

UNIVERSIDAD DE CORDOBA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE
LOS ALIMENTOS**

TESIS DOCTORAL

Modificaciones microbiológicas, fisicoquímicas y organolépticas de vegetales envasados en atmósfera modificada. Bases para el establecimiento de los modelos predictivos del crecimiento microbiano

ROSA MARIA GARCIA GIMENO

CORDOBA, 1995

Modificaciones microbiológicas, fisicoquímicas y organolépticas de vegetales envasados en atmósfera modificada. Bases para el establecimiento de los modelos predictivos del crecimiento microbiano

Tesis que presenta
la Licenciada D^a Rosa María García Gimeno
para optar al título de Doctor en Veterinaria
El Doctorando

V^o B^o
El Director

Fdo.: Gonzalo Zurera Cosano

**GONZALO ZURERA COSANO PROFESOR TITULAR DEL AREA
DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA DE LA FACULTAD DE
VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE CORDOBA**

INFORMA:

Que el trabajo presentado por la Licenciada D^o Rosa María García Gimeno con el título **“Modificaciones microbiológicas, fisicoquímicas y organolépticas de vegetales envasados en atmósfera modificada. Bases para el establecimiento de los modelos predictivos del crecimiento microbiano”**, se ha desarrollado bajo mi dirección en el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, durante los años 1991, 1992, 1993 y 1994, considerando que reúne los requisitos necesarios para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente informe, en Córdoba a 9 de febrero de 1995

Fdo.: Gonzalo Zurera Cosano

A mi padre y a Blas,

por todo y por siempre...

*“La sabiduría es como una luz,
que para ser vista necesita que un cuerpo la refleje.”*

Chiara Lubich

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento:

Al Profesor Dr. D. Gonzalo Zurera Cosano, por su continua dedicación y entusiasmo en el desarrollo de esta Tesis, aportando en todo momento su enorme experiencia y animándome a superar con optimismo las muchas dificultades encontradas.

A la CICYT por la concesión del proyecto ALI 93-0327 y ALI 90-1216-E FLAIR Concerted Action N° 5, que han servido de sustento económico al desarrollo de la parte experimental.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de la Beca de Formación del Profesorado y Personal Investigador disfrutada durante el desarrollo de la presente Tesis.

A D. Jose M^a Garrido, Director de Control de Calidad de la empresa Vega Mayor S. A. , y a ésta, por su aportación de muestras y ayuda prestada.

A los Dres. József Baranyi y Terry Roberts del Institute of Food Research (Reino Unido), por cordial acogida y valiosas orientaciones en el desarrollo de la modelización de los datos de esta Tesis.

A los Dres. Martin Cole y Carol Adair, de la Unidad Microbiológica de Unilever Research (Reino Unido), y de M^o Elizabetta Guerzoni, Aurelia Casadei, Frances Westall y Basem Abdullah de la Universidad de Bologna (Italia), por su cordial acogida en sus centros de trabajo y sus inestimables consejos en el desarrollo de la parte experimental de la Tesis.

Al Dr. Jose M^a Vazquez Bolan de la Universidad Complutense de Madrid por los servicios prestados en la serotipificación de *Listeria monocytogenes*.

A los Dres. Rafael Moreno Rojas, Manuel Amaro López y Francisco Rincón León, por su apoyo y ayuda constante durante todos estos años.

A las Licenciadas Cristina Cañal Ruiz y M^a Dolores Sanchez Pozo, por toda su ayuda moral y laboratorial y por su entrañable amistad.

A todos los demás miembros del Departamento por las atenciones que me han otorgado.

Al Dr. Casimiro García Carrillo, por su constante apoyo, y ayuda incondicional y esmerada en todo momento. Por inculcarme, desde que comencé en el campo de la investigación, la importancia del rigor científico, ya sea en el ámbito experimental como en la elaboración escrita de la Tesis.

A mi familia y amigos por animarme y apoyarme constantemente con su cariño y paciencia.

Y a Blas, por su valiosa ayuda en la elaboración final de la tesis y su apoyo y paciencia puesta a prueba durante todos estos años.

INDICE

INDICE

I.	
INTRODUCCION.....	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	7
1. CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR MEDIO DE ATMÓSFERA MODIFICADA.....	9
1.1 GASES USADOS EN EL ENVASADO CON ATMÓSFERA MODIFICADA.....	12
1.2 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA	15
1.3 PELÍCULAS PLÁSTICAS UTILIZADAS PARA EL ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA	15
2. LA ENSALADA DE IV GAMA.....	18
2.1 EL PROCESO	19
2.2 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS VEGETALES DE IV GAMA.....	22
2.2.1 <i>Vida media</i>	22
2.2.2 <i>Factores intrínsecos</i>	23
2.2.3 <i>Factores extrínsecos</i>	24
2.3 CALIDAD DEL PRODUCTO	26
2.4 CONTROL DE CALIDAD Y SEGURIDAD DEL PRODUCTO	29
2.5 LEGISLACIÓN	26
3. EL MERCADO Y EL FUTURO DEL ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA.	39
4. LOS MICROORGANISMOS Y EL ENVASADO EN ATMÓSFERA MODIFICADA	43
4.1 LISTERIA MONOCYTOGENES	46
4.1.1 <i>Agente patógeno de origen alimentario</i>	48
4.1.2 <i>Control de la listeriosis</i>	52
4.2 AEROMONAS HYDROPHILA	53
4.2.1 <i>Agente patógeno de origen alimentario</i>	55
4.3 BACTERIAS PSICROTROFAS	57
4.4 BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS.....	58
5. MODELOS PREDICTIVOS DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN ALIMENTOS.....	59
5.1 MODELAMIENTO DE DATOS.....	64
5.2 TIPOS DE MODELOS PREDICTIVOS EN MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA	70

5.2.1 Modelos de crecimiento bacteriano.....	71
5.2.1.1 Funciones sigmoideas.	72
5.2.1.2 Modelo de formas polinómicas	75
5.2.1.2.1 Respuestas en Superficies.....	75
5.2.1.2.2 Modelo de Duh y Schaffner.....	76
5.2.1.2.2.1 Modelo de tasa de crecimiento.....	76
5.2.1.2.2.2 Modelo de tiempo de adaptación	76
5.2.1.3 La ecuación de Arrhenius y los modelos derivados.....	77
5.2.1.3.1 Arrhenius lineal de Davey	77
5.2.1.3.2 Modelo de Hinselwood	78
5.2.1.3.3 Modelo Schoofield	78
5.2.1.3.3.1 Modelo de tasa de crecimiento.....	78
5.2.1.3.4 Modelo hiperbólico	79
5.2.1.3.4.1 Modelo de tiempo de adaptación	79
5.2.1.4 Modelo de Raíz Cuadrada.	80
5.2.1.4.1 Modelo de tasa de crecimiento	80
5.2.1.4.2 Modelo de tiempo de adaptación, “lag time”	81
5.2.1.4.3 Función que relaciona la asíntota superior con la temperatura:	82
5.2.1.4.4 Modelo para describir el efecto combinado de temperatura, pH y actividad agua :	82
5.2.1.5 Modelos dinámicos:	82
5.2.1.5.1 Modelo dinámico de Van Impe.....	82
5.2.1.5.2 Modelo dinámico de Baranyi y Roberts:.....	83
5.2.2 Modelos de inactivación o supervivencia.....	84
5.2.3 Modelos para condiciones cambiantes.....	85
5.3 APLICACIONES.....	85

III.

OBJETIVOS.....	89
-----------------------	-----------

IV MATERIAL Y

MÉTODOS.....	93
---------------------	-----------

1. MATERIAL.....	95
-------------------------	-----------

1.1 MEDIOS DE CULTIVO	95
1.1.1 Caldos	95
1.1.2 Agares	96
1.2 REACTIVOS	97
1.3 INSTRUMENTAL.....	100

2. MÉTODOS	102
-------------------------	------------

2.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS	102
2.1.1 Sistemática de muestreo.....	102

2.1.2 Preparación de la muestra para el análisis microbiológico	103
2.2 EXAMEN MICROBIOLÓGICO DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.....	103
2.2.1 Comportamiento y monitorización de los diferentes grupos de microorganismos presentes en vegetales envasados con atmósfera modificada en condiciones de refrigeración de 4 °C	103
2.2.1.1 Recuento, aislamiento e identificación de bacterias acidolácticas .	104
2.2.1.2 Recuento, aislamiento e identificación de microorganismos aerobios psicrotrofos	105
2.2.1.3 Recuento, aislamiento e identificación de levaduras y mohos	105
2.2.1.4 Recuento, aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> , coliformes totales y fecales.....	105
2.2.1.5 Aislamiento e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	106
2.2.1.5.1 Preenriquecimiento:.....	106
2.2.1.5.2 Primer enriquecimiento selectivo:.....	106
2.2.1.5.3 Segundo enriquecimiento selectivo:.....	106
2.2.1.5.4 Siembra en medio selectivo	106
2.2.1.5.5 Confirmación	106
2.2.1.6 Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i>	107
2.2.1.6.1 Preenriquecimiento.....	107
2.2.1.6.2 Enriquecimiento selectivo.....	107
2.2.1.6.3 Siembra en placa en medios de agar selectivo.....	107
2.2.1.6.4 Confirmación bioquímica	108
2.2.1.7 Recuento, aislamiento e identificación de clostridios sulfito reductores	108
2.2.1.8 Recuento, aislamiento e identificación de <i>Aeromonas hydrophila</i>	108
2.2.1.9 Recuento, aislamiento e identificación de enterococos	109
2.2.1.10 Recuento, aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	109
2.2.1.11 Recuento, aislamiento e identificación de <i>Yersinia enterocolítica</i>	109
2.2.2 Comportamiento y monitorización de bacterias acidolácticas y psicrotrofas en ensaladas durante el almacenamiento a 10 °C y 15°C.....	110
2.2.3 Comportamiento y monitorización de los microorganismos inoculados en condiciones de refrigeración y envasado (<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	110
2.2.3.1 Preparación del inóculo	110
2.2.3.1.1 Restitución del cepario	110
2.2.3.1.2 Calibración de las suspensiones bacterianas	111
2.2.3.1.3 Preparación de la concentración del inóculo	111
2.2.3.2 Inoculación.....	111

2.2.3.3 Recuento, aislamiento e identificación de microorganismos inoculados.....	112
2.2.3.3.1 Recuento, aislamiento e identificación de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	112
2.2.3.3.2 Recuento, aislamiento e identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	112
2.2.3.3.3 Recuento, aislamiento e identificación de <i>Aeromonas hydrophila</i>	112
2.2.3.3.4 Recuento, aislamiento e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	112
2.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y ORGANOLÉPTICOS DURANTE EL PERÍODO DE ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN	113
2.3.1 Concentración de gases en el interior del envase (O_2 , CO_2).....	113
2.3.2 pH.....	113
2.3.3 Características organolépticas	113
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	114
2.5 APLICACIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS DE CRECIMIENTO BACTERIANO	114
2.5.1 Programa DModel.....	115
2.5.2 Programa Gomplamu de Cupper	119
2.5.3 Programa MFSmodel de Buchanan y Whiting versión 4.0	119
2.5.4 Curvas de inhibición celular.....	120
2.6 DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE VIDA COMERCIAL. RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LAS ALTERACIONES ORGANOLÉPTICAS, Y FISICO-QUÍMICAS CON LA PRESENCIA DE BACTERIAS ALTERANTES Y PATÓGENAS.....	121
2.6.1 Determinación de vida media desde el punto de vista microbiológico.....	121
2.6.2 Determinación de la vida comercial.....	122

V.

RESULTADOS.....123

1. EVOLUCIÓN DE LA MICROFLORA NATURAL EN LA

ENSALADA ALMACENADA EN REFRIGERACIÓN (4°C) 125

1.1 RECuento, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS (BAL)	125
1.2 RECuento, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS PSICROTROFOS	125
1.3 RECuento, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS Y MOHOS.....	129
1.4 RECuento, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE E. COLI. Y COLIFORMES TOTALES Y FECALES	129
1.5 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES	129
1.6 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SALMONELLA	132

1.7 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CLOSTRIDIOS SULFITO REDUCTORES.....	132
1.8 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE AEROMONAS HYDROPHILA.....	132
1.9 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROCOCOS.....	132
1.10 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE STAPHYLOCCOCUS AUREUS.....	132
1.11 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE YERSINIA ENTEROCOLÍTICA	132
2. COMPORTAMIENTO Y MONITORIZACIÓN DE BACTERIA ACIDOLÁCTICAS Y PSICROTROFAS EN ENSALADAS ENVASADAS CON ATMÓSFERA MODIFICADA DURANTE SU ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	133
2.1 BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS.....	133
2.2 BACTERIAS PSICROTROFAS	133
3. COMPORTAMIENTO Y MONITORIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS INOCULADOS EN CONDICIONES DE REFRIGERACIÓN Y ENVASADO.....	134
3.1 PSEUDOMONAS FLUORESCENS.....	134
3.2 LEUCONOSTOC MESENTEROIDES	136
3.3 LISTERIA MONOCYTOGENES	138
3.4 AEROMONAS HYDROPHILA	138
4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y ORGANOLÉPTICOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE ENSALADAS ENVASADAS CON ATMÓSFERA MODIFICADA	142
4.1 CONCENTRACIÓN DE GASES EN EL INTERIOR DEL ENVASE DURANTE EL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	142
4.2 EVOLUCIÓN DEL PH EN LOS ENVASES DURANTE EL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS	144
4.3 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	144
5. APLICACIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS	145
5.1 MODELOS DE CRECIMIENTO BACTERIANO.....	145
5.1.1 Programa DModel :.....	145
5.1.2 Programa “Gomplamu”	148
5.1.3 Programa MFSmodel.....	150
5.2 CURVAS DE INHIBICIÓN Y MUERTE CELULAR.....	150
5.3 AJUSTE DE LA EVOLUCIÓN DEL CO ₂	155
5.4 AJUSTE DE LA EVOLUCIÓN DEL PH.....	157
5.5 RELACIÓN LINEAL CON LA TEMPERATURA	157
5.6 EFECTO INHIBITORIO DEL CO ₂ Y DEL PH.....	159

5.7 DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE VIDA COMERCIAL. RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LAS ALTERACIONES ORGANOLÉPTICAS Y FISICOQUÍMICAS CON LA PRESENCIA DE BACTERIAS ALTERANTES Y PATÓGENAS.....	163
--	-----

VI.

DISCUSION.....	179
-----------------------	------------

1. EVOLUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LAS ENSALADAS DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN A 4 °C

1.1 BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS Y PSICROTROFAS	182
1.2 LEVADURAS Y MOHOS.....	183
1.3 ESCHERICHIA COLI Y COLIFORMES TOTALES.....	183
1.4 LISTERIA MONOCYTOGENES	184
1.5 SALMONELLA, STAPHYLOCOCCUS AUREUS, AEROMONAS HYDROPHILA, YERSINIA ENTEROCOLÍTICA, CLOSTRIDIOS SULFITOREDUCTORES Y ENTEROCOCOS	185

2. COMPORTAMIENTO Y MONITORIZACIÓN DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS Y PSICROTROFAS EN ENSALADAS DURANTE SU ALMACENAMIENTO A 10 Y 15 °C.....

3. EVOLUCIÓN DE MICROORGANISMOS ALTERANTES INOCULADOS EN LA ENSALADA.....

3.1 PSEUDOMONAS FLUORESCENS.....	187
3.2 LEUCONOSTOC MESENTEROIDES	189

4. EVOLUCIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS INOCULADOS EN ENSALADA

4.1 AEROMONAS HYDROPHILA.....	190
4.2 LISTERIA MONOCYTOGENES	191

5. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y ORGANOLÉPTICOS DE LA ENSALADA DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACIÓN.....

5.1 CONCENTRACIÓN DE GASES EN EL INTERIOR DEL ENVASE DURANTE EL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS	192
5.2 EVOLUCIÓN DEL pH EN LOS ENVASES DURANTE EL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	193
5.3 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	193

6. APLICACIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS DE CRECIMIENTO

6.1 DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE VIDA COMERCIAL. RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LAS ALTERACIONES ORGANOLÉPTICAS Y FISICOQUÍMICAS CON LA PRESENCIA DE BACTERIAS ALTERANTES Y PATÓGENAS.	194
---	-----

6.2 EVOLUCIÓN DE BACTERIAS PSICROTROFAS Y ACIDOLÁCTICAS	196
6.3 EVOLUCIÓN DE PSEUDOMONAS FLUORESCENS	197
6.4 EVOLUCIÓN DE LEUCONOSTOC MESENTEROIDES	199
6.5 EVOLUCIÓN DE AEROMONAS HYDROPHILA.....	200
6.6 EVOLUCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES.....	200

VII. CONCLUSIONES.....	203
---	------------

VIII. RESUMEN.....	209
-------------------------------------	------------

IX. BIBLIOGRAFIA.....	213
--	------------

ANEXO I.....	249
-------------------------------	------------

ANEXO II.....	273
--------------------------------	------------

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

En la actualidad, el consumidor tiene la tendencia a adquirir productos frescos y naturales, sin aditivos. Al mismo tiempo la vida ajetreada, sobre todo de las grandes ciudades, y la incorporación de la mujer al mundo laboral, hacen que la sociedad demande cada vez con mayor insistencia productos ya preparados y listos para su consumo, como es el alimento objeto de nuestro estudio.

La ensalada envasada en atmósfera modificada es un producto nuevo, sin legislación española, de gran aceptación por parte del consumidor por sus características de alimento fresco sin aditivos y por estar preparada para su consumo inmediato. Todo esto hace que el estudio de este producto sea de gran interés.

Las ensaladas envasadas en atmósfera modificada, denominadas por los franceses como vegetales de IV Gama, son vegetales troceados, lavados y envasados en bolsas de películas plásticas. Pueden o no ser inyectados con diferentes combinaciones gaseosas en el momento del envasado. La atmósfera en el interior del envase se modifica durante el almacenamiento fruto de la respiración del vegetal y el metabolismo microbiano. El interior del envase va sufriendo un paulatino cambio de su atmósfera, enriqueciéndose con CO_2 y consumiendo el O_2 presente. Los mecanismos por los cuales el CO_2 actúa inhibiendo el desarrollo microbiano no se conocen con exactitud, aunque son diversas las hipótesis formuladas. El alimento envasado en atmósfera modificada conserva sus características organolépticas durante mucho más tiempo que los conservados en ambiente aerobio. Durante el almacenamiento, la composición gaseosa creada no sólo actúa sobre los microorganismos sino también retardando la respiración de los vegetales y por lo tanto retardando su alteración y alargando su vida útil comercial.

La necesidad de mantener la cadena de frío durante todo el proceso de producción, distribución y venta es de suma importancia para el mantenimiento de las características óptimas de calidad. Mediante el estudio de la evolución de los grupos microbianos predominantes en la ensaladas envasadas en atmósfera modificada a 4, 10 y 15 °C se pretende establecer las bases para la confección de

un modelo predictivo que permita predecir la vida útil del producto si la temperatura de almacenamiento oscila entre dichas temperaturas.

Entre los microorganismos psicrotrofos predominantes en las ensaladas, *Pseudomonas fluorescens* ha sido señalado por diversos autores como el principal responsable de la alteración de vegetales de ensaladas envasadas en atmósfera modificada (Denis y Picoche, 1986, Brocklehurst, et. al., 1987, Eyles et al., 1993).

Otro grupo microbiano de gran importancia en este alimento son las bacterias acidolácticas. *Leuconostoc mesenteroides* fue descrito por Carlin et al. (1990) como el causante principal de la alteración de la ensalada con atmósfera modificada, debido fundamentalmente a las fermentaciones lácticas.

Aeromonas hydrophila y *Listeria monocytogenes* han sido aislados por diversos autores de ensalada envasada con atmósfera modificada. Por su carácter patógeno y su capacidad para crecer y sobrevivir a temperatura de refrigeración, hacen de estos microorganismos un riesgo potencial para la salud, sobre todo para poblaciones de riesgo como son los niños, ancianos, mujeres embarazadas e inmunodeficientes. El hecho de que las ensaladas de IV Gama sean destinadas, en un alto porcentaje, a la restauración colectiva de colegios, hospitales, etc., agudiza la preocupación por el tema. No es conocido el nivel de células necesarias de ser ingeridas para contraer la enfermedad pero al ser este un alimento destinado en cierto porcentaje a comedores colectivos de poblaciones de riesgo, la importancia de conocer el comportamiento de este microorganismos es aún mayor.

El modelamiento predictivo del crecimiento microbiano es un campo prometedor dentro de la microbiología de los alimentos (Zwietering et al., 1990). Los modelos predictivos se utilizan para describir el comportamiento de los microorganismos bajo diferentes condiciones como temperatura, gases y pH. Estos modelos permiten realizar predicciones sobre la supervivencia de microorganismos en alimentos o la vida media de los productos, detección de partes críticas del proceso de producción o de la distribución y la optimización de la producción y cadenas de distribución.

Si se representa la curva de crecimiento como el logaritmo de recuento de microorganismos frente al tiempo se obtiene una curva sigmoideal, constituida por una primera fase de adaptación seguida por una fase exponencial y una fase

estacionaria. Para describir estas curvas y reducir los datos obtenidos experimentalmente a unas pocas variables que nos interesen (tasa específica de crecimiento, tiempo de generación, tiempo que tarda en alcanzar un determinado nivel, etc.) se necesitan modelos adecuados.

Según Whiting y Buchanan (1993) existen tres tipos de modelos. Los modelos primarios, que miden la respuesta de un microorganismo en el tiempo en unas condiciones determinadas (por ejemplo, la función de Gompertz, la logística, el modelo de Baranyi). Los modelos secundarios describen el comportamiento de uno o varias variables (tasa específica de crecimiento, tiempo de generación, tiempo que tarda en alcanzar un determinado nivel, etc.) cuando se varía en una o más condiciones del medio de cultivo (temperatura, pH, sal, gas, etc). Estos modelos serían por ejemplo las Respuestas en Superficie, modelos de Arrhenius y de Ratkowsky. Los modelos terciarios son la aplicación de los modelos secundarios para la elaboración de sistemas para dotar de predicciones a personas no expertas en la materia. (Programa MFSmodel, Food Micromodel, etc.).

El hecho de que el CO₂, O₂ y pH varíen durante el almacenamiento dificulta la comparación con otros estudios y la aplicación de modelos elaborados a partir de experimentos utilizando medios de cultivo donde las variables (CO₂ y pH) permanecen constantes.

En el presente trabajo se pretende estudiar los diferentes grupos microbianos presentes en ensaladas envasadas con atmósfera modificada a la temperatura recomendada por el fabricante (4°C) y posteriormente observar la evolución de bacterias psicrotrofas y acidolácticas a 10 y 15 °C para conocer el efecto de la temperatura sobre su evolución. Se observa el comportamiento de *Pseudomonas fluorescens* y *Leuconostoc mesenteroides* inoculados en las ensaladas buscando con ello estudiar con mayor facilidad un representante de cada uno de los grupos mayoritarios presentes en las ensaladas. Asimismo, se estudia la posibilidad de crecimiento de microorganismos patógenos susceptibles de crecer en atmósfera modificada y temperatura de refrigeración como *Aeromonas hydrophila* y *Listeria monocytogenes*. Con los datos obtenidos se realizó una aproximación para la confección de un modelo predictivo que permitiría predecir la vida media del producto al variar la temperatura de almacenamiento. El análisis microbiológico será complementado por el estudio de las modificaciones organolépticas, de la concentración de los gases y el pH.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

1. Conservación de los alimentos por medio de atmósfera modificada

La utilización de atmósferas modificadas como conservante en los alimentos tiene relativa reciente implantación.

El desarrollo de estas tecnologías se deriva fundamentalmente del cambio de prioridades alimentarias de los consumidores, que prefieren productos poco tratados, exentos de conservantes y listos para el consumo.

La modificación de esta composición dentro del envase alimentario, disminuyendo la concentración de oxígeno y aumentando la del dióxido de carbono, se ha visto que extiende la vida útil del producto refrigerado (Parry, 1993)

El uso de la atmósfera modificada para la extensión de la vida media de los alimentos no es un concepto nuevo en conservación de alimentos. Sus orígenes se remontan a 1922 cuando Brown realizó investigaciones sobre el efecto que ejercían diferentes concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono, a diferentes temperaturas, en la germinación y el crecimiento de un hongo responsable de la podredumbre de la fruta. Sus estudios revelaron la efectividad de CO₂ al 10 % o más en retrasar la germinación y el crecimiento del hongo. Más tarde, en 1927, Kidd y West estudiaron el efecto de la atmósfera modificada en el almacenamiento de la fruta. Estos estudios dieron como resultado el primer almacén comercial de manzanas con atmósfera controlada construida en Kent, Inglaterra, en 1929 (Parry, 1993).

En la década de los 60 tomó auge la conservación por vacío de productos secos y carne fresca. Las investigaciones se aceleraron entre 1970 y 1980, dando como resultado exitosas aplicaciones comerciales. Los alimentos envasados con atmósfera modificada de tamaño familiar no aparecieron en los supermercados hasta 1973 en Alemania, 1974 en Francia, 1978 en Dinamarca y en 1979 en Inglaterra (Parry, 1993). En España aparecieron los primeros vegetales envasados en atmósfera modificada en 1986 (Carbonell, 1989).

Una definición general de un alimento almacenado en **atmósfera modificada** sería un alimento perecedero almacenado en un ambiente diferente al aire (Hintlian y Hotchkiss, 1986, Farber et al., 1993). Esta definición incluiría el envasado al vacío, inyección de gases, envasado de los productos con una película plástica de especial permeabilidad sin inyección inicial gaseosa, el envasado en atmósfera controlada (CAP) y el almacenamiento hipobárico (Farber et al., 1993).

En el caso del **CAP** se trata de un alimento que está expuesto constantemente a una composición gaseosa determinada y regulada que compensa los cambios naturales que produce la respiración y la permeabilidad del envase (Hintlian y Hotchkiss, 1986, Farber et al., 1993). En cambio aquellos productos en que se **inyectan gases** solo se insufla el gas al envasarlo y luego la composición evoluciona sin control debido a factores como la respiración del producto, cambios bioquímicos y la permeabilidad a los gases del envase (Farber, 1993).

El **envasado** de los productos con una película plástica de especial permeabilidad **sin inyección inicial gaseosa** conduce a una modificación natural de la atmósfera en el interior del envase debido a la permeabilidad de la pared del envase y a otros factores como la respiración del producto y cambios bioquímicos.

El **envasado al vacío** es el sistema más frecuente de envasado y consiste en la evacuación del aire del envase del producto antes de su sellado y donde el envase se caracteriza por su baja permeabilidad al O₂. Con esto se busca inhibir el desarrollo de microorganismos aerobios, oxidación o deterioro (Hintlian y Hotchkiss, 1986, Parry, 1993).

El **almacenamiento hipobárico** es una forma de almacenamiento de un producto a baja presión, por debajo de la presión atmosférica, controlada junto a la temperatura y la humedad. Se utiliza para el almacenamiento de frutas suaves (Parry, 1993).

Para la creación y mantenimiento de atmósfera modificada en los envases con películas plásticas se puede utilizar una técnica de modificación activa o pasiva o una combinación de ambas (Kader et al., 1989).

El envasado con **modificación activa** de la atmósfera se refiere a la incorporación de ciertos aditivos en el envase o contenedor para modificar el

medio ambiente interno y prolongar la vida media del producto. Estos aditivos serían absorbentes de oxígeno, dióxido de carbono o etileno, o bien emisores de dióxido de carbono o vapores de etanol (Parry, 1993). Esta tecnología puede tener futuro pero actualmente es demasiado costosa para su uso en la industria.

El envasado con **modificación pasiva** consiste en envasar el producto con una película plástica de una permeabilidad adecuada, teniendo en cuenta que por la respiración de los vegetales consume O_2 y se produce CO_2 que se almacena en el interior del envase (Figura 1). Si se conocen las características respiratorias y condiciones óptimas gaseosas del producto, se puede envolver en una película plástica con una permeabilidad que lleve a un equilibrio entre la concentración de O_2 y CO_2 y conseguir una atmósfera modificada equilibrada (EMA). Se ha demostrado que con un 2-5 % de O_2 y 3-8 % de CO_2 se retrasa la maduración y reblandecimiento de los vegetales, y reduce la degradación de la clorofila, la alteración microbiana y el pardeamiento enzimático (Parry, 1993). Por la acción del etileno eliminado por el vegetal se controlan los procesos de marchitamiento y senescencia (Keteller y Tobback, 1994)

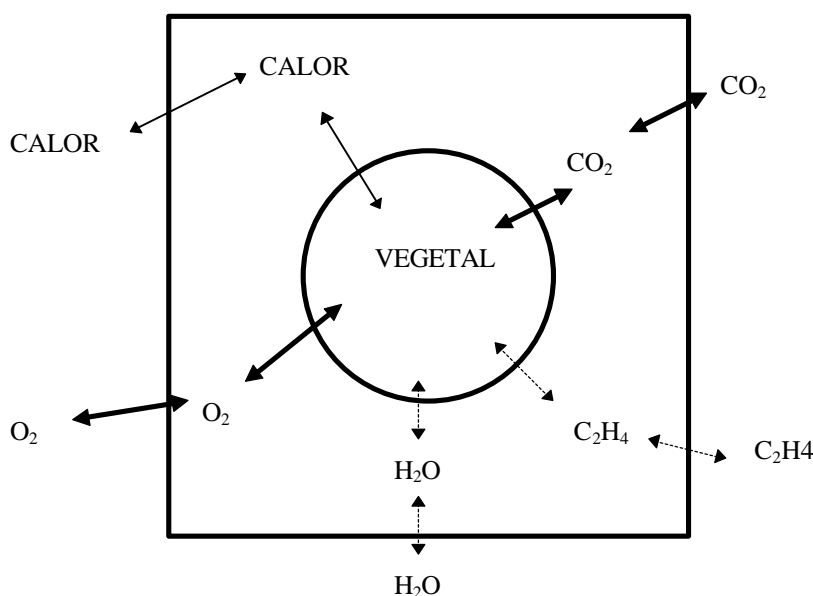


Figura 1. Flujo de gases que se produce por la conservación de productos vegetales en envases semipermeables (Adaptado de Varoquaux, 1987)

1.1 Gases usados en el envasado con atmósfera modificada

La composición gaseosa normal del aire seco a nivel del mar es el descrito en el Cuadro 1:

Cuadro 1. Composición gaseosa normal del aire seco a nivel del mar. Adaptado de Parry (1993)

Gas	Porcentaje
Nitrógeno (N ₂)	78.03
Oxígeno (O ₂)	20.99
Argón (Ar)	0.94
Dióxido de carbono (CO ₂)	0.03
Hidrógeno (H ₂)	0.01

Los tres principales gases usados comercialmente son oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono, aunque otras sustancias gaseosas como monóxido de carbono, óxido nitroso y dióxido de azufre son mencionadas como posibles gases a emplear para atmósferas modificadas (Farber, 1991). También se han realizado estudios en el envasado en atmósfera modificada con cloro, óxido de etileno, dióxido de nitrógeno, ozono, propileno, dióxido de azufre pero no han encontrado aprobación legal de las autoridades para su uso comercial (Parry, 1993).

El **oxígeno** es utilizado por los microorganismos aerobios y el tejido vegetal, también toma parte de reacciones bioquímicas en alimentos como es la oxigenación de la mioglobina en la carne o la oxidación de la grasa y otros compuestos sensibles como las vitaminas. Por estas razones en el envasado en atmósfera modificada se tiende a eliminar el oxígeno o mantenerlo a bajas concentraciones. Sin embargo esto no puede ser muy estricto en casos como carne la cual sin oxígeno perdería su color, la fruta o los vegetales que lo necesitan para respirar o para evitar el desarrollo de microorganismos anaerobios (Parry, 1993).

La ausencia de oxígeno provoca el comienzo de la fermentación que se evidencia por la delicuescencia de las hojas, la formación de etanol y de olores indeseables al abrir las bolsas. Generalmente el cambio de metabolismo aerobio a anaerobio resulta en una disminución de la tasa de crecimiento de los microorganismos aerobios.

El **dióxido de carbono** es un buen inhibidor del crecimiento bacteriano y su mecanismo de acción aun no está claro. Es especialmente efectivo frente a gramnegativos, como *Pseudomonas spp* (Kader et al., 1989, Jones, 1989). Sin embargo otros microorganismos se ven favorecidos por su presencia como es el caso de las bacterias acidolácticas. El efecto inhibitorio de CO₂ aumenta al disminuir la temperatura debido al aumento de su solubilidad (Daniels et al., 1985, Kader et al., 1989, Parry, 1993). Además, el efecto inhibitorio de CO₂ depende de diversos factores como la presión parcial de CO₂, el volumen del espacio de cabeza, acidez, actividad agua, los tipos de microorganismos, la fase de crecimiento de los microorganismos y el medio utilizado. Se emplea en altas concentraciones en quesos, productos de bollería y pescado graso (Kader et al., 1989). El CO₂ se encontrará en el tejido biológico disuelto en la fase líquida del tejido y en forma de ácido carbónico (alrededor de un 2 %). A pH igual o menor a 6 el ácido carbónico se disocia en bicarbonato e ion hidrógeno produciendo un ligero descenso del pH (Jones, 1989, Kader et al., 1989)

Existen diversas teorías sobre el mecanismo de acción de CO₂ sobre las bacterias que se pueden resumir en (Farber, 1991):

- alteración de las funciones de la membrana celular bacteriana incluyendo efectos sobre la absorción de nutrientes,
- inhibición directa o disminución de la tasa de reacción de las enzimas,
- atraviesa la membrana celular produciendo cambios intracelulares del pH,
- cambios directos fisicoquímicos sobre las propiedades de las proteínas

La absorción de CO₂ por parte del producto depende en gran medida de la humedad y del contenido en grasa del producto. Con alto contenido en grasa y humedad se produce una gran absorción por lo que se puede producir un fenómeno de “colapso del envase”.

El **nitrógeno** es un gas inerte con baja solubilidad en agua o grasa. Su función en el envasado en atmósfera modificada es desplazar el oxígeno del interior de la bolsa y así ralentizar la rancidez oxidativa, inhibir el crecimiento de microorganismos aerobios y evitar el fenómeno de “colapso del envase” por exceso de CO₂ (Kader et al., 1989, Parry, 1993).

El **monóxido de carbono** tiene escaso efecto inhibidor sobre los microorganismos pero si se ha visto su efectividad en mantener el color rojo de

las carnes al formarse carbomioglobina. El uso comercial de este gas no está permitido pues se trata de una sustancia altamente tóxica para el hombre (Parry, 1993).

El **ozono** ha sido propuesto por la industria alimentaria en diferentes formas para tratamiento de carnes, frutas manteca, queso, mariscos, y agua para el lavado de pollos. La gran ventaja que tiene este gas es que su producción es “in situ” a partir del aire por una descarga eléctrica. Se ha usado para purificación de áreas de procesado y almacenamiento y para la “esterilización” directa del alimento, el agua ionizada para limpiar, descongelar o blanquear alimentos, hielo ozonizado para aumentar la vida media de productos altamente perecederos como el pescado. El mecanismo de acción no se conoce con seguridad pero probablemente sea debida a la producción de radicales libres (Hoigne y Bader, 1979). Solo tiene acción sobre superficies ya que se descompone al tomar contacto con materia orgánica. Se esperaría que actuara aumentando la oxidación lipídica en los alimentos, sin embargo en el tratamiento de pollo con agua ozonizada no se produjo mayor enranciamiento (Sheldon y Brown, 1986).

Las mezclas de gases utilizadas para cada producto dependen de varios factores como son el tipo de producto, la tasa de respiración, la permeabilidad de la película plástica, y la temperatura de almacenamiento.

Las condiciones recomendadas para el envasado de col y lechuga en atmósfera modificada se describen en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Composición gaseosa recomendada.

	% óptimo		T °C	Referencia
	O ₂	CO ₂		
col	2-3	3-6	0	Wang y Watada (1992)
	3-5	5-7	0-5	Powerie y Skura (1990)
lechuga	1-3	0	0	Wang y Watada (1992) Powerie y Skura (1990)

Las mezclas gaseosas recomendadas para diferentes productos se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Mezclas gaseosas recomendadas para el envasado en atmósfera modificada. Adaptado de Parry (1993).

Producto	% Oxígeno	% Dióxido de carbono	% Nitrógeno
Carne roja	60-85	15-40	-
Carne cocida o curada	-	20-35	65-80
Carne de ave	-	25	75
Pescado (blanco)	30	40	30
Pescado (graso)	-	60	40
Salmón	20	60	20
Queso duro	-	100	-
Queso blando	-	30	70
Pan	-	60-70	30-40
Tartas sin leche	-	60	40
Tartas con leche	-	-	100
Pasta fresca	-	-	100
Frutas y vegetales	3-5	3-5	85-95
Alimentos secos o tostados	-	-	100

1.2 Ventajas y desventajas del envasado en atmósfera modificada

La utilización de atmósferas modificadas presenta numerosas ventajas, pero también algunos problemas que es necesario destacar que se resumen en el Cuadro 4 y Cuadro 5 (Zagory y Kader, 1989, Farber, 1991, Parry, 1993).

1.3 Películas plásticas utilizadas para el envasado en atmósfera modificada

Según el tipo de producto ha de optimizarse la permeabilidad del envase y la proporción de gases empleados, pues de la adecuación de estos parámetros al producto concreto, dependerá principalmente la calidad (Berrang et al., 1989, Farber, 1991).

La difusión de un gas a través de una película plástica dependerá de una serie de parámetros como son: la estructura de la película plástica, la permeabilidad específica de la película plástica a un determinado gas, el grosor de la película plástica, la temperatura existente, y las diferencias de presión entre ambos lados de la película plástica. La humedad relativa puede afectar la permeabilidad en algunos casos (Kader et al., 1989).

Cuadro 4. Ventajas de la utilización de atmósfera modificada para conservación de alimentos

Ventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Incremento del período de vida útil (50-400 %) gracias a que reduce la respiración y a la producción de etanol; retrasa la maduración y el resblandecimiento, reduce la degradación de la clorofila, la biosíntesis de carotenoides y antocianinas y el pardeamiento enzimático, mantiene el color, alivia desórdenes fisiológicos y daños por refrigeración y preserva las vitaminas de los productos frescos. • Reducción de costes de producción y almacenamiento debido a la mejor utilización de la mano de obra, equipos y espacio. • Posibilidad de distribución a grandes distancias. • Mejora la presentación al utilizarse envases plásticos donde se ve el producto claramente a través del envase transparente. Su frescura y calidad atraen al consumidor • El envase es termosellado que lo hace más higiénico y evita contaminaciones posteriores, permite que se amontonen los envases lo que facilita su transporte y almacenamiento. Al estar sellado, el producto no gotea ni despide olores. • Proporciona elevada calidad al producto, se trata de productos previamente seleccionados, la atmósfera modificada hace que esta calidad se conserve e incluso que mantenga la calidad nutricional ya que retiene el ácido ascórbico y las vitaminas. • Fácil separación de porciones del producto.

Cuadro 5 Desventajas de la utilización de atmósfera modificada para conservación de alimentos

Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Coste añadido patente. • Coste del capital de la maquinaria de envasado con gases. • Coste del equipo analítico para controlar que se utilizan las mezclas gaseosa adecuadas. • Coste del sistema de control de la calidad. • Aumenta el coste del transporte al aumentar el volumen al estar envasados. • Necesidad de temperatura controlada. • Respiración anaerobia con la consecuente producción de olores y sabores desagradables • Crecimiento potencial de gérmenes patógenos por elevación de la temperatura • Los beneficios del envasado en atmósfera modificada se pierden por defectos del envase • Diferentes mezclas gaseosas para diferentes productos. • Diseños especiales de equipos.

La solubilidad de cada gas en una película plástica determinará que gas se difundirá a mayor velocidad. Esto dependerá del tamaño, forma y polaridad de la molécula de gas, como también de la cristalización, grado de entrecruzamiento y movilidad de los segmentos de la cadena de polímeros dentro de la matriz de la película plástica (Kader et al., 1989).

Otra variable que afecta la difusión del gas a través de la película plástica es el volumen libre del espacio de cabeza que haya en el envase, el sellado del cierre del envase y la velocidad del aire alrededor del envase (Kader et al., 1989).

La película plástica utilizada para el envasado de un producto dependerá de las condiciones óptimas de concentración de CO₂ y O₂ del producto y de la temperatura de almacenamiento. La mayoría de los productos vegetales prefieren que la película plástica sea más permeables al CO₂ y menos al O₂ (Kader et al., 1989).

Las características que se deben tener en cuenta en las películas plásticas destinadas al envasado en atmósfera modificada serían las siguientes (Greengrass, 1993, Kader et al., 1989):

1. Permeabilidad necesaria para diferentes gases (CO₂, O₂, N₂) y al vapor de agua
2. Buena transparencia y brillo, propiedades anti-empañamiento
3. Resistencia alta a la rotura y estiramiento y nivel de rigidez necesario
4. Temperatura baja para el termosellado
5. No tóxico
6. No reaccione con el producto
7. Buena resistencia térmica y al ozono.
8. Buena ambientación interna
9. Conveniente comercialmente, peso ligero, coste económico por m² disponibilidad de la película plástica, margen de tiempo de suministro
10. Manejable
11. Fácil de etiquetar, capacidad de ser pintado en la superficie y en sandwich, capacidad de aceptar codificación y etiquetas

Los productos frescos precisan una permeabilidad selectiva de la película plástica, por ejemplo, debe ser impermeable al CO₂ y al vapor de agua, pero bastante permeable al O₂. Existen varios polímeros de moderada permeabilidad al O₂, como son los nylon, poliésteres, y cloruros de polivinilo no plastificados. También se han usado polietileno laminado, poliésteres o polipropileno (Ooraikul, 1990b).

Se han descrito también películas plásticas comestibles como complementarios a las películas plásticas. Hay tres tipos: polisacáridos, proteínas y lípidos (Ooraikul, 1990b).

Las películas plásticas usadas normalmente en envasado en atmósfera modificada incluyen los polivinilcloruros, polipropilenos, polistireno, nylon y el polietileno, las cuales tiene propiedades de permeabilidad dependiendo del espesor (Greengrass, 1993).

El coste de la película plástica es un factor importante a tener en cuenta, aunque técnicamente es fácil ignorarlo, pues el producto debe ser competitivo y rentable. El productor deberá sopesar los beneficios de una vida media mayor del producto con el coste que le supone una determinada película frente o otra película plástica más barata pero menos idónea.

2. La ensalada de IV Gama

El rango de alimentos que se clasificarían como vegetales "listos para su uso" sería bastante extenso, incluiría vegetales crudos (y su mezcla), vegetales mínimamente procesados (lavados, pelado, troceado) con o sin aderezos, combinaciones entre vegetales y trozos de alimentos cocinados.

Los vegetales refrigerados y envasados en que se centra este estudio son los llamados "vegetales de IV Gama" por los franceses y "ready-to-use " o "minimally processed" por los ingleses y norteamericanos. Aun tienen poca difusión en el mercado español pero comienzan a tomar auge (Carbonell, 1989).

Los productos de IV Gama son hortalizas frescas acondicionadas (seleccionadas, peladas, troceadas, lavadas y envasadas) listas para ser consumidas y conservadas en cadenas de frío entre 2- 4°C, con una vida útil de alrededor de 7 días.

Se denomina de IV Gama por venir, dentro de la secuencia histórica de tratamiento y presentación de los productos hortofrutícolas, tras los tradicionales productos frescos (I Gama), las conservas (II Gama), y los congelados (III Gama).

En nuestra sociedad hay una clara tendencia hacia el consumo de productos naturales que no contengan aditivos, como así también resalta la escasez de tiempo, por lo que estos productos ya preparados cobran cada vez mayor importancia y tienen más aceptación. Los vegetales son alimentos que necesitan más tiempo para ser cocinados y ocupan mayor volumen pero al mismo tiempo son importantes en una dieta equilibrada por lo que estas ensaladas y verduras de IV Gama favorecen el consumo al simplificar su preparación.

La idea de IV Gama es originaria de EE.UU., dirigida en un principio a abastecer de lechuga a los restaurantes de comida rápida, o “fast- foods”. Se introdujo en Europa por Alemania y Suiza y fue adaptándose a cada país en aspectos concretos como: los gustos del consumidor, fabricación, distribución, y legislación.

La materia prima, las hortalizas, no difieren en cuanto a su naturaleza de las comercializadas frescas, pero las exigencias particulares de producción hacen que a los productores se les pida cultivos específicos. Los cultivos de hortalizas para IV Gama debe cumplir dos exigencias principales:

- El abastecimiento de calidad específica y homogénea. El producto final no puede variar.
- El abastecimiento regular durante todo el año.

Para mantener la calidad obtenida en la recolección es necesario realizar una rápida **prerrefrigeración** de las materias primas, primer paso de la cadena de frío que no deberá interrumpirse hasta llegar al consumidor. Las hortalizas recolectadas diariamente llegan en camiones frigoríficos y tras superar el control de calidad de materias primas entran en la fase de **prealmacenamiento** a 0-2°C. La fábrica de producción busca que el stock sea mínimo y la calidad máxima por lo que procura recibir las materias primas cada día.

2.1 El proceso

Los vegetales son llevados desde el almacén a la zona de **selección**. Aquí son limpiados y seleccionados de forma artesanal, ocupando esta operación dos

tercios del personal de la fábrica, pues resulta difícil de mecanizar. Los tubérculos, bulbos y raíces necesitan ser pelados, para lo que se suelen utilizar métodos abrasivos. En el proceso de selección se producen unas pérdidas de rendimiento que oscilan entre el 20 y el 80 % del producto, según el tipo de hortaliza y su calidad. La materia prima permanece apenas 10 minutos en esta parte de la fábrica, climatizada a 12 °C como máximo durante todo el año.

La parte útil de la hortaliza es transportada mediante una cinta desde esta zona de selección a otra zona de la planta de procesado, que está separada físicamente de la primera.

En esta nueva zona los vegetales son **rayados o cortados** en rodajas, cubos o trozos diversos, mediante la utilización de diferentes máquinas cortadoras. En un sistema de transporte en agua fría, no superior a 4 °C, son conducidos los trozos de vegetales a la sala final de procesado, anterior al almacenamiento final. Ambas salas están totalmente separadas.

El **lavado** del producto se realiza mediante inmersión en un baño de agua a una temperatura igual o inferior a 4 °C. En el agua de lavado se inyecta un chorro de aire cuyo burbujeo elimina los restos de tierra o cuerpos extraños, evitando daños mecánicos sobre el producto.

En el agua de lavado se adiciona **hipoclorito sódico** con una concentración total de 50-100 ppm de cloro activo. Los posibles restos de hipoclorito son eliminados en el aclarado posterior por duchas de agua a 2°C, solo pueden quedar como máximo 1 ppm de cloro activo en el producto. El agua de lavado se cambia diariamente pero en ocasiones también se cambia entremedias del lavado de diferentes vegetales si una verdura está muy sucia. El agua de enjuagado renueva el agua de lavado continuamente. Todo el cloro que se añade no es realmente activo, parte se une a minerales, materia orgánica, etc. En la Figura 2 se observa un esquema de la las partes en que se disocia el hipoclorito añadido. La acción del cloro es más eficaz cuanto más ácido es el medio, sin embargo el pH aconsejable es alrededor de 6 (Carbonell, 1989). El aumento de la concentración de hipoclorito por encima de 100 ppm no es aconsejable porque si bien aumenta el efecto antimicrobiano, los efectos corrosivos también aumentan. Se ha demostrado que el disminuir el pH a 5 aumenta del orden de 1.5 a 4 veces el efecto antimicrobiano (Adams et al., 1989). Según algunos autores la forma HOCl es la forma activa del hipoclorito pero se ve afectada por el pH, materia orgánica, dureza del agua y temperatura (Brackett, 1987). Estudios realizados por

Adams et al. (1989) sostenían que los microorganismos supervivientes en lechugas lavadas con hipoclorito no poseían resistencia intrínseca a este, por lo que sería la falta de contacto con el desinfectante lo que permitiría que sobrevivieran los microorganismos. Esta supervivencia podría estar asociada a la disminución de la actividad del hipoclorito por contacto con el tejido vegetal (Adams et al., 1989). Sin embargo, estudios donde se añadió Tween 80 junto al hipoclorito que aumenta el efecto inhibitor, sugieren que el efecto inhibitor está relacionado con la propiedad hidrofóbica de la cutícula vegetal donde se formarían compartimentos en los que los microorganismos podrían permanecer sin ser afectados por la solución acuosa (Adams, et al., 1989).

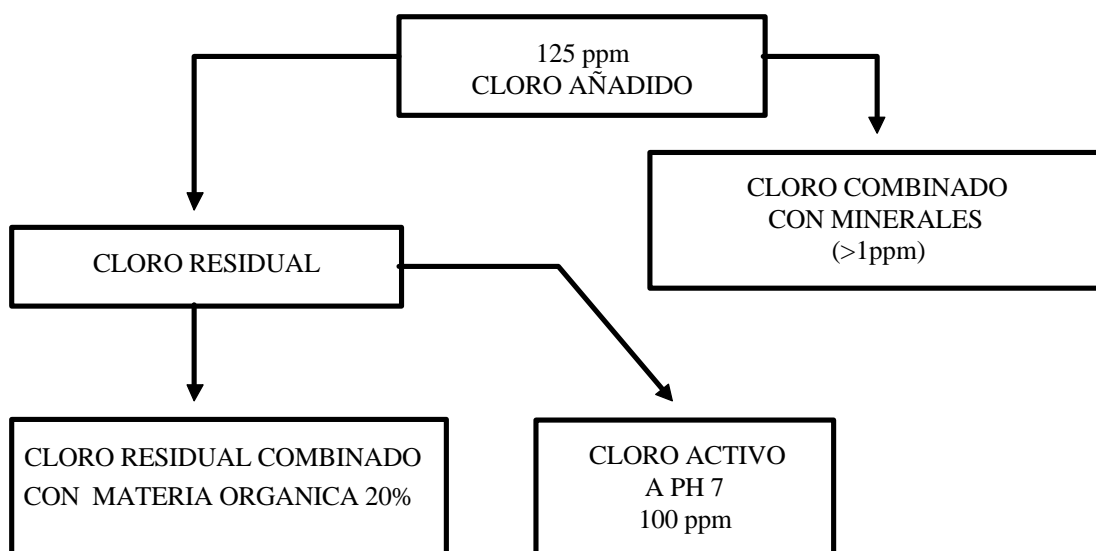


Figura 2. Esquema de la disociación del hipoclorito sódico en el agua.

El exceso de agua es eliminado mediante el empleo de **centrifugas**.

Las mezclas de vegetales se pueden realizar en dos puntos luego del lavado o después del centrifugado.

El producto ya seco pasa al **pesado** automático asociativo. Este equipo de pesado automático asociativo está compuesto por una serie de células de peso, dispuestas en círculo y alimentadas simultáneamente por vibración. Un microprocesador calcula en cada instante si la suma de dos o más células

corresponden al peso requerido y cuando se alcanza se abren las células para completar el contenido de una bolsa.

La caída del producto en el tubo de alimentación de película plástica desencadena la soldadura y el corte del plástico, liberándose así una bolsa completa del producto terminado. Antes de proceder al cierre pueden ser inyectados con una composición deseada de gases. En las ensaladas analizadas no se realizó ninguna inyección.

Al final de la cadena se coloca un detector de metales.

Una vez confeccionado el producto se empaqueta en cajas de cartón y se almacena en frigoríficos para productos terminados a 2°C hasta ser distribuidos.

En la distribución debe mantenerse la cadena de frío y se deben utilizar expositores adecuados en los puntos de venta.

La vida media de este producto es de 7 a 12 días, según los vegetales utilizados, el tamaño de troceado, la cadena de frío en el procesado, transporte y distribución, y parece influir enormemente en el crecimiento bacteriano la interacción entre el metabolismo que desarrollan los vegetales envasados y el tipo de material de embalaje (Guerzoni et al., 1991).

La elaboración de productos de IV Gama deja bastantes residuos vegetales, que según Carbonell (1989) constituye aproximadamente el 50 % de todas las hortalizas que entran a la fábrica.

2.2 Características biológicas de los vegetales de IV Gama

2.2.1 Vida media

La vida media de un producto se definiría como el tiempo transcurrido entre la cosecha o elaboración hasta su consumición, manteniendo este su calidad y seguridad (Greengrass., 1993).

Los vegetales envasados en atmósfera modificada tienen una vida media de aproximadamente 7 a 12 días y se ve afectada por una serie de factores intrínsecos y factores extrínsecos. Entre los factores intrínsecos estarían la tasa de respiración, el pH, la a_w , la estructura biológica, la producción de etanol y la sensibilidad a este. Entre los factores extrínsecos estaría la cosecha o madurez del producto en el momento de la cosecha, la manipulación, la higiene, la

temperatura, la humedad, el material de envasado y la proporción gas-producto (Greengrass, 1993).

2.2.2 Factores intrínsecos

Los vegetales de IV Gama están constituidos por células vivas, por lo tanto tienen lugar en él numerosas reacciones biológicas que se ven afectadas por la eliminación de las capas exteriores de protección, por el corte, troceado o rallado del producto.

La **respiración** sigue realizándose y será más o menos intensa según la especie, la madurez o la temperatura. En el momento de realizar el envasado debe tenerse en cuenta que la respiración consume O_2 y libera CO_2 que se acumula en la atmósfera, modificándola y produciendo una disminución en la tasa de respiración (Day, 1993).

Los vegetales y frutas con altas tasas de respiración son más perecederos y por lo tanto tendrán menor vida media. Un producto cortado tendrá una tasa de respiración mucho mayor que entero y un producto joven tendrá una tasa de respiración superior al maduro. Incluso existen diferencias entre variedades diferentes de una misma especie.

En un producto envasado y cerrado herméticamente, simplemente por la respiración del vegetal se producirá un cambio de la atmósfera, se consumirá el O_2 y aumentará la concentración de CO_2 , esto provocará una disminución de la tasa de respiración (Day, 1993). La tasa de respiración se ve afectada por la temperatura y la atmósfera modificada.

El **pH** inhibe el desarrollo de microorganismos de alteración y patógenos en productos ácidos como las frutas (limón, naranjas, pomelos, etc.) que tienen un pH por debajo de 4.5. Sin embargo la mayoría de los vegetales tiene pH superiores a 4.5. Ensaladas de lechugas envasadas en atmósfera modificada almacenadas a $5^{\circ}C$ experimentaron un descenso de pH desde 7.5 hasta 6.5 aproximadamente a los 15 días, mientras que a $12^{\circ}C$ partiendo del mismo pH inicial descendió hasta 7. En el caso de la ensalada de zanahoria el pH descendió solo una unidad con un pH inicial de 7 tanto a 4 como $12^{\circ}C$ (Abdul-Rauof et al., 1993). El pH de zanahoria fresca descrito por otros autores es entre 4.9 y 5.4 y de col entre 5.2 y 5.4 (Powerie y Skura, 1990).

La **actividad agua** es elevada, entre 0.97 y 1, medio ideal para el crecimiento bacteriano.

La resistencia de las plantas o frutas a la difusión de los gases dependerá también de la **estructura biológica** de estas. El intercambio gaseoso que realiza la planta con su medio ambiente dentro del envasado en atmósfera modificada puede describirse en cuatro fases:

1. difusión del gas a través de la dermis del vegetal,
2. difusión del gas a través del sistema intercelular,
3. intercambio de gases entre el medio intercelular y la célula
4. difusión en solución dentro de la célula hacia los centros receptores de O₂ o hacia las centros de producción de CO₂ y etanol.

El CO₂ y el etanol producidos por la respiración se liberan en el hialoplasma, se difunden al espacio intercelular hacia zonas de menor concentración hasta llegar a la dermis. Aquí se difunden por las aberturas o poros del producto hacia el ambiente (Kader et al., 1989).

El O₂ hace el camino inverso al CO₂ y etanol hasta llegar a los aceptores de O₂.

La producción de **etileno** y la sensibilidad a este se ven disminuidas en las frutas y vegetales envasados en atmósfera modificada. El etileno acelera la maduración del producto. Se ha descrito que bajas concentraciones de O₂ o altas de CO₂ o ambos juntos disminuyen la respiración y la producción de etileno (Zagory y Kader, 1988).

2.2.3 Factores extrínsecos

La **recolección** del producto es un factor extrínseco importante pues si se recolecta demasiado pronto no tendrá la calidad deseada y si se realiza más tarde la vida media será más corta. Normalmente los vegetales se recolectan un poco antes de llegar al pico de madurez porque así permanecen más firmes y resisten mejor los posibles daños mecánicos.

La **manipulación** debe realizarse de forma que se eviten lo más posible los daños tisulares que darán lugar a pérdida de materia, enzimas, decoloraciones, y será una zona susceptible de desarrollo microbiano (Day, 1993). Si se cuida que las cuchillas durante el troceado permanezcan bien afiladas las lesiones serán

menores. El tamaño del corte también afecta la calidad final del producto (Bolin et al., 1977)

La práctica de la **higiene** rigurosa y sistemática es importantísima en toda la cadena de producción, desde la cosecha hasta el terminado del producto. Evitando que se produzcan contaminaciones, tanto de gérmenes patógenos como alterantes, se consigue aumentar la vida media del producto.

La **temperatura** es uno de los factores extrínsecos más importantes e influye más en la vida media del producto envasado en atmósfera modificada que la propia atmósfera modificada. La lechuga cortada tiene una vida más larga almacenada a 2°C que a 5°C o 10°C. A mayor temperatura se produce mayor pardeamiento enzimático, reblandecimiento y pérdida del color verde de la lechuga (Bolin et al., 1977). La recolección debe hacerse a primera hora de la mañana o por la noche para que los vegetales recolectados no sufran altas temperaturas. El transporte debe hacerse refrigerado o en vacío. Durante la elaboración del producto las salas se mantienen a 10-12°C y el producto terminado se almacena a 4°C. El control de la temperatura a lo largo de la cadena es crítico para todo producto de calidad.

La pérdida de **humedad** del producto lleva al deterioro de la calidad, el vegetal se arruga y se marchita. Los vegetales con un contenido en agua del 80-95 %, se desecan rápidamente si la humedad relativa de su entorno desciende y basta que pierdan un 3-6 % de su contenido en agua para que se muestren deteriorados. Esto se puede controlar con envases con películas plásticas impermeables al vapor de agua. El inconveniente de que sean totalmente impermeables al vapor de agua sería la creación de un ambiente de alta humedad y condensación de agua en el interior del envase, medio muy favorable para el desarrollo de microorganismos (Zagory y Kader, 1988). El control de la temperatura refrigerada favorece la menor transpiración. La pérdida de humedad también está relacionada con el tipo de vegetal, si está entero o troceado, cual es la superficie en relación al volumen que posee y si cuenta con una estructura protectora gruesa. Por ejemplo, la zanahoria pierde rápidamente su humedad debido a que la capa protectora, dermis, es delgada, más que en el caso de una manzana. Si el producto está troceado perderá agua más rápidamente.

La película plástica del **envase** debe seleccionarse según el producto a envasar. Si se utilizan películas plásticas impermeables en el envasado de vegetales frescos se acumulará el CO₂ producido por la planta y comenzarán

procesos fermentativos con la consecuente formación de etanol, acetaldehído, ácidos orgánicos, y otros compuestos que están asociados con olores y sabores desagradables y por lo tanto el alimento pierde calidad. A todo esto se le añade el factor riesgo del crecimiento de gérmenes patógenos anaerobios como el *Clostridium botulinum*. En términos generales se recomienda siempre un 2-3 % de O₂ (Day, 1993).

Si la película plástica utilizada para el envasado es excesivamente permeable no creará la atmósfera modificada o será muy leve. El producto se deshidratará y se alterará como si estuviese al aire.

Si se escoge la permeabilidad intermedia adecuada se puede llegar a alcanzar un equilibrio de atmósfera modificada (EMA). Se encuentra en equilibrio cuando la tasa de transmisión de O₂ y CO₂ se igualan a la tasa de respiración del producto.

Un parámetro a considerar a la hora de envasar es la **proporción de gas y producto** a mantener en el envase. Para ser eficientes el gas debe rodear al producto por completo para extender la vida media. Por regla general los fabricantes suelen envasar proporciones de 3 partes de gas por cada parte de producto o una parte y una parte (Day, 1993). La cantidad de producto y su tasa de respiración determinarán las necesidades de O₂. Por otra parte la superficie de la película plástica y su permeabilidad al gas determinará las tasas de transmisión de CO₂ y O₂ entre dentro y fuera del envase. El volumen del envase determinará el tiempo que tardará en alcanzar el equilibrio EMA. Si se insufla aire se debe controlar la cantidad pues no es deseable que el envase aparezca abombado.

2.3 Calidad del producto

La **calidad de la presentación del producto** es muy importante para el fabricante pues será ésta la responsable de la primera elección del consumidor frente a la competencia. La pérdida del color verde en vegetales procesados y almacenados es debida a la degradación de la clorofila. Los carotenoides más importantes que dan el color a frutas y vegetales son los derivados alfa y beta carotenos y licopeno. Los carotenos son importantes desde el punto de vista de la nutrición, el sabor y la apariencia como precursor de la vitamina A, precursor de compuestos volátiles del aroma y como pigmentos (Zagory y Kader, 1989). El etileno acelera la biosíntesis de carotenoides y bajas concentraciones de O₂ la reducen. Las antocianinas son pigmentos rojos a pH bajos, incoloros a intermedio

y azules a pH alto. El azul está más relacionado con la quelación de metales que como efecto directo del pH. Se ha visto que el O₂ y la alta temperatura son los factores que más influyen en la degradación de antocianinas de frutas como las fresas, cerezas, uvas, grosellas y frambuesas (Zagory y Kader, 1989).

Los cortes en el tejido vegetal se ponen en contacto con el oxígeno dando lugar al **pardeamiento enzimático y no enzimático** que adquiere tonalidades rosáceas, pardas, grises o negruzcas. La velocidad de estas reacciones dependerá de diversos factores como son la especie, el momento de la recolección y la temperatura.

Se ha visto que la atmósfera controlada retrasa la pérdida de clorofila (verde), la biosíntesis de carotenoides (amarilla y naranja) y de antocianinas (rojo y azul), y la biosíntesis y oxidación de compuestos fenólicos (marrón) (Zagory y Kader, 1989).

La **calidad de la textura** en los vegetales se busca la rigidez del tejido sin que implique dureza. El endurecimiento que sufren los vegetales durante el almacenamiento parece estar ligado al metabolismo de los fenoles y la lignificación. Con O₂ en bajas concentraciones y altas de CO₂ se reduce parcialmente la acción de la fenilalanina hidroxilasa (PAL) y se retrasa el pardeamiento en lechugas (Zagory y Kader, 1989).

El **sabor** está determinado en frutas y vegetales por la cantidad de carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos, lípidos y fenoles. Se producirán olores y sabores desagradables al iniciarse la respiración anaerobia. El efecto específico del envasado en atmósfera modificada dependerá de cada producto. Bajas concentraciones de O₂ y altas de CO₂ reducen la degradación de almidón a azúcar y por lo tanto inhiben el desarrollo de sabores dulces. Niveles moderados de CO₂ (5-7.5 %) inhibieron el metabolismo de los azúcares. En otros estudios, niveles elevados de CO₂, por encima del óptimo, aumentaron la descomposición de la glucosa o sacarosa en zanahoria, coles de bruselas y rábanos (Zagory y Kader, 1989). Los ácidos orgánicos y sus sales, ésteres, y glicósidos son importantes fuentes de energía para la célula vegetal y responsables del aroma y sabor especialmente en las frutas. Bajos niveles de O₂ y altos de CO₂ reducen la degradación de varios ácidos orgánicos, sin embargo en otros estudios en lechugas, espinacas y brocoli se observó menor contenido en ácidos orgánicos en los productos envasados en atmósfera modificada comparados con los almacenados en aire (Zagory y Kader, 1989).

El contenido de los vegetales en proteínas y aminoácidos es bajo pero tienen un papel importante como componentes primarios del sabor y también influyen en la degradación de otros compuestos responsables del sabor como la oxidación del ácido ascórbico. Varios aminoácidos son considerados de sabor desagradable, otros dulces, salados o amargos (Zagory y Kader, 1989).

Una atmósfera modificada inapropiada llevaría a procesos fermentativos dando como resultado malos olores y sabores, debido a la formación de etanol y acetaldehído (Zagory y Kader, 1989).

La **calidad nutricional** es un aspecto de la calidad total que se debe tener en cuenta. La composición química general de los vegetales es por término medio el 88 % agua, el 8.6 % hidratos de carbono, el 1.9 % proteínas, el 0.3 % grasas y el 0.84 % cenizas (Jay, 1991) pero la composición más detallada de los ingredientes de la ensalada estudiada se pueden observar en la Cuadro 6.

Cuadro 6: Composición química aproximada de alimentos vegetales , ingredientes de la ensalada estudiada (en porcentajes).

Vegetales	Agua	Hidratos de Carbono	Proteínas	Grasas	Cenizas	Referencia
Col	92.4	5.3	1.4	1.2	0.8	Jay, 1991
Lechuga	94.8	2.9	1.2	0.2	0.9	Jay, 1991
Zanahoria	86	8	2.4	0.3	1.2	Eskin, 1989

Las vitaminas se degradan rápidamente luego de ser cosechado el vegetal por lo que es necesario que el tratamiento posterior sea rápido. El efecto de la atmósfera controlada sobre las vitaminas difiere según el producto, la atmósfera y la temperatura. El ácido ascórbico en el caso de lechuga, perejil, col china, espinacas, judías verdes, brocoli, coles de bruselas, manzanas, grosellas rojas, y berro envasadas en atmósfera controlada con 1-4 % de O₂ se degrada más lentamente debido probablemente, al menor contenido en oxígeno y por lo tanto es menos oxidado (Zagory y Kader, 1989). La vitamina A no se encuentra en general en grandes cantidades pero sí su precursor el caroteno. Este se degrada con facilidad y sobre todo cuando se marchitan las hojas. Bajas concentraciones en O₂ y altas en CO₂ parece prevenir su degradación (Zagory y Kader, 1989).

Los vegetales son ricos en minerales y constituyen una fuente importante de estos para la nutrición humana. Los minerales no se pierden durante el almacenamientos pero pueden emigrar a diferentes partes y concentrarse. Se ha

visto que durante el almacenamiento de coliflores con bajo contenido en O₂ el potasio y el molibdeno disminuían en la cabeza y aumentaban en las hojas (Zagory y Kader, 1989).

2.4 Control de calidad y seguridad del producto

El control de calidad comprende el control sobre la calidad y seguridad de los productos frescos y de la película plástica del envase, el proceso de producción y envasado, evaluación del producto elaborado, distribución y almacenamiento hasta que llega al consumidor.

La seguridad y calidad del producto es importantísima. En primer lugar no debe constituir ningún riesgo para la salud. Las autoridades se encargan de controlar que los productos cumplan los requisitos legales para salvaguardar la salud pública pero al mismo tiempo al productor no le interesa que sus productos cobren mala fama. En segundo lugar es muy importante las características organolépticas, textura, sabor, valor nutricional, etc., que presenten pues en ello se fijará el consumidor y de ello dependerá que elija una marca comercial u otra. El método más frecuente y además más recomendado para el control de la seguridad y calidad de este tipo de productos es el Análisis de Riesgos e Identificación de Puntos Críticos de Control (ARICPC). Hoy día también se habla del Control de Calidad Total (TQC) para referirse al control de la calidad no relacionada con la seguridad como es la calidad organoléptica y nutricional. El TQC es un planteamiento para el logro de los objetivos de calidad a un precio óptimo, y en todo momento satisfaciendo las exigencias del consumidor. Es una estrategia para ganar competitividad en la industria cada vez más competitiva.

El hecho de que se trata de productos no tratados térmicamente y por lo tanto con mayor riesgo para la salud, hace que, la aplicación del ARICPC sea aún más necesaria. Los alimentos envasados en atmósfera modificada son productos con ingredientes sensibles (carne, pescado, leche, huevos, vegetales, frutas,...), lo cual, sumado a la posibilidad de sufrir aumento de temperaturas, hace que el ARICPC tome un papel importante en la seguridad de estos productos

El concepto de análisis de riesgos e identificación y control de puntos críticos (ARICPC) se refiere a la aplicación sistemática de una metodología de identificación, evaluación y control de riesgos de supervivencia, contaminación o desarrollo de microorganismos patógenos. Este sistema evita los numerosos defectos inherentes a los métodos de inspección y confianza en las pruebas

microbiológicas. Al centrar la atención en los factores que afectan directamente a la inocuidad microbiológica del alimento se suprime el despilfarro de recursos garantizando el logro y mantenimiento de los niveles deseados de calidad y resultan más favorables las relaciones coste/beneficios. En otras palabras, se basa en tomar todas las medidas preventivas necesarias para evitar el desarrollo de microorganismos patógenos en aquellos puntos de la cadena de producción en que se ha detectado como posible punto de contaminación o de desarrollo microbiano. Se han establecido seis principios básicos:

1. Identificación de los riesgos o peligros y valoración de su gravedad y de la probabilidad de su presentación (análisis de riesgos), asociados con la producción, obtención o recolección, procesado/manufactura, distribución, comercialización, preparación y /o utilización de productos crudos o de productos transformados. El **riesgo o peligro**, que en inglés se denomina “hazard”, se refiere a la contaminación, supervivencia, o crecimiento inaceptable de microorganismos o la producción de sus toxinas, que afectan la inocuidad o alteran el alimento. La gravedad se refiere a la magnitud de este riesgo para la salud. El riesgo (“risk” en inglés) es una estimación de la probabilidad de que exista el peligro.
2. Determinación de los **puntos críticos de control** (PCC) en los que puedan ser controlados los peligros identificados. La determinación de los PPC es una operación (práctica, procedimiento, localización o proceso) en la que es posible intervenir sobre uno o más factores con el fin de eliminar, evitar o minimizar un peligro. Se denominará PCC1 a aquellos que aseguren la eliminación del peligro y PCC2 a aquellos que los reduzcan al mínimo.
3. Especificación de los **criterios** que indiquen si una operación está controlada en un determinado punto crítico de control. Estos criterios se refieren a los límites especificados de las características de naturaleza física, química, biológica o sensorial.
4. Establecimiento y aplicación de métodos para vigilar cada punto crítico a fin de **comprobar** que se encuentra bajo control. La vigilancia implica la observación, la medición y el registro sistemático de factores de importancia para controlar el peligro. Los métodos de vigilancia elegidos deben servir para tomar medidas para rectificar toda situación que esté fuera de control al iniciar o durante una operación de un proceso. Los principales tipos de vigilancia utilizados son cinco: observación,

evaluación sensorial, determinación de las propiedades físicas, análisis químico y examen microbiológico.

5. Aplicación de **medidas correctivas** apropiadas cuando la vigilancia revele que un PCC no se encuentra bajo control
6. **Verificación**, es decir, empleo de información suplementaria y de pruebas apropiadas para cerciorarse de que el sistema funciona según lo previsto.

Hay una serie de condiciones, requisitos previos, que se suponen existen para establecer el ARICPC, como es el caso del control de la calidad del agua, un programa para asegurarse del mantenimiento y funcionamiento de los equipos, un programa de control de plagas, buenas prácticas de fabricación incluyendo control sanitario y de la higiene del personal y un procedimiento eficaz de control del proceso (Alli, 1993).

Si bien al principio de aplicar ARICPC resulta un gasto adicional y requiere mayor tiempo, una vez controlados los puntos críticos se ahorra mucho tiempo, y resulta menos costoso y más eficaz que el análisis de muestras y la inspección de la planta de producción. Otra ventaja del ARICPC es que permite adoptar medidas correctoras con rapidez, al poder detectar una contaminación inaceptable, un fallo del tratamiento o la existencia de condiciones favorables a la multiplicación de microorganismos en el momento en que se produce o poco después.

El control de la calidad de los vegetales destinados a la elaboración de productos de IV Gama parte de la elección de la especie de vegetal a cultivar, los fertilizantes y si es posible no utilizar fertilizantes de origen animal o controlarlos muy bien. No utilizar para el riego aguas residuales.

El enfriamiento es importante en los vegetales de hojas. El control adecuado de la temperatura resulta esencial para una buena curación que facilite la cicatrización de las lesiones y reduzca al mínimo la alteración de las cosechas de raíces (ICMSF, 1991).

En la lechuga se pueden encontrar microorganismos patógenos tales como *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae* y entre la microflora *Flavobacterium*, *Chromobacter*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Aerococcus*, *Streptobacterium* y *Lactobacillus* (ICMSF, 1991).

El principal riesgo sanitario de los vegetales es la contaminación microbiológica con microorganismos fecales patógenos a partir de los fertilizantes de origen animal y aguas residuales. Estos microorganismos pueden sobrevivir largo tiempo en la superficie de las hojas o en la tierra. La contaminación puede ser evitada o por lo menos reducida al mínimo (PCC2), controlando la fertilización con abono animal o el riego con aguas residuales o con aguas extraídas en el cauce inferior de ríos donde desagüen aguas residuales. Se comprobará este punto inspeccionando los vegetales con regularidad, como así también las fuentes de agua y fertilizantes.

La **recolección** se realizará antes que se espiguen. La lechuga tiene un tejido poco consistente y se rompe con facilidad por lo que se puede lesionar al ser recolectada y le favorece el ser almacenadas inmediatamente en frío. El control consistirá en realizar el corte con cuchillas afiladas que eviten el desgarro. Toda la maquinaria utilizada se conservará libre de residuos. Se comprobará la habilidad de los recolectores, el ajuste de las cosechadoras y la limpieza de los equipos de transporte. El transporte es refrigerado hasta la fábrica de cuarta gama.

En la **recepción** de vegetales crudos el riesgo que se identifica es que sean portadores de microorganismos, tanto propios, como procedentes de restos de tierra así como la posible contaminación química (pesticidas, nitratos, etc.). El punto crítico de control sería la limpieza de los productos frescos y el control sería el lavado del producto en caso necesario. Se supervisa visualmente y se realizan análisis periódicos del producto fresco.

El **prealmacenamiento** se realiza a 0-2°C (a temperatura ambiente, las lechugas se marchitan rápidamente y el frío reduce la respiración). Aquí se identifican dos riesgos, por un lado la posibilidad de crecimiento de los microorganismos presentes en los vegetales y por otro que estos sean contaminados en la cámara de refrigeración donde se almacenan. Por lo tanto, los puntos críticos de control a este nivel son la temperatura y la limpieza de la cámara de refrigeración. Se controla este paso manteniendo la temperatura adecuada y la zona de prealmacenamiento limpia y desinfectada. Se comprueba realizando registros de la temperatura, velocidad del aire y la humedad en la cámara, zona de fácil limpieza y control microbiológico y visual.

Cuando el producto va a ser introducido en la cadena de producción es transportado hacia el inicio de esta. Debe controlarse la temperatura de la sala y

el tiempo que permanece en espera que debe ser el mínimo para que no de pie a ningún desarrollo microbiano. Esto debe ser supervisado.

La fase de **selección** donde los vegetales son limpiados y recortados de forma artesanal mejora la calidad de la lechuga, col, escarolas, etc., al eliminar las hojas marchitas, lesionadas. Sin embargo existe el riesgo de toda manipulación humana de introducir gérmenes patógenos, el error humano de dejar elementos contaminados en el producto y la contaminación del equipo que se esté utilizando. Luego aquí es muy importante la higiene personal y salud de los manipuladores, su formación y facilidades para lavarse las manos, como así también la limpieza de los equipamientos. Estos puntos críticos se controlan formando, informando y dando todas las facilidades posibles a los manipuladores sobre su tarea a realizar, controles médicos y que todos los residuos que se van generando se deben ir evacuando para reducir al mínimo la contaminación microbiana y los equipos se limpien por lo menos una vez al día.

El **troceado** del vegetal mediante máquinas cortadoras no implica más riesgo sanitario que el de la adecuada limpieza de la cortadora y el hecho de si existen microorganismos en lesiones del vegetal aumenta la posibilidad de crecimiento microbiano. Desde el punto de vista organoléptico es importante que se controle que los equipos tengan las cuchillas, estén bien afiladas y según la disposición deseada, como así también que estén limpios y desinfectados. Se comprobará realizando análisis microbiológicos de las superficies de los equipos en contacto con los alimentos. El traslado hacia los baños de lavado se realizará con un canal de agua fría.

El **lavado** se realiza en baños de agua a menos de 4°C, se agita por burbujeo de aire para facilitar que la suciedad se desprenda de las hojas. Los riesgos en esta etapa serían la posible contaminación microbiológica por los baños de agua, el uso excesivo de desinfectante (según la legislación) o un proceso ineficaz. Los puntos críticos de control serían entonces la carga bacteriana, el pH del agua del baño y la concentración del desinfectante. El control que se efectuará será usar agua potable que se reciclará periódicamente, a una temperatura de 4°C y este agua de lavado llevará hipoclorito sódico (100 ppm) que deberá permanecer en contacto con el vegetal 3-5 minutos lo que estará regulado de alguna forma. La comprobación que se realizará será verificando la temperatura y pH del agua, así como su reciclado, determinando las

concentraciones de cloro activo presente en el agua y que el sistema de regulación, el burbujeo y los rociadores funcionen correctamente.

Posteriormente se pasará a la fase de **enjuagado** para que la concentración de cloro activo quede reducida a 1 ppm. Los puntos críticos de control serían la posible contaminación bacteriana del agua y el exceso de desinfectante en el producto. Se controlará renovando periódicamente el agua, manteniéndola refrigerada a la temperatura adecuada de aproximadamente 4°C, y que permanezca el tiempo necesario en el enjuagado. Se comprobará el flujo de agua de enjuagado, la temperatura del agua, determinaciones del contenido residual del desinfectante y las características organolépticas del producto.

En el **centrifugado** existe el riesgo de que el producto quede demasiado húmedo y por lo tanto sea un medio adecuado para el crecimiento microbiano y por otro lado que sufra lesiones por la fuerza del centrifugado. El control se ejercerá sobre la velocidad y tiempo de centrifugado y la cantidad de llenado del tambor. Se comprobará la humedad del producto terminado, el tiempo y velocidad del centrifugado y el llenado del tambor.

En el **pesado y el embolsado** la contaminación se puede producir por el equipo, por el aire y por el material de embalaje. Los puntos críticos de control serán la temperatura de la sala, la concentración de restos de producto en el equipo, la calidad microbiológica del aire y del material de envasado y la efectividad del cierre del envase. Se controlará la higiene de los equipos, la temperatura y limpieza del aire y el sellado correcto del envase. Se verificará registrando la temperatura y sometiendo a un grupo de muestras a la prueba de sumergirlas en agua para verificar el sellado.

Durante el **almacenamiento** del producto terminado se controlará la temperatura, humedad y velocidad del aire para evitar el desarrollo de microorganismos y se registrará la temperatura para comprobarlo.

Durante el **transporte y distribución** es importantísimo el mantener la temperatura de refrigeración hasta que llegue al consumidor y esto debe controlarse. La comprobación se realizará con monitorización electrónica de la temperatura y humedad introducidos en los camiones frigoríficos.

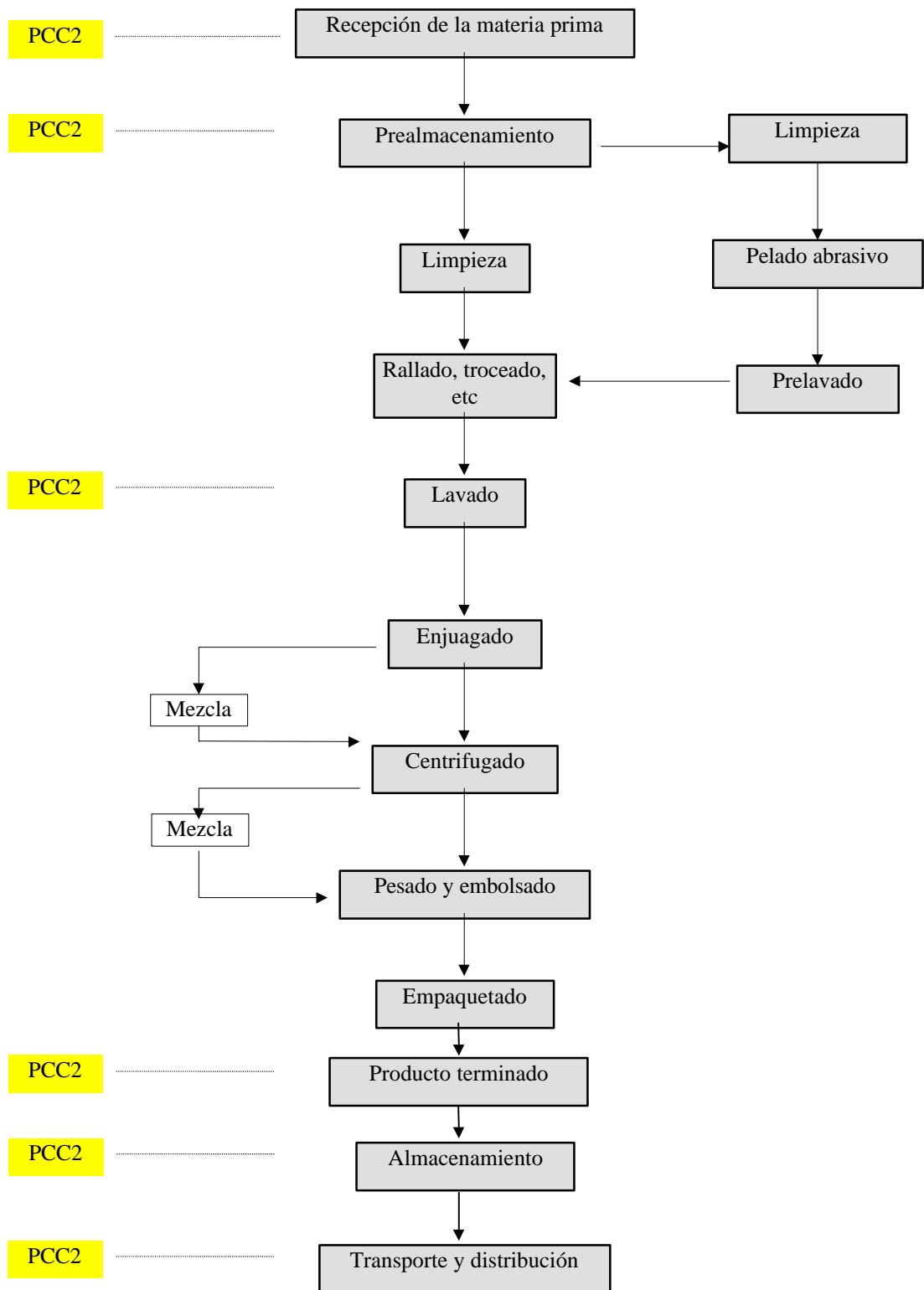


Figura 3. Proceso general de fabricación de ensalada de IV Gama

Para el caso de la zanahoria el control de calidad es muy semejante solo que como se describe en la Figura 3 después de la limpieza es necesario un proceso abrasivo y un prelavado en el que se controlarán los mismos parámetros que en el lavado.

Trabajos realizados en este tipo de alimento demuestran la ineficacia del lavado para eliminar la microflora y especialmente microorganismos como *Salmonella*, *Shighella sonnei*, *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila*. Esto indica la necesidad de darle importancia a las repercusiones de seguridad microbiológica que tiene este alimento (Abdul- Raouf et al., 1993).

2.5 Legislación

Los vegetales envasados en atmósferas modificadas, no tienen en España reglamentación alguna, aunque podrían ser incluidos dentro de semiconservas vegetales, definido como "aquellos productos de origen vegetal o animal, perecederos, mantenidos en envases impermeables a líquidos y que han sufrido un tratamiento autorizado que asegure una conservación limitada en ambiente refrigerado.

Hay varios aspectos que deben regularse, entre estos, la película plástica del envase utilizada, la seguridad microbiológica del alimento y la integridad del envase. Puede ser envasado en material metálico, vidrio o plástico (Reglamentación Técnico Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de platos preparados, del Real Decreto N° 2519, del 9 de agosto de 1974) También entrarían dentro de la legislación correspondiente a comedores colectivos (R.D. 2817/83; B.O.E. 270, 11 Nov. 1983). No obstante, por las características del producto y su aceptación en el mercado español, se hace necesaria una reglamentación específica que lo asegure.

El material utilizado, la película plástica para el envasado, es una fuente potencial de contaminación del alimento por migración de las moléculas que lo forman. La directiva de la CE, 90/128/EEC con fecha 23/02/1990 describe los materiales y artículos elaborados con plástico que pueden ser utilizados para contacto con los alimentos. Estas directivas se reflejan en leyes con reglamentaciones en los distintos países europeos (Greengrass, 1993).

Las películas plásticas utilizadas para el envasado deben cumplir lo dispuesto en la Reglamentación Técnico Sanitaria sobre Materiales Poliméricos

(R.D. 1125/1982, B.O.E. 133, del 4 de junio de 1982 y correcciones del R.D.1425/1988, B.O.E. 288, de 1 de diciembre de 1988 y R.D. 668/1990, B.O.E. 130, de 31 de mayo de 1990) y Lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos (R.D. 211/1992, B.O.E. 72, de 24 de marzo de 1992, Orden de 3 de julio de 1985, B.O.E. 166, de 12 de julio de 1985 y R.D. 1769/1993, B.O.E. 266, de 6 de noviembre de 1993).

La seguridad de que se trata de un alimento libre de agentes patógenos y de sano consumo es importante. Debido a las características particulares de refrigeración y creación de atmósfera modificada ciertos gérmenes patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium*, pueden crecer y constituir un grave riesgo.

En la legislación alemana se establece que debe realizarse el control de *Listeria monocytogenes*; *E. coli* (solo ocasionalmente y en pequeña proporción); y *Enterobactereaceas* aunque no se considera contaminación fecal en el caso de los vegetales crudos. La propuesta que tienen formulada es de un límite de 5×10^7 /g de mesófilos aerobios, 10^3 ufc/g de *E. coli*, y ausencia de *Salmonella* en 25 g de muestra (Garrido, comunicación personal, 1994).

En Holanda se establece para productos de IV Gama que en el día de caducidad podrá haber como máximo (Garrido, comunicación personal, 1994):

Recuentos de aerobios totales	10^7 ufc/g
Enterobacterias	10^5 ufc/g
Estafilococos	5×10^2 ufc/g
Mohos y levaduras	5×10^6 ufc/g
Lactobacilos	ausencia

En Austria se acepta como niveles máximos de recuento para este producto (Garrido, comunicación personal, 1994):

	Día de caducidad	Día de producción
Aerobios totales	10^6 ufc/g	10^7 ufc/g
Coliformes totales	10^5 ufc/g	10^6 ufc/g
<i>E. coli</i>	ausencia	10^2 ufc/g
Estafilococos	ausencia	ausencia
<i>Salmonella</i>	ausencia	ausencia
Mohos	10^2 ufc/g	10^4 ufc/g
Levaduras	10^4 ufc/g	10^5 ufc/g

En Suiza debe tener menos de 10 ufc/g de *E. coli* (Garrido, comunicación personal, 1994)

En Francia existen ya disposiciones concernientes a las condiciones que deben cumplir los vegetales de IV gama (Extrait du Bulletin Officiel de la République Française, 1992). Entre otros conceptos, establece la necesidad de mantener la cadena de refrigeración durante todo momento, desde la producción hasta el punto de venta. Debe constar en la etiqueta del producto la fecha de caducidad y la temperatura a respetar, que será establecida bajo responsabilidad del fabricante y donde la vida media dependerá de la temperatura de almacenamiento, transporte y venta. Recomienda que la vida media sea igual o menor a 7 días. El producto terminado debe sufrir inspecciones periódicas para asegurar que está libre de microorganismos patógenos y verificar el control de calidad, tanto respecto a las características organolépticas como higiénicas, hasta el final de la vida media del producto. Establece unos parámetros

Cuadro 7. Parámetros microbiológicos de aceptación o rechazo de la calidad microbiológica de productos de IV Gama en la legislación francesa.

	n	c	m	M
Microorganismos aerobios a 30°C/g				
En el momento de ser producido	5	2	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^6$
En el tiempo de caducidad	5	2	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^7$
Coliformes a 44.5°C	5	2	10	10^3
Salmonella en 25 g	5	0	ausenci	ausenci
			a	a

n= número de unidades de muestra de un lote que se analizaron según el programa de muestreo establecido; c= número de muestras que puede sobrepasar el límite m sin ser superior a M; m= límite microbiológico que únicamente c de las muestras pueden sobrepasar; M= nivel límite máximo de aceptabilidad

microbiológicos para determinar la calidad conforme, aceptable, o rechazable (Cuadro 7):

Establece como calidad conforme cuando todos los valores de las muestras observados sean inferiores o iguales a 3m en el caso de que se utilice medio sólido para el cultivo, o bien, sean inferiores o iguales a 10m en medio líquido.

Se considera calidad aceptable cuando ningún valor observado sea mayor que M y los valores están comprendidos entre 3m y M si se utiliza medio sólido y entre 10m y M con medio líquido.

La calidad rechazable es la que es mayor que M.

Las muestras tomadas para el análisis deben tener un volumen igual o mayor a 100g, y deben ser mantenidas a 0-4°C y no congeladas, siguiendo la metodología de análisis contenida en las normas ACNOR (NF V.08-002, NF V.08-010, NF V.08-011, NF V.08-017, NF V.08-013).

El control de la **integridad del envase** es un punto importante, se calcula que el 30-50 % de la tasa de alteración de los alimentos que sufren los Países del Tercer mundo es debido al mal cierre de los envases, frente al 2-3 % del mundo desarrollado (Greengrass, 1993).

3. El mercado y el futuro del envasado en atmósfera modificada.

Los productos envasados en atmósfera modificada no se ven habitualmente en el marketing alimenticio, sin embargo constituyen una porción sustancial y creciente del suministro alimenticio en América y Europa, incluyendo productos envasados en vacío.

Grandes cantidades de frutas y vegetales (15 % de la lechuga producida en EE.UU.) son transportadas a occidente en atmósfera modificada. En Europa varios cientos de panaderos envasan sus productos en atmósfera modificada, especialmente pan y tartas. La pasta fresca está siendo distribuida en su mayoría en atmósfera modificada. En Francia se utilizan grandes cantidades de “sous vide” (comida precocinada y envasada al vacío), en las cadenas de restaurantes (Brody, 1993). Algunos autores estiman más rentable el envasado en atmósfera modificada que el vacío (Seideman y Durland, 1984). En EE.UU. y Canadá más de las tres cuartas partes de la carne vacuna se transporta de las industrias a los vendedores y servicios de catering (hoteles, restaurantes, instituciones) envasada

al vacío y en proporciones similares en Europa. Un tercio de la carne fresca de pollo en EE.UU. es envasada en atmósfera modificada. La mayoría de las carnes curadas o cocinadas en ese país se venden envasadas en atmósfera inerte o vacío.

En Europa, a los vendedores les interesa vender los productos frescos con un margen mayor y reducir los costes de almacenamiento y pérdidas por lo perecedero de estos. Cadenas comerciales como Sainsbury, Tesco, Safeway, Asda, y Marks & Spencer en el Reino Unido, Euromarche, Carrefour y Lenor en Francia, Spar en Holanda, y Tengelmann en Alemania han dominado el mercado de los alimentos al por menor, con sus actividades en alimentos refrigerados y alimentos envasados en atmósfera modificada y han propiciado el desarrollo de alimentos envasados en atmósfera modificada e incluso con exigencias específicas para su cadena comercial (Brody, 1993). El Reino Unido y Francia (Cuadro 8) son los dos países europeos de mayor producción y consumo de alimentos envasados en atmósfera modificada debido probablemente a la organización y fuerza de las grandes cadenas comerciales alimenticias.

Cuadro 8. Mercado europeo de alimentos envasados en atmósfera modificada (Adaptado de Brody, 1993)

	Millones de unidades			
	1986	1987	1988	1990
Reino Unido	360	485	600	750
Francia	165	250	350	500
Italia	43	85	150	300
Holanda	22	45	85	200
Bélgica	15	30	65	130
Alemania (antigua Alemania Federal)	45	65	85	120
Total	650	960	1325	2000

En la Cuadro 9 se puede observar la incidencia de este tipo de envasado en diferentes tipos de alimento en Europa, correspondiendo a los vegetales un bajo porcentaje aún.

Cuadro 9. Mercado europeo de alimentos envasados en atmósfera modificada para uso final (Adaptado de Brody, 1993)

	1986		1988		1990	
	Millones de unidades	%	Millones de unidades	%	Millones de unidades	%
Carne	505	78	995	75	1150	58
Fruta	Despreciable	-	Despreciable	-	50	3
Pescado	50	8	95	7	250	12
Productos de panadería	25	4	60	5	150	9
Vegetales	Despreciable	-	50	4	200	10
Otros productos	70	10	125	9	200	10
Total	650	100	1325	100	2000	100

En los últimos años la producción de vegetales y frutas envasados en atmósfera modificada han aumentado en Europa. Mientras que en Norte América los productos preferentemente envasados en atmósfera modificada (excluyendo el vacío) son pasta fresca, salchichas, galletas y pollo precocinado, en Europa, los productos más significativos son la carne roja fresca, ensaladas vegetales frescas, pasta fresca, comidas preparadas y productos de panadería (Brody, 1993).

En España la producción de este tipo de alimento está aún en sus comienzos, sobre todo si consideramos los productos envasados en atmósfera modificada excluyendo los envasados al vacío. Hasta donde he alcanzado a saber, sólo hay dos productores de vegetales de IV Gama en España, Cadisa y Vega Mayor S.A. Un tercero es Agrofel Pascual Hermanos pero no tiene su fábrica en España (Carbonell, 1989). La primera empresa, Cadisa, lleva produciendo desde 1986 y la segunda desde 1988. La gran dificultad con que se encuentran es la red de distribución que encarece considerablemente el producto.

El objetivo de la industria que produce frutas y vegetales envasados en atmósfera modificada es aumentar su vida media, reducir los costes, producir un producto sano y de calidad. Para ello precisa encontrar el envase adecuado para cada producto. Un entendimiento y conocimiento más profundo de las interacciones entre temperatura, concentraciones gaseosas, permeabilidad de las películas plásticas, resistencia del producto a la difusión gaseosa, tasa de respiración de los vegetales, etc., en general los parámetros extrínsecos e

intrínsecos y su efecto sobre la calidad llevaría a mayores avances tecnológicos. De los estudios realizados por Jones (1989), Kader et al. (1989), Zagory y Kader (1989), Ooraikul, (1990a), y Labuza et al. (1992), se desprende que es necesario profundizar en diversos aspectos en los que destacan los siguientes puntos:

- Permeabilidad de las películas plásticas entre 0 y 20°C con una humedad relativa entre 85 y 95 %.
- Confección de películas plásticas biodegradables eficaces, la posibilidad de incorporar a estos modificadores atmosféricos y el uso de películas plásticas comestibles.
- Tasas de respiración de los productos frescos en atmósfera modificada.
- Relaciones existentes entre la reducción del O₂ y la alta concentración de CO₂ y la producción de etileno.
- Como afecta al producto el hecho de que la atmósfera va continuamente cambiando dentro del envase en atmósfera modificada hasta conseguir el equilibrio y como modifica este hecho los valores predichos a partir de un sistema de atmósfera estable.
- RQ (cociente respiratorio) de diferentes productos y como se afecta el RQ al cambiar la atmósfera.
- Resistencia de frutas y vegetales a la difusión del O₂, CO₂ y etileno bajo diferentes atmósfera y temperaturas.
- Como afecta el CO₂, actividad agua, pH y temperatura para alargar el tiempo de adaptación de los microorganismos y su tasa de crecimiento
- Efecto de la atmósfera modificada sobre microorganismos patógenos y la producción de toxinas
- Probabilidad de que un germen patógeno pueda desarrollarse y producir toxinas antes que los microorganismos alterantes deterioren el alimento, signo de alerta para el consumidor.
- Cual es el mecanismo inhibidor de CO₂.
- Efecto de la atmósfera modificada sobre la textura, sabor, olor y calidad nutricional.
- Desarrollo de un modelo matemático capaz de seleccionar el mejor envase para crear las condiciones ideales en un determinado producto.

- Competitividad entre los microorganismos que componen la microflora natural especialmente el efecto antagónico que ejercen bacterias como las acidolácticas sobre otras bacterias, en alimentos envasados en atmósfera modificada.
- Combinaciones gaseosas de envasado en atmósfera modificada.
- Desarrollo de sistemas de control como los indicadores de tiempo-temperatura que al detectar alteraciones en la historia de la temperatura en la cadena puede predecir la vida media y seguridad del alimento.

4. Los microorganismos y el envasado en atmósfera modificada

La incidencia de los microorganismos en los vegetales refleja la calidad sanitaria de cada etapa del procesado y las condiciones microbiológicas del producto crudo en el momento del procesado (Jay, 1991)

La carga microbiana inicial en los vegetales influye en la calidad del producto terminado. Estudios realizados en España sobre la carga microbiana de vegetales frescos recogidos en mercados, supermercados y del campo, revelaron una media de aproximadamente 10^6 - 10^7 bacterias aerobias en 100g. El 82.6 % de las muestras tenían 10^3 - 10^4 coliformes totales/100g y 32.2 -51 % tenían *E. coli* por encima de 10^3 /100g (García-Villanova Ruiz, et al., 1987, Fernández et al., 1994). *Salmonella* se aisló de 7.8 % de las muestras (García-Villanova Ruiz, et al., 1987).

En la lechuga se pueden encontrar microorganismos patógenos tales como *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae* (ICMSF, 1991) y entre la microflora *Flavobacterium*, *Chromobacter*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Aerococcus*, *Streptobacterium* y *Lactobacillus* (ICMSF, 1991). Trabajos realizados en España recientemente describen el aislamiento a partir de lechugas frescas de *Enterobacter*, *Kliebsiella*, *Escherichia*, *Proteus* y *Serratias* entre las enterobacterias, además *Pseudomonas* y dentro de estas la más frecuente *Pseudomonas fluorescens*. Este mismo trabajo describe el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en el 16 % de las muestras (Fernández et al., 1994). *Aeromonas hydrophila* fue aislada en el 8.1 % de las hortalizas frescas analizadas en Barcelona por De Simón et al. (1994).

La contaminación de productos vegetales puede proceder del riego con aguas residuales y abono animal como así también por la manipulación de alimentos (Abdul-Raouf et al., 1993).

Los factores extrínsecos relevantes que influyen en el crecimiento de microorganismos en el alimento son dos, la temperatura y la composición gaseosa, y son justamente estos los que se controlarán para retrasar la alteración del alimento y extender su vida media. Al ser el efecto inhibitorio de CO₂ dependiente de la temperatura, aquellos microorganismos que toleran el CO₂ pero se encuentran inhibidos a temperatura bajas, se desarrollan al elevarse la temperatura (Hintlian y Hotchkiss, 1986).

La alteración del alimento es causada por el crecimiento microbiano y se caracteriza por su aspecto desagradable en color, textura, olor o sabor. Pero justamente esta alteración es una salvaguarda para que no se produzcan intoxicaciones alimentarias pues su apariencia alerta al consumidor y el alimento no es ingerido.

Los microorganismos alterantes comunes de los alimentos son inhibidos por concentraciones de CO₂ de 5 % v/v, especialmente los psicrotrofos. Se ha observado que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Micrococcus* y *Bacillus* son especialmente sensibles al CO₂. Los hongos, al ser aerobios estrictos, son inhibidos mientras que las levaduras sobreviven en ausencia de oxígeno.

La atmósfera modificada al ser un efectivo inhibidor de la microflora alterante hace que los gérmenes patógenos vean el camino abierto, sin competencia, para desarrollarse en el alimento y tienen mayores posibilidades de alcanzar niveles más altos. El producto tiene una vida media mayor y la presencia de toxinas o gérmenes patógenos no alteran la apariencia del producto y por lo tanto constituye un riesgo para el consumidor.

Niveles altos de concentración de CO₂, se ha visto que inhiben a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolítica*, y el efecto inhibitorio aumenta al disminuir la temperatura (Hintlian y Hitchkiss, 1986)

Clostridium botulinum tipo E, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolítica*, *Escherichia coli* enterotoxigénico, y *Aeromonas hydrophila* pueden crecer a temperaturas inferiores a 5°C. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Bacillus cereus* pueden crecer a una

temperatura ligeramente superior a 5°C. La capacidad de la atmósfera modificada para inhibir estos microorganismos dependerá en gran medida del control de la temperatura. Las bacterias acidolácticas constituyen una competencia fuerte para estos microorganismos por su rápido crecimiento y las sustancias inhibitorias que producen.

Clostridium botulinum tipo E, anaerobio y tolerante de bajas temperaturas, constituye un riesgo grave al desarrollarse en un alimento envasado en atmósfera modificada pues producirá la toxina antes que la alteración del producto pueda ser apreciada por el consumidor (Genigeorgis, 1985). Foegeding y Busta (1983) observaron que el CO₂ estimuló la germinación de esporos lo que haría del uso de CO₂ un alimento con riesgo para la salud pública.

Clostridium perfringens puede crecer en alimentos envasados en atmósfera modificada según diversos estudios pero al mismo tiempo se ha visto que se evita su crecimiento en carne envasada con una atmósfera con 75 % de CO₂ y almacenada a 8°C (Hintlian y Hotchkiss, 1986).

Se ha observado que el 10 % de CO₂ estimuló el crecimiento de *Yersinia enterocolítica*, sin embargo con un 40 % se extendió la fase de adaptación y con un 100 % aumentó aún más la fase de adaptación y disminuyó la tasa de crecimiento (Farber, 1991). Otros autores también han descrito el efecto inhibitorio de CO₂ sobre este microorganismo y que aumenta dicho efecto al disminuir la temperatura (Eklund y Jarmund, 1983). Este microorganismo se caracteriza por su crecimiento psicrotrofo, creciendo a una temperatura mínima de 0-5°C y por lo tanto podría crecer en alimentos refrigerados (Hintlian y Hotchkiss, 1986).

Escherichia coli es causante de procesos enteropatológicos, enteroinvasivos y enterotoxigénicos. En 1982, *E. coli* O157:H7 fue relacionado con un brote de intoxicación alimentaria en EE.UU. provocando colitis hemorrágica. Se registraron diversas intoxicaciones por este microorganismo vinculados con alimentos como ensaladas (Merson et al., 1976). Se ha observado que el crecimiento de *Escherichia coli* disminuía en medio con CO₂ y aún más si se disminuía la temperatura. A 6°C disminuyó 2 % de crecimiento con respecto al crecimiento en aire (Hintlian y Hotchkiss, 1986). Un trabajo reciente ha demostrado la capacidad de *E. coli* O157:H7 de crecer en ensaladas de vegetales frescos en condiciones rutinarias de comercialización (Abdul-Raouf et al., 1993). Este mismo estudio demostró menor desarrollo de *E. coli* en zanahorias que en

lechuga o pepinos a 21°C, posiblemente debido a algún factor inhibidor no identificado de la zanahoria, hecho que se ha descrito también con respecto a *Listeria monocytogenes* (Nguyen y Lund, 1989).

Staphylococcus aureus es un microorganismos anaerobio facultativo con temperatura mínima de crecimiento de 5-10°C. Este hecho puede ser el causante de que no crezca de forma significativa en alimentos mantenidos a 4°C. La atmósfera modificada parece no estimular el crecimiento de *S. aureus*. La acción sinérgica del frío y la atmósfera modificada actúan acelerando la muerte bacteriana (Hintlian y Hotchkiss, 1986).

Hintlian y Hotchkiss (1987) han demostrado que el CO₂ ejerce efecto inhibitorio sobre *Salmonella* y que este efecto es mayor al disminuir la temperatura mientras que Silliker y Wolfe (1980) observaron que el CO₂ no inhibía el crecimiento de *Salmonella* en carne a 25°C aunque si a 10°C. Se ha demostrado la alta incidencia de *Salmonella* e indicadores fecales en lechugas cultivadas en pequeñas huertas de Méjico e Italia (Ercolani, 1976, Rosas et al., 1984).

Silliker y Wolfe (1980) observaron que los enterococos inoculados en carne vacuna envasada en películas plásticas permeables eran inhibidos a 10°C pero no a 20°C.

Bacillus cereus es muy sensible al efecto de CO₂ según indican varios estudios (Farber, 1991).

4.1 *Listeria monocytogenes*

Ha sido aislado de ensaladas con atmósfera modificada almacenadas a 5°C (Sizmur y Walker, 1988, Beuchat y Brackett, 1990) y en espárragos, brocoli y coliflor a 4°C (Berrang et al., 1989b).

Listeria es considerada generalmente un microorganismo mesófilo debido a que su crecimiento óptimo es a 30-37°C, sin embargo es un psicrótrofo por su capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración (Wilkins et al., 1972). En el Manual de Bergey se recoge que la temperatura mínima es de 1°C, basado en un estudio realizado por Junttila et al. (1988) en el cual observó crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 1.1°(± 0.3).

Se ha comprobado que *Listeria* es inhibida por compuestos similares a las bacteriocinas producidas por *Pediococcus acidilactici* (Bhunja et al., 1988, Pucci

et al., 1988, Harris et al., 1989, Hoover et al., 1989, Raccach y Geshell, 1993) y por algunas cepas de *Pediococcus pentasocceus* (Harris et al., 1989, Hoover et al., 1989, Raccach y Geshell, 1993). Especies del género *Lactobacillus* como *L. plantarum* y *L. acidophilus* ejercen sobre *Listeria* acción inhibitoria, mientras que otros microorganismos fueron estimulantes, como es el caso descrito con *Pseudomonas* spp. (Marshall y Schmidt, 1988, Farrag y Marth, 1989). La presencia de *Pseudomonas fluorescens* favorece el desarrollo de ambas especies, según algunos autores debido a la actividad proteolítica *Ps. fluorescens* favorece la multiplicación de *Listeria monocytogenes* potenciada quizás por una elevación del pH.

El rango de pH en el cual puede crecer *Listeria monocytogenes* según Seeliger y Jones (1986) es entre 5.6 y 9.6 con crecimiento óptimo alrededor del pH neutro. Diversos estudios posteriores indicaron que crece a pH 5, a 4.39-4.63 (George et al., 1988). Conner et al., 1986 estudiaron el desarrollo de *Listeria monocytogenes* en coles añadiendo sal en condiciones de pH bajo y observó que el jugo de col es un medio adecuado para el desarrollo de este microorganismo y es más tolerante a condiciones del ambiente, de pH y concentraciones de sal que las halladas hasta entonces en la bibliografía

Knight et al. (1988) realizaron un estudio de las superficies de una planta de procesamiento y observaron que los drenajes del suelo eran especialmente difíciles de desinfectar y podrían ser la fuente de *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* es inactivada por los desinfectantes empleados en las industrias (Lopes, 1986, El-Kest y Marth, 1988, Cordier et al., 1989, Mustapha y Liewen, 1989, Pappalardo et al., 1990). Jacquet y Reynaud (1994) pusieron de manifiesto que en las concentraciones recomendadas por los fabricantes solo dos desinfectantes fueron realmente eficaces para inhibir *Listeria monocytogenes*; desinfectantes que contenían amonio cuaternario más peróxido y amida respectivamente.

Otra sustancia que se ha demostrado inhibitoria de *Listeria monocytogenes* es la lisozima de huevo (Hughey et al., 1989), como así también la zanahoria (Nguyen y Lund, 1989).

4.1.1 Agente patógeno de origen alimentario

La transmisión de la listeriosis al hombre es en mayor medida a través de los alimentos (Hird, 1987). Entre los alimentos se ha encontrado en quesos,

leche, carne, frutas y vegetales. Generalmente son más sensibles las personas debilitadas e inmunodeprimidas, mujeres embarazadas y niños durante el parto o después del nacimiento, aunque también pueden ser afectadas personas sanas (Eley, 1994). La mayoría de las personas sanas cuyo tracto intestinal está contaminado por listerias es probablemente asintomática o presenta síntomas muy débiles que bien pueden pasar desapercibidos. Müller (1990) observó que el 0.8 % de las heces de individuos sanos contenían *Listeria monocytogenes*. Estudios en trabajadores de mataderos e incluso mujeres embarazadas saludables han revelado que el 1 al 10 % albergaban *Listeria monocytogenes* en sus heces sin mostrar signos de la enfermedad (Seeliger, 1990)

La tasa de mortalidad, es alta del 20 % al 30 % (Eley, 1994), superior en niños y ancianos. La incidencia de la listeriosis en la población española fue de 0.67 por millón de habitante de camas hospitalarias (tasa real). Se estima que se declaró el 9.6 % de los casos existentes en 1991, por lo que si se hubiesen declarado todos sería 1.87 por millón de habitantes (tasa teórica) (Vázquez Boland, 1994, comunicación personal).

La dosis infectiva mínima se desconoce pero en individuos sensibles se cree que con 100 bacterias sería suficientes (Eley, 1994).

Listeria monocytogenes es frecuente en ensilado, suelo, aguas residuales, fango, plantas, vegetales marchitos, forraje, abonos naturales, desagües de mataderos y agua de ríos, principalmente.

Entre 1949 y 1987 se han documentado 26 brotes de listeriosis con 1347 casos humanos (Cuadro 10 y 11):

Cuadro 10: Brotes de listeriosis entre 1949 y 1987, casos sospechosos y confirmados. (Adaptado de Ryser y Marth, 1991)

Localización	Año	Número de casos	Posible vía de infección	Referencia
Halle, Alemania	1949-1957	aprox. 100	Leche cruda, leche cortada, crema, queso cottage	Gray y Killinger (1966), Potel (1952, 1953), Reiss et al. (1951), Seeliger (1961)
Jena, Alemania	1954	26	Desconocido	Urbach y Schabinski (1955)
Unión Soviética	1956	19	Cerdo, ratón	Gudkova y Voronina (1956)
Bremen, Alemania	1960-1961	81	Desconocido	Fischer (1962)
Halle, Alemania	1966	279	Desconocido	Ortel (1968)
Auckland, N. Zelanda	1969	13	Desconocido	Becroft et al. (1971)
Anjuo, Francia	1975-1976	162	Desconocido	Carbonelle et al. (1978)
Johannesburg, Sudáfrica	1977-1978	14	Desconocido	Jacobs et al. (1978)
Australia	1978-1979	12	Vegetales crudos	Souëf y Walters (1981)
Massachusetts, EE.UU.	1979	20	Vegetales crudos	Ho et al. (1986)
Auckland, N. Zelanda	1979-1980	10	Desconocido	Ralovich (1984)
Auckland, N. Zelanda	1980	22	Mariscos, pescado crudo	Lennon et al. (1984)
Cambria del Este, Inglaterra	1981	11	Crema	Gilbert et al. (1989), McLauchlin et al. (1986)

Cuadro 11. Brote de listeriosis entre 1949 y 1987, casos sospechosos y confirmados. (Adaptado de Ryser y Marth, 1991) (Continuación)

Localización	Año	Número de casos	Posible vía de infección	Referencia
Slovakia	1981	49	Desconocido	Ralovich (1984)
Maritime Provinces, Canadá	1981	41	Coleslaw	Schlech et al. (1983)
Christchurch, N. Zelanda	1981-1982	18	Desconocido	Faoagali y Schousboe (1985)
Houston, Texas, EE.UU.	1983	10	Desconocido	Canfield et al. (1984)
Saxony, (Antigua Alemania Federal)	1983	25	Desconocido	Nicolai-Scholten et al. (1985)
Massachusetts, EE.UU.	1983	49	Leche pasteurizada	Fleming et al. (1985)
Vaud, Suiza	1983-1987	122	Queso de Vacherin Mont d'Or	Bille et al. (1988), Bula et al. (1988)
Los Angeles, CA, EE.UU.	1985	142	Queso mejicano	Linnan et al. (1988)
Dinamarca	1985-1987	35	Desconocido	Rothgardt et al. (1988), Samuelsson et al. (1988)
Linz, Austria	1986	20	Leche cruda, vegetales	Allerberger (1988), Tulzer et al. (1987)
Los Angeles, CA, EE.UU.	1986-1987	33	Huevos crudos	Schwartz et al. (1988)
Los Angeles, CA, EE.UU.	1987	11	Manteca	Mascola et al. (1988)
Inglaterra	1987	23	Desconocido	McLauchlin et al. (1989)

En 1922, ya se asoció la listeriosis de rumiantes con el consumo de ensilaje, aunque no fue confirmado hasta 1960 (Gray, 1960). A partir de esta fecha se describió la presencia de *Listeria monocytogenes* en vegetales asociados a listeriosis animales y no fue hasta 1975 cuando se comprobó un brote en Canadá de listeriosis humano ligado al consumo de vegetales, “coleslaw”, ensalada de col y otros vegetales con una salsa.

Se ha aislado *Listeria monocytogenes* de lechuga (Beuchat y Brackett, 1990), apio, tomates, coles (Schleck et al., 1983, Heisick et al., 1989), pepino, patatas y rábano (Heisick et al., 1989), y champignon (Junttila y Brander, 1989).

En ensaladas listas para su consumo se ha aislado *Listeria monocytogenes* (Sizmur y Walker, 1988, Steinbruegge et al., 1988). En Inglaterra, Sizmur y Walker, (1988) aislaron *Listeria monocytogenes* de ensaladas listas para su consumo, uno de los tipos contenían col, apio, pasas, cebolla, zanahoria y el otro lechuga, pepino, rábanos, hinojos, berros y puerros. Una de las cepas aisladas pertenecía al tipo 4b y las demás cepas pertenecían al tipo 1/2.

En estudios sobre el crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes* en vegetales (Beuchat et al., 1986) se observó que inoculando coles esterilizadas por calor y mantenidas durante 42 días a temperatura de refrigeración, la concentración de microorganismos disminuía de 10^7 a 10^4 ufc/g. Sin embargo, en coles frescas la concentración de *Listeria monocytogenes* aumentaba cuatro veces su valor inicial durante 25 días de almacenamiento, compitiendo con la flora aerobia y las bacterias acidolácticas. Otros vegetales en los que se ha comprobado crece y sobrevive *Listeria monocytogenes* son; espárragos, coliflores, broccoli (Lovett et al., 1988, Berrang, et al., 1989, a y b), maíz, judías verdes, lechuga (Hughey et al., 1989, Beuchat y Brackett, 1990) y nabos (Lovett et al., 1988)

La atmósfera modificada parece tener poco o ningún efecto sobre el desarrollo de *Listeria monocytogenes* en ensaladas (Beuchat y Brackett, 1990, Beuchat et al., 1990). Esto hace que el riesgo de que se desarrolle el germen aumente ya que el sistema permite el almacenar el alimento durante un período más prolongado sin deteriorarse y da tiempo a que crezca el microorganismo (Ryser y Marth, 1991).

La fuente más frecuente de contaminación de los vegetales es por el uso de abonado de tierras de cultivo con abono natural de animales infectados por listeriosis (Ryser y Marth, 1991). Ralovich (1984) consideró que sería importante considerar la transmisión por manipuladores de alimentos.

4.1.2 Control de la listeriosis

El control de esta enfermedad es importante, tanto para los ganaderos como para la salud humana. Para los ganaderos debido al coste económico que

conlleva los animales enfermos, y para la medicina humana por ser causa del 1 % al 6 % de interrupción del embarazo y de infección perinatal como así también tener una letalidad elevada, entre el 25 % y 30 % (Quevedo, 1993).

En 1986, la OMS organizó en Berlin, una Consulta sobre Prevención y Control de Listeriosis de la cual se aprobaron las siguientes recomendaciones (Quevedo, 1993)

1. Aunar esfuerzos para el desarrollo urgente de sistemas adecuados de monitoreo para la evaluación de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Esto conlleva al desarrollo de métodos estandarizados de detección y enumeración del microorganismo. Se insta a los productores y a las agencias de regulación que cooperen mutuamente para resolver el problema.
2. Recoger los datos obtenidos por el monitoreo de los alimentos a nivel nacional y la investigación a fondo de los brotes. La recolección sistemática y centralizada de los datos epidemiológicos, a nivel mundial, permite la mejor comprensión de la incidencia, prevalencia y control de la listeriosis humana y animal.
3. Informar a los médicos y otros profesionales de la salud sobre los riesgos asociados al consumo de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*.
4. Tomar todas las medidas adecuadas en el manejo de los animales para prevenir la presencia o difusión de la enfermedad, especialmente guardar muy bien las condiciones higiénicas después de abortos o mastitis. Producir piensos de buena calidad.
5. Informar adecuadamente a los productores sobre la posible contaminación de *Listeria monocytogenes* y la importancia de la aplicación de los principios de análisis de riesgos e identificación de los puntos críticos de control (ARICPC).
6. Todas las personas que intervienen en la manipulación, producción, transporte y distribución de productos alimenticios deben recibir una educación adecuada sobre los peligros potenciales asociados a *Listeria* en los alimentos.

En 1988, la OMS convocó un Grupo de Trabajo Informal sobre Listeriosis Transmitida por alimentos, del que se extrajeron las siguientes recomendaciones (Quevedo, 1993):

Continuar las investigaciones sobre la transmisión de este microorganismo por los alimentos y enfocarlo hacia aspectos de la epidemiología, virulencia, patogenicidad, metodología, contaminación de alimentos crudos y procesados, efectos de los factores intrínsecos y extrínsecos, así como sobre el papel de otras especies de *Listeria* como posibles indicadoras de contaminación.

Este Grupo ratificó la vigencia de las recomendaciones hechas en la Consulta de 1986. Las medidas a adoptar para reducir *Listeria monocytogenes* son las mismas que para cualquier otro germen patógeno y el hecho de que pueda crecer a temperatura de refrigeración hace que la reducción numérica o eliminación sea mucho más importante. Dado que *Listeria monocytogenes* es particularmente común en los ambientes húmedos, el mantenimiento del ambiente seco es uno de los métodos para limitar su multiplicación.

La notificación sobre incidencia de *Listeria monocytogenes* ha aumentado en la última década. La incidencia real alcanza la de los patógenos entéricos Gram negativos clásicos. Este incremento puede ser real como consecuencia de mayor número de individuos susceptibles de padecer la enfermedad como son los inmunodeprimidos o bien puede deberse al avance de las técnicas de detección y la mejor vigilancia epidemiológica. En Inglaterra la listeriosis presentó un máximo en 1988 alcanzando los 300 casos. El 91 % de los aislamientos de *Listeria monocytogenes* en los casos humanos de Inglaterra pertenecen al serotipo ½ y 4b (Eley, 1994).

4.2 *Aeromonas hydrophila*

Las especies de *Aeromonas* en los últimos años están siendo estudiadas para verificar su posible papel como enteropatógenas. Al menos ciertas cepas parecen ser enteropatógenas según algunos estudios (Altewegg y Geiss, 1989, Kuijper et al., 1990, Janda, 1991, Jiang et al., 1991). Esta especie ha sido asociada con procesos de gastroenteritis pero no se ha demostrado que fuera el causante (Gracey et al., 1982, Janda y Duffey, 1988, Altewegg y Geiss, 1989). Parece estar más asociada a niños menores de 2 años y a adultos mayores de 50 como así también a pacientes inmunodeprimidos (Burke et al., 1984, Agger, 1986, San Joaquin y Pickett, 1988, Kuijper et al., 1989, Gluskin et al., 1992) y se

presenta en picos en verano (Burke et al., 1984, Agger et al., 1985, Nishikawa y Kishi, 1988, Wilcox et al., 1992).

Diversos estudios han demostrado que *Aeromonas hydrophila* puede crecer en ensaladas con atmósfera modificada almacenadas a 4-5°C (Callister y Agger, 1987, Berrang et al., 1989a y c)

La mayoría de las especies de *Aeromonas* en alimentos crecen a temperaturas óptimas y máximas típicas de microorganismos mesófilos pero varias, incluyendo cepas productoras de exotoxinas, tienen habilidad para crecer a temperatura de refrigeración (Palumbo et al., 1985, Callister y Agger, 1987, Berrang et al., 1989a y c). Las temperaturas teóricas de crecimiento obtenidas se acercan a las características de los psicrótrofos (Kirov, 1993) incluso fue aislada de leche de cabra una cepa de *Aeromonas hydrophila* cuya temperatura mínima de crecimiento fue -5.3°C pero también es capaz de crecer a 43°C (Kirov, 1993). Son microorganismos sensibles al calor y el tratamiento térmico los destruye, en 10 minutos a 56°C (Kirov, 1993, Eley, 1994)

A bajas temperaturas el crecimiento de *Aeromonas spp.* se ve afectado por la concentración de sal, pH, atmósfera y flora competidora (Palumbo, 1988, Palumbo y Buchanan, 1988, Knøchel, 1990, Beuchat, 1991, Palumbo et al., 1991, 1992). A temperatura óptima de 28°C se han descrito cepas de aeromonas que toleran niveles de sal superiores al 4 % (w/w) (Knøchel, 1990), y algunas cepas crecen en rangos amplios de pH, entre 4 y 10 (Kirov, 1993)

Buchanan y Palumbo (1985) observaron que la disminución de oxígeno en carnes refrigeradas favorecía el desarrollo de *Aeromonas* posiblemente debido a que inhibe la flora competitiva. Varios autores han expresado su preocupación por el uso de atmósfera modificada para extender la vida media de los alimentos pues tendrían el riesgo de que se desarrollen altos niveles de aeromonas (Enfors et al., 1979, Berrang et al., 1989a y c). Otros autores han descrito que crecen a 100 % de CO₂ (Blickstad y Molin, 1983) y que se desarrolla en ensaladas con atmósfera modificada (Marchetti et al., 1992).

Las aeromonas son responsables también de la alteración de los alimentos, esto se ha descrito en carnes (Len, 1987), en pollo (Toule y Murphy, 1978), pescado (Gorczyca et al., 1985, Gram et al., 1987), en mariscos (Smith et al., 1984) y huevo entero no pasteurizado (Mackenzie y Skerman, 1982).

4.2.1 Agente patógeno de origen alimentario

La fuente principal es el agua, incluso se la puede encontrar en agua clorada de bebida (Hazen et al., 1978, Burke et al., 1984, Schubert, 1991).

El género *Aeromonas* ha sido aislado con frecuencia de amplia variedad de alimentos. Seguramente estos fueron contaminados a través del agua, heces animales o manipuladores de alimentos (Kirov, 1993). En Japón observaron una correlación entre el aumento del aislamiento de *Aeromonas* en el hombre con el mayor aislamiento de esta bacteria en los alimentos (especialmente carne picada, cerdo y pollo), mucho más que los niveles de aeromonas encontradas en agua de bebida o del río (Nishikawa y Kishi, 1988). Otros estudios han puesto de relieve que algunas cepas de *Aeromonas*, incluyendo las enteropatógenas, eran psicrótrofas, o sea, que crecían a 5°C por lo que la refrigeración no es un método fiable para el control de este microorganismo (Palumbo, 1986, Beuchat, 1991)

Los casos descritos de gastroenteritis por *Aeromonas* son muy pocos (Cuadro 12). Los alimentos sospechosos de ser vehículos de *Aeromonas* y causantes de intoxicación han sido alimentos precongelados y no cocinados adecuadamente, en especial mariscos y ostras (Kirov, 1993). Altewegg et al. (1991) encontraron pruebas evidentes de que las gambas fueron el vehículo transmisor de *Aeromonas* al aislarlo también de las muestras de pacientes con diarreas.

En Japón se ha detectado en mayor proporción (60 %) *Aeromonas caviae* en pescado marino y vegetales (Nishikawa y Kishi, 1988) mientras que *Aeromonas hydrophila* predominó en los aislamientos en EE.UU. (Callister y Agger, 1987) .

Cuadro 12: Intoxicaciones alimentarias asociadas a Aeromonas hydrophila spp. (Adaptado de Kirov, 1993)

Localización	Tasa de ataque	Periodo de incubación (h)	Aeromonas aisladas de		Referencia
			alimento	heces	
Rusia, escuela	intoxicación masiva	?	Pescado (precongelado)	?	Kalina, 1977
Hungría	Varios casos	20	Sopa, caldos con almidón	?	Jánossy y Tarjan, 1980
Nigeria,	1 /2	20	Serpientes de tierra (precongeladas)	Si	Agbonlahor et al., 1982
Luisiana, EE.UU.	4/2	24-48	Ostras	NE	Abeyta et al., 1986
Florida, EE.UU.	7/7	22-34	Ostras	Si	Abeyta et al., 1986
Japón, escuela primaria	29/37	?	Desconocido	Si	Kobayashi y Ohnaka, 1989
Japón, casa de huéspedes	4/5	?	Mariscos (sashimi)	Si	Kobayashi y Ohnaka, 1989
Escocia	>20	<24	Gambas cocidas	No	Small, 1980, citado por Todd et al., 1989
Inglaterra, restaurante	3/3	24-36	Ostras	NE	McSwiggan y Jones, 1978, citado por Todd et al., 1989
Inglaterra, restaurante	14	<24	Gambas cocidas	NE	Todd et al., 1989 (citado por)
Inglaterra, restaurante	2	6-8	Gambas cocidas	no	Todd et al., 1989 (citado por)
Tienda	1	48	Coctail de gambas	Si	Altewegg et al., 1991

NE, no examinado.

Los cuadros entéricos que produce la aeromonas son dos; el más frecuente es similar al cólera, caracterizado por diarrea acuosa y fiebre suave. En niños pequeños se pueden observar vómitos. Más raro es un cuadro similar a la disentería caracterizado por diarrea y presencia de mucus y sangre en las heces. No ha sido descrito ningún brote completamente confirmado de intoxicación alimentaria.

4.3 *Bacterias psicrotrofas*

La capacidad de las bacterias de crecer a 0°C fue descrita por primera vez por Foster en 1887. El microorganismo fue aislado de un pez y mantenido a temperatura bajas y era fluorescente. Más tarde Foster (1892) realizó el aislamiento de otras bacterias en diferentes ambientes, agua natural, alimentos, en la superficie e intestinos de pescado fresco y especialmente en agua de mar y peces oceánicos que eran capaces de crecer a 0°C (Morita, 1975).

El término **psicrófilo** fue acuñado por Schmidt-Nielsen en 1902 para los microorganismos que crecían a 0°C (Jay, 1991). Hoy día se aplica este término a aquellos microorganismos que crecen desde bajo 0 a 20°C, con crecimiento óptimo a 10-15°C (Morita, 1975). Alrededor de 1960, se sugirió el uso del término **psicrotrofo** (psychros=frío, y trephein= nutrir) para los microorganismos capaces de crecer a 5°C o por debajo (Jay, 1991). Hoy día es comúnmente aceptado entre los microbiólogos de alimentos que los psicrotrofos son microorganismos que pueden crecer a temperatura entre 0 y 7°C y producen colonias visibles o turbidez en 7-10 días. Algunos psicrotrofos que pueden crecer a temperatura de 43°C se les considera mesófilos. A partir de estas definiciones cabría esperar que las bacterias psicrófilas se aíslan solo de productos de aguas oceánicas y los psicrotrofos serían los responsables de las alteraciones de los alimento refrigerados entre 0 y 5 °C (Jay, 1991).

Para el aislamiento de bacterias psicrófilas se recomienda mantener la muestra en todo momento a temperatura baja y Morita (1975) recomienda no utilizar la técnica de siembra en masa pues a 45°C, que debe estar el agar, inhibiría a los psicrófilos.

La microflora predominante en las ensaladas listas para consumo está constituida fundamentalmente por psicrotrofos, bacilos Gram negativos siendo los más numerosos los géneros *Pseudomonas* y *Erwinia* (Willocox et al., 1993). Durante el almacenamiento se cita a las cepas peptolíticas de *Pseudomonas* como

responsables de la alteración de los vegetales (Denis y Picoche, 1986, Brocklehurst et al., 1987, Carlin et al., 1990a). Dentro del género *Pseudomonas*, *Pseudomonas fluorescens* ha sido identificada como indicador de la alteración de los vegetales de IV Gama (Willox et al., 1993). Algunas cepas de esta especie han sido aisladas a partir de plantas enfermas, por ejemplo, lechuga, e identificadas como *Pseudomonas marginalis* (Palleroni, 1986).

Los niveles alcanzados por las bacterias psicrótrofas en ensaladas en atmósfera modificada oscila alrededor de 10^8 ufc/g a los 14 días partiendo de 10^5 ufc/g (Abdul-Raouf et al., 1993). Marchetti et al., (1992) encontraron niveles iniciales de 10^7 ufc/g aproximadamente en ensaladas de zanahoria y mixta.

Se han realizado diversos estudios sobre el efecto de las concentraciones de CO_2 y O_2 sobre *Pseudomonas* y se observa que el CO_2 es efectivo inhibidor de su crecimiento a determinadas concentraciones y temperatura (Clark y Burki, 1972, Wells, 1974, Gill y Tan, 1979, Enfors y Molin, 1980, Moir et al., 1993, Wilcox et al., 1993). Todos coinciden en observar que al disminuir la temperatura aumenta el poder inhibitorio de CO_2 .

4.4 Bacterias acidolácticas

El grupo de las bacterias acidolácticas comprende 8 géneros (Jay, 1991): *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus*.

Aunque son microorganismos mesófilos algunos pueden crecer por debajo de los 5°C y otros a tanto como a 45°C . En cuanto al pH crecen entre 3.2 y 9.6, y la mayoría crecen a 4-4.5. Las bacterias acidolácticas son proteolíticas y lipolíticas.

Estas bacterias presentan la característica interesante de producir sustancias antimicrobianas. Se ha querido utilizar esta propiedad para prevenir el desarrollo de otros microorganismos. En los últimos años se están realizando diversos estudios para aplicarlo como método alternativo de conservación para sustituir los aditivos que tanta polémica suscitan. Algunas especies de *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* producen sustancias inhibitoras de gérmenes patógenos y alterantes. Se ha demostrado inhibición frente a *Aerobacter aerogenes*, distintas especies de *Pseudomonas*, *Streptococcus fecalis* y *pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Clostridium*

botulinum, *Salmonella typhimurium*, y *Brucella abortus* y con *Brochothrix thermophacta* (Collins-Thompson y Rodríguez-López, 1980, Zurera Cosano et al., 1988). Se ha descrito que la col tiene efecto inhibitorio sobre las bacterias acidolácticas (Kyung y Fleming, 1994).

La especie más aislada en las ensaladas analizadas por Carlin et al., (1990a) fue *Leuconostoc mesenteroides*. La temperatura óptima de crecimiento es 20-30°C y puede crecer desde 5°C a 30°C. No es patógeno ni para las plantas ni para animales u hombres. Se aísla a partir de plantas y en menor proporción en leche y productos lácteos (Garvie, 1986).

5. Modelos predictivos de crecimiento bacteriano en alimentos.

La materia prima que constituye el alimento en general tiene una carga microbiana inicial que varía de un producto a otro, de una región geográfica a otra, de métodos diferentes de producción, cosecha o sacrificio. Se han realizado, y se siguen realizando, estudios para conocer en detalle la composición de esta microflora inicial con el fin de poner los medios necesarios para evitar su desarrollo e incluso evitar las intoxicaciones alimentarias inhibiendo el desarrollo de microorganismos patógenos (Roberts, 1994).

La microflora que se desarrolla en un alimento es función de la microflora inicial, de los procesos aplicados, de la naturaleza del alimento y de las condiciones de conservación. Los microorganismos necesitan condiciones adecuadas para desarrollarse como pH, agua, temperatura y nutrientes. Estos parámetros determinarán en que medida los microorganismos podrán multiplicarse y por ello constituir la flora alterante (Roberts, 1994).

La conservación del alimento se consigue actuando sobre estos parámetros incrementando los factores desfavorables para los microorganismos. El procesado busca destruir los microorganismos total o parcialmente, o al menos inhibir su desarrollo. El fallo en el procesado o la conservación puede dar lugar a la supervivencia de microorganismos potencialmente peligrosos o sus toxinas. Las nuevas técnicas de procesado se apoyan en la investigación sobre las características de los microorganismos transportados por los alimentos como son sus necesidades de agua, temperatura resistencia al calor, al frío y a sustancias antimicrobianas (Roberts, 1994). Desde hace algunos años se ha visto la necesidad de profundizar el conocimiento de la interacción de los diferentes

factores que afectan el crecimiento bacteriano, de forma que fuese posible predecir el comportamiento de los microorganismos en ese alimento y por lo tanto la estabilidad y seguridad microbiológica. Esto requeriría la realización de complejos experimentos multifactoriales, cuyo número de combinaciones de factores está condicionado por problemas prácticos como puede ser la ausencia de recuento automático (Roberts, 1994).

Los sistemas actuales de producción de alimentos avanzan rápidamente mejorando, innovando continuamente y sacando al mercado nuevos productos. Por ello se necesitan cada vez más controles rápidos de la calidad, seguridad e higiene e incluso sería necesario anticiparse a la posible respuesta de los microorganismos que pudieran producir toxinas o alterar el alimento (Bratchell et al., 1990).

En la fábrica, durante el procesado se toman una serie de medidas para el control de la calidad alimentaria y control de la seguridad, se supervisan las operaciones y se realizan mediciones físicas, químicas y microbiológicas (Roberts, 1994). El control de riesgos microbiológicos en los alimentos tiene serias limitaciones. Tomar muestras representativas de la producción y examinar un número suficientes de muestras unitarias es difícil. Los métodos microbiológicos disponibles son lentos, frecuentemente poco específicos y caros, solo identifican la consecuencia pero no controlan o señalan la causa del fallo. Normalmente se centra el estudio microbiológico en el producto terminado lo cual es un sistema ineficaz de control, es necesario prevenir que ocurran fallos. Tampoco permite tomar decisiones de aceptación o rechazo "on -line" de la línea de procesado. Los resultados de las investigaciones solo se aplicaban a los productos en particular sin poder ser aplicados a nuevos productos que continuamente están surgiendo en el mercado (Roberts, 1994).

Recientemente se ha desarrollado una aproximación más eficaz para controlar los peligros microbiológicos, basados en la anticipación de los riesgos asociados con la producción o uso de alimentos, y en la identificación de los puntos donde podemos controlar esos riesgos (Roberts, 1994) que es el sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos (ARICPC).

Por todo lo anterior, fue propuesto el concepto de **microbiología predictiva**, en la que las respuestas de crecimiento de microorganismos de interés en los alimentos serían modelizadas respecto a los principales parámetros de control (temperatura, pH, aw) para luego incorporar el resto de factores que

también intervienen. Si pudieran desarrollarse modelos aplicables a amplias categorías de alimentos, se reduciría en gran medida la necesidad de exámenes de nuevos productos y sería posible realizar rápidamente predicciones de seguridad y vida útil por medio de la computarización de una base de datos, con beneficio económico considerable a largo plazo (Roberts, 1994). La microbiología predictiva pretende relacionar cada factor determinante con el crecimiento o supervivencia de los microorganismos.

La confección de los modelos predictivos utiliza como instrumento fundamental el sistema informático, sin el cual, sería compleja la resolución de ecuaciones con varios factores.

Una de las bases de la microbiología de alimentos es el estudio del crecimiento bacteriano en función del medio que le rodea (el alimento). Cada uno de los factores intrínsecos de un alimento influye sobre el desarrollo microbiano y hace que favorezca el desarrollo de unos microorganismos en detrimento de otros. Teóricamente el gran número de factores que intervienen podría ser cuantificados por lo que se podría establecer si el alimento en cuestión es o no un posible medio adecuado para que se desarrollen gérmenes patógenos. Si consideramos la cantidad de alimentos diferentes que existen, llegaríamos a la conclusión de que, sería una tarea enorme recoger todos los datos sobre la relación de cada factor con cada microorganismo (Buchanan, 1991). Por suerte, los factores determinantes que predominan en el crecimiento de microorganismos son solo unos pocos, entre los que destacan pH, aW y temperatura (Pooni y Mead., 1984). Si se puede derivar la respuesta de los microorganismos a estas variables se podría estimar su posible desarrollo en los alimentos. Esta es la base de la subdisciplina que se está desarrollando dentro de la microbiología de alimentos, la microbiología predictiva (Buchanan, 1991).

Según Roberts y Jarvis (1983), 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. Esto supone el conocimiento detallado de la ecología de los microorganismos en los alimentos durante el almacenamiento, para poder predecir su desarrollo en diversas condiciones. El concepto es similar al Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (ARICPC), donde el conocimiento detallado del proceso permite una reducción significativa en el número de pruebas bacteriológicas a realizar (McMeekin y Olley, 1986).

Los comienzos de estos estudios se remontan a 1960 pero ha sido en la década de los 80 cuando ha comenzado su auge (Quevedo, 1992).

Los primeros trabajos de modelamiento de datos en microbiología se hicieron en fermentaciones industriales, donde se desarrolló una serie de ecuaciones como la que introdujo Monod en 1949, (citado por Buchanan, 1992) para describir el impacto de las variables en el rendimiento. Las condiciones en que se basan estos modelos son diferentes a las que rodean los procesos de alteración del alimento, pues por ejemplo, consideran que se parte de una fase estacionaria en el crecimiento microbiano. Desde hace tiempo se tiene interés en conocer la medida en que diferentes factores afectan el crecimiento bacteriano o la producción de toxinas (Farber, 1986). Este interés ha planteado la necesidad de buscar técnicas de modelamiento de datos que les expliquen.

Ya en la década de los 90 algunos gobiernos muestran interés en financiar y sostener este tipo de investigaciones e incluso la industria realiza estudios al respecto. La OMS también ha mostrado su interés en la microbiología predictiva y pone énfasis en que sería interesante que se realizaran estudios del modelamiento predictivo en alimentos tradicionales, alimentos de venta ambulante, y alimentos caseros en países en desarrollo para obtener más información sobre el desarrollo de gérmenes patógenos en los alimentos (Quevedo, 1992).

Los países que han demostrado particular interés por el modelamiento predictivo han sido EE.UU., el Reino Unido, y algunos países de la CEE, incluida España (Proyectos CICYT, ALI 90-1216-E; ALI93-0327; ALI93-0239; ALI93-0216; ALI94-0079 y AMB94-0352-CO2-O2). Gobiernos, organizaciones de investigación e industrias están trabajando, ya sea independientemente o en conjunto, para generar bases de datos para la elaboración de los modelos predictivos como así también en el desarrollo de sistemas para que la información sea asequible para un amplio rango de usuarios (McMeekin et al., 1993).

Un gran inconveniente que tiene el sistema de modelamientos predictivos es la gran cantidad de datos que precisa y el coste económico que ello conlleva. Sin embargo, si se calculan los costes producidos por las enfermedades transmitidas por los alimentos, los costes de investigación se relativizan. Así por ejemplo, se calcula que puede haber costado del orden de medio millón de dólares (unos 65 millones de pesetas) la base de datos *Listeria monocytogenes* creada por Buchanan (McMeekin et al., 1993), mientras que el coste económico

producido por intoxicaciones es mucho más alto: en el Reino Unido se estimó en 1988 que las intoxicaciones producidas por Salmonella tuvieron un coste de 18 144 000 libras (3 773 952 000 ptas., aproximadamente.). En Australia estimaron que se ahorra un 20 % de costes con la prevención de la alteración de los alimentos (McMeekin et al., 1993).

Un **modelo matemático** se puede representar por la fórmula:

$$y = \alpha + \beta * x_1 + \gamma * x_2 + \varepsilon$$

donde:

y es la variable dependiente o de respuesta. En el caso de modelos cinéticos de crecimiento esta sería la tasa o duración de algún proceso de crecimiento microbiano.

a, **b** y **g** son los parámetros que se calculan a partir de los datos y se ajustan minimizando las diferencias entre los valores predictivos y los observados, y cuantifican la relación existente entre las variables.

x₁, **x₂** son las variables independientes, también llamadas explicativas o predictoras (temperatura, pH, sal, etc.), las cuales se fijan en el experimento, y serían las que explicarían la magnitud de la respuesta observada del microorganismo.

e es el error, o sea, la diferencia entre el valor observado y el predicho (McMeekin et al., 1993).

El modelo se formula describiendo una relación conocida o asumida entre la variable independiente y las variables de respuesta o dependientes, pero son los parámetros de la ecuación los que cuantifican la relación. Los parámetros son constantes para unas condiciones dadas y se calculan a partir de los datos obtenidos de forma que se ajusten a ellos lo más posible. La forma usual de valorar la estimación de los parámetros es a través de minimizar los valores residuales (McMeekin et al., 1993). Un modelo predictivo pretende estimar tanto los parámetros como los valores residuales.

Un **modelo empírico** es aquel que se desarrolla a partir de los datos obtenidos experimentalmente y un **modelo mecanístico** parte de una base teórica biológica y matemática.

La **tasa de crecimiento específica (μ) y relativa** se calcula tradicionalmente a partir de la tangente de la pendiente de la fase exponencial de la curva de crecimiento. Esta sería constante si no hubiese límite de nutrientes. La **tasa de crecimiento específica máxima (μ_{max})** sería aquella en que la disposición de nutrientes es máxima y los metabolitos tóxicos liberados son mínimos (McMeekin et al., 1993).

El **tiempo de generación o tiempo de duplicación (g)** de una generación (“doubling time”) es el tiempo que tarda una población en reproducirse hasta alcanzar el doble de población o lo que es lo mismo el tiempo medio que tarda una célula en reproducirse. Se puede determinar gráficamente si se representa el \log_{10} de N frente al tiempo tal que:

$$\text{pendiente de la tangente} = \frac{\log_{10} 2}{g}$$

La **fase de latencia o adaptación o “lag time” (λ)** es el tiempo que transcurre desde el tiempo 0 hasta que comienza la fase exponencial o logarítmica. Se puede calcular gráficamente, en una representación de \log_{10} frente al tiempo extrapolando la recta de la fase exponencial, el tiempo que coincide con la intersección entre esta y la asíntota inferior es el final de esta fase. En esta fase las células ajustan su fisiología al medio en que se encuentran.

En la **fase exponencial o logarítmica** las células se reproducen lo más rápido que pueden en ese medio y tiende a ser lineal si se representa el $\log_{10} N$ frente al tiempo. Se considera que las células de la población son fisiológicamente iguales.

En la **fase estacionaria** los metabolitos tóxicos comienzan a acumularse e inhiben el desarrollo de las células.

5.1 Modelamiento de datos.

Un requisito lógico e imprescindible para la confección de un modelo matemático adecuado es la obtención de datos apropiados que describan los efectos de diferentes factores en el desarrollo bacteriano.

La estrategia a seguir para la confección de un modelo predictivo de crecimiento bacteriano consta según Roberts y Jarvis (1983) de las siguientes fases:

1.- DISEÑO: elección de los parámetros y confección de un plan de combinación de estos parámetros (Figura 4).

Es necesario establecer las variables en las que se basará el experimento, si existen o no relaciones entre ellas, el rango en que oscilarán, la cantidad de datos necesarios, el modelo experimental usado y cual será la medición de las respuestas.

La Figura 4 muestra un cubo que sería la representación de los puntos donde se debería realizar el análisis de tres parámetros, para que abarcase todo el área equitativamente. Sin embargo se sabe que existen zonas de este cubo donde las condiciones son extremas y no habrá crecimiento.

El diseño dependerá de lo que se pretenda estudiar, no es el mismo si se quiere modelar la producción de una toxina que la duración del tiempo de adaptación de un microorganismo patógeno en un alimento.

2.- ACUMULACION DE DATOS: La aproximación al modelamiento se ha desarrollado usando curvas de crecimiento. Es importante que se realice suficiente cantidad de recuentos para describir toda la curva. Valores a tiempos iguales son apropiados.

3.- AJUSTE DE LA CURVA: Si se representa el logaritmo del recuento bacteriano frente al tiempo, se obtiene una curva sigmoideal (Figura 5). Se observa una primera fase, la fase de adaptación de las células al nuevo ambiente, donde la tasa de crecimiento aumenta, luego le sigue la fase exponencial donde la tasa de crecimiento es constante, las células se reproducen lo más rápido que pueden y llegan a una tercera fase donde la tasa de crecimiento es cero, para luego pasar a ser negativa en la fase de declive o muerte.

Describir parámetros cinéticos de una curva de crecimiento de microorganismos (tiempo de adaptación, tasa de crecimiento específica y la densidad máxima de la población) puede ser tan simple como usar una regla para medir la porción lineal de la curva al representar el logaritmo decimal con respecto al tiempo. En los últimos tiempos los avances científicos permiten usar expresiones matemáticas para realizar estos cálculos.

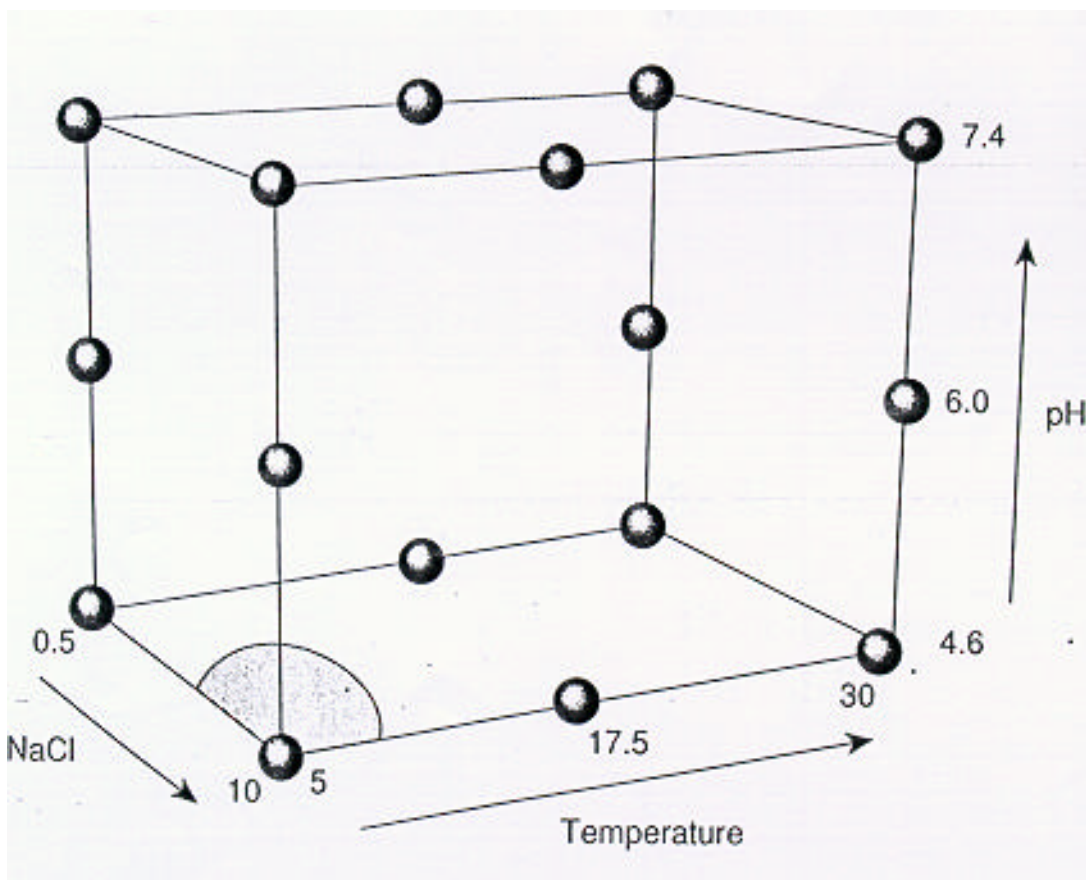


Figura 4. Esquema gráfico de tres variables independientes (pH, temperatura y sal) y los puntos mínimos que se deberían incluir en el diseño de un modelo predictivo de crecimiento bacteriano en alimentos para abarcar equitativamente los rangos de las variables.

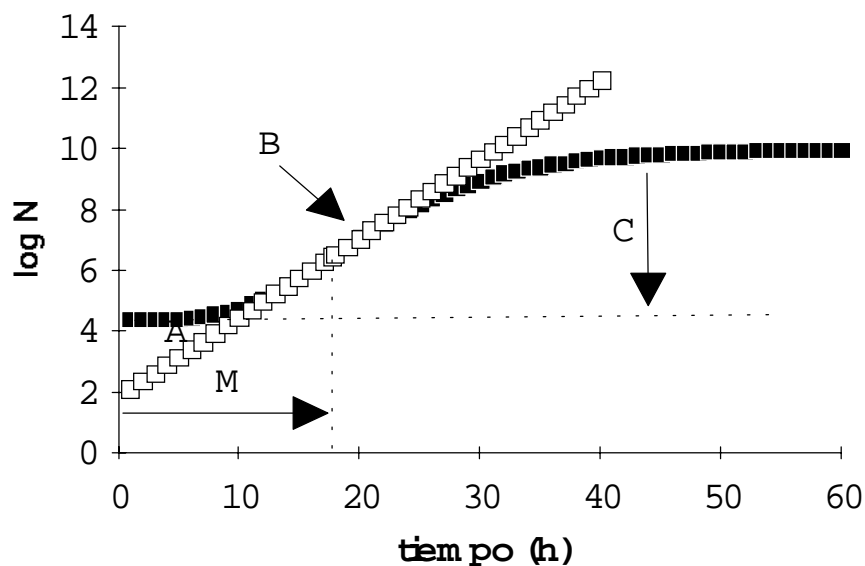


Figura 5. Representación gráfica de la función de Gompertz y sus parámetros A, B, M y C, por la cual se puede describir el crecimiento bacteriano en alimentos y calcular valores predictivos de los parámetros de crecimiento.

La función más usada es la de Gompertz

$$\text{Gompertz} = L(t) = A + C * e^{(-e^{-B*(t-M)})}$$

donde:

L(t)= logaritmo decimal del número de bacterias en el tiempo t (en horas) {log (cfu/ml)}

A= número de bacterias (asíntota) cuando el tiempo disminuye indefinidamente (nivel inicial de bacterias o inóculo) {log(cfu/ml)}

C= Cantidad de crecimiento (asintótico) que ocurre cuando el tiempo aumenta indefinidamente {log(cfu/ml)}, o lo que es lo mismo la diferencia existente entre el número inicial y final de la fase estacionaria, expresada en logaritmos decimales

M= tiempo en el que el valor absoluto de crecimiento es máximo (h), o tiempo del punto de inflexión.

B= Tasa relativa de crecimiento a M $\{\log(\text{cfu/ml})/h\}$, o sea, la pendiente que indica la tasa de crecimiento en el punto de inflexión

Este ajuste a la curva debe posibilitar la definición de los parámetros necesarios para el modeling (B, M, C, A) en el caso de la función de Gompertz, buscando para su estimación la diferencia mínima de los mínimos cuadrados. Deben existir suficientes puntos de recuentos en donde la pendiente de la línea cambia (superior e inferior). Si no se tienen suficientes puntos se obtendrá una estimación muy pobre de la pendiente máxima que se utilizará en el siguiente paso del modelamiento. Expresiones de la respuesta de crecimiento (tiempo de generación, tiempo de adaptación, etc.) se pueden calcular a partir de los parámetros de Gompertz.

Tasa exponencial de crecimiento

$$EGR = \frac{B * C}{e} \{ \log(\text{cfu} / \text{ml}) / h \}$$

Tiempo de generación

$$GT = \log_{10}(2) * \frac{e}{B * C} \{h\}$$

Tiempo de adaptación (“lag time”)

$$\lambda = M - \left(\frac{1}{B} \right)$$

4.- MODELAMIENTO: Existen diferentes aproximaciones al “modelling”. Si se genera un número suficiente de curvas de crecimiento de buena calidad, y estas curvas incluyen condiciones cercanas a los límites de crecimiento con pH, temperatura, y actividad agua, una polinomial cuadrática (Ecuación 1) sería adecuada para modelar los parámetros (por ejemplo tasa de crecimiento específica) derivados de ajustar la curva de crecimiento.

Ecuación 1

$$\ln y = a + b_1 * S + b_2 * T + b_3 * P + b_4 * S^2 + b_5 * T^2 + b_6 * P^2 + b_7 * S * T + b_8 * S * P + b_9 * T * P + e$$

donde:

y puede ser B o M

e es el error aleatorio

a, b_1, b_2, \dots, b_9 son coeficientes determinados por regresión lineal múltiple.

T es la temperatura

P es el pH

S es la concentración de sal

5.- VALIDACION: Habiendo obtenido un modelo que parece adecuado, se lo enfrenta a datos experimentales. Por ejemplo, valores predictivos para respuestas de crecimiento son comparados con aquellos que en ese momento se obtienen en el laboratorio. Este modelo aún pareciendo bueno necesita su validación comparando las respuestas de crecimiento conocidas (tiempos de generación, tasa de crecimiento, densidad máxima, etc. que han sido publicados en la literatura científica) con los valores generados por el modelo en las mismas condiciones. En algunos casos la coincidencia es excelente, otras veces la literatura no tiene muchos ejemplos. Los modelos derivados de medios de laboratorio coinciden bien con las respuestas de crecimiento del microorganismo en el alimento. Si la correlación entre los parámetros de crecimiento predictivos y reales del alimento es pobre, deben existir otros factores que influyen sobre el crecimiento. Zwietering et al. (1994a) han realizado un estudio reciente sobre la validación de los modelos y transformaciones que se realizan a los datos.

6.- PREDICCIÓN: Solo después de que el modelo haya sido validado, ya sea basándose en la literatura que incluye varios ejemplos de crecimiento en alimentos con amplio rango de propiedades, o por estudios de inoculación en paquetes, puede tenerse la garantía de que el modelo puede ser usado en predicciones (FLAIR, 1993).

5.2 Tipos de modelos predictivos en microbiología alimentaria

Podría considerarse que existen dos tipos de modelos matemáticos según su finalidad, el tipo de bacteria que se pretenda modelar y su repercusión en la alteración del alimento o en su seguridad: un grupo sería el de los modelos probabilísticos que predicen la probabilidad de que ocurra un hecho y otro sería el de los modelos cinéticos, que son los más útiles y que predicen la concentración microbiana según esté afectada por diversos factores (Buchanan, 1992).

El primer grupo, **los modelos probabilísticos**, se utiliza más con microorganismos cuya sola presencia constituye un riesgo (por ejemplo las esporas del *Clostridium*) y el segundo grupo, **los modelos cinéticos**, en aquellos microorganismos que no se consideran patógenos hasta un cierto nivel de crecimiento o no alteran la calidad hasta que no llegan a un cierto límite (Buchanan, 1992).

Los modelos cinéticos de crecimiento predicen parámetros como el tiempo de adaptación y la tasa de crecimiento microbiano, teniendo en cuenta los varios factores que les influyen. Muchos factores afectan a los alimentos, aunque en realidad solo unos pocos influyen fuertemente sobre el crecimiento microbiano; estos son la temperatura, el pH y la actividad agua.

Se habla de **modelos lineales y no lineales**. Esta linealidad se refiere a la relación entre los parámetros por los que una ecuación tal como:

$$y = \alpha + \beta * x + \gamma * x^2$$

Si bien es curvilínea, es una regresión lineal. La diferencia entre utilizar un modelo lineal o no lineal estriba en la forma de ajustar los datos y en las propiedades que tienen las estimaciones una vez ajustadas (McMeekin et al., 1993).

Whiting y Buchanan (1994) proponen clasificar los modelos predictivos en tres niveles; primarios, secundarios y terciarios.

Clasifican como modelos de **nivel primario** a aquellos que describen como varía la cantidad de microorganismos en el tiempo en unas condiciones determinadas, por ejemplo como crece o muere a 4°C. Incluiría las curvas de crecimiento y de supervivencia. Dentro de este grupo y entre los modelos de crecimiento bacteriano estarían por ejemplo la función de Gompertz, y otros

modelos mecanísticos desarrollados por Whiting y Cygnarowicz-Provost (1992), Baranyi et al., (1993a, b y c) y Jones y Walker (1993).

Los **modelos secundarios** indicarían como varían los parámetros calculados en los modelos primario (tasa de crecimiento específica, tiempo de adaptación, densidad máxima de la población, por ejemplo), con respecto a un factor extrínseco (la temperatura, pH, atmósfera, etc.). Los modelos de crecimiento de este nivel estarían basados en tres tipos fundamentalmente: ecuaciones de respuesta en superficie (polinomiales), Arrhenius y raíz cuadrada (modelo de Bélehrádek) (Whiting y Buchanan, 1994).

Los **modelos terciarios** sería aquellos que basándose en los primarios y secundarios elaboran los gráficos, predicciones y comparaciones deseados. Para esto existen expresiones matemáticas y programas informáticos, como los elaborados en EE.UU. por el “Microbial Food Safety Research Unit” del Departamento de Agricultura (USDA), “Agricultural Research Service (ARS)” y el “Eastern Regional Research Service Center (ERRC)”; u otro elaborado en el Reino Unido denominado “Food Micromodel”. El siguiente paso es el desarrollo de sistemas computarizados “inteligentes” donde el usuario respondiendo a una serie de preguntas recibe la información que desea. Zwietering et al. (1992b), Adair y Briggs (1993), Jones (1993) y Voyer y McKeller (1993) han descrito programas con este sistema. .

5.2.1 Modelos de crecimiento bacteriano

Los modelos pueden consistir, desde la simple respuesta de crecimiento o no de un microorganismo a una determinada situación, hasta los más complejos sistemas informáticos donde se estudian varios factores a las vez. En algunos casos interesa conocer el momento en que empieza la fase exponencial más que la tasa de crecimiento específica, estos son los llamados modelos de “lag-time”. Este es el caso del estudio del crecimiento de *Clostridium botulinum* en un alimento, donde lo que se pretende conocer es el momento en que comienza a producir la toxina.

Los parámetros son modelados en general tras realizarles transformaciones matemáticas como $\sqrt{\text{tasa}}$ (raíz cuadrada de la tasa) en los modelos de Raíz Cuadrada, $\ln(\text{tasa})$ en Arrhenius, $\sqrt{1/t_{30}}$ (raíz cuadrada de $1/t_{30}$) donde t_{30} es el tiempo que tarda en alcanzar el 30 % de variación de la densidad óptica (Adams, et al., 1991), $\log(1/M)$ (Gibson et al., 1987, Buchanan, et al., 1989), tiempo para

alcanzar una condición como puede ser el incremento en un determinado número en ciclos logarítmicos (Stannard et al., 1985), o el tiempo en alcanzar un determinado nivel de alteración (Daud et al., 1978).

La gran mayoría de los modelos predictivos de crecimiento predicen el crecimiento bacteriano con respecto a la temperatura, aunque se están realizando grandes esfuerzos para realizarlo respecto al pH y a_w . Los más conocidos son los siguientes:

1. Funciones sigmoidales (Gibson y Roberts, 1986a, Gibson et al., 1987, Zwietering, et al., 1990, McMeekin et al., 1993)
2. Modelo de formas polinómicas (Gibson y Roberts, 1986a y b, Davey, 1991, Duh y Schaffner, 1993)
3. Modelo de Arrhenius y algunos derivados (Schoofield, et al., 1981, Broughall, et al., 1983, Adair et al., 1989, Zwietering, et al., 1990, Davey, 1991)
4. Modelo Raíz cuadrada (Ratkowsky, et al., 1983, Zwietering et al., 1991)
5. Modelo dinámico de Van Impe (Van Impe et al., 1992) y de Baranyi (Baranyi et al., 1993a b y c, Baranyi y Roberts 1993)

5.2.1.1 Funciones sigmoidales (McMeekin et al., 1993; Zwietering et al., 1991)

La función de Gompertz es una curva sigmoidal, asimétrica con cuatro parámetros, que fue elegida para ajustar datos de crecimiento microbiológico porque consiste en cuatro fases comparables a las cuatro fases del crecimiento microbiano (período inicial, período de aceleración, período de desaceleración y período estacionario).

La fórmula de **Gompertz** es:

$$L(t) = A + C * e^{(-e^{-B*(t-M)})}$$

donde:

L(t)= logaritmo decimal del número de bacterias en el tiempo t (en horas) {log₁₀ (cfu/ml)}

A= número de bacterias (asíntota) cuando el tiempo disminuye indefinidamente (nivel inicial de bacterias o inóculo) $\{\log_{10}(\text{cfu/ml})\}$

C= Cantidad de crecimiento (asintótico) que ocurre cuando el tiempo aumenta indefinidamente $\{\log_{10}(\text{cfu/ml})\}$, o lo que es lo mismo la diferencia existente entre el número inicial y final de la fase estacionaria, expresada en logaritmos decimales

M= tiempo en el que el valor absoluto de crecimiento es máximo (h), o tiempo del punto de inflexión.

B= Tasa relativa de crecimiento a M $\{\log_{10}(\text{cfu/ml})/h\}$, o sea, la pendiente que indica la tasa de crecimiento en el punto de inflexión

Para el cálculo de la tasa de crecimiento (t.c.), el tiempo de latencia (λ) y el tiempo de generación (g) se utilizan las siguientes fórmulas (Gibson et al., 1987, McMeekin et al., 1993):

$$\text{t.c.} = \frac{B * C}{e}$$

$$\lambda = M - \frac{1}{B} + \frac{\log N_{(0)} - A}{\frac{B * D}{e}}$$

$$g = \frac{24 * \log_{10}(2) * e}{B * C}$$

En la fórmula modificada de Gompertz por Zwietering et al. (1994b) los parámetros A, B y C son sustituidos por parámetros con significado biológico, tal que:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = A * \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_m * e}{A} * (\lambda - t) + 1\right]\right\}$$

donde

μ_m = tasa específica de crecimiento

λ = tiempo de adaptación

e= base logarítmica natural

N = número de microorganismos en el tiempo t

N_0 = número inicial de microorganismos

La fórmula **logística** a diferencia de la de Gompertz es simétrica y sería:

$$L(t) = A + \frac{C}{\{1 + e^{(-B*(t-M))}\}}$$

donde:

$L(t)$ = log del número de bacterias en el tiempo t (en horas) $\{\log_{10}$ (cfu/ml) $\}$

A = número de bacterias (asíntota) cuando el tiempo disminuye indefinidamente (por ejemplo, nivel inicial de bacterias) $\{\log_{10}$ (cfu/ml) $\}$

C = Cantidad de crecimiento (asintótico) que ocurre cuando el tiempo aumenta indefinidamente $\{\log_{10}$ (cfu/ml) $\}$

M = tiempo en el que el valor absoluto de crecimiento es máximo (h).

B = Tasa relativa de crecimiento a M $\{\log_{10}$ (cfu/ml)/h $\}$

Para el cálculo de la tasa de crecimiento (t.c.), el tiempo de latencia (λ) y el tiempo de generación (g) se utilizan las siguientes fórmulas (Gibson et al., 1987):

$$t.c. = \frac{B * C}{4}$$

$$lag = M - \frac{2}{B}$$

$$g = \frac{96 * \log_{10}(2)}{B * C}$$

La función modificada de **Richards**, **Schnute** y de **Stannard** es (Zwietering et al., 1994b):

$$L(t) = A * \left\{ 1 + \nu * \exp(1 + \nu) * \exp\left[\frac{\mu_m}{A} * (1 - \nu) * (\lambda - t)\right] \right\}^{(-1/\nu)}$$

donde:

$L(t) = \log$ del número de bacterias en el tiempo t (en horas) $\{\log_{10}(\text{cfu/ml})\}$

$A =$ número de bacterias (asíntota) cuando el tiempo disminuye indefinidamente (por ejemplo, nivel inicial de bacterias) $\{\log_{10}(\text{cfu/ml})\}$

$\mu_m =$ tasa específica de crecimiento

$\lambda =$ tiempo de adaptación

$v =$ parámetro de forma

En un estudio comparativo de diferentes modelos sigmoidales realizado por Zwietering et al., (1990) se vió que la función de Gompertz era la mejor, más sencilla y fácil de aplicar.

5.2.1.2 Modelo de formas polinómicas (Gibson y Roberts, 1986 a, b)

Las formas polinómicas de bajo orden fueron utilizadas por diversos autores para modelar el efecto combinado de varios factores como pueden ser temperatura, actividad agua y pH (Ecuación 1)(Roberts et al., 1981a, b y c, Gibson y Roberts, 1986a, b, Gibson et al., 1987, 1988).

Este modelo es bueno, de hecho, es el que mejor se ajusta a las curvas, pero no permite extrapolar valores fuera del rango analizado.

5.2.1.2.1 Respuestas en Superficies.

En este modelo predictivo en el crecimiento bacteriano se intenta describir la tasa de crecimiento en función de varias variables independientes, tal que si tienen n variables independientes se está modelando una respuesta en superficie de n dimensiones. El diseño de una Respuesta en Superficie sería la representación gráfica de los puntos de forma que se observe la posible combinación de las diferentes variables independientes en el espacio de n dimensiones (McMeekin et al., 1993).

En cuanto a la cantidad de datos, es necesario que exista un mayor número de curvas que parámetros a estimar. McMeekin et al. (1993) aconsejan del orden de 10-15 curvas por cada variable independiente.

5.2.1.2.2 Modelo de Duh y Schaffner(1993)

5.2.1.2.2.1 Modelo de tasa de crecimiento

$$\mu = \frac{(a + cx + ex^2)}{(1 + bx + dx^2 + fx^2)}$$

donde:

μ es la tasa de crecimiento (h^{-1})

a, b, c, d, e y f son coeficientes de regresión

x es la temperatura de incubación ($^{\circ}K$)

Duh y Schaffner seleccionaron esta ecuación a partir de 8 016 ecuaciones en el programa de ajustes de curvas TABLECURVE

5.2.1.2.2.2 Modelo de tiempo de adaptación

Ecuación seleccionada por el programa TABLECURVE:

$$\frac{1}{\mu} = \lambda = \exp\left[a + \left(\frac{b}{x'}\right)\right] \quad \frac{1}{\mu} = \lambda = \exp\left[a + \left(\frac{b}{x^2}\right)\right]$$

donde

λ es el tiempo de adaptación

x es la temperatura de incubación ($^{\circ}K$)

a y b son coeficientes de regresión

Un segundo modelo se desarrolló tomando el ln de la anterior ecuación:

$$\ln(\lambda) = \exp\left[a' + \left(\frac{b'}{x}\right)\right]$$

5.2.1.3 La ecuación de *ARRHENIUS* y los modelos derivados

La ecuación de Arrhenius es la descripción de los efectos de la temperatura en una reacción química. Esta ecuación tiene su origen en los trabajos realizados por Arrhenius en 1889 y van't Hoff en 1884 (referido por McMeekin, et al., 1993) sobre reacciones químicas

$$k = A * e^{(-Ea/R*T)}$$

donde:

A es el llamado factor de colisión

Ea = es la energía de activación

R = es la constante universal de los gases = $8.37 \text{ Jmol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = es la temperatura absoluta

k = es la tasa constante específica de reacción, en su aplicación del crecimiento de microorganismos se sustituye esta directamente por la tasa específica de crecimiento

Para el estudio del crecimiento microbiano se sustituye k por μ , tasa de crecimiento específica a una determinada temperatura.

A partir de esta ecuación de Arrhenius surgieron muchas otras como la de Davey, Hinselwood, Schoolfield y el hiperbólico.

5.2.1.3.1 Arrhenius lineal de Davey (1991)

Este autor propuso un modelo aditivo para modelar la temperatura y la actividad agua conjuntamente, tal que :

$$\ln\left(\frac{1}{\lambda}\right) = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2} + C_3 * a_w$$

donde:

λ es el tiempo de adaptación

C_0 , C_1 , C_2 y C_3 son coeficientes de regresión

a_w es la actividad agua

5.2.1.3.2 Modelo de Hinselwood (Zwietering, et al., 1990)

Se basa en las premisas siguientes:

- Los componentes totales de la células son constantes y solo una enzima controla la tasa de crecimiento.

- Los productos de esta enzima se degradan a alta temperatura.

Así obtienen la siguiente ecuación:

$$\mu_m = k_1 * \exp\left(-\frac{E_1}{R * T}\right) - k_2 * \exp\left(-\frac{E_2}{R * T}\right)$$

donde:

A es el llamado factor de colisión

E_1 y E_2 son las energías de activación de la reacción enzimática y de la desnaturalización por alta temperatura

R es la constante universal de los gases = $8.37 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T es la temperatura absoluta

k_1 y k_2 son las frecuencias de formación de metabolitos

Este modelo se ha visto que no modela bien el crecimiento a bajas temperaturas (McMeekin, et al., 1993).

5.2.1.3.3 Modelo Schoofield et al. (1981)

Este modelo asume que la tasa de crecimiento está regulada por una tasa de reacción enzimática limitante (McMeekin, et al., 1993)

5.2.1.3.3.1 Modelo de tasa de crecimiento

Describe el efecto de la temperatura sobre la tasa de crecimiento, tal que:

$$\mu = \frac{\rho_{(25)} \frac{T}{298} \exp\left[\frac{H_A}{R} \left(\frac{1}{298} - \frac{1}{T}\right)\right]}{1 - \exp\left[\frac{H_L}{R} \left(\frac{1}{T_{1/2L}} - \frac{1}{T}\right)\right] + \exp\left[\frac{H_H}{R} \left(\frac{1}{T_{1/2H}} - \frac{1}{T}\right)\right]}$$

donde

μ es la tasa de crecimiento (h^{-1}) o (tiempo de generación $^{-1}$)

$\rho_{(25)}$ es la tasa de crecimiento a 25°C

T es la temperatura (°K)

H_A es la entalpía de la reacción que es catalizada por la enzima limitante del crecimiento ($cal\ mol^{-1}$)

R es la constante universal de los gases

H_L & H_H son las entalpías de las temperaturas baja y alta de inhibición del crecimiento

$T_{1/2L}$ & $T_{1/2H}$ son las temperaturas a las cuales las tasas de crecimiento se reducen al 50 % debido a las condiciones de temperaturas bajas o altas.

298 se refiere a 298 °K que se corresponde con 25°C

5.2.1.3.4 Modelo hiperbólico

Adair et al. (1989) realizaron unas modificaciones al modelo de Schoolfield constituyendo el llamado modelo hiperbólico.

5.2.1.3.4.1 Modelo de tiempo de adaptación

Propuesto por Adair et al. 1989, relaciona el tiempo de adaptación con la temperatura de incubación:

$$\ln(\lambda) = p / (T - q)$$

donde

p= medición del descenso del tiempo de adaptación cuando la temperatura aumenta

q= la temperatura a la cual el tiempo de adaptación es infinito. No existe crecimiento

Zwietering et al., (1994b) encontraron dos complicaciones al utilizar esta fórmula hiperbólica para el cálculo del tiempo de adaptación. Una dificultad es que a alta temperatura se aproximan los valores predichos a una asíntota, por lo

tanto el tiempo de adaptación se acerca al valor 1 y su logaritmo a 0. Otra dificultad es que no refleja que, a mayor temperatura de la óptima, el tiempo de adaptación aumenta. Por ello este autor propone las ecuaciones siguientes:

$$\mu = (b_1(T - T_{\min}) * \{1 - \exp[c_1 * (T - T_{\max})]\})^2$$

$$\ln(\lambda) = \ln[(b_2 * (T - T_{\min}) * \{1 - \exp[c_2 * (T - T_{\max})]\})^{-2}]$$

donde:

b_1 , b_2 , c_1 y c_2 son coeficientes de correlación

T_{\min} y T_{\max} son las temperatura mínimas y máximas de crecimiento

5.2.1.4 Modelo de Raíz Cuadrada.

El modelo de raíz cuadrada ha sido utilizado con éxito en alimentos refrigerados. Es una ecuación sencilla de utilizar una vez que se ha establecido la relación lineal existente entre la raíz cuadrada de la tasa de crecimiento (μ) y la temperatura ($^{\circ}\text{K}$).

Esta es una función empírica que se basa en la observación de que a bajas temperaturas existe una relación lineal entre $\sqrt{\mu}$ y $1/T$.

5.2.1.4.1 Modelo de tasa de crecimiento

Este modelo se basa en establecer una relación lineal entre la raíz cuadrada de la tasa de crecimiento (μ) y la temperatura ($^{\circ}\text{K}$), tal que :

$$\sqrt{\mu} = b * (T - T_{\min})$$

donde:

μ = tasa de crecimiento (h⁻¹)

b = coeficiente de regresión

T = temperatura ($^{\circ}\text{K}$)

T_{\min} = temperatura mínima de crecimiento

Ratkowsky et al. (1983) propusieron una modificación a esta fórmula para que abarcase todo el rango de temperaturas:

$$\sqrt{\mu} = b * (T - T_{\min}) * \{1 - \exp * [c * (T - T_{\max})]\}$$

donde:

μ = tasa de crecimiento (h^{-1})

b y c = coeficientes de regresión

T = temperatura ($^{\circ}K$)

T_{\min} & T_{\max} = temperaturas mínima y máxima de crecimiento, a las cuales la tasa de crecimiento es 0 $^{\circ}K$

Zwietering et al. 1991 propusieron una posterior modificación a ésta última ecuación pues vieron que a temperaturas mayores que T_{\max} la fórmula predecía tasas de crecimiento positivas:

$$\mu = [b (T - T_{\min})^2 \{1 - \exp[c(T - T_{\max})]\}]$$

5.2.1.4.2 Modelo de tiempo de adaptación, “lag time”

Se sustituye en la ecuación μ por $1/\lambda$ donde λ es el “lag time”, o tiempo de adaptación, tiene las mismas unidades de tiempo⁻¹. Zwietering et al. (1991) para evitar problemas si los datos tiempos de los tiempos de adaptación son largos (su inversa se aproximaría a 0), invirtió primero la ecuación de la tasa de crecimiento y luego ajustó los datos. Los datos de “lag time” mostraron valores muy altos de error de mínimos cuadrados (MSE) por lo que realizaron una modificación logarítmica en la ecuación para limitar este efecto, por ejemplo, ajustaron la siguiente ecuación:

$$\ln(\lambda) = \ln * [(b * (T - T_{\min}) * \{1 - \exp * [c * (T - T_{\max})]\})^2]$$

donde λ es el tiempo de adaptación

A los otros modelos se les realiza la misma transformación.

5.2.1.4.3 Función que relaciona la asíntota superior con la temperatura:

Zwietering et al., (1991) señalaron que a temperaturas bajas, la asíntota no presenta una dependencia fuerte frente a la temperatura y proponen una ecuación de Ratkowsky modificada que se ajustaría a la siguiente ecuación:

$$A = b_4 * \left(1 - \exp\left[-c_4 (T - T_{A_{\max}})\right] \right)$$

donde:

b_4 es el nivel final alcanzado a bajas temperaturas y equivale a $21.58 - \ln(N_0)$, si el contenido inicial de partida es diferente a $5 * 10^5$ ufc/ml

c_4 es un parámetro de Ratkowsky

T_{\max} es la temperatura máxima en la que presenta crecimiento

5.2.1.4.4 Modelo para describir el efecto combinado de temperatura, pH y actividad agua :

Basándose en la ecuación de Ratkowsky se elaboró la siguiente fórmula para describir el efecto combinado de temperatura y actividad agua:

$$\sqrt{k} = d(T - T_{\min}) \sqrt{(a_w - a_{w\min})}$$

donde $a_{w\min}$ es la actividad de agua mínima en la que crece el microorganismo

Para el efecto combinado de temperatura y pH:

$$\sqrt{k} = C \sqrt{pH - pH_{\min}} * (T - T_{\min})$$

donde pH_{\min} es el pH mínimo en el que crece el microorganismo

5.2.1.5 Modelos dinámicos:

5.2.1.5.1 Modelo dinámico de Van Impe et al. (1992)

Van Impe et al. (1992) diseñaron un modelo matemático dinámico en el que se tiene en cuenta la variación de temperatura que sufre un producto en la cadena de frío. No considera la posible influencia del pH y la actividad agua. Zwietering et al. (1990 y 1991) comparan varios modelos predictivos para crecimiento bacteriano usando muchísimos datos experimentales. Ellos reparametrizan las variables para obtener parámetros biológicamente significativos, como son tasa específica de crecimiento máximo (μ_m), el tiempo de adaptación (λ), y el nivel asintótico (A) de la curva y llegan a la conclusión de que en la mayoría de los casos, los tres parámetros de la ecuación de

Gompertz, eran los mejores para modelar el logaritmo del tamaño relativo de la población. Estos modelos solo se pueden usar con valores constantes de temperatura.

El modelo dinámico se caracteriza por:

En primer lugar, el crecimiento bacteriano y la inactivación están descritos en la misma expresión. Así se puede simular fácilmente la transición entre el crecimiento y la inactivación.

En segundo lugar, como el modelo está en forma de una ecuación diferencial de primer orden, en vez de una función explícita, se puede enfrentar a variaciones de temperatura de forma consistente.

En tercer lugar, a una temperatura constante dentro del rango de crecimiento bacteriano, se le aplica la ecuación de Gompertz como lo sugiere Zwietering et al. (1991) el cual describe muy bien los datos.

5.2.1.5.2 Modelo dinámico de Baranyi y Roberts (1993):

Es un modelo matemático con parte mecanística que se basa en el principio de que existen sustancias que limitan el crecimiento bacteriano. Parte de lo expresado por Frederickson et al. (1967) donde se asume que el estado de una población homogénea de bacterias se puede caracterizar por el medio extracelular, factores fisicoquímicos y condiciones intracelulares. Así su modelo se define como:

$$\frac{dx(t)}{dt} = \frac{z_1(t)}{K_z + z_1(t)} \mu_{\max} \left(1 - \left(\frac{x(t)}{x_{\max}} \right)^m \right) * x(t)$$

donde:

$$\frac{dz_1(t)}{dt} = k_1 * z_1(t)$$

donde :

x = concentración celular

x_{\max} = concentración máxima celular

m = parámetro que describe la curvatura de transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria

t = tiempo

K_z, k_1 = parámetros del modelo

$z(t)$ = vector del estado interno, con dos componentes, z_1 y z_2 que se refieren a la cantidad por célula de factor limitante de crecimiento y a la biomasa de la célula respectivamente.

μ_{\max} = tasa específica de crecimiento

A partir de estas ecuaciones se derivan fórmulas para la estimación de los parámetros como tiempo de adaptación o la tasa de crecimiento.

5.2.2 Modelos de inactivación o supervivencia

El modelamiento matemático se puede considerar que comenzó con los cálculos de los tiempos D de las curvas de letalidad térmica, y fueron fundamentales para el control de la intoxicación por toxina botulínica en las conservas. Los valores de D y z se obtienen a partir de una ecuación de primer orden en logaritmos donde disminuye con respecto al tiempo de calentamiento. Sin embargo se han desarrollado pocos estudios para desarrollar modelos matemáticos que expresen la letalidad o la inactivación de microorganismos en un medio refrigerado (Whiting y Buchanan, 1994). Bhaduri et al. (1991) invirtieron la función de Gompertz para describir la inactivación térmica a baja temperatura de *Listeria monocytogenes*.

Buchanan et al. (1993b) utilizaron un modelo lineal al que le incorporó un término para describir el tiempo de duración de la primera fase de adaptación seguida de un modelo de primer orden para el descenso por inactivación de *Listeria monocytogenes*.

5.2.3 Modelos para condiciones cambiantes

Los datos para la mayoría de los modelos se obtienen en condiciones constantes. Sin embargo, los alimentos sufren variaciones de temperatura, pH, atmósfera, o a_w durante su almacenamiento y transporte. Con frecuencia se estima el crecimiento considerando pequeños tiempos de donde se obtiene una media. La población final se calcula secuencialmente (de un periodo al siguiente)

teniendo en cuenta todas las medias obtenidas. Esto fue satisfactorio para el cálculo de crecimiento bacteriano en carne cocinadas. Fu et al., (1991) propusieron un modelo para fluctuaciones sinusoidales de temperatura, pero observaron que no se ajustaba completamente, pues se producía un efecto-historia del producto (Whiting y Buchanan, 1994).

Se precisa profundizar en la elaboración de modelos que tengan en cuenta las variaciones de temperatura, pH, atmósfera, a_w , y en conjunto todas las condiciones que afectan al producto durante el almacenamiento (Whiting y Buchanan, 1994).

5.3 APLICACIONES

El ARICPC y la microbiología predictiva son conceptos complementarios donde la microbiología predictiva puede aportar un uso más poderoso del ARICPC al establecer, objetiva y cuantitativamente, los efectos de cada fase del proceso con la calidad y seguridad del alimento (McMeekin et al., 1993). Estos autores establecen una comparación entre la definición de la ARICPC por el ICMSF(1991) y la definición de los estudios de la microbiología predictiva en los alimentos.

La definición de ARICPC establece que:

1. Análisis de riesgos: identificación del riesgo y establecimiento de la severidad en varias fases del procesado del alimento, distribución, almacenaje y uso.
2. Control de puntos críticos: puntos donde se debe ejercer el control para prevenir el riesgo o minimizarlo.
3. Especificación de los criterios para los factores intrínsecos, extrínsecos o de procesamiento para asegurar que el control se ha realizado.
4. Establecimiento de un sistema de monitorización de los puntos de control para responder rápidamente a situaciones no deseadas.

Para la microbiología predictiva se establecen los siguientes puntos equivalentes:

1. Identificar el germen responsable (alterante o patógeno)

2. Entender la ecología del germen y cuales son sus fuentes como así también la probabilidad de contaminación y los efectos del procesado, distribución, almacenamiento, etc. con números.

3. Comparar la información obtenida con los conceptos de aceptación o rechazo del proceso o para indicar la vida media que le queda al producto.

4. Incorporar la información en un equipo de monitorización para indicar la extensión de la proliferación microbiana (McMeekin et al., 1993).

La bondad de un modelo se mide por la exactitud con que dicho modelo puede predecir las características del sistema.

¿Cómo se sabe cual es el mejor modelo?

El mejor ajuste no significa el mejor modelo (Baranyi, comunicación personal). El mejor modelo será aquel que prediga mejor los valores reales.

No siempre una ecuación sola es la que mejor se ajusta y predice los parámetros μ , λ y A . Zwietering et al. (1994 a y b) hallaron para sus datos tres ecuaciones diferentes para cada uno de estos parámetros.

Los modelos predictivos se han desarrollado basándose en experimentos utilizando medios de cultivos o directamente productos alimenticios. Medios de cultivos como infusión cerebro-corazón (Buchanan, et al., 1993a), triptosa agar (Buchanan y Klawitter, 1990), agar nutritivo (Ratkowsky, et al., 1983) etc. Jugos de zanahoria (Marchetti et al., 1992), col (Conner et al., 1986), lechuga (Marchetti et al., 1992), achicoria (Marchetti et al., 1992).

Se han realizado modelos a partir de productos como carnes y productos cárnicos (Nderu y Genigeorgis, 1975; Rödel et al., 1976; Daud et al., 1978; Jarvis y Patel, 1979; Thompson y Busta, 1981, Roberts y Jarvis, 1983, Pooni y Mead, 1984; Zamora y Zaritzky, 1985, Gibson et al., 1987, Zurera Cosano et al., 1988, Dickson et al., 1992, Hudson, 1992b, Russell et al., 1992, Nicolai et al., 1993, Zanoni, et al., 1993, Avery et al., 1994), leche (Muir y Phillips, 1984, Chandler y McMeekin, 1985, Griffiths y Phillips, 1988; Fu, et al., 1991; McKellar et al., 1994), vegetales y frutas (Bourne, 1989, Chinnan, 1989, Gardini et al., 1990, Guerzoni et al., 1990, 1991, 1992; Marchetti et al., 1992; Russel et al., 1992), salsas (Zanoni et al., 1993) y pescado (James y Olley, 1971; Charm et al., 1972; Olley y Ratkowsky, 1973, Gibson, 1985, Baker y Genigeorgis, 1990).

Los microorganismos sobre los que se han realizado modelos predictivos son muchos, entre ellos los más estudiados fueron; *Clostridium botulinum* (Roberts y Ingram, 1973, Jarvis y Patel, 1979; Roberts et al., 1981a, b, c, 1982, Gibson y Roberts, 1982; Roberts y Jarvis, 1983, Gibson et al., 1987, Baker y Genigeorgis, 1990); *Clostridium perfringens* (Yip y Genigeorgis, 1981); *Listeria monocytogenes* (Conner et al., 1986, Buchanan et al., 1989, 1993b, Buchanan y Klawitter, 1990, 1991; Buchanan y Phillips, 1990, Saguy 1992, Duh y Schaffner, 1993, Witjzes et al., 1993 Avery et al., 1994, Buchanan y Golden, 1994); *Yersinia enterocolitica* (Adams et al., 1991; Little et al., 1994, Sutherland y Bayliss, 1994); *Staphilococcus* (Genigeorgis et al., 1971a y b; Nderu y Genigeorgis, 1975, Broughall et al., 1983; Broughall y Brown, 1984; Buchanan, et al. 1993c; Sutherland et al., 1994); *Salmonella* (Genigeorgis et al., 1977, Broughall et al., 1983; Broughall y Brown, 1984; Gibson y Roberts, 1986a, Gibson et al., 1988, Dickson et al., 1992); *Aeromonas hydrophila* (Guerzoni et al., 1992; Hudson, 1992a y b, Palumbo et al., 1992); *Escherichia coli* (Gibson y Roberts, 1986a, McClure y Roberts, 1987, Buchanan et al., 1993a); *Bacillus cereus* (Raevuori y Genigeorgis, 1975); *Pseudomonas* (Enfors y Molin, 1981, Guerzoni et al., 1992; Willocx et al., 1993, Membré y Burlot, 1994); psicrófilos y psicrotrofos (Mohr y Krawiec, 1980, Stannard et al., 1985), bacterias acidolácticas (Blickstad y Molin, 1984, Zurera Cosano et al., 1988, Zwietering et al., 1991, 1994a, Nicolai et al., 1993) y levaduras (Gardini et al., 1990)

Se han desarrollado varios programas para modelamiento de datos como el de MFSmodel, Dmodel, Food Micromodel, Gomplamu, cuyo uso es restringido para trabajos de investigación.

La exactitud de la predicción se ve afectada en diferentes grados por numerosos factores como el diseño adecuado, que incluye las especificación adecuada del sistema, sus alrededores y líneas limítrofes y también la identificación y definición de individuos y las interrelaciones de factores endógenos y exógenos, algunos de las cuales pueden ser variables dependientes y otras independientes.

Cuando no se tiene cierta información fundamental para la construcción de un modelo se acepta una serie de premisas, las cuales harán que las conclusiones que se elaboren con dicho modelo estén influenciadas por estas premisas. Por lo tanto premisas falsas llevan a conclusiones erróneas.

Otros beneficios del modelling son:

- el diseño de experimentos de laboratorio con resultados valiosos
- evaluación de resultados experimentales conflictivos
- ofrecer explicación a diferentes resultados

Si se ejecuta adecuadamente, un modelo sería mucho más eficiente que un proceso teórico o experimental individual.

Farber (1986) menciona como limitación de la información obtenida por los modelos predictivos:

1. No se deben realizar predicciones o extrapolaciones fuera de los límites del experimento.

2. Los experimentos realizados en medios de cultivo no deberían ser usados para predecir el crecimiento o la producción de toxinas en alimentos. (Genigeorgis et al., 1971b; Raevuori y Genigeorgis 1975).

3. No se pueden realizar aseveraciones de que un microorganismo no podrá crecer o no producirá una toxina en un determinado alimento. Pequeñas variaciones del alimento pueden producir un aumento o disminución de la probabilidad de crecimiento o producción de la toxina, por lo que solo se puede asegurar con certeza el efecto relativo que producirá la combinación de tratamientos (Roberts et al., 1981c).

III. OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1°.- Estudio de la microflora presente en vegetales envasados en atmósfera modificada con énfasis en la búsqueda de microorganismos patógenos tales como *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila*.
- 2°.- Comportamiento y monitorización de bacterias acidolácticas y psicrotrofas presentes en ensaladas con atmósfera modificada durante el almacenamiento a 4 °C, 10°C y 15 °C
- 3°.- Comportamiento y monitorización de los microorganismos inoculados en ensalada de IV Gama en condiciones de refrigeración (*Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* y *Leuconostoc mesenteroides*).
- 4°.- Determinación de los parámetros fisicoquímicos y organolépticos durante el período de almacenamiento en refrigeración.
- 5°.- Determinación del período de vida comercial de la ensalada envasada en atmósfera modificada. Relación existente entre las alteraciones organolépticas y fisicoquímicas con la presencia de bacterias alterantes y patógenas.
- 6°.- Aplicación de modelos de predicción de crecimiento bacteriano en ensaladas de IV Gama en función de la temperatura de almacenamiento.

IV. MATERIAL Y METODOS

IV. MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL

1.1 *Medios de cultivo*

Agua de peptona al 0.1 % para realizar las diluciones (Difco)

1.1.1 Caldos

- Caldo selenito cistina (Bacto Selenite Cystine Broth, Difco)
- Caldo tetracionato verde brillante (TVB), modificación de Kauffmann, siguiendo la técnica descrita por ICMSF (1982), se preparó de la siguiente forma: se mezcló caldo tetracionato esterilizado (Bacto Tetrathionate Broth Base, Difco) con 2 ml de una solución acuosa de verde brillante (Bacto Brilliant Green, Difco) al 0.5 % esterilizada por ebullición durante 10 minutos, luego se añadieron 20 ml de una solución de yodo elaborada disolviendo 5 g de yoduro potásico (Panreac) y 6 g de yodo cristalino (Panreac) en 20 ml de agua destilada estéril. Se agitó suavemente hasta conseguir la resuspensión del precipitado y distribuyó asépticamente.
- Caldo verde brillante con 2 % de bilis (Bacto Brilliant Green Bile 2 %, Difco)
- Infusión cerebro-corazón (BHI)(Bacto Brain Heart Infusion, Difco)
- Listeria Enrichment Broth Base (UVM formulation) (Oxoid) complementado con Listeria Primary Selective Enrichment Supplement (UVM I) (Oxoid)
- Listeria Enrichment Broth Base (UVM formulation) (Oxoid) complementado con Listeria Secondary Selective Enrichment Supplement (UVM II)(Oxoid)

- Medio Fraser (Oxoid) suplementado con Fraser Supplement (Oxoid)
- MRS Caldo (Man, Rogosa, Sharpe, Oxoid)

1.1.2 Agares

- Agar base de Baird-Parker (BP) (Bacto Baird-Parker Agar Base, Difco) enriquecido con telurito potásico y yema de huevo (Bacto EY Tellurite Enrichment, Difco)
- Agar base selectivo para *Yersinia* (Bacto *Yersinia* Selective Agar Base, Difco) enriquecido con Suplemento antimicrobiano para yersinia con cefsulodina y novobiocina (Bacto *Yersinia* Antimicrobial Supplement CN, Difco)
- Agar Columbia con sangre de cordero (Biomérieux)
- Agar con bilis, rojo neutro y violeta cristal (VRB) (Bacto Violet Red Bile Agar, Difco)
- Agar con hierro y lisina inclinado (LIA) (Bacto Lysine Iron Agar, Difco)
- Agar con patata y dextrosa (PDA) (Bacto Potato Dextrosa Agar, Difco) acidificado con ácido tartárico al 10 % para alcanzar un pH de 3.5.
- Agar con sulfito de bismuto (Bacto Bismuth Sulfite Agar, Difco)
- Agar con sulfito, polimixina y sulfadiacina (SPS) (Bacto SPS Agar, Difco)
- Agar con triple azúcar e hierro, inclinado (TSI) (Bacto Triple Sugar Iron Agar, Difco)
- Agar con xilosa, lisina y desoxicolato (XLD) (Bacto XLD Agar, Difco)
- Agar KF para estreptococos (Bacto KF *Streptococcus* Agar, Difco)
- Agar Oxford (*Listeria* Selective Medium, Oxford formulation, Oxoid) enriquecido con *Listeria* Selective Supplement (Oxoid)

- Agar para *Pseudomonas* (Bacto *Pseudomonas* Agar F, Difco) adicionado con 10 g de Bacto Glycerol (Difco)
- Agar para recuento en placa (PCA) (Bacto Plate Count Agar, Difco)
- Agar Sabouraud Dextrosa (Difco)
- Agar Sangre (Oxoid) enriquecido con sangre de cordero
- Agar Sangre (Oxoid) enriquecido con sangre de caballo
- Agar triptosa (Bacto Trytose Agar, Difco)
- Agar verde brillante (Bacto Brilliant Green agar, Difco)
- MacConkey (Bacto MacConkey, Difco)
- Medio basal para oxidación y fermentación (Bacto Basal Medium, Difco)
- Medio Palumbo confeccionado según lo descrito por Palumbo et al. (1985). Por cada litro de Agar Base con Rojo Fenol (Bacto Phenol Red Agar Base, Difco) se añadieron 10 g de almidón soluble (Soluble Starch, Difco) y 10 mg de ampicilina (Sigma) esterilizada por filtración con Millipore.
- Medio para pruebas de movilidad (Bacto Motility Test Medium, Difco)
- MRS Agar (Man, Rogosa, Sharpe, Oxoid)

1.2 Reactivos

- Aceite de inmersión
- Aceite de parafina
- Acido tartárico al 10 %
- Catalizador de paladio para la reacciones de producción de gases en la jarra de anaerobiosis (Oxoid)

- Colorantes para la tinción de Gram: cristal violeta modificado por Hucker, lugol, y safranina (OPS/OMS, (1983) Manual de Técnicas Básicas para un laboratorio de Salud. Publicación científica, N°439, Washington)
- Kit de reactivos para galerías de identificación API 20 C AUX (Biomerieux) para la identificación de levaduras,

Agar Sabouraud Dextrosa (Difco)

Agua destilada, 2 ml

C Medium (Biomerieux)

RAT Medium (Biomerieux)

- Kit de reactivos para galerías de identificación API 20 E (Biomerieux)

Agua destilada estéril

IND (Reactivo de Kovacs, Biomerieux)

MacConkey (Bacto MacConkey, Difco)

Medio basal para oxidación y fermentación (Bacto Basal Medium, Difco)

Medio para pruebas de movilidad (Bacto Motility Test Medium, Difco)

NIT1 y NIT2 (Reactivo de Griess para los nitritos, Biomerieux)

OX (Tetrametil-p-fenilendiamina al 1 % en alcohol isoamílico, Difco)

TDA (Percloruro férrico al 3.4 % en solución acuosa, Biomerieux)

VP1 y VP 2 (Reactivos de Voges-Proskauer, Biomerieux)

Zn (Polvo de zinc, Biomerieux)

- Kit de reactivos para galerías de identificación API 20 NE (Biomerieux)

JAMES (reactivo para la investigación del indol)

Medio AUX (Biomerieux)

NaCl 0.85 % Medium (Biomerieux)

NIT1 y NIT2 (Reactivo de Griess para los nitritos, Biomerieux)

OX (Tetrametil-p-fenilendiamina al 1 % en alcohol isoamílico, Difco)

Zn (Polvo de zinc, Biomerieux)

- Kit de reactivos para galerías de identificación API 20 STREP (Biomerieux)

Agar Columbia con sangre de cordero (Biomerieux)

Agar Sangre Base (Oxoid)

Agua destilada estéril

API 20 STREP Medium (Biomerieux)

NIN (reactivo para ninhidrina) (Biomerieux)

VP1 y VP 2 (Reactivos de Voges-Proskauer, Biomerieux)

ZYM A, y ZYM B (reactivo para la investigación de la actividad enzimática)

- Kit de reactivos para galerías de identificación API 50 CHL (Biomerieux)

Agua destilada

Agua oxigenada para la detección de la producción de catalasa

API 50 CHL Medium para Lactobacillus (Biomerieux)

MRS Agar (Man, Rogosa, Sharpe, Oxoid)

- Kit de reactivos para galerías de identificación Sistema Pasco para Bacteria Gram positivas (Difco)

Acido sulfanílico al 0.8 % para el test del nitrato (Difco)

Agua oxigenada para la detección de la producción de catalasa

Diluyente con Tween 80, tubos de 12.5 ml, (Difco)

N, N-dimetil-1-naftilamina al 0.6 % para el test del nitrato (Difco)

OX (Tetrametil-p-fenilendiamina al 1 % en alcohol isoamílico, Difco)

PYR para la prueba del pyroglutamato (Pasco)

Tryptic Soy Agar con un 5 % de sangre de carnero (Difco)

VP A y VP B (hidróxido potásico al 40 % y alfa-naftol al 5 %, Difco)

Zn (Polvo de zinc, Biomerieux)

- Kit de reactivos para galerías de identificación Sistema Pasco para Bacteria Gram negativas (Difco)

IND (Reactivo de Kovacs, Difco)

NIT1 y NIT2 (Reactivo de Griess para los nitritos, Difco)

OX (Tetrametil-p-fenilendiamina al 1 % en alcohol isoamílico, Difco)

TDA (Percloruro férrico al 3.4 % en solución acuosa, Difco)

VP1 y VP 2 (Reactivos de Voges-Proskauer, Difco)

Zn (Polvo de zinc, Biomerieux)

- Patrones McFarland (Biomerieux)
- Sobres para generar atmósfera de anaerobiosis (Anaerobic Kit BR0038, Oxoid)
- Solución tampón standard pH 4.0 y pH 7.2 para calibrar el potenciómetro (Crison, Digit 502)
- Solución de formol al 5 %

1.1 Instrumental

- Cámara de flujo laminar
- Cuentacolonias
- Espectrofotómetro Beckman DV-64
- Estufas a 7 °C, 25 °C, 30 °C y 37 °C
- Medidor de gases PAK 12 Abiss
- Potenciómetro CRISON Digit 502

- Ordenador 486 DX33
- Stomacher
- Pipetas automáticas regulables de 100 μ l y 1000 μ l, Justor 1100 DG (NICHIRYO)
- Accesorios del Sistema de indentificación Pasco (asas de inoculación, inoculadores desechables Pasco, para paneles MIC/ID y TRI-ID, tiras de papel para incubación)
- Balanza de precisión, autoclave, baño termostático, frigorífico, mezclador Vortex, microscopio óptico
- Material de vidrio vario; botes de 250 ml, de dilución de 100 ml, campanas de Durham, jarra de anaerobiosis de 3.5 l de capacidad (Oxoid), pipetas estériles de 1, 5, y 10 ml, pipetas Pasteur, portaobjetos y cubreobjetos
- Bolsas estériles de Stomacher, asa de siembra, cajas de Petri de 90 x 15 mm desechables, mechero Bunsen, pinzas y tijeras estériles

2. METODOS

2.1 *Descripción de las muestras*

Las muestras objeto de este estudio estaban compuestas por un 75 % (del peso total de la ensalada) de lechuga, el 15 % de zanahoria y el 10 % col lombarda troceadas envasadas en películas plásticas, suministradas por Vega Mayor S.A., Milagro (Navarra).

Durante el proceso de fabricación estos vegetales fueron seleccionados, limpiados y desechadas las partes deterioradas para posteriormente ser cortados y lavados. Los tozos de lechuga eran aproximadamente de 20 mm de ancho y menos de 70 mm de largo, de zanahoria de unos 1.8 mm de ancho y longitud variable, y en el caso de la col era variable. El lavado se realizó con agua potable con 100 mg/l de cloro activo y con una temperatura de 4°C. Tras ser enjuagados se centrifugaron y mezclaron con otros vegetales para constituir la ensalada deseada. Posteriormente fueron pesados, envasados con películas plásticas de polipropileno (permeabilidad al CO₂ de 142 cm³/m²/24 horas/atm. y al O₂ de 44 142 cm³/m²/24 horas/atm) con unas dimensiones de 290 de largo por 155 mm de ancho, sin inyección de gases, y almacenados a 2 °C. La temperatura recomendada por el fabricante es de igual o inferior a 4 °C.

2.1.1 Sistemática de muestreo

Las muestras fueron tomadas al azar en la planta de fabricación y transportadas a temperatura de refrigeración, entre 0°C y 4 °C en camiones refrigerados.

Una vez en el laboratorio las muestras fueron almacenadas a 4 °C, temperatura recomendada por el fabricante para su almacenamiento, con el fin de estudiar la evolución de los microorganismos presentes en las ensaladas.

También se almacenaron muestras a 10°C y 15 °C para conocer el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la evolución de bacterias acidolácticas y psicrotrofas, grupos mayoritarios del contenido microbiano en la ensalada y responsables de su alteración según diversos autores.

Para el estudio posterior de la evolución de *Leuconostoc mesenteroides*, *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas fluorescens* inoculados en la ensalada, éstas se almacenaron a las temperatura extremas, 4 °C y 15 °C.

Una vez aislada *Listeria monocytogenes* en la ensalada se quiso saber que capacidad de reproducción tenía este microorganismo dentro de la ensalada, por lo que se inocularon las muestras que fueron almacenadas a la temperatura recomendada por el fabricante.

Las muestras almacenadas a 4 °C se tomaron en diferentes épocas del año, invierno (enero), primavera (mayo) y otoño (octubre) para comprobar si existían diferencias significativas de recuentos microbianos entre estaciones.

De un total de 669 bolsas de ensaladas de 10 lotes diferentes, cada 12 horas durante los tres primeros días, y cada 24 horas a partir de entonces, se fueron recogiendo 3 muestras para su análisis hasta llegar a las 204 horas del período experimental.

2.1.2 Preparación de la muestra para el análisis microbiológico

Para la preparación de la muestra se introdujeron 25 g de la ensalada en una bolsa de Stomacher estéril y se diluyó en 225 ml de agua de peptona al 0.1%, triturándose en el Stomacher Colworth durante 2 minutos.

Una vez homogeneizada la muestra se hicieron diluciones decimales seriadas en frascos de dilución con 90 ml de agua de peptona al 0.1 % y se sembraron por duplicado (ICMSF, 1982).

2.2 Examen microbiológico del crecimiento bacteriano

Se describe la metodología utilizada según los objetivos planteados:

2.2.1 Comportamiento y monitorización de los diferentes grupos de microorganismos presentes en vegetales envasados con atmósfera modificada en condiciones de refrigeración de 4 °C

1. Recuento, aislamiento e identificación de bacterias acidolácticas.
2. Recuento, aislamiento e identificación de microorganismos aerobios psicrotrofos

3. Recuento, aislamiento e identificación de levaduras y mohos.
4. Recuento, aislamiento e identificación de *E. coli*. y coliformes
5. Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*
6. Aislamiento e identificación de *Salmonella*.
7. Recuento, aislamiento e identificación de *Clostridium* sulfito reductores
8. Recuento, aislamiento e identificación de *Aeromonas hydrophila*.
9. Recuento, aislamiento e identificación de enterococos.
10. Recuento, aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*
11. Recuento, aislamiento e identificación de *Yersinia enterocolitica*.

2.2.1.1 Recuento, aislamiento e identificación de bacterias acidolácticas

A partir de la muestra bien homogeneizada se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembró 1 ml de cada dilución en medio MRS en masa y por duplicado. Una vez solidificado, fue cubierto con otra capa de medio y se incubaron las placas a 30 °C durante 48 horas según la técnica descrita por Garg et al. (1990).

Para la identificación de las bacterias acidolácticas fueron aisladas al menos diez colonias de cada una de las placas sembradas de cada muestra y se sembraron en caldo MRS, incubando 48 horas a 30 °C para posteriormente volver a sembrarlos en la superficie de agar MRS con asa de siembra y en estrías. Se incubaron 24 horas a 30 °C.

Una vez aisladas se identificaron con galería API 50 CHL. Se utilizó un programa elaborado especialmente en lenguaje FORTRAN 77 para determinar la especie más aislada. El programa calcula la probabilidad de cada una de las 32 especies de bacterias acidolácticas (descritas en el protocolo API con sus probabilidades), como el producto de la probabilidad p de la existencia de una especie en un medio (la reacción ha resultado positiva) y $(1-p)$ cuando la reacción ha resultado negativa en el medio, para cada uno de los 50 medios del método API 50 CHL. Las entradas al programa son: el número total de medios con resultado positivo y a continuación cuales son los medios positivos, numerados de 0 a 49. La salida del programa contiene los nombres de las 32 especies del

método con su probabilidad. Por último, el programa ordena las tres especies con probabilidad más elevada.

2.2.1.2 Recuento, aislamiento e identificación de microorganismos aerobios psicrotrofos

A partir de la muestra bien homogeneizada se realizaron diluciones seriadas decimales y se sembró 0.1 ml de la suspensión en superficie en PCA (Plate Count Agar, Difco) por duplicado según la técnica recomendada por el ICMSF (1982), incubando a 7 °C durante 10 días.

Se aislaron al menos diez colonias de cada una de las placas sembradas de cada muestra en agar triptosa para su posterior identificación por galerías bioquímicas, API 20 E, API 20 NE, y PASCO para Gram negativas y positivas.

2.2.1.3 Recuento, aislamiento e identificación de levaduras y mohos

A partir de la muestra bien homogeneizada se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembró en masa 1 ml de cada dilución por duplicado en medio Potato Dextrosa Agar (PDA) con 10 % de ácido tartárico para alcanzar un pH de 3.5, según la técnica recomendada por el ICMSF (1982). Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 3 días.

Una vez aisladas se identificaron con galería API para levaduras.

1.2.1.1 Recuento, aislamiento e identificación de E. coli, coliformes totales y fecales

A partir de la muestra bien homogeneizada se realizaron diluciones seriadas decimales. Se sembró 1 ml de cada dilución en series de tres tubos de caldo verde brillante, según la técnica del Número más Probable (NMP), incubando los tubos inoculados a 37 °C y a 44 °C.

La lectura se realizó a las 24 y 48 horas, confirmando los tubos positivos con formación de gas en medio VRB agar. Para ello se procedió a sembrar con asa de siembra, a partir de cada tubo positivo, en la superficie de placas de VRB fresco, incubándose a 37 °C durante 24 horas, considerando como positivas solo las colonias violáceas con halo de precipitación (ICMSF, 1982).

Se identifican con las galerías API 20 E.

1.2.1.2 Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* (Lee y McClain, 1986)

1.2.1.2.1 Preenriquecimiento:

Para la preparación de la muestra se introdujeron 25 g de la ensalada en una bolsa de Stomacher estéril y se diluyó en 225 ml de agua de peptona tamponada al 1%, ajustando el pH a 7.2 ± 0.1 . Se trituró en el Stomacher Colworth durante 2 minutos e incubó a 30 °C durante 24 horas.

1.2.1.2.2 Primer enriquecimiento selectivo:

Se diluyeron 10 ml de la solución incubada en agua de peptona tamponada en 90 ml de Caldo Selectivo, UVLM I. Se incubaron los frascos durante 24 horas a 30°C (modificación de USDA).

1.2.1.2.3 Segundo enriquecimiento selectivo:

Se colocó 0.1 ml del caldo selectivo I (UVLM I) en 10 ml del caldo selectivo II, (UVLM II). Se incubaron los tubos durante 24 horas a 30°C.

1.2.1.2.4 Siembra en medio selectivo

A partir del caldo UVLM II se sembró con asa de siembra por estrías en medio Oxford agar y se incubaron las placas durante 24 - 48 horas a 30°C.

1.2.1.2.5 Confirmación

Se tomaron al menos 5 colonias típicas de una placa de cada muestra y se sembraron en placas con BHI y agar sangre con sangre de caballo. Las colonias típicas en medio Oxford eran verde grisáceas con halo negro. Se incubaron las placas a 37 °C por una noche.

A partir de las colonias crecidas

- se sembraron en caldo de BHI y se incubaron a 37 °C para luego verificar su capacidad de hemólisis

- se sembraron en medio semisólido y se incubaron a 20 °C y se observó la formación típica de paraguas.

- Se sembraron en agar BHI inclinado y se incubaron a 37 °C una noche para posteriormente realizar los test de oxidasa, catalasa y Gram.

- Se identificaron luego con Sistema Pasco para grampositivas.

1.2.1.3 Aislamiento e identificación de Salmonella

El aislamiento e identificación de este microorganismo se realizó en varias fases de enriquecimiento (ICMSF, 1982):

1.2.1.3.1 Preenriquecimiento

Para la preparación de la muestra se introdujeron 25 g de la ensalada en una bolsa de Stomacher estéril y se diluyó en 225 ml de agua de peptona al 1 %, ajustando el pH a 7.2. Se trituró en el Stomacher Colworth durante 2 minutos e incubó a 37 °C durante 18-24 horas

1.2.1.3.2 Enriquecimiento selectivo

A partir del cultivo de preenriquecimiento se pipeteó 1 ml en 10 ml de caldo selenito cistina y 10 ml de caldo tetrionato verde brillante. Se incubaron en baño de agua a 43°C ± 0.05 durante 24 horas.

1.2.1.3.3 Siembra en placa en medios de agar selectivo

Luego de la incubación en caldo selectivo se sembraron en placas de agar selectivo, en superficie y con asa de siembra. Los agares utilizados fueron:

- a) **Agar verde brillante** : se incubaron a 35-37°C durante 24 horas. Se aislaron aquellas colonias sospechosas, que fueran colonias incoloras, rosa o fucsia o traslúcidas a opacas con el medio que las rodeara un rosa a rojo.
- b) **Agar sulfito de bismuto** : se incubaron a 35-37°C durante 48 horas. Se aislaron aquellas colonias sospechosas, que fueran colonias marrones o grises a negro, a veces con brillo metálico. El medio que las rodeara podría ser marrón al principio, cambiando a negro al transcurrir el tiempo. Algunas cepas verdes con medio que las rodea poco o nada oscurecido.

Se incubaron a 37°C durante 48 horas y se aislaron aquellas colonias sospechosas, que fueran colonias con centro negro y transparentes alrededor.

1.2.1.3.4 Confirmación bioquímica

Las colonias aisladas se sembraron en tubos con :

- a) **Agar triple azúcar hierro:** en tubos inclinados se sembraron en estrías de atrás a adelante en la superficie inclinada y después por picadura. Se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se consideraron sospechosas aquellos tubos que mostraran la parte inclinada roja, la columna de medio amarilla, con o sin ennegrecimiento. También se consideraron sospechosas de Salmonella si todo el tubo aparecía amarillo.
- b) **Agar lisina hierro:** en tubos inclinados se sembraron en estrías de atrás a adelante sobre la superficie inclinada y después por picadura. Se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se consideraron sospechosas aquellos tubos que mostraran todo el tubo púrpura con o sin ennegrecimiento. También se consideraron sospechosas de Salmonella si la parte inclinada del tubo se presentaba amarilla y la columna púrpura, con reacciones típicas en TSI (Agar triple azúcar hierro).

Debían dar los dos tubos positivos para que se consideraran como positivo.

1.2.1.4 Recuento, aislamiento e identificación de clostridios sulfito reductores

A partir de la muestra bien homogeneizada se realizaron diluciones decimales seriadas. Se sembró por duplicado 1 ml de cada dilución con pipeta estéril en tubos con SPS (agar con sulfito, polimixina y sulfadiacina) previamente licuados, realizándolo cuidadosamente desde el fondo hacia la superficie del tubo para que no se produjeran burbujas. Posteriormente se cubrieron con 2 cm de parafina estéril para lograr la anaerobiosis necesaria. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se realizó el recuento de las colonias negras (ICMSF, 1982; Gimenez, 1991).

1.2.1.5 Recuento, aislamiento e identificación de *Aeromonas hydrophila*

A partir de la muestra bien homogeneizada y realizadas las diluciones decimales se sembró 0.1 ml de cada dilución en la superficie del Medio Palumbo

(Palumbo et al., 1985) e incubaron las placas a 25 °C durante 24-48 horas. Aquellas colonias sospechosas de ser *Aeromonas* (amarillentas y de unos 1 a 3 mm, mucosas), fueron aisladas de las placas. Luego se inundó la placa con una solución de lugol (la misma de la tinción del Gram), realizando el recuento de aquellas colonias que manifestaran un halo claro amarillento alrededor, debido a la capacidad de *Aeromonas* de degradar el almidón del medio.

A partir de las colonias aisladas se realizaron API 20 E para identificarla.

1.2.1.6 Recuento, aislamiento e identificación de enterococos

A partir de la muestra bien homogeneizada se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembró por duplicado en masa 1 ml de cada dilución en medio KF Streptococcus, incubándose a 35-37 °C durante 48 horas. Se realizó el recuento de aquellas colonias que presentaban un rojo intenso y rosa claro.

Una vez aisladas se identificaron con galería API 20 Strep.

1.2.1.7 Recuento, aislamiento e identificación de Staphylococcus aureus

A partir de la muestra bien homogeneizada se realizaron diluciones seriadas decimales, se sembró 0.1 ml de la suspensión en superficie en Agar Baird-Parker por duplicados y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Solo se contaron aquellas colonias negras azabache con halo de precipitación y más externamente un halo traslúcido.

Una vez aisladas se identificaron con galería PASCO para Gram positivas.

1.2.1.8 Recuento, aislamiento e identificación de Yersinia enterocolítica

A partir de la muestra bien homogeneizada y realizadas las diluciones decimales se sembró 0.1 ml de cada dilución en la superficie de Agar base selectivo para *Yersinia*, incubándose las placas a 27°C durante 24-48 horas.

Se realizó el recuento y aislamiento de aquellas colonias que después de 18-24 horas de incubación fueran traslúcidas, o traslúcidas con centros rosa oscuro, bordes perfectos o irregulares. Después de 48 horas colonias rosa oscuro con zonas de delimitación traslúcidas, pudiendo estar rodeadas por una zona de bilis precipitada.

1.2.2 Comportamiento y monitorización de bacterias acidolácticas y psicrotrofas en ensaladas durante el almacenamiento a 10 °C y 15°C

Las técnicas utilizadas fueron descritas en los puntos 2.2.1.1 y 2.2.1.2

1.2.3 Comportamiento y monitorización de los microorganismos inoculados en condiciones de refrigeración y envasado (*Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* y *Leuconostoc mesenteroides*)

1.2.3.1 Preparación del inóculo

1.2.3.1.1 Cepario

Las cepas utilizadas en nuestro estudio procedieron de la Colección Española de Cultivos Tipo. Estas cepas fueron:

Leuconostoc mesenteroides dextranicum CECT N° 912

Aeromonas hydrophila hydrophila CECT N° 839

Pseudomonas fluorescens CECT N° 378

Listeria monocytogenes Scott A, F 4642

Las cepas liofilizadas fueron reconstituídas según las indicaciones de los responsables de la Colección Española de Cultivos Tipo.

Para cada microorganismo se eligió un medio de cultivo líquido: Caldo Triptosa Soja para la *Aeromonas hydrophila*, y *Pseudomonas fluorescens*, para *Leuconostoc mesenteroides* se utilizó caldo MRS y BHI para *Listeria monocytogenes*.

Los medios sembrados fueron incubados durante 24 horas a 30 °C y se realizaron repetidas resiembras. Solo el *Leuconostoc mesenteroides* se incubó en jarras de anaerobiosis.

En un medio sólido favorable fueron sembradas unas gotas de la suspensión de material reconstituido del liofilizado; así, *Aeromonas hydrophila* en Agar Triptosa Soja, BHI, y Palumbo; *Pseudomonas fluorescens* en Agar Triptosa Soja, BH Agar y Medio F ; para *Leuconostoc mesenteroides* se utilizó MRS agar y BH Agar. Se incubaron a 30 °C en las mismas condiciones gaseosa que los caldos.

1.2.3.1.2 Calibración de las suspensiones bacterianas

Con el fin de conocer con mayor precisión el tamaño del inóculo inyectado a la muestra se realizó una serie de calibraciones con cada cepa con lectura en espectrofotómetro.

Se realizaron diluciones seriadas decimales en el mismo caldo y diluciones seriadas dobles en una solución de formol al 5 % con el fin de inactivar los microorganismos y proteger el personal y el instrumental de contaminación con células vivas. Se confeccionó un blanco formado por mitad el caldo y mitad la solución de formol.

A partir de las diluciones en caldo de cultivo se sembraron en placas con agar del mismo medio para así conocer la concentración exacta. Se incubó a 30°C durante 24 horas.

Se realizó la lectura por el espectrofotómetro a 550 nm y se trazó una recta de calibrado para cada cepa.

Se realizaron al menos tres repeticiones de estas calibraciones antes de utilizarlo en el momento de inocular las muestras.

1.2.3.1.3 Preparación de la concentración del inóculo

Para la inoculación de las muestras se sembraron las cepas en un frasco con 50 ml de caldo apropiado y se incubaron durante 24 horas a 30°C. Se siguió el método empleado en la calibración y a partir de la absorbancia obtenida se calculó la cantidad de microorganismos presentes en el cultivo original. Simultáneamente se sembró el inóculo en placas para conocer la concentración exacta. Así se realizaron las diluciones en caldo necesarias para tener en las bolsas 10^3 ufc/g inoculando un mililitro de la suspensión bacteriana, de forma que, si el contenido de ensalada en una bolsa es de 250 g, entonces el inóculo a preparar deberá ser de $2.5 \cdot 10^5$ ufc/ ml para que la concentración final fuese 10^3 ufc/g.

1.2.3.2 Inoculación

Las bolsa de la ensalada fueron inoculadas con jeringas estériles dentro de un cámara de flujo laminar, siempre la esquina derecha inferior con respecto a la etiqueta. Primero se desinfectó con alcohol, una vez seco se pegó un botón de caucho siliconado para impedir la salida de gases. Se inoculó 1 ml de la

suspensión bacteriana preparada en las muestras y se almacenaron a 4 °C y 15 °C manteniendo siempre la esquina inoculada hacia abajo.

1.2.3.3 Recuento, aislamiento e identificación de microorganismos inoculados

1.2.3.3.1 Recuento, aislamiento e identificación de *Leuconostoc mesenteroides*

A partir de la muestra bien homogeneizada se realizaron diluciones decimales seriadas. Se sembró 1 ml de cada dilución en medio Mayeux en masa y por duplicado y se incubaron las placas a 30 °C durante 48 horas según la técnica descrita por Mayeux et al. (1962).

Para la identificación de las bacterias se aislaron al menos diez colonias de cada una de las placas sembradas de cada muestra y se sembraron en caldo MRS, e incubaron durante 48 horas a 30 °C para posteriormente volver a sembrarlos en la superficie de agar MRS con asa de siembra y en estrías. Se incubaron 24 horas a 30 °C.

Una vez aisladas se identificaron con galería API 50 CHL.

1.2.3.3.2 Recuento, aislamiento e identificación de *Pseudomonas fluorescens*

A partir de la muestra bien homogeneizada y realizadas las diluciones decimales se sembró 0.1 ml de cada dilución en la superficie del Medio F y se incubaron las placas a 30 °C durante 24-48 horas.

Para la identificación de las bacterias se aisló la raíz cuadrada del recuento de colonias de una de las placas sembradas de cada muestra y se sembró en Medio F, incubando 48 horas a 30 °C para posteriormente volver a sembrarlos en la superficie de PCA con asa de siembra y en estrías. Se incubaron 24 horas a 30°C.

Una vez aisladas se identificaron con galería API 20 NE.

1.2.3.3.3 Recuento, aislamiento e identificación de *Aeromonas hydrophila*

La técnica utilizada fue la misma que la ya descrita en el punto 2.2.1.8.

1.2.3.3.4 Recuento, aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*

Se procedió igual que en el punto 2.2.1.5.

Al mismo tiempo se realizó otra técnica para el recuento de *Listeria monocytogenes* utilizando el medio líquido Fraser y la técnica del NMP. Se consideraron positivos aquellos medios que viraron su coloración a negro, indicativo de la degradación de la esculina (Fraser y Sperber, 1988, Buchanan et al., 1989).

1.3 Determinación de los parámetros fisicoquímicos y organolépticos durante el período de almacenamiento en refrigeración

1. Concentración de gases en el interior del envase (O₂, CO₂)
2. pH
3. Características organolépticas

1.3.1 Concentración de gases en el interior del envase (O₂, CO₂)

La concentración de gases se realizó mediante medidor de CO₂ y O₂ modelo Pak 12 de Abiss, equipado con detector de infrarrojos para CO₂ y detector electroquímico para O₂. Las muestras gaseosas (20 ml) se tomaron de las bolsas de ensalada usando jeringas herméticas de gas a través de un septum de goma, expresando las concentraciones en % (v/v), según la técnica descrita por el fabricante.

1.3.2 pH

El pH se midió con un potenciómetro Crison pH/mv-meter digit 501, a partir de la muestra triturada en el Stomacher Colworth diluida 1/10 en solución salina fisiológica.

1.3.3 Características organolépticas

Las características organolépticas de color, textura, pardeamiento de los cortes e hinchazón del envase fueron catalogadas por un panel de la siguiente forma en orden de preferencia en una escala hedónica del 0 al 4 (Strugnell, 1988):

Color y textura:

0= inaceptable

1= pobre

2= regular

3= buena

4= muy buena

Pardeamiento:

0= inaceptable

2= ligero

4= ninguno

Hinchazón del envase:

0= excesivo, parece a punto de estallar

1= muy hinchada

2= hinchada

3= ligeramente hinchada

4= no hinchada

1.4 Análisis estadísticos

Para el análisis los datos estadísticos y varianza ha sido utilizado el programa Statgraphics versión 5. Para el caso del análisis sensorial se utilizó un test no paramétrico de Spearman y Kruskal-Wallis. En los análisis de varianza se comprobaron los supuestos teóricos.

1.5 Aplicación de modelos predictivos de crecimiento bacteriano

Para la elaboración de los modelos predictivos se ha utilizado varios programas, “DModel” de Baranyi et al. (1993b y c), “Gomplamu” de Cupper (FLAIR, 1993), el programa “MFSmodel” de Buchanan, Excel v 5.0 y Statgraphics. Se compararon los resultados y se escogió el de menor valor residual mínimo cuadrado (RMSE).

Una vez realizado el ajuste de los datos a la función escogida, se calculó la tasa específica de crecimiento (μ_{\max} o k), el tiempo de adaptación, el tiempo de generación, nivel de densidad máxima (y_{\max} o A) y el tiempo en alcanzar 10^6 ufc/g para calcular con posterioridad la posible vida media del producto.

Para confeccionar los modelos predictivos en función de la temperatura se representó la tasa específica de crecimiento frente a la temperatura según las ecuaciones de Arrhenius (McMeekin et al., 1993) y Ratkowsky et al., (1982).

La ecuación de Arrhenius se derivó a $\ln k = \ln A - (E_a/RT)$

donde k es la tasa específica de crecimiento, A es constante a las diferentes temperaturas, E_a es la energía de activación, R es la constante de los gases.

Si se representa $\ln k$ *versus* $1/T$ dará lugar a una recta donde la pendiente equivaldría a E_a/R

La ecuación de Ratkowsky et al., (1982) es un modelo especialmente adecuado para temperaturas bajas. Se representó la raíz cuadrada de la tasa específica de crecimiento (\sqrt{k}) frente a la temperatura para obtener la temperatura mínima (T_{\min}) para aplicar la ecuación:

$$\sqrt{k} = b \cdot (T - T_{\min})$$

donde:

k es la tasa específica de crecimiento

b es la pendiente

T es la temperatura considerada

T_{\min} es la temperatura mínima de crecimiento de ese microorganismo

1.5.1 Programa DModel (Baranyi y Roberts, 1994, Baranyi et al., 1993b y c)

DMDemo es un programa para ajustes de curvas y forma parte del sistema DModel creado en IFR (Institute of Food Research) para modelar crecimiento bacteriano, fruto también del proyecto FLAIR Concerted Action N° 5.

Se dispusieron los datos con el formato requerido por los autores, expresado en logaritmos decimales. Posee tres opciones para ajustar los datos: la primera es la función de Gompertz, la segunda es la función DModel/2 y la tercera es DModel/3.

La función recomendada por los autores es esta tercera.

Las ecuaciones que representan las distintas opciones fueron las siguientes:

Opción 1. Gompertz.

$$L(t) = A + C * e^{\left(-e^{(-B*(t-M))}\right)}$$

donde:

L(t)= logaritmo decimal del número de bacterias en el tiempo t (en horas)
{log₁₀ (ufc/ ml)}

A= número de bacterias (asíntota) cuando el tiempo disminuye indefinidamente (nivel inicial de bacterias o inóculo){log₁₀(ufc/ ml)}

C= cantidad de crecimiento (asintótico) que ocurre cuando el tiempo aumenta indefinidamente {log₁₀(ufc/ ml)}, o lo que es lo mismo la diferencia existente entre el número inicial y final de la fase estacionaria, expresada en logaritmos decimales

M= tiempo en el que el valor absoluto de crecimiento es máximo (horas), o tiempo del punto de inflexión.

B= Tasa relativa de crecimiento a M {log₁₀(ufc/ ml)/ horas}, o sea, la pendiente que indica la tasa de crecimiento en el punto de inflexión

Opción 2. DModel/2 (Baranyi et. al., 1993b y c).

$$y(t) = y_0 + m_{max} * A_n(t) - \frac{1}{m} * \ln \left(1 + \frac{e^{m_{max} * A_n(t)} - 1}{e^{y_{max} - y_0}} \right)$$

$$A_n(t) = \int_0^t \frac{s^n}{1+s^n} * ds = 1 * \left(\frac{t}{1} - B_n * \left(\frac{t}{1} \right) \right)$$

$$B_n(t) = \int_0^t \frac{1}{1+s^n} * ds$$

Donde:

$y(t) = \ln N$, donde N es ufc/g

y_0 = recuento ln de inicial de microorganismos

μ_{\max} = tasa específica de crecimiento máximo.

m = parámetro que caracteriza la curvatura entre la fase exponencial y la estacional cuyo valor preestablecido por el autor es 1.

y_{\max} = ln del recuento máximo de microorganismos alcanzado.

λ = es un parámetro relacionado con la función de ajuste de la forma del tiempo de adaptación.

s = variable de integración del tiempo

t = tiempo

n = parámetro que caracteriza la curvatura entre la fase de adaptación y la fase exponencial. Para un valor de $n = 4$, que es el preestablecido por el autor, se obtiene:

$$B_4(t) = \frac{1}{2 * \sqrt{2}} * \left(\frac{1}{2} * \ln \frac{t^2 + \sqrt{2} * t + 1}{t^2 - \sqrt{2} * t + 1} + g(t) \right)$$

Cuando m y n valen cero, la ecuación se corresponde con una regresión lineal.

Opción 3. DModel/3. (Baranyi y Roberts, 1994).

La función empleada fue la siguiente:

$$y(t) = y_0 + m_{\max} * A_n(t) - \frac{1}{m} * \ln \left(1 + \frac{e^{m * m_{\max} * A_n(t)} - 1}{e^{m * (y_{\max} - y_0)}} \right)$$

$$A(t) = t + \frac{\ln(e^{-m_{\max} * t} + e^{-h_0} - e^{-m_{\max} * t - h_0})}{m_{\max}}$$

Donde:

$$h_0 = p^2/\mu_{\max}$$

Los parámetros de curvatura prefijada son m y n iguales a 1 aunque el programa permite variarlos.

Los datos generados por cualquiera de las opciones se desvían a dos archivos, uno que contiene toda la información detallada y otro donde se reúnen todos los parámetros cuyos encabezados significan:

“curve”=	nombre del fichero donde se encuentran los datos
“nv”=	números de datos experimentales considerados
“ydatmin”=	valor mínimo de la curva expresado en logaritmos naturales
“tlas”=	último tiempo de la curva
“se(LN)”= RMSE=	error estándar de regresión expresado en logaritmos natural
“err”=	código de error estándar de regresión., tal que, =0 ajuste sin problemas =1 buen ajuste pero no alcanza la tolerancia fijada =2, 3 y 4 diferentes problemas matriciales y de ajuste
“modelcode”=	códigos según el modelo elegido, o sea, si el modelo incluye el cálculo de la asíntota superior o el tiempo de adaptación
“mumax”=	la tasa de crecimiento específica máxima
“p2”=	estimación del tiempo de adaptación en la opciones 1 y 2, y en el 3 es igual al producto entre mumax y h0.
“y0”=	asíntota inferior estimada expresada en logaritmo natural
“ymax”=	asíntota superior estimada expresada en logaritmos naturales

1.5.2 Programa Gomplamu de Cupper

Este programa facilita los parámetros de Gompertz, el tiempo de generación, la tasa exponencial de crecimiento, el tiempo de adaptación y el nivel de densidad máxima. La función de Gompertz fue reparametrizada de forma que :

$$L(0)=A+C*\exp(-\exp(B*M)),$$

$$L(\infty)=A+C,$$

$$La =M+(\exp*(1-\exp*(b-M))-1)/B$$

$Mu=B*C*Ln(10)/\exp(1)$, si $L(t)$ está expresado en logaritmos decimales.

Donde $L(0)$ es el recuento en logaritmos en el tiempo 0, $L(\infty)$ se refiere a la asíntota cuando el tiempo tiende a infinito, La es el tiempo de adaptación y Mu es la tasa específica de crecimiento.

1.5.3 Programa MFSmodel de Buchanan y Whiting versión 4.0 (Buchanan, 1991)

Este programa informático “MFS Pathogen Modeling Program” en su versión 4.0 fue facilitado gratuitamente por Buchanan, responsable de “Microbial Food Safety Research Unit”, grupo perteneciente al “United States Department of Agriculture (Unidad de Investigación en Seguridad Microbiana en Alimentos del Departamento de Agricultura de EE.UU.), autores de este programa. Confeccionado basándose en Lotus 1,2,3 y compilado con Baler que hace que trabaje independientemente de tener el programa Lotus, aunque este es necesario para sacar por impresión los gráficos. Los valores predictivos que provee están basados en modelos elaborados en sus propias investigaciones con microorganismos patógenos y utilizando la función de Gompertz junto a análisis de regresión no lineales.

El propósito es dar la oportunidad a los microbiólogos de alimentos de explorar como se ve afectado el crecimiento o supervivencia de los microorganismos patógenos al variar factores asociados con la composición del alimento o del medio de almacenamiento. No es posible introducir datos propios. Los microorganismos que incluye este software son : *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphilococcus aureus*, *Yersinia enterocolítica*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* O157:H7.

El uso que se le dio a este software en este trabajo fue obtener las predicciones generadas por él para *Listeria monocytogenes* a 5 °C y *Aeromonas hydrophila* a 5°C y 15 °C en medio anaerobio con 0.5 % de cloruro sódico, 0 % de nitrito sódico y pH 6.

El modelo de crecimiento está basado en la función de Gompertz:

$$L(t) = A + C * \exp * (- \exp * (-B * (T - M)))$$

Para el cálculo de el tiempo de generación, la tasa exponencial de crecimiento y el nivel de densidad máxima utiliza las fórmula descritas en la Revisión Bibliográfica.

Incluye un modelo de inactivación no térmica o de supervivencia, en el que se describen situaciones donde el microorganismo no crece sino que disminuye. El modelo se basa en el cálculo de el tiempo necesario para el descenso de cuatro logaritmos en el número de microorganismos (t_{D4}). Así se basa en la siguiente fórmula:

$$N = N_0 - \left(\frac{1}{D}\right) * (t - t_i)$$

donde

t_i es el periodo de adaptación

D es el tiempo necesario para que disminuya la población un logaritmo

N es el recuento expresado en log ufc/ ml

t es el tiempo

N_0 es la población inicial

$N=N_0$ cuando $t < t_i$

1.5.4 Curvas de inhibición celular

Para realizar el ajuste de las curvas donde se observó inhibición de células se utilizaron los Programas Excel y Statgraphics. También se le aplicó el DModel teniendo en cuenta que los resultados son reflejo de los valores reales.

Se aplicó el modelo lineal de inactivación descrito por Buchanan en su programa. Se calcularon los valores de D y T_1 de la siguiente forma :

$$N=N_0-(1/D)*(t-T_1)$$

donde

T_1 es el periodo de adaptación antes de comenzar a descender

D es el tiempo necesario para que el recuento descienda 1 logaritmo

N es el número de microorganismos en el tiempo $t > T_1$

t es el tiempo

N_0 es la población inicial

1.6 Determinación del período de vida comercial. Relación existente entre las alteraciones organolépticas y fisico-químicas con la presencia de bacterias alterantes y patógenas.

1.6.1 Determinación de vida media desde el punto de vista microbiológico

En la mayoría de los países se ha establecido como criterio que los productos listos para su consumo deben contener $< 10^6$ ufc/g, o ml, de mesófilos en el punto de consumo como así también que debe existir ausencia de gérmenes patógenos o sus toxinas que constituyan un riesgo para la salud (Notermans et al., 1993).

Se calculó el tiempo (t_s) que tardaría en alcanzar 10^6 ufc/g cada microorganismo alterante a partir de la ecuación de ajuste de las curvas. En el caso de los microorganismos patógenos inoculados se determinó el tiempo (t_s) en alcanzar 10^3 ufc/g para observar su comportamiento.

Se representó gráficamente la relación existente entre el logaritmo neperiano de t_s y la temperatura ($^{\circ}\text{K}$) (Singh, 1994), los cuales describen una relación lineal tal que:

$$t_s = t_0 * e^{-a*(T-T_0)}$$

donde

t_s es el tiempo de vida media

t_0 es el tiempo de vida media a la temperatura de referencia

T es la temperatura

T_0 es la temperatura de referencia

a es la pendiente

1.6.2 Determinación de la vida comercial

Se representaron gráficamente y de forma conjunta los valores obtenidos de la vida media microbiológica, sensorial y evolución de la concentración de los gases y pH, y se buscó establecer los criterios para determinar la vida útil del producto.

Se comprobó que los atributos sensoriales estuviesen correlacionados. Se fijó como 2 el valor de pérdida del atributo, así se determinó el fin de vida útil del alimento cuando la media de los atributos alcanzara el valor 2. King et al. (1986), establecieron en una escala hedónica de 1 a 9 para espárragos, el valor de 6 como el valor que determinaba la vida útil del producto, o sea, la mitad más uno de la graduación hedónica.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Evolución de la microflora natural en la ensalada almacenada en refrigeración (4°C)

Se estudió la presencia y evolución durante el tiempo de almacenamiento de bacterias acidolácticas, psicrotrofas, levaduras, mohos, coliformes totales y fecales y *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, clostridios sulfito reductores, *Aeromonas hydrophila*, enterococos, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica*.

1.1 Recuento, aislamiento e identificación de bacterias acidolácticas (BAL)

Los recuentos de bacterias acidolácticas partieron de aproximadamente $7 \cdot 10^2$ ufc/g en la ensalada almacenada a 4°C y ascendieron linealmente hasta el final del período de análisis donde alcanzaron $9.6 \cdot 10^5$ ufc/g (Tabla 1).

Las especies de bacterias acidolácticas más aisladas fueron *Leuconostoc mesenteroides* subespecie *dextranicum*, *Lactobacillus brevis* 3, *Lactobacillus casei pseudoplantarum*, *Lactobacillus brevis* 1, y *Lactobacillus plantarum*, también se aisló *Lactobacillus brevis* 2, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* subespecie *mesenteroides*, *Lactobacillus curvatus*, y *Streptococcus lactis* (Tabla 2).

1.2 Recuento, aislamiento e identificación de microorganismos aerobios psicrotrofos

El recuento observado en ensaladas mantenidas a 4 °C partió de $1.07 \cdot 10^5$ ufc/g y ascendió lentamente hasta alcanzar $1.48 \cdot 10^7$ ufc/g al final del periodo de observación (Tabla 3).

Las especies aisladas con mayor frecuencia fueron en primer lugar *Pseudomonas fluorescens* (19%) seguida de *Pseudomonas putrida* (8%), *Chromobacterium violaceum* (7%), *Acinetobacter anitratus* (5%), *Staphilococcus cohnii* (4%), *Enterobacter agglomerans* (3%), *Pasteurella urae*

Tabla 1. Evolución de los recuentos de bacterias acidolácticas en ensal

mantenidas a diferentes temperaturas de almacenamiento

Tiempo (horas)	4°C			10°C			15°C	
	Medias	D.T.	C.V. (%)	Medias	D.T.	C.V. (%)	Medias	D.T.
0	2,85	0,22	7,72	2,90	0,37	12,60	3,05	0,12
12	3,06	0,13	4,24	3,31	0,32	9,71	4,02	0,09
24	3,21	0,15	4,58	4,03	0,53	13,11	5,02	0,10
36	3,61	0,16	4,33	4,79	0,81	16,82	6,03	0,16
48	3,61	0,09	2,63	5,56	0,65	11,67	6,46	0,34
60	3,79	0,04	1,01	5,64	1,03	18,23	7,25	0,10
72	-	-	-	5,96	0,40	6,74	7,50	0,00
84	4,25	0,28	6,57	6,32	0,30	4,73	7,64	0,05
108	4,61	0,02	0,35	6,06	0,45	7,40	7,86	0,14
132	4,85	0,37	7,66	5,85	1,26	21,50	7,83	0,19
156	5,05	0,35	6,93	6,69	0,65	9,78	7,82	0,10
180	5,72	0,11	1,92	7,20	0,31	4,27	7,82	0,15
204	5,98	0,10	1,63	7,17	1,04	14,54	7,71	0,05

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 2. Especies identificadas de los aislamientos realizados de bacterias psicrotrofas, bac durante el almacenamiento de las ensaladas

Bacterias psicrotrofas		Bacterias acidolácticas	
<i>Enterobacter intermedium</i>	1%	<i>Lactobacillus curvatus</i>	
<i>Pasteurella haemolytic biotipo T</i>	1%	<i>Streptococcus lactis</i>	
<i>Pseudomonas spp.</i>	1%	<i>Lactobacillus brevis 2</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1%	<i>Lactobacillus fermentum</i>	
<i>Pseudomonas picketti biotipo 1</i>	1%	<i>Leuconostoc mesenteroides var. mesenteroides</i>	
<i>Pseudomonas putrefasciens</i>	1%	<i>Lactobacillus brevis 1</i>	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1%	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Salmenella cholerae suis</i>	1%	<i>Lactobacillus brevis 3</i>	
<i>Acinetobacter spp.</i>	3%	<i>Lactobacillus casei pseudoplarum</i>	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3%	<i>Leuconostoc mesenteroides var. dextranicum</i>	
<i>Pasteurella urae</i>	3%	N.I.	
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	3%		
<i>Pseudomonas maltophila</i>	3%		
<i>Staphylococcus cohnii</i>	4%		
<i>Acinetobacter anitratus</i>	5%		
<i>Chromobacterium violaceum</i>	7%		
<i>Pseudomonas putrida</i>	8%		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	19%		
N.I.	33%		

N.I., No identificados

Tabla 3. Evolución de los recuentos de bacterias psicrotrofas en ensaladas mantenidas a diferentes temperaturas de almacenamiento

Tiempo (horas)	4°C			10°C			15°C	
	Medias	D.T.	C.V. (%)	Medias	D.T.	C.V. (%)	Medias	D.T.
0	5,03	0,32	6,37	5,14	0,70	13,53	5,61	0,04
12	5,66	0,23	3,97	5,65	0,33	5,85	6,48	0,15
24	6,15	0,14	2,23	6,08	0,44	7,24	6,74	0,04
36	6,15	0,14	2,23	6,37	0,65	10,19	7,39	0,20
48	6,19	0,11	1,73	6,84	0,33	4,78	7,34	0,05
60	6,48	0,15	2,39	6,78	0,61	8,99	7,56	0,11
72	-	-	-	7,03	0,84	11,96	7,58	0,15
84	6,42	0,08	1,25	7,05	0,63	8,88	7,58	0,09
108	6,51	0,03	0,53	7,02	0,63	9,02	7,09	0,04
132	6,64	0,15	2,24	6,98	1,03	14,71	6,40	0,37
156	6,40	0,75	11,69	7,34	0,86	11,73	6,35	0,16
180	7,06	0,03	0,45	7,52	0,86	11,50	5,79	0,09
204	7,17	0,05	0,64	7,68	0,82	10,68	3,44	0,03

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

(3%), *Plesiomonas shigelloides* (3%), *Pseudomonas maltophila* (3%), *Enterobacter intermedium* (1%), *Pasteurella haemolytica* biotipo T (1%), *Pseudomonas aeruginosa* (1%), *Pseudomonas picketti* biotipo I (1%), *Pseudomonas putrefasciens* (1%), *Pseudomonas stutzeri* (1%), *Salmonella cholerae suis* (1%). También se aislaron otras especies del género *Acinetobacter* y *Pseudomonas* y algunas levaduras (Tabla 2).

1.3 Recuento, aislamiento e identificación de levaduras y mohos

No se aislaron mohos.

Los niveles de levaduras observados fueron muy bajos, no se detectaron hasta las 156 horas 10^3 ufc/g y se mantuvo hasta las 204 horas.

Las levaduras aisladas pertenecían según las pruebas bioquímicas de API AUX, a las especies del género *Trichosporon*, *Candida lambica*, *Candida valida*, *Geotrichum*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula glutinis* y *Torulopsis*. El más aislado fue *Trichosporon* (18% de los casos) seguido de *Candida lambica* (11%).

1.4 Recuento, aislamiento e identificación de *E. coli*. y coliformes totales y fecales

No se observó ningún tubo positivo para coliformes fecales ni *E. coli*. En cuanto a coliformes totales, estos ascendieron a partir de 1-2 logaritmos decimales hasta alcanzar 5.3 logaritmos a las 48 horas. Los coeficientes de variación hallados fueron algo elevados (42% al 91%) (Tabla 4).

Las especies aisladas fueron *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans* y *Vibrio fluvialis*.

1.5 Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes fue hallada en 14 muestras (25.93%) de un total de 54 muestras de ensalada pertenecientes a lotes diferentes, analizadas en diferentes tiempos de almacenamiento y todas fueron hemolíticas. Los aislamientos realizados fueron hechos en los siguientes tiempos en horas, entre paréntesis se detalla el número de muestras positivas: 0 (4), 36 (2), 60 (2), 132(4), 156(2) (Tabla 5).

Tabla 4. Recuentos de coliformes totales en ensaladas almacenadas a 4 °C

Tiempo (horas)	Medias	D.T.	C.V. %
0	1.85	0.10	5.42
12	1.44	1.31	91.19
24	2.74	0.62	22.59
36	4.57	1.03	22.51
48	5.30	1.50	28.30
60	5.30	1.40	26.41
72	5.30	1.35	25.47
108	0.72	0.17	23.75
132	4.63	3.50	75.64
156	4.79	3.14	65.55
180	5.22	2.67	51.19
204	1.31	0.88	67.07

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 5. Aislamientos de *Listeria monocytogenes* en ensaladas no inoculadas durante el almacenamiento a 4°C

Tiempo	N° muestras positivas	Total muestras	Frecuencias %
0	4	6	66.67
12	0	6	0.00
36	2	6	33.33
60	2	6	33.33
108	0	6	0.00
132	4	6	66.67
156	2	6	33.33
180	0	6	0.00
204	0	6	0.00
TOTAL	14	54	25.93

Las cepas aisladas fueron enviadas al Dpto. de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid y Centro de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitaria, Majadahonda, para su serotipificación, y resultaron pertenecientes al serotipo 3a y 3b.

1.6 Aislamiento e identificación de Salmonella

No se detectó *Salmonella* en ninguna de las muestras analizadas.

1.7 Recuento, aislamiento e identificación de clostridios sulfito reductores

Todos los tubos sembrados resultaron negativos.

1.8 Recuento, aislamiento e identificación de Aeromonas hydrophila

Se aisló en un caso *Aeromonas hydrophila* a las 72 horas de almacenamiento y *Aeromonas caviae* a las 120 horas.

1.9 Recuento, aislamiento e identificación de enterococos

No se aislaron enterococos en ninguna muestra.

1.10 Recuento, aislamiento e identificación de Staphylococcus aureus

No se detectó su presencia en ninguna muestra.

1.11 Recuento, aislamiento e identificación de Yersinia enterocolítica

Con el sistema Pasco se identificó en un caso *Yersinia enterocolítica* y en otro *Yersinia intermedia*.

2. Comportamiento y monitorización de bacteria acidolácticas y psicrotrofas en ensaladas envasadas con atmósfera modificada durante su almacenamiento a diferentes temperaturas

2.1 Bacterias acidolácticas

Se estudiaron muestras almacenadas a 10°C y 15°C, en las que el recuento inicial de bacterias acidolácticas en todas ellas fue de aproximadamente 10^3 ufc/g. Se observó que las bacterias acidolácticas aumentaron su número más rápidamente en las muestras almacenadas a 15°C y el crecimiento bacteriano disminuyó a medida que descendió la temperatura de almacenamiento.

En las ensaladas almacenadas a 10°C el recuento aumentó más rápidamente que a los 4°C hasta alcanzar 10^6 ufc/g a las 84 horas para luego mantenerse entre los logaritmos 6 y 7 hasta el final del período de observación.

En las ensaladas almacenadas a 15°C los recuentos aumentaron hasta alcanzar las $1.81 \cdot 10^7$ ufc/g a las 60 horas y a partir de aquí se conservó aproximadamente el nivel de recuento hasta las 204 horas.

Se realizó un análisis de varianza de dos factores, tiempo y temperatura, observando diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) (Anexo I, Tabla 1).

Se compararon los recuentos realizados en lotes confeccionados en diferentes épocas del año, enero, mayo y octubre, mediante un análisis de varianza de dos factores teniendo en cuenta como covariante el tiempo y la temperatura, y se detectó que existía una diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$) (Anexo 1, Tabla 2). Para mayor exactitud se realizó un análisis de varianza para conocer cual mes era el diferente, y se observó que a 4 °C el mes de mayo difería significativamente del resto ($p < 0.0001$) (Anexo I, Tabla 3).

2.2 Bacterias psicrotrofas

Las bacterias psicrotrofas ascienden en número desde aproximadamente $1.33\text{--}4.1 \cdot 10^5$ ufc/g hasta $4.79 \cdot 10^7$ ufc/g en las mantenidas a 10°C. En ensaladas almacenadas a 15°C los recuentos aumentaron hasta llegar a $2.65 \cdot 10^7$ ufc/g a las 36 horas, se mantuvieron a este nivel hasta las 84 horas aproximadamente, para luego descender a las 204 horas llegando a $2.75 \cdot 10^3$ ufc/g (Tabla 3).

Se realizó un análisis de varianza de dos factores, tiempo y temperatura, observando diferencias altamente significativas para el factor temperatura ($p < 0.005$) y para el tiempo ($p < 0.0001$) (Anexo I, Tabla 4)

Igualmente se compararon los recuentos realizados en lotes confeccionados en diferentes épocas del año, enero, mayo y octubre, mediante análisis de varianza de dos factores teniendo en cuenta como covariante el tiempo y la temperatura, y se detectó diferencia significativa ($p < 0.0001$) (Anexo I, Tabla 5). Para mayor exactitud se realizó un análisis de varianza para conocer el mes diferente, y se observó que a 4°C el mes de mayo difería significativamente del resto ($p < 0.0001$) (Anexo I, Tabla 6).

3. Comportamiento y monitorización de los microorganismos inoculados en condiciones de refrigeración y envasado

Con el fin de estudiar el efecto alterativo de las bacterias acidolácticas y psicrotrofas se estudió el comportamiento de *Leuconostoc mesenteroides* como representante de bacterias acidolácticas y *Pseudomonas fluorescens* como representante de bacterias psicrotrofas. Como bacterias patógenas se escogió *Aeromonas hydrophila* y *Listeria monocytogenes*.

3.1 *Pseudomonas fluorescens*

Las ensaladas inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* almacenadas a 4°C y a 15°C, partieron con un recuento inicial de aproximadamente un logaritmo decimal de 9, debido a la suma del inóculo más la flora natural de la ensalada. En el almacenamiento a ambas temperaturas los recuentos descendieron y en aquellas almacenadas a 4°C al alcanzar las 84 horas aparentaron estabilizarse alrededor de 10^6 ufc/g hasta el final del período de experimentación. En las ensaladas almacenadas a 15°C los recuentos descienden hasta las 108 horas, donde alcanzaron $1.6 \cdot 10^5$ ufc/g. A partir de esta hora los cultivos a 15°C fueron negativos (Tabla 6).

En las ensaladas control a 4°C el recuento de *Pseudomonas fluorescens* coincide con las psicrotrofas aproximadamente hasta las 48 horas y luego continua un ligero descenso. En las de 15°C coincide con las psicrotrofas las primeras 36 horas a partir del cual desciende su número rápidamente para dejar de detectarse a las 184 horas.

Tabla 6. Evolución de los recuentos de *Pseudomonas fluorescens* inoculado en ensaladas durante su almacenamiento a 4 °C y 15 °C

Tiempo (horas)	4°C			15°C		
	Medias	D.T.	C.V. (%)	Medias	D.T.	C.V. (%)
12	8.82	0.16	1.86	9.55	0.05	0.48
24	7.76	0.05	0.7	7.66	0.06	0.76
36	7.25	0.05	0.66	6.77	0.22	3.19
48	6.94	0.27	3.9	6.43	0.08	1.20
60	6.62	0.43	6.48	6.20	0.35	5.64
84	5.91	0.10	1.63	5.54	0.20	3.63
108	5.93	0.07	1.22	5.19	0.13	2.53
132	5.36	0.09	1.7	< 2	-	-
156	5.36	0.17	3.16	< 2	-	-
180	5.64	0.22	3.84	< 2	-	-
204	5.84	0.10	1.77	< 2	-	-

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

En el análisis de varianza quitándole el efecto del tiempo (covariante) fue significativa la diferencia entre el recuento a las diferentes temperaturas y entre las ensaladas controles-inoculadas (Anexo I, Tabla 7).

La curva que representa la evolución de las bacterias psicrotrofas en ensaladas almacenadas a 4°C mostró un crecimiento suave y continuo durante todo el período de observación (204 horas) mientras que cuando la temperatura de almacenamiento fue de 15°C se observó una curva de crecimiento sostenido hasta las 84 horas en que los recuentos fueron disminuyendo hasta el final del período de observación cuando los cultivos aún eran positivos pero apenas sobrepasaban las mil células por gramo.

Los recuentos de bacterias psicrotrofas y *Pseudomonas* en las ensaladas denotan diferencias significativas entre ellas (tipo) (Anexo I, Tabla 8).

3.2 *Leuconostoc mesenteroides*

Se estudió su evolución a dos temperatura, 4°C y 15°C. En las ensaladas inoculadas con *Leuconostoc mesenteroides* almacenadas a 4°C, su evolución partió del inóculo inicial de 10^3 ufc/g, aumentó su número hasta alcanzar $3.5 \cdot 10^5$ ufc/g a las 36 horas y se mantuvo hasta el final del experimento.

En las ensaladas almacenadas a 15°C la evolución fue similar a la de 4°C solo que se mantuvo alrededor de logaritmo decimal 7 (Tabla 7).

El análisis de varianza demostró la diferencia altamente significativa entre la evolución a 4°C y a 15°C (Anexo I, Tabla 9), como así también entre los inoculados y los controles (Anexo I, Tabla 10).

A 4°C la evolución del *Leuconostoc mesenteroides* describe una curva con mayor aumento del nivel de células que las bacterias acidolácticas para luego estabilizarse a las 36 horas alrededor de $5.5 \cdot 10^5$ ufc/g, en cambio las bacterias acidolácticas parecen describir una evolución ascendente lineal, alcanzando ambos el mismo nivel final a las 204 horas ligeramente por debajo del logaritmo 6. A 15 °C la evolución de bacterias acidolácticas y *Leuconostoc mesenteroides* es similar.

El análisis de varianza comparando la evolución conjunta de bacterias acidolácticas y *Leuconostoc mesenteroides* dió una diferencia significativa (Anexo I, Tabla 11)

Tabla 7. Evolución de los recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* en ensaladas durante su almacenamiento a 4° y 15°C

Tiempo (horas)	4°C			15°C		
	Medias	D.T.	C.V. (%)	Medias	D.T.	C.V. (%)
0	3.27	0.10	3.05	3.27	0.10	3.05
12	4.48	0.36	7.96	5.21	0.11	2.11
24	5.00	0.15	3.00	5.82	0.17	2.87
36	5.37	0.28	5.13	7.20	0.33	4.56
48	5.54	0.05	0.89	7.05	0.20	2.78
60	5.45	0.10	1.90	6.52	0.72	11.03
84	5.50	0.30	5.49	7.06	0.07	1.07
108	5.41	0.10	1.85	7.18	0.09	1.22
132	5.83	0.04	0.65	7.05	0.41	5.76
156	5.45	0.24	4.46	7.21	0.29	4.00
180	5.48	0.15	2.77	7.17	0.34	4.75
204	5.84	0.07	1.19	6.90	0.36	5.20

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

3.3 *Listeria monocytogenes*

Las muestras fueron inoculadas como se describe en el capítulo de Métodos y almacenadas a 4°C.

La evolución que se observó fue prácticamente de mantenimiento del nivel de inoculación, 10^3 ufc/g, el que ascendió ligeramente hasta alcanzar 10^4 ufc/g a las 300 horas, utilizando la técnica de recuento directo con medio Oxford (Figura 6 y Tabla 8).

Se utilizaron dos técnicas de recuento directo. Se observó que la técnica del NMP con medio líquido Fraser detectó en todo momento por lo menos un logaritmo menos de *Listeria monocytogenes* que en el medio Oxford (Figura 6). Se realizó un análisis de varianza de dos factores, medio utilizado y tiempo, se obtuvo diferencia altamente significativa en el medio ($p < 0.0001$) y significativa en el tiempo ($p < 0.05$). (Anexo I, Tabla 12).

Entre las muestras no inoculadas hubo 7 casos de aislamiento de *Listeria monocytogenes* por el método de doble enriquecimiento. Estas cepas pertenecían al serotipo 3a y 3b.

3.4 *Aeromonas hydrophila*

Las muestras fueron almacenadas a dos temperaturas, 4° y 15°C. Los recuentos realizados en ensaladas almacenadas a 4°C oscilaron durante todo el tiempo de experimentación entre el logaritmo 3 y 4, en cambio, en aquellas almacenadas a 15°C los recuentos aumentaron desde el nivel de inoculación, aproximadamente 10^3 ufc/g, hasta alcanzar a las 24 horas $7.7 \cdot 10^7$ ufc/g y en este punto descendieron bruscamente hasta hacerse negativos a las 156 horas (Tabla 9). Se realizó un análisis de varianza quitándole el efecto del tiempo y la diferencia entre temperaturas fue altamente significativa. (Véase Anexo I, Tabla 13). No se detectó *Aeromonas hydrophila* en las ensaladas almacenadas como controles, ni a 4 ni a 15°C.

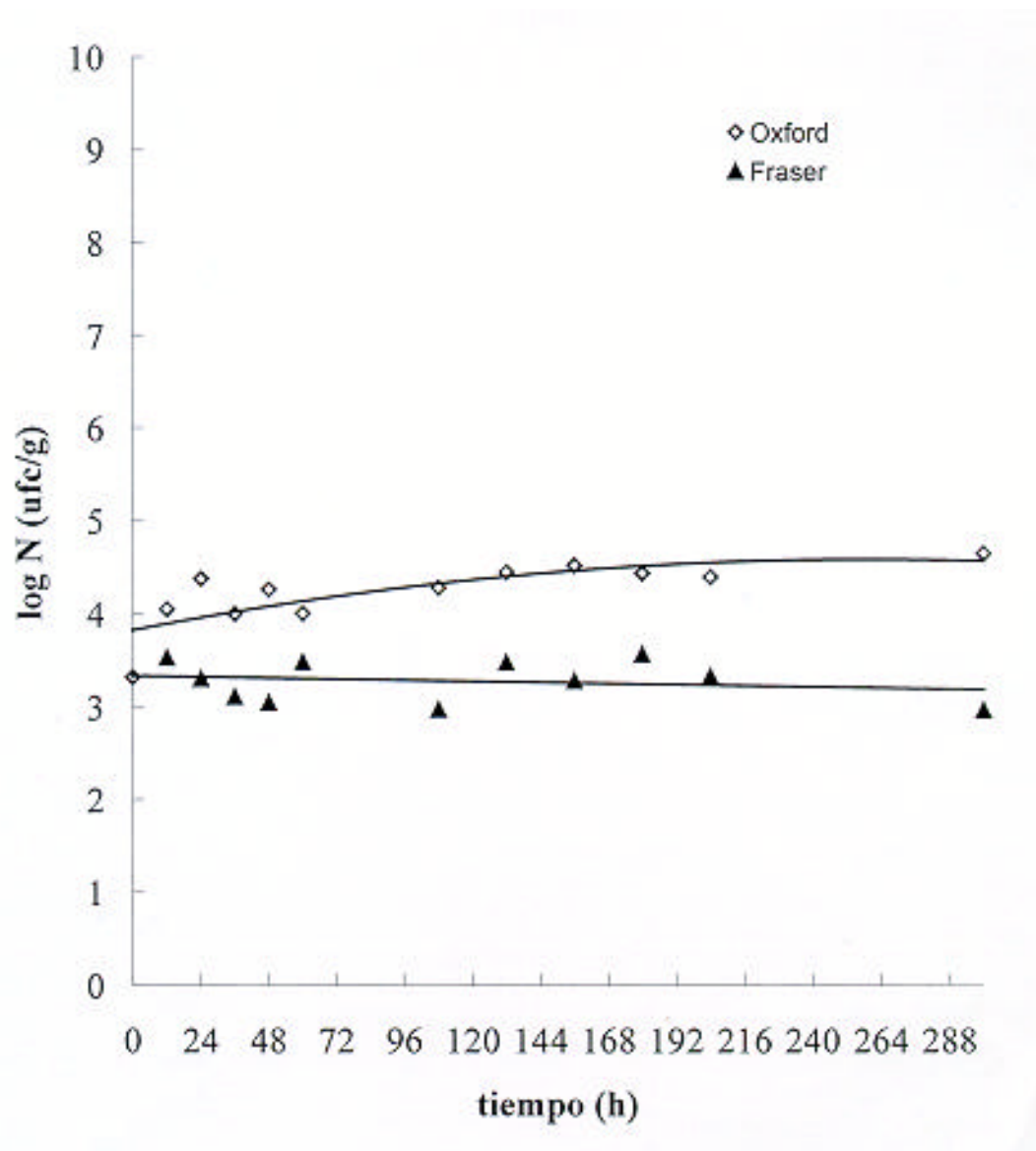


Figura 6. Comparación del recuento de *Listeria monocytogenes* en los medios Oxford y Fraser durante el almacenamiento de ensaladas

Tabla 8. Evolución de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en ensaladas almacenadas a 4 °C enumerado en medio Oxford

Tiempo (horas)	Media	D.T.	C.V. (%)
0	3.22	0.42	13.18
12	3.94	0.35	8.83
24	4.37	0.04	1.02
36	3.80	0.52	13.69
48	4.25	0.07	1.66
60	3.89	0.39	9.98
108	4.18	0.33	7.99
132	4.41	0.17	3.79
156	4.43	0.28	6.23
180	4.41	0.12	2.77
204	4.11	0.58	14.03
300	4.27	0.60	14.01

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 9. Evolución de los recuentos de *Aeromonas hydrophila* en ensaladas durante su almacenamiento a 4 °C y 15 °C

Tiempo (horas)	4 °C			15 °C		
	Medias	D.T.	C.V. (%)	Medias	D.T.	C.V. (%)
0	2.85	0.48	16.73	2.99	0.48	16.73
12	2.62	1.74	66.46	6.64	0.08	1.16
24	2.50	1.60	64.14	7.89	0.55	7.18
36	2.23	1.36	60.98	7.39	0.10	1.38
48	2.54	1.65	64.89	7.00	0.15	2.14
60	2.45	1.56	63.4	5.97	0.30	5.03
84	2.43	1.54	63.28	5.07	0.78	16.66
108	2.95	1.12	37.81	4.54	0.45	10.29
132	3.52	0.50	14.2	3.88	1.74	93.05
156	3.12	0.55	17.52	< 2	-	-
180	3.31	0.74	22.47	< 2	-	-
204	2.93	1.23	42.09	< 2	-	-

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

4. Determinación de los parámetros fisicoquímicos y organolépticos durante el almacenamiento de ensaladas envasadas con atmósfera modificada

4.1 Concentración de gases en el interior del envase durante el almacenamiento a diferentes temperaturas

La evolución de los gases fue muy diferente en las muestