganismos.

La microbiología predictiva comprende el estudio de la respuesta de crecimiento de microorganismos que crecen en los alimentos frente a factores que les afectan y a partir de estos datos predecir lo que sucederá en el almacenamiento (Roberts y Jarvis, 1983).

El modelo predictivo del crecimiento bacteriano describe la tasa de crecimiento en función de una serie de variables independientes. Existen varios esquemas para categorizar los modelos predictivos de crecimiento bacteriano. Uno de ellos divide dichos modelos en modelos de crecimiento y modelos de inactivación/supervivencia. Dentro de las diferentes categorías se subdividen en modelos primarios, secundarios y terciarios (Whiting y Buchanan, 1994; Alzamora y col., 1995; López- Malo, 2000; Alzamora y col., (2010).

1. Modelos primarios: describen cambios en la respuesta microbiana frente al tiempo en un ambiente específico. Con estos modelos se pueden cuantificar unidades formadoras de colonia por mililitro o por gramo, formación de toxinas,

niveles de sustrato o productos metabólicos. Una vez generada la curva de crecimiento o muerte microbiana, se utiliza una función o ecuación matemática para describir el cambio de la respuesta en función del tiempo. Un ejemplo del modelo primario es el modelo trilineal o modelo lineal trifásico.

2. Modelos secundarios: describen las respuestas de los parámetros de los modelos primarios frente a cambios en uno o más factores ambientales como temperatura, pH o a_w .
3. Modelos terciarios: son rutinas de software que convierten los modelos primarios y secundarios en programas que pueden calcular las respuestas microbianas frente a condiciones que no fueron evaluadas inicialmente, comparar el efecto de diferentes condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos.

2. OBJETIVO

El presente trabajo tiene como objetivo observar el crecimiento/supervivencia de *Escherichia coli* no patógeno y *Escherichia coli* O157:H7 a lo largo del tiempo en Zumos Naturales de Frutas a dos temperaturas distintas, 4°C y 20°C.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Zumos naturales de frutas

En el laboratorio se elaboraron 2 lotes de cada uno de los zumos a razón de 1 litro cada uno.

- Melocotón
- Naranja
- Piña
- Manzana
- Ciruela

Proceso de elaboración:

- Materia prima: Los zumos fueron obtenidos a partir de frutos sanos, frescos y maduros.
- Lavado y pelado: Las frutas se lavaron con agua potable y luego se realizó el pelado de cada una de ellas.

- Extracción del zumo: (i) Trituración o molturación: La fruta, una vez pelada, pasa a través de un extractor de zumo (Moulinez Frutelia ME28) donde se desintegra, obteniéndose el zumo. (ii) Prensado: Esta operación fue aplicada solo con naranjas, donde se utilizó un equipo comercial. La eficiencia de esta operación depende, una vez más, de la textura, la variedad, grado de madurez y frescura de la fruta de partida.
- Tamizado: Si el zumo bruto contiene excesiva pulpa en suspensión o partículas grandes es necesario realizar un tamizado adicional con un colador metálico o tamiz.
- Envasado: El zumo fue envasado a razón de 100 ml en botellas de tapón roscado de 250 ml de capacidad.
- Tratamiento térmico: los zumos se esterilizaron a 115°C durante 15 min.
- Almacenamiento: Una vez obtenido el zumo, se almacenó a una temperatura de 4°C.

3.2. Cepas bacterianas

Escherichia coli no patógeno CECT 516 (EC)

Escherichia coli O157:H7 CECT 4076 y CECT 4267 (ECO): ambas cepas bacterianas se inocularon juntas en los zumos de frutas naturales utilizados para el estudio.

3.3. Condiciones de cultivo

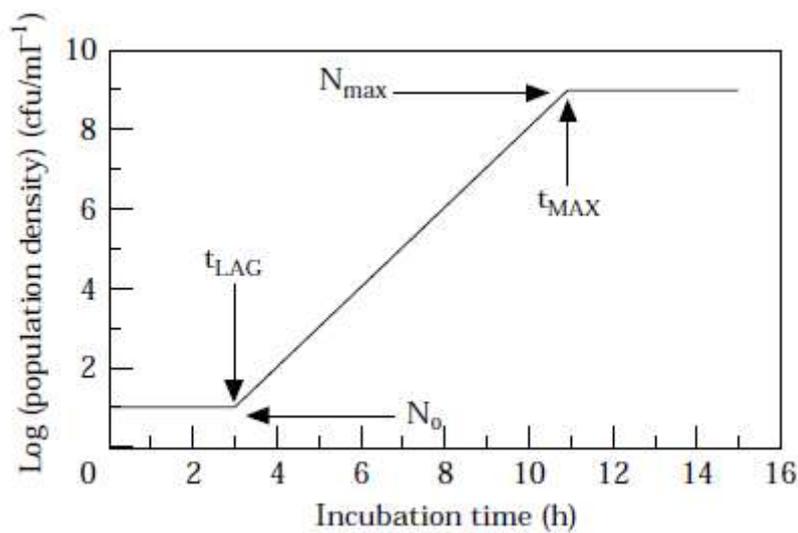
Las poblaciones enumeradas a continuación se expresaron como log ufc/ml. Los datos fueron obtenidos previamente en el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona. Dichos datos fueron introducidos de forma manual en el programas de software de hoja de cálculo Excel.

3.4. Modelo trilineal

El modelo lineal trifásico fue desarrollado para demostrar cómo se podían describir las curvas de crecimiento utilizando un modelo más simple que los modelos utilizados generalmente, Baranyi y Gompertz. Este modelo se aplicó utilizando la plataforma DMFit (ComBase, IFR, UK; Baranyi and Roberts, 1994).

El modelo trilineal divide las curvas de crecimiento en tres fases (Buchanan y col, 1997): fase de retraso, fase exponencial, y fases de crecimiento estacionario (o fase inmóvil). Al igual que los modelos de Gompertz y de Baranyi, el modelo trilineal no considera la fase de muerte. Durante la fase de retraso, se asume que las células no

se multiplican ya que se adaptan al medio, la velocidad de crecimiento específica es cero ($\mu=0$). Una vez adaptadas, las células comienzan a crecer a una velocidad que es máxima para el microorganismo en el ambiente específico. Durante la fase exponencial de crecimiento, la velocidad de crecimiento específica se asume para ser una constante ($\mu=k$), donde el logaritmo de la población bacteriana aumenta con el tiempo. Por último, una vez alcanzada la fase de crecimiento estacionario no hay aumento neto de población, y la velocidad de crecimiento vuelve a ser cero ($\mu=0$). El modelo trilineal consta de cuatro parámetros: N_0 (Log10 de la densidad demográfica inicial), N_{MAX} (Log10 de la densidad demográfica final), t_{LAG} (tiempo en que la fase de retraso termina), y t_{MAX} (tiempo en que la fase exponencial termina).



Representación gráfica del modelo trilineal

Las tres fases del modelo pueden ser descritas por:

Fase de latencia:

Para $t \leq t_{LAG}$,

$$N_t = N_0$$

Fase de crecimiento exponencial:

Para $t_{LAG} < t < t_{MAX}$,

$$N_t = N_0 + \mu(t - t_{LAG})$$

Fase de crecimiento estacionario:

Para $t \geq t_{MAX}$,

$$N_t = N_{MAX}$$

donde: N_t = Log de la densidad demográfica en el tiempo t [$\text{Log}(\text{cfu ml}^{-1})$]; N_0 = Log de la densidad de población inicial, [$\text{Log}(\text{cfu ml}^{-1})$]; N_{MAX} = Log de la densidad demográfica máxima soportada por el ambiente ($\text{Log}(\text{cfu ml}^{-1})$); t = tiempo transcurrido (h); t_{LAG} = Tiempo cuando la fase de retraso termina (h); t_{MAX} = Tiempo cuando la máxima densidad demográfica es alcanzada (h); μ = velocidad de crecimiento específica [$\text{Log}(\text{cfu ml}^{-1})\text{h}^{-1}$].

Este modelo proporciona medios matemáticos de curvas de ajuste del crecimiento que aproxima la manera tradicional que los microbiólogos tienen para estimar la cinética del crecimiento gráficamente.

4. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó mediante modelado primario la respuesta de *Escherichia coli* no patógeno y *Escherichia coli* O157:H7 en función del tiempo a dos temperaturas (4°C y 20°C).

Las figuras representan el crecimiento de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 como densidad de población, expresado en logaritmo decimal de las unidades formadoras de colonias (log ufc/ml), frente al tiempo, expresado en días.

La Figura 1 muestra el crecimiento de *E. coli* en zumo de melocotón a una temperatura de 4°C. Se observa que no existe variación significativa de la población de *E. coli* durante los primeros 28 días. A partir del día 28 se aprecia una disminución de la población de este microorganismo (de 3,06 ufc/ml a 2,67 ufc/ml), y tras el día 29 se produce un descenso brusco de la población que deja de detectarse cuando se alcanza un tiempo de 30 días.

La Figura 2 muestra el crecimiento de *E. coli* en el zumo de melocotón a una temperatura de 20°C. En la gráfica se observa un aumento de la población de *E. coli* durante los primeros días, pasando de 3,43 ufc/ml, inicialmente, a 4,91 ufc/ml cuando se alcanza un tiempo de 6 días. A partir del día 12 comienza a haber una disminución progresiva de la población y el microorganismo deja de detectarse el día 53.

La Figura 3 muestra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en el zumo de melocotón a una temperatura de 4°C. Aunque no existe una variación significativa en la población de *E. coli* O157:H7 durante los primeros días, en la gráfica se observa un leve aumento pasando de 3,98 ufc/ml a 4,03 ufc/ml. Después, se produce una pequeña disminución

de la población de forma progresiva hasta el día 27. El día 28 se produce un descenso más notable, seguido de un brusco descenso de la población del microorganismo, que deja de detectarse cuando se alcanza un tiempo de 29 días.

La Figura 4 muestra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en el zumo de melocotón a una temperatura de 20°C. Se observa que en un primer momento se produce un aumento de la población, pasando de 3,89 ufc/ml a 7,89 ufc/ml. A partir del día 1, comienza a descender lenta y progresivamente hasta el día 15. Después se produce un brusco descenso de la población, hasta que deja de detectarse el microorganismo el día 53.

La Figura 5 muestra el crecimiento de *E. coli* en el zumo de naranja a una temperatura de 4°C. En la gráfica se observa una primera disminución de la población del *E. coli* que se hace más notable cuando se alcanza un tiempo de 2 días, pasando de 4,12 ufc/ml a 2,94 ufc/ml. A partir del día 2 comienza a producirse un descenso progresivo de la población del microorganismo, hasta que deja de detectarse cuando se alcanza un tiempo de 25 días.

La Figura 6 muestra el crecimiento de *E. coli* en el zumo de naranja a una temperatura de 20°C. En la gráfica se observa una continua disminución de la población del microorganismo. Durante las primeras horas esta disminución es más marcada pasando de 4,27 ufc/ml a 3,58 ufc/ml, y después disminuye la velocidad de muerte hasta las primeras 24 horas del estudio y vuelve a producirse una disminución más rápida de *E. coli* que deja de detectarse el día 8.

La Figura 7 muestra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en el zumo de naranja a una temperatura de 4°C. Al principio se observa una disminución seguida de un aumento de la población del microorganismo en el día 2. Después se produce un notable descenso de la población, pasando de 4,05 ufc/ml en el día 2 a 2,93 ufc/ml en el día 3. A partir del día 3 se observa que la población sigue disminuyendo de forma progresiva hasta que el microorganismo deja de detectarse cuando se alcanza un tiempo de 15 días.

La Figura 8 muestra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en el zumo de naranja a una temperatura de 20°C. En la gráfica se observa una disminución de la población más rápida del día 0 al día 3, pasando de 4,72 ufc/ml a 1,47 ufc/ml. A partir del día 3 continua disminuyendo de forma más paulatina hasta que deja de detectarse el día 8.

La Figura 9 muestra el crecimiento de *E. coli* en el zumo de manzana a una temperatura de 4°C. Durante las primeras 24 horas no se producen cambios significativos en la población de *E. coli*. Cuando se alcanza un tiempo de 19 horas, aproximadamente, comienza producirse un descenso progresivo de la población del microorganismo, que deja de detectarse en el día 2.

La Figura 10 muestra el crecimiento de *E. coli* en el zumo de manzana a una temperatura de 20°C. En la gráfica se observa un ligero aumento de la población de *E. coli* durante las primeras horas. A partir del día 2, en el que se produce un descenso de la población, ésta continúa disminuyendo de forma paulatina hasta el día 15. Del día 15 al 16 se produce un descenso brusco de la población del microorganismo, que deja de detectarse pasando de 2,44 ufc/ml el día 15 a 0 ufc/ml el día 16.

La Figura 11 muestra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en el zumo de manzana a una temperatura de 4°C. Se observa un primer aumento de la población durante las primeras horas, pasando de 2,64 ufc/ml a 3,17 ufc/ml. A partir de las 6 primeras horas se produce una disminución progresiva del microorganismo, que deja de detectarse cuando se alcanza un tiempo de 2 días.

La Figura 12 muestra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en el zumo de manzana a una temperatura de 20°C. En la gráfica se observa un aumento de la población hasta el día 1, pasando de 4,05 ufc/ml a 4,78 ufc/ml. A partir del día 1 comienza a disminuir la población, produciéndose primero un descenso más notable de la misma hasta el día 6 (de 4,78 ufc/ml a 2,92 ufc/ml), seguido de un descenso paulatino hasta el día 54 que deja de detectarse el microorganismo.

La Figura 13 muestra el crecimiento de *E. coli* en el zumo de ciruela a una temperatura de 4°C. En un primer momento se produce un descenso de la población de *E. coli*, seguido de un aumento de la misma cuando el tiempo es de 6 horas. Después se observa un descenso más destacado de la población en el día 1, que se mantiene constante hasta el día 3. A partir del día 3 se produce un nuevo descenso dejando de detectarse el microorganismo cuando se alcanza un tiempo de 4 días.

La Figura 14 muestra el crecimiento de *E. coli* en el zumo de ciruela a una temperatura de 20°C. Durante las primeras horas se observa una disminución más brusca de la población del microorganismo. Después esta se mantiene constante y deja de detectarse cuando el tiempo alcanzado es de 1 día.

La Figura 14 muestra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en el zumo de ciruela a una temperatura de 4°C. Durante las primeras horas hay un descenso paulatino de la población. El día 1 se produce una disminución más destacada, pasando de 3,02 ufc/ml a 1,30 ufc/ml. A partir del día 1 continúa disminuyendo la población de forma más lenta y progresivamente, hasta que deja de detectarse el microorganismo cuando se alcanza un tiempo de 4 días.

La Figura 16 muestra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en el zumo de ciruela a una temperatura de 20°C. En la gráfica se observa una disminución significativa del microorganismo durante las primeras 3 horas, pasando de 3,57 ufc/ml a 1 ufc/ml. A partir de las 3 horas, continúa descendiendo la población de forma más lenta, hasta que deja de detectarse el microorganismo a las 6 horas.

La Figura 17 muestra el crecimiento de *E. coli* en el zumo de piña a una temperatura de 4°C. Durante las primeras horas no se observan cambios significativos en la población de *E. coli*. A partir de las 6 horas se produce una disminución brusca de la población. El microorganismo deja de detectarse cuando se alcanza un tiempo de 2 días.

La Figura 18 muestra el crecimiento de *E. coli* en el zumo de piña a una temperatura de 20°C. Durante las primeras horas no hay cambios significativos. Alrededor de las 4 horas se produce una disminución más notable de la población, pasando de 3,51 ufc/ml, inicialmente, a 2,85 ufc/ml. Después se produce un descenso brusco de la población del microorganismo, que deja de detectarse en el día 1.

La Figura 19 muestra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en el zumo de piña a una temperatura de 4°C. Durante las primeras 12 horas no hay cambios significativos. Después se produce una disminución progresiva de la población, hasta que deja de detectarse el microorganismo cuando se alcanza un tiempo de 2 días.

La Figura 20 muestra el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en el zumo de piña a una temperatura de 20°C. Durante las primeras 6 horas no hay cambios significativos en la población, produciéndose posteriormente una disminución progresiva de la misma, hasta que deja de detectarse el microorganismo en el día 1.

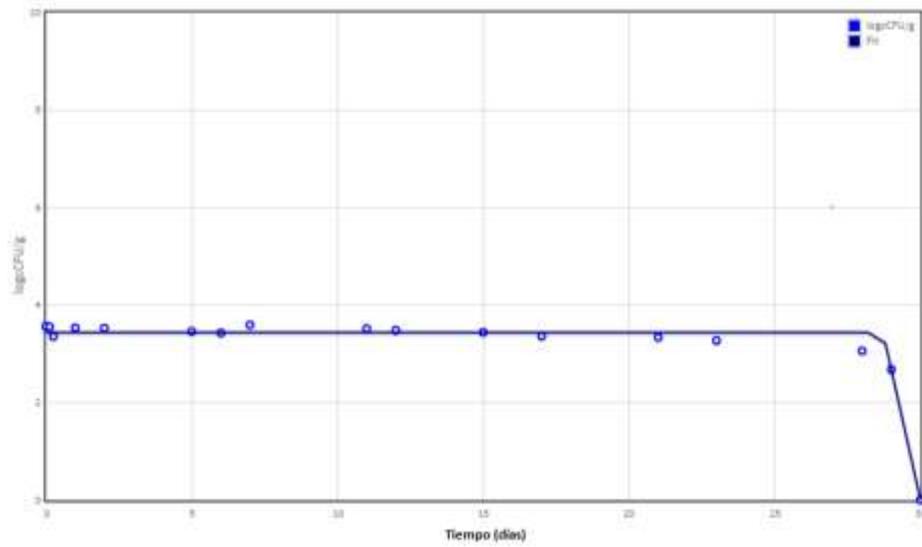


Figura 1. Curva de supervivencia de *E. coli* en zumo de melocotón a 4°C

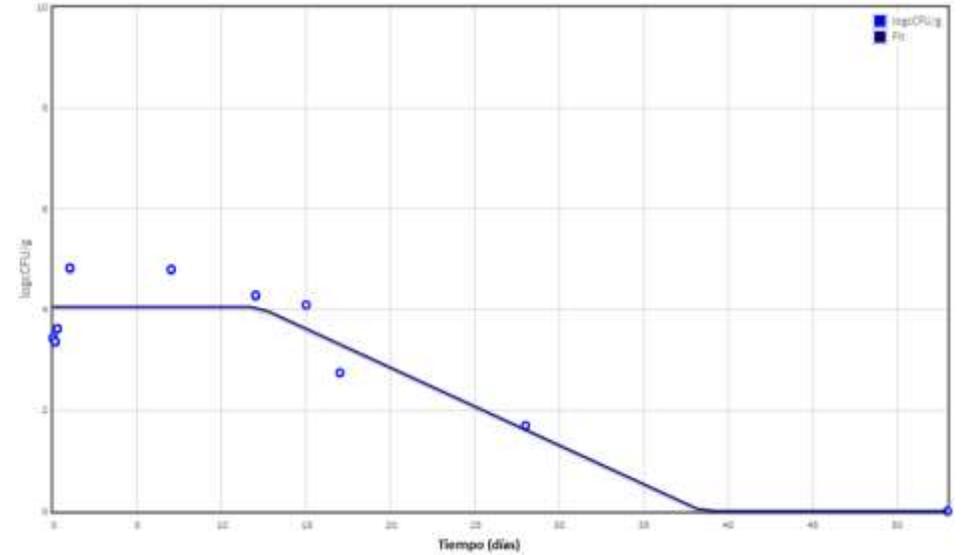


Figura 2. Curva de supervivencia de *E. coli* en zumo de melocotón a 20°C

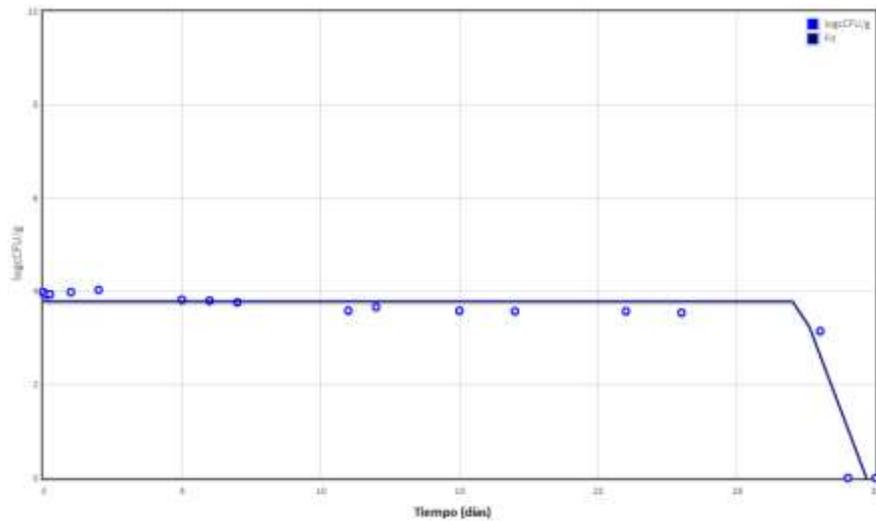


Figura 3. Curva supervivencia de *E. coli* O157:H7 en zumo de melocotón a 4°C

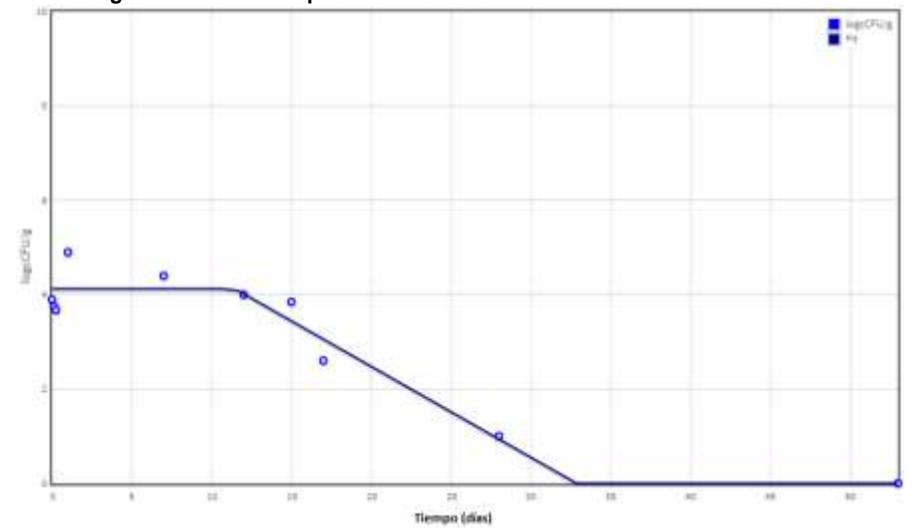


Figura 4. Curva de supervivencia de *E. coli* O157:H7 en zumo de melocotón a 20°C

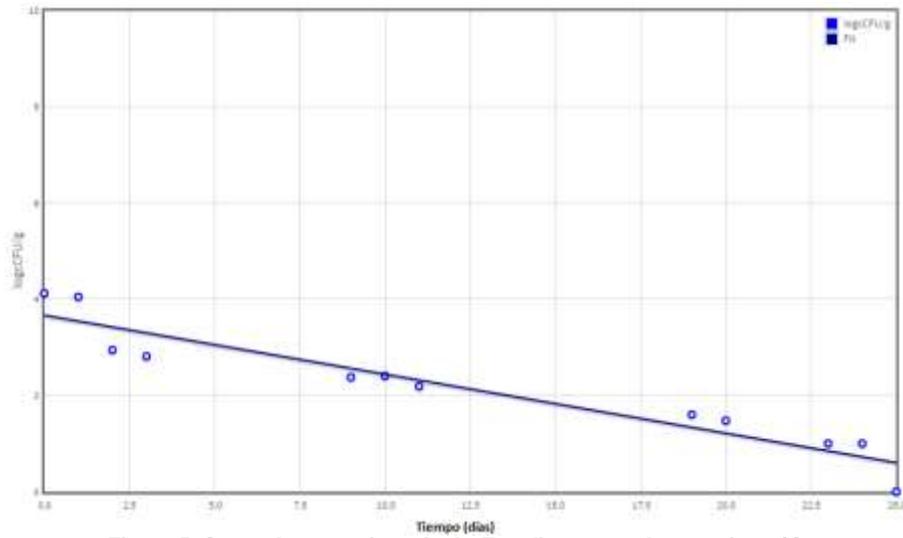


Figura 5. Curva de supervivencia de *E. coli* en zumo de naranja a 4°C

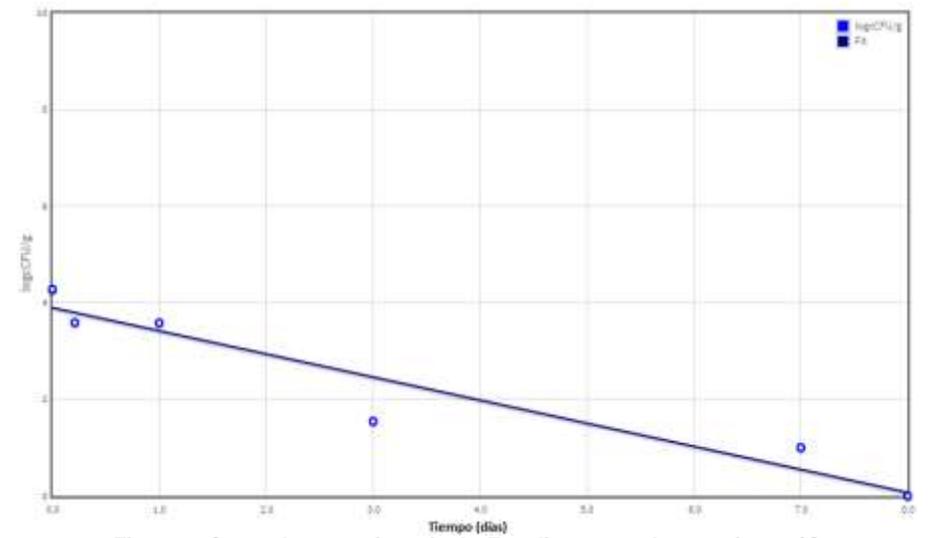


Figura 6. Curva de supervivencia de *E. coli* en zumo de naranja a 20°C

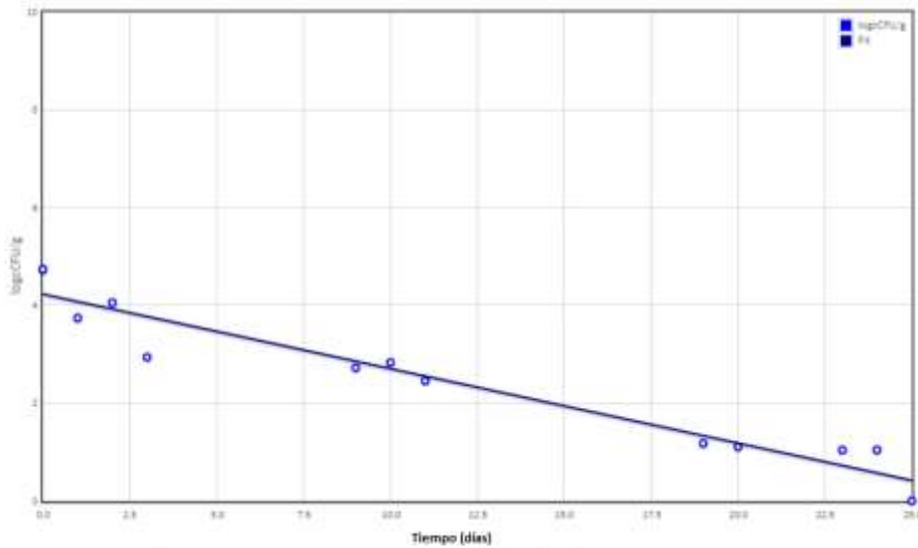


Figura 7. Curva supervivencia de *E. coli* O157:H7 en zumo de naranja a 4°C

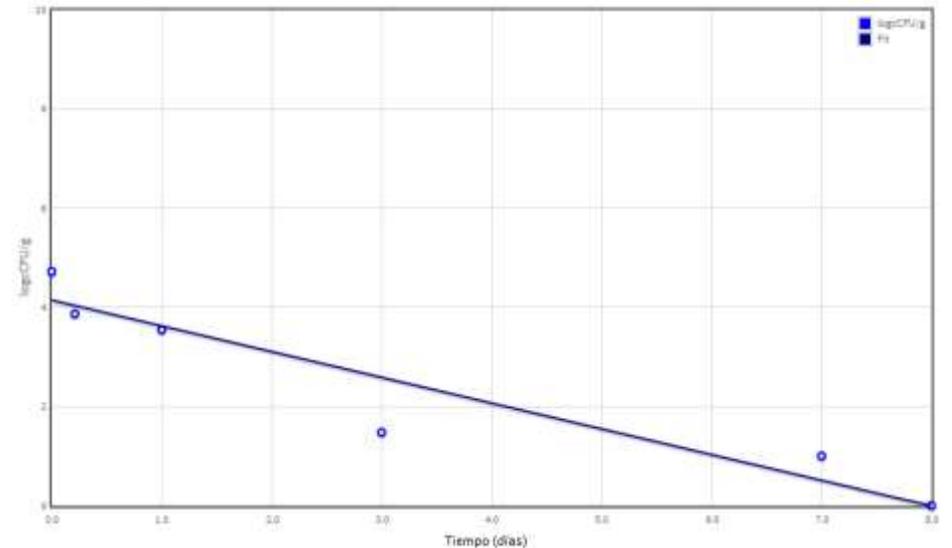


Figura 8. Curva de supervivencia de *E. coli* O157:H7 en zumo de naranja a 20°C

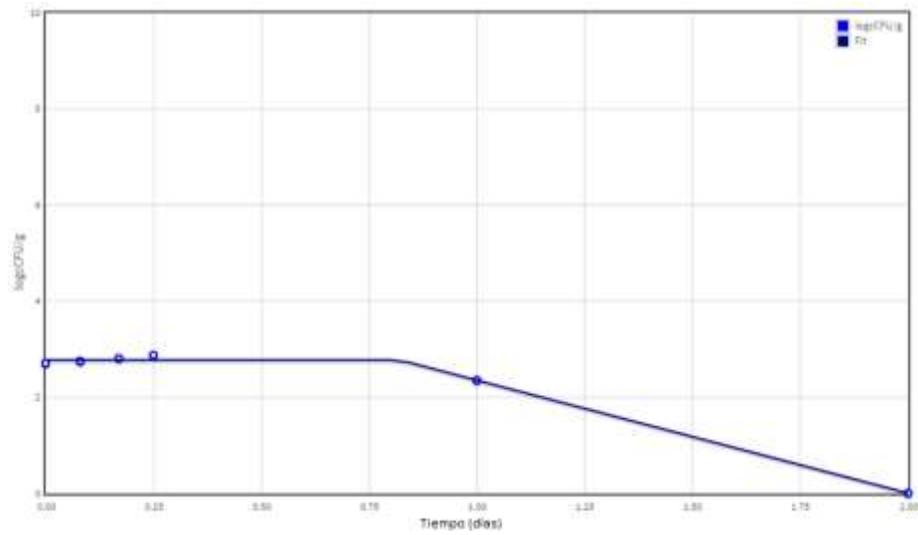


Figura 9. Supervivencia de *E. coli* en zumo de manzana a 4°C

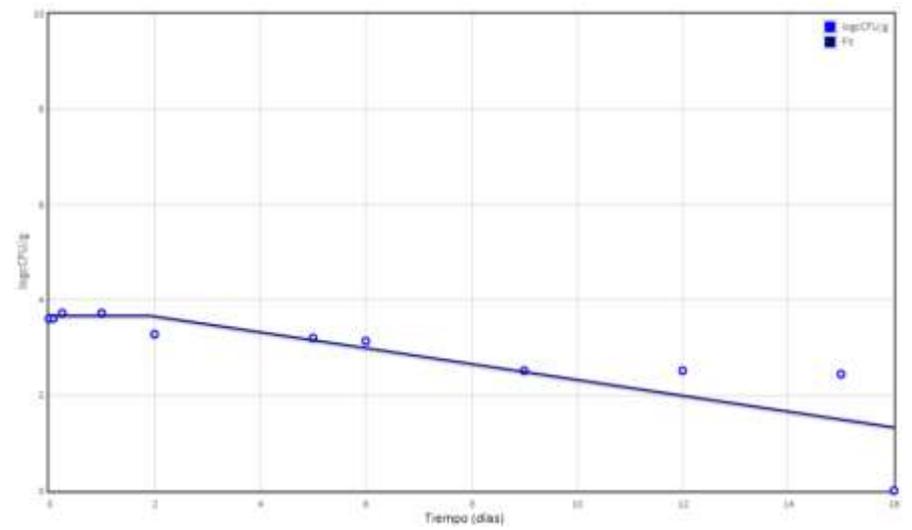


Figura 10. Supervivencia de *E. coli* en zumo de manzana a 20°C

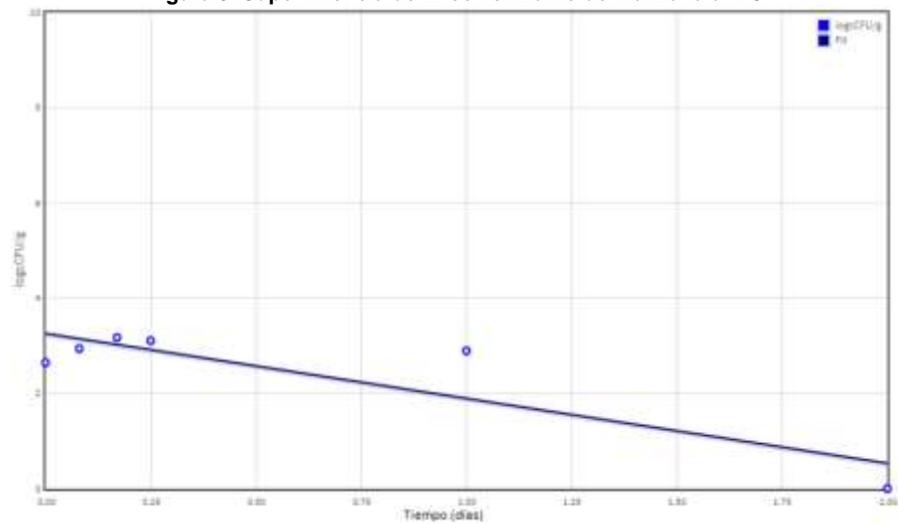


Figura 11. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana a 4°C

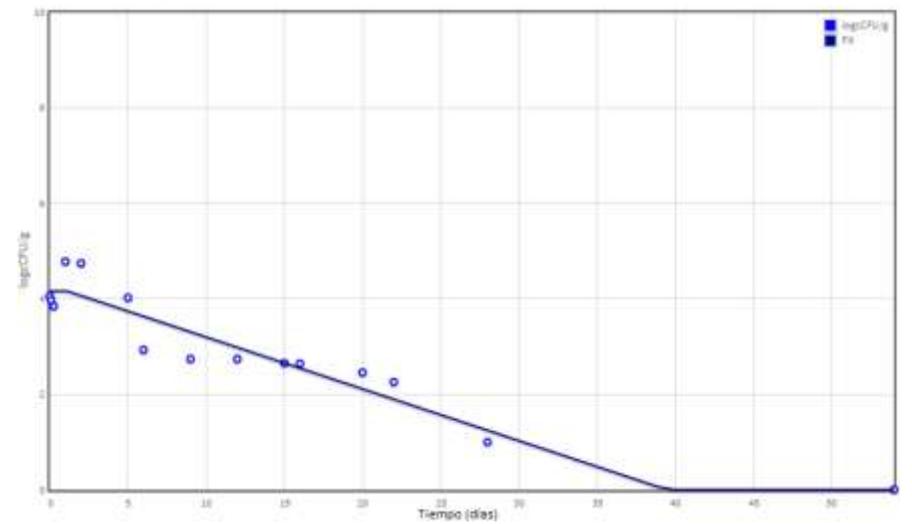


Figura 12. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana a 20°C

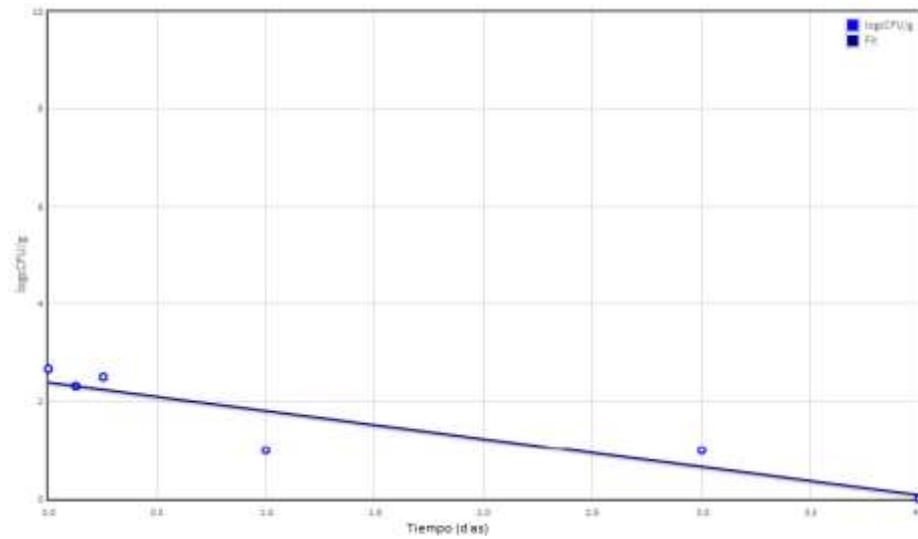


Figura 13. Supervivencia de *E. coli* en zumo de ciruela a 4°C

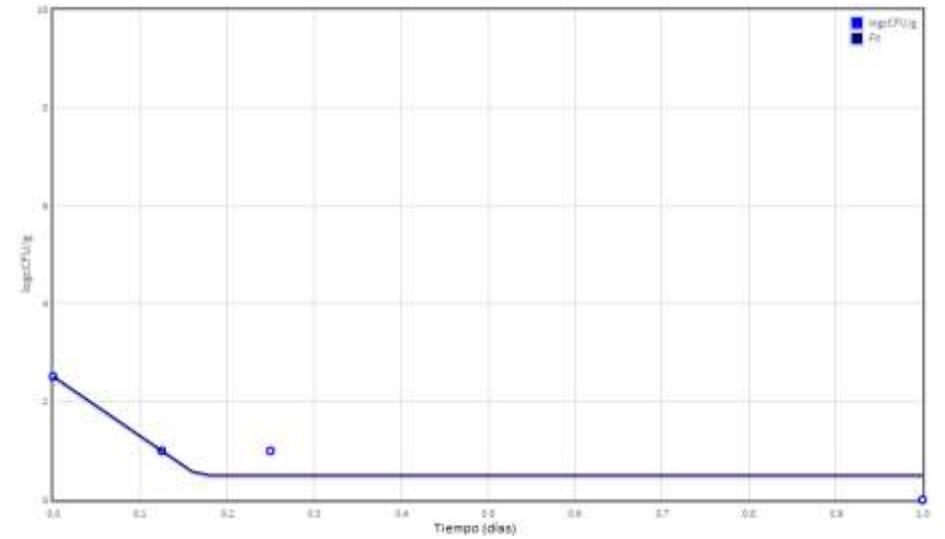


Figura 14. Supervivencia de *E. coli* en zumo de ciruela a 20°C

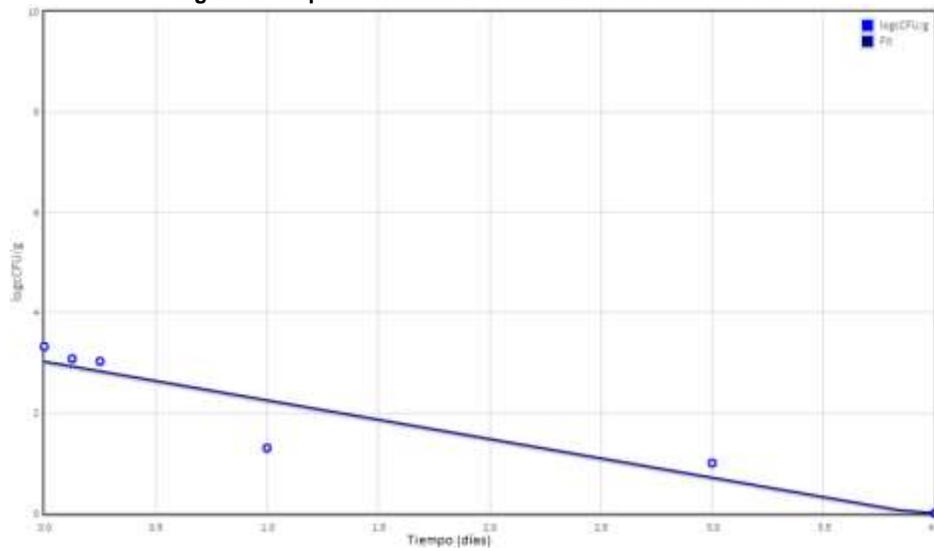


Figura 15. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 en zumo de ciruela a 4°C

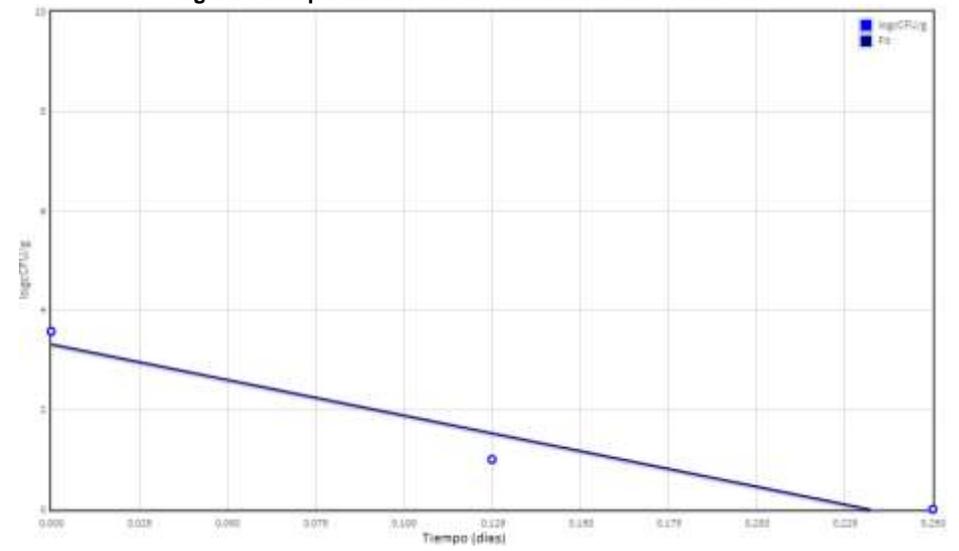


Figura 16. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 en zumo de ciruela a 20°C

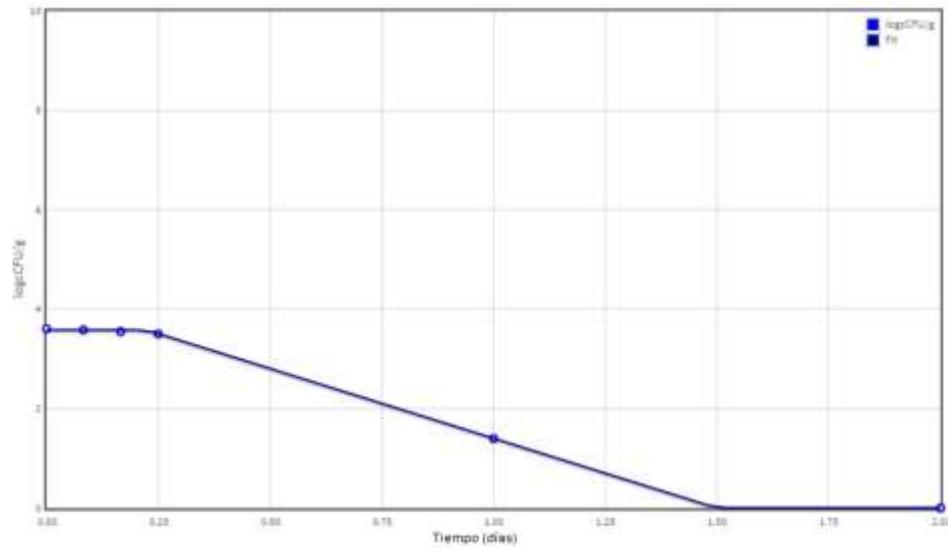


Figura 17. Supervivencia de *E. coli* en zumo de piña a 4°C

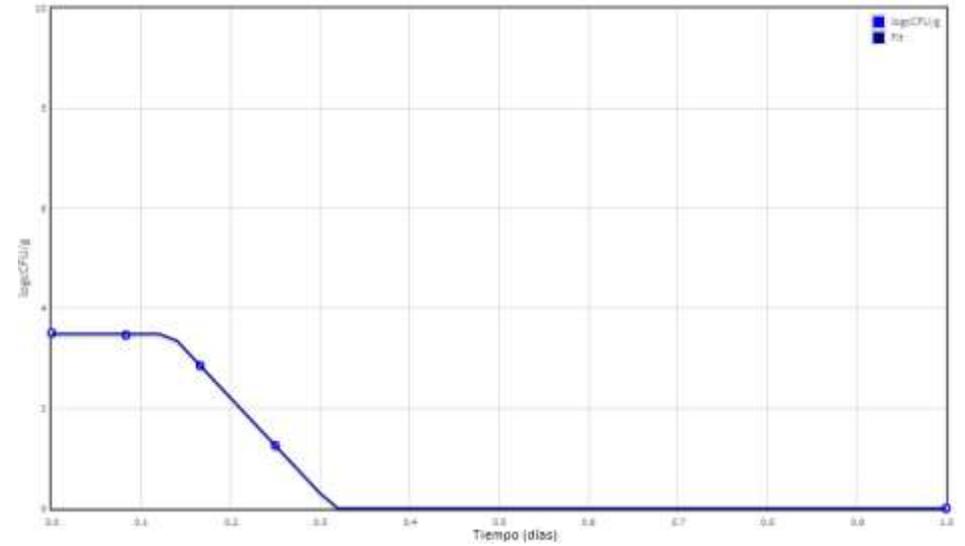


Figura 18. Supervivencia de *E. coli* en zumo de piña a 20°C

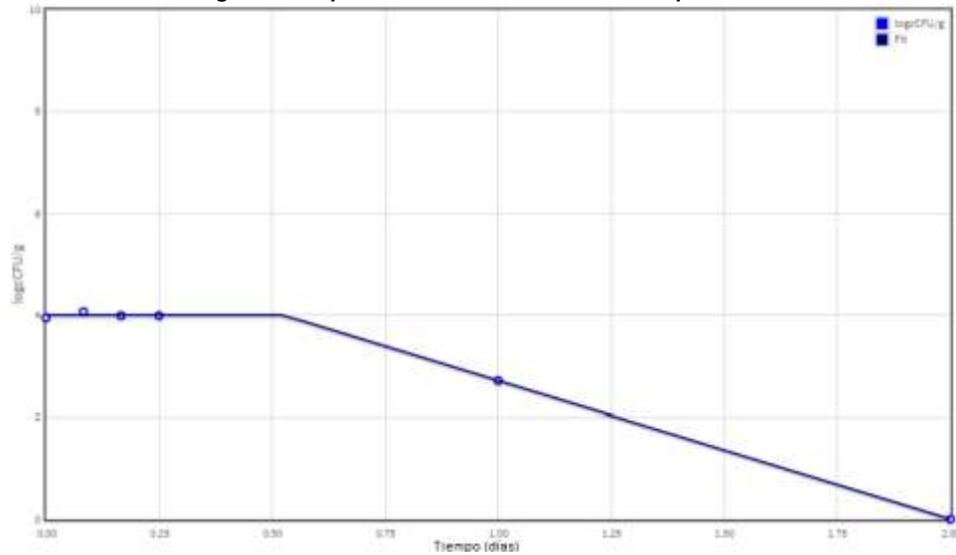


Figura 19. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 en zumo de piña 4°C

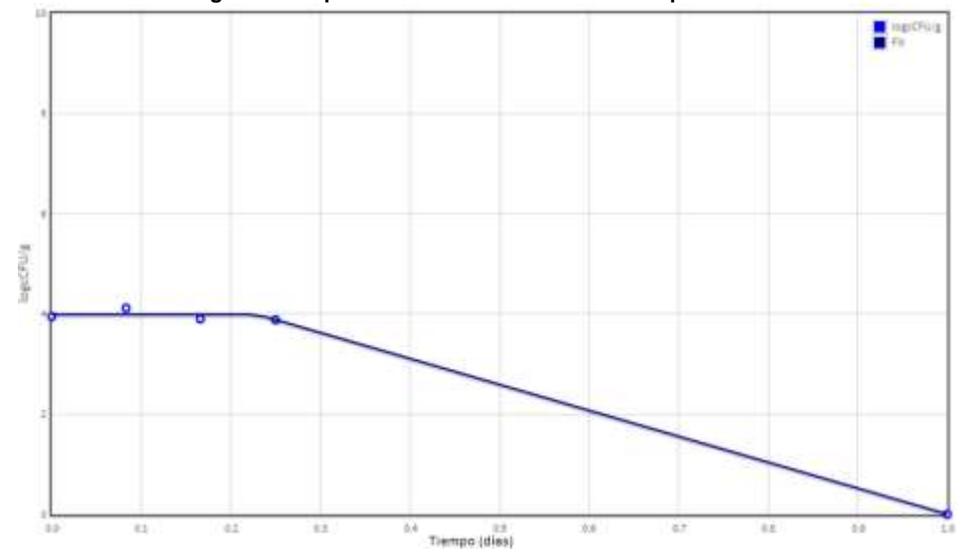


Figura 20. Supervivencia de *E. coli* O157:H7 en zumo de piña a 20°C

En la Tabla 1, a una temperatura de 4°C, para el parámetro λ solo se han encontrado datos en zumo de melocotón, zumo de manzana y zumo de piña. La mayor tasa de supervivencia o muerte se da en el zumo de piña (-2,811), mientras que la mínima velocidad de muerte pertenece al zumo de naranja (-0,123). Como se observa, todos los datos se ajustan correctamente, con un menor ajuste de el zumo de ciruela (0,789).

En la Tabla 1, a una temperatura de 20°C, solo se han encontrado datos del parámetro λ para el zumo de melocotón, el zumo de manzana y el zumo de piña. Como se observa en la tabla, la mayor tasa de supervivencia o muerte se produce en el zumo de piña (-19,0721), mientras que la mínima velocidad de supervivencia se da en el zumo de melocotón (-0,154). Todos los datos se ajustan correctamente, con un menor ajuste en el zumo de ciruela (0,537) y de manzana (0,663).

Comparando los datos a las distintas temperaturas estudiadas, se observa que existe menor ajuste de los datos a 20°C.

En la Tabla 2, a una temperatura de 4°C, para el parámetro λ solo se han encontrado datos en el zumo de melocotón y en el zumo de piña. Según los datos observados, la mayor tasa de supervivencia se produce en el zumo de piña (-2,712), mientras que la menor tasa de supervivencia o muerte la encontramos en el zumo de naranja (-0,152). Todos los datos se ajustan correctamente, siendo este ajuste menor en el zumo de manzana (0,704) y en el zumo de ciruela (0,799).

En la Tabla 2, a una temperatura de 20°C, observamos que se han encontrado datos para el parámetro λ en el zumo de melocotón, zumo de manzana y zumo de piña. La mayor tasa de supervivencia se produce en el zumo de ciruela (-14,308), mientras que la mínima tasa de supervivencia aparece en el zumo de manzana (-0,109). Todos los datos se ajustan correctamente, con un menor ajuste en el zumo de ciruela (0,799).

Tabla 1. Estimaciones de los parámetros de crecimiento de *E. coli* en zumos naturales a 4°C y 20°C. λ : Tiempo de latencia; $-\mu$: Tasa de supervivencia o muerte; R^2 : Coeficiente de determinación; SE: Error estándar

Temperatura	Parámetros de crecimiento estimados		Bondad de ajuste	
	λ	$-\mu$	R^2	SE
4°C				
Zumo melocotón	28,715 ± 0,06 94	-2,677 ± 0,196	0,972	0,139
Zumo naranja	-----	-0,123 ± 0,0125	0,896	0,398
Zumo manzana	0,816 ± 0,0402	-2,352 ± 0,103	0,996	0,0728
Zumo ciruela	-----	-0,58 ± 0,127	0,798	0,482
Zumo piña	0,223 ± 0,0119	-2,811 ± 0,0533	1	0,0283
20°C				
Zumo melocotón	12,17 ± 4,291	-0,154 ± 0,0655	0,743	0,648
Zumo naranja	-----	-0,478 ± 0,0428	0,912	0,493
Zumo manzana	1,928 ± 3,176	-0,166 ± 0,0483	0,663	0,625
Zumo ciruela	-----	-12,148 ± 8	0,537	0,707
Zumo piña	0,133 ± 0,00267	-19,0721 ± 0,532	1	0,0316

Tabla 2. Estimaciones de los parámetros de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en zumos naturales a 4°C y 20°C. Ver leyenda en Tabla 1.

Temperatura	Parámetros de crecimiento estimados		Bondad de ajuste	
	λ	$-\mu$	R^2	SE
4°C				
Zumo melocotón	27,262 ± 0,33	-1,573 ± 0,266	0,907	0,376
Zumo naranja	-----	-0,152 ± 0,0123	0,927	0,416
Zumo manzana	-----	-1,364 ± 0,38	0,704	0,664
Zumo ciruela	-----	-0,772 ± 0,247	0,799	0,617
Zumo piña	0,524 ± 0,0304	-2,712 ± 0,0715	0,999	0,0505
20°C				
Zumo melocotón	11,461 ± 2,195	-0,193 ± 0,0406	0,901	0,491
Zumo naranja	-----	-0,52 ± 0,0745	0,879	0,634
Zumo manzana	1,119 ± 3,228	-0,109 ± 0,0182	0,882	0,453
Zumo ciruela	-----	-14,308 ± 3,642	0,799	0,617
Zumo piña	0,229 ± 0,0257	-5,176 ± 0,213	0,996	0,113

5. DISCUSIÓN

En el estudio se ha observado que tanto *Escherichia coli* no patógeno como *E. coli* O157:H7 dejan de detectarse antes en los zumos que tienen un pH más bajo (piña y ciruela), mientras que en el zumo de melocotón (a 4°C y 20°C) y en el zumo de manzana (a 20°C), que tienen el pH más alto, *E. coli* y *E. coli* O157:H7 tienen mayor supervivencia, es decir, tardan más tiempo en dejar de detectarse.

Comparando la supervivencia entre *E. coli* y *E. coli* O157:H7 en el mismo zumo y a la misma temperatura, ésta es muy similar por lo que no podemos obtener conclusiones de qué cepa tiene mayor supervivencia en las mismas condiciones de pH y temperatura.

El pH óptimo para el crecimiento de *E. coli* es casi neutro aunque puede crecer a pH inferior a 4,4 (Adams M.R. y Moss M.O., 1995). Según los resultados del estudio, tanto *E. coli* como *E. coli* O157:H7 fueron capaces de sobrevivir hasta 25 días en un pH ≤ 4 (zumo de naranja) a 4°C, y *E. coli* O157:H7 sobrevivió hasta 53 días a 20°C en un pH $< 4,3$ (zumo de melocotón), y hasta 54 días a 20°C en un pH entre 4,43 y 3,94 (zumo de manzana). El serotipo *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir durante mucho tiempo en alimentos ácidos (Cameron y col., 1995).

Debido a ciertas circunstancias, durante el recuento de las cepas se produjo una interrupción desde el día 28 hasta el día 53 en el zumo de melocotón y en el zumo de manzana a una temperatura de 20°C.

En el zumo de melocotón, *E. coli* pasa de 1,69 ufc/ml el día 28 a 0 ufc/ml el día 53, y *E. coli* O157:H7 pasa de 1 ufc/ml el día 28 a 0 ufc/ml el día 53. Mientras que en el zumo de manzana a 20°C, *E. coli* deja de detectarse el día 16, es decir, antes de que se produzca la interrupción, pero *E. coli* O157:H7 pasa de 1 ufc/ml el día 28 a 0 ufc/ml el día 54.

Esto podría invalidar o alterar los resultados descritos anteriormente sobre la supervivencia de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 en el zumo de melocotón y manzana a un pH $< 4,4$. Sin embargo, apoyándonos en las gráficas de supervivencia de estas cepas obtenidas mediante un modelo predictivo, se observa que en el zumo de melocotón a 20°C *E. coli* deja de detectarse el día 39 y *E. coli* O157:H7 el día 33; y en el zumo de manzana a 20°C *E. coli* O157:H7 dejaría de detectarse el día 40. Por lo tanto, la supervivencia de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 seguiría siendo amplia en un pH ácido ($< 4,4$).

Diversos trabajos han descrito la tolerancia de cepas de *E. coli* patógenas a pH bajo (Glass y col. 1992). Zhao y Doyle (1994) demostraron que *E. coli* O157:H7 sobrevivió en

sidra de manzana (pH 3,6-4) durante 10-31 días a 8°C y 2-3 días a 25°C. La resistencia a los ácidos puede permitir que este patógeno sobreviva en medios ácidos como zumos de frutas, sidra de manzana, mayonesa, así como a los ácidos del estómago del hombre (Small y col., 1994; Benjamin y Datta, 1995).

Por otra parte se ha observado en el estudio que en el zumo de melocotón y manzana, tanto *E. coli* como *E. coli* O157:H7 tienen mayor supervivencia a 20°C, mientras que en el zumo de piña, zumo de ciruela y zumo de naranja, existe mayor supervivencia a 4°C. La menor tasa de muerte de *E. coli* O157:H7 a temperaturas más bajas se debe probablemente a una reducción del metabolismo total del organismo a temperaturas más bajas (Strawn y Danyluk, 2009). Nair y col. (2005) explicaron que estos resultados se podían relacionar con cambios en la fluidez de la membrana de las células cuando éstas son expuestas a temperaturas de refrigeración. Estos cambios pueden interferir con la entrada de los compuestos antimicrobianos en las células, reduciendo los efectos de dichos antimicrobianos. Además, los microorganismos son fisiológicamente más activos a temperatura ambiente que a temperatura de refrigeración. A temperatura de refrigeración, las reacciones biológicas en las células son más lentas y pueden ser menos sensibles a los compuestos antimicrobianos que a temperatura ambiente (Yuste y Fung, 2003, 2004). Numerosos estudios han demostrado que la supervivencia es más prolongada a temperatura de refrigeración que a temperatura ambiente (Zhao y Doyte, 1994; Weagant y col., 1994; Tsai y Ingham, 1997).

Fijándonos en el pH de los zumos, observamos que a 20°C tanto *E. coli* como *E. coli* O157:H7 tienen una supervivencia más prolongada en los zumos con valores de pH más altos, siendo dicho pH entre 4,7 y 3,5 en el zumo de melocotón, y entre 4 y 3,7 en el zumo de naranja, mientras que la supervivencia más prolongada de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 a 4°C se da en los zumos con un pH más bajo, es decir, en el zumo de piña, que tiene un pH de 3,5, y en el zumo de ciruela, que tiene un pH de 2,8-2,9. Miller y Kasper (1994) demostraron que el almacenamiento a temperaturas más bajas aumentó la supervivencia de *E. coli* O157:H7 a pH más bajo, en sidra de manzana. Esta característica de *E. coli* O157:H7 a incrementar la supervivencia en un pH más bajo y temperaturas más bajas también se ha observado en otros productos tales como pulpas de la fruta (Marques y col., 2001), y conservas del tomate (Eribo y Ashenafi, 2003).

El valor del pH no cambia a lo largo del estudio ni en el zumo de piña y ni en el zumo de ciruela a ninguna de las temperaturas estudiadas (4°C y 20°C). Tampoco se han producido cambios de pH en el zumo de melocotón y en el zumo de manzana a 4°C. Por el contrario,

se ha observado disminución del pH en el zumo de melocotón a 20°C y en el zumo de naranja a 4°C con crecimiento de ambas cepas (*E. coli* no patógeno y *E. coli* O157:H7), siendo este crecimiento mucho más débil en el zumo de naranja. En el caso del zumo de naranja almacenado a temperatura ambiente, se han observado cambios en el pH pero no se ha producido crecimiento de ninguna de las cepas inoculadas. La disminución de pH indica la utilización activa de azúcares fermentables disponibles en el zumo. Únicamente aparece aumento significativo del valor del pH a lo largo del estudio en el zumo de manzana a una temperatura de 20°C, que también se acompaña con el crecimiento de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 los primeros días.

Mutaku I. y col. (2005) observaron que en el zumo de piña no hubo crecimiento ni cambios de pH a temperatura ambiente (25°C) ni a temperatura de refrigeración (4°C); lo mismo sucedió en el zumo de manzana. Por el contrario, en el zumo de papaya se observó crecimiento de la cepa *E. Coli* O157:H7 y reducción de pH tanto a 25°C como a 4°C, al igual que en el zumo de aguacate donde *E. coli* O157:H7 creció lujosamente a temperatura ambiente con una disminución significativa en el pH, y creció a temperatura de refrigeración, con una disminución de pH menos marcada.

Analizando los valores obtenidos de la tasa de supervivencia o muerte de los microorganismos, se observa que la menor tasa de supervivencia para *E. coli* y *E. coli* O157:H7 a 4°C se da en el zumo de piña, siendo dicha tasa muy similar en ambas cepas (-2,811 en *E. coli*, y -2,712 en *E. coli* O157:H7). Por tanto, en el zumo de piña a 4°C mueren mucho más rápido que en el resto de zumos. Por el contrario, la mayor tasa de supervivencia o muerte de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 a 4°C se produce en el zumo de naranja, siendo para *E. coli* -0,123, y para *E. coli* O157:H7 -0,152.

Por otra parte, a 20°C, la menor tasa de supervivencia o muerte de *E. coli* se observa en el zumo de piña, con un valor de -19,0721, mientras que a esa misma temperatura la menor tasa de supervivencia o muerte para *E. coli* O157:H7 se da en el zumo de ciruela, con un valor de -14,308. En este caso sí existe una gran diferencia en estos valores, siendo la tasa de supervivencia de *E. coli* mucho más baja que en *E. coli* O157:H7, es decir, *E. coli* muere mucha más rápido que *E. coli* O157:H7.

Por último, a 20°C, la máxima tasa de supervivencia o muerte de *E. coli* se observa en el zumo de naranja, con un valor de -0,478, mientras que a esa misma temperatura la mayor tasa de supervivencia o muerte para *E. coli* O157:H7 se da en el zumo de manzana, con un valor de -0,109.

Comparando los valores anteriores según las cepas, se puede concluir que en este caso *E. coli* tiene a 20°C menor tasa de supervivencia o muerte que *E. coli* O157:H7. Sin embargo, las diferencias de estos valores a 4°C son insignificantes. La mayor parte de los trabajos científicos publicados estudian el comportamiento de los microorganismos durante el crecimiento, sin considerar su supervivencia durante largos periodos de tiempo.

En lo referente a la resistencia al medio ácido mencionada anteriormente, se han descrito distintos mecanismos que pueden permitir que este patógeno sobreviva en medios ácidos. A menudo los microorganismos tienen que adaptarse a cambios ambientales para poder sobrevivir. En las bacterias, los sistemas de transporte de sodio y de potasio pueden corregir 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, *E. coli* sintetiza 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) que desempeña un papel muy importante en la supervivencia y crecimiento en medios ácidos.

6. CONCLUSIONES

1. Existe mayor tasa de supervivencia de *Escherichia coli* y *Escherichia coli* O157:H7 en los zumos con un pH más alto.
2. *E. coli* y *E. coli* O157:H7 pueden sobrevivir en un pH ácido (< 4,4) durante un periodo de tiempo prolongado adaptándose al medio.
3. Cuando el pH es más bajo, el almacenamiento a temperatura de refrigeración aumenta la supervivencia de ambos serotipos.
4. *E. coli* tiene menor tasa de supervivencia que *E. coli* O157:H7 a 20°C, es decir, *E. coli* muere antes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Adams M.R. y Moss M.O. 1995. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. p. 227-231.
- 2.- Alzamora, S.M., Guerrero, S.N., López Malo, A., Palou, E., Char, C.D. y Raffellini, S. 2010. Models for Microorganism Inactivation: Application in Food Preservation Desing. p. 87-115. En: Processing Effects on Safety and Quality of Food. Ed. E. Ortega-Rivas. CRC Press.
- 3.- Alzamora, S.M; Cerrutti, P.; Guerrero, S. y López-Malo, A. 1995. Minimally processed fruits by combined methods. p. 463-492. En: Food Preservation by Moisture Control. Fundamentals and Applications. ISOPOW PRACTICUM II. Eds. G.V. Barboosa-Cánovas y J. Wilti-Chanes. Technomic Publication, Pennsylvania, USA.
- 4.- Baranyi, J. and Roberts T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J Food Microbiol. 23 (3-4): 277-294.
- 5.- Benjamin, M.M. and Datta, A.R. 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 4:1669-1672.
- 6.- Buchanan, R.L., Whiting, R.C. y Damert, W.C. 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. Food Microbiol. 14: 313-326.
- 7.- Cameron, S., Walker, C., Beers, M., And Aneer, E. 1995. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outbreak in South Australia associated with the consumption of Mettwurst. Communicable Diseases Intelligence. 19:70-71.
- 8.- Eribo, B., Ashenafi M. 2003. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in tomato and processed tomato products. Food Res Int. 36:823-830
- 9.- 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. Appl Environ Microbiol. 58:2513-2516.
- 10.- 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. p. 33-35

- 11.- ICMSF. 1996. Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia, S.A. p. 147-149
- 12.- López-Malo, A. 2000. La preservación multiobjetivo de alimentos: efecto de factores tradicionales y emergentes en la respuesta de *Aspergillus flavus*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- 13.- Marques, P.A., Worcman-Barninka D., Lannes S.C. and Landgraf M. 2001. Acid tolerance and survival of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in fruit pulps stored under refrigeration. J Food Prot. 64:11, 1674–1678.
- 14.- Miller, L.G., Kaspar, C.W. 1994. *Escherichia coli* O157:H7 Acid Tolerance and Survival in Apple Cider. J Food Prot. 57:460-464.
- 15.- Mutaku, I., Erku W. y Ashenafi M. 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh tropical fruit juices at ambient and cold temperatures. Int J Food Sci Nutr. 56(2): 133-139.
- 16.- Nair, M.K., Abouelezz, M.H., Hoagland, T., Venkitanarayanan, K. 2005. Antibacterial effect of monocaprylin on *E. coli* O157:H7 in apple juice. J Food Prot. 68: 1895-1899.
- 17.- Organización Mundial de la Salud. 2011. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- 18.- Pooni, G. S., y Mead, G. C. 1984. Prospective use of temperature function integration for predicting the shelf-life of non frozen poultry-meat products. Food Microbiol. 1: 67-78.
- 19.- Prescott, L.M., Harley, J.P., and Klein, D. A. 1999. Microbiología 4ª Edición. Ed. McGraw-Hill. Interamericana. p.114-136.
- 20.- 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. Disponible en: https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2013-10611
- 21.- Roberts, T. A., y Jarvis, B. 1983. Predictive Modelling of Food Safety with Particular Reference to *Clostridium botulinum* in Model Cured Meat Systems. En T. Roberts y F. Skinner: Food Microbiology: Advances and Prospects, edict Academic Press. p. 85-95.

- 22.- Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2014. Madrid, 2015. Disponible en: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-sistema-informacion-microbiologica/pdf_2015/Informe_anual_2014_20150918.pdf
- 23.- Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E. and Slonczewski, J. L. 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexineri*: role of *rpo S* and growth in acid. J Bacteriol. 176:1729-1737.
- 24.- Strawn y Danyluk. 2009. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas. Int. J Food Microbiol. 138: 78-84.
- 26.- Tsai, Y. and Ingham S.C. 1997. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp in acidic condiments. J Food Prot. 60:751-755.
- 27.- Walls, I. y Scott, V. 1997. Validation of Predictive Mathematical Models describing the Growth of *Listeria monocytogenes*. J Food Prot. 60: 1142-1145.
- 28.- 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. J Food Prot. 57:629-631.
- 29.- Whiting, R.C. y Buchanan, R.L. 1994. Microbial modeling. Scientific Status Summary. Institute of Food Technologists, Expert Panel on Food Science and Nutrition. 48:113-120.
- 30.- Yuste, J., Fung, D.Y.C. 2003. Evaluation of *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* counts in apple juice with cinnamon, by conventional media and thin agar layer method. Food Microbiol. 20: 365-370.
- 31.- Yuste, J., Fung, D.Y.C. 2004. Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *E. coli* O157:H7 in apple juice by a combination of nisin and cinnamon. J Food Prot. 67: 371-377.
- 32.- Zhao, T., and Doyle, M.P. 1994. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in commercial mayonnaise. J Food Prot. 57:780-783.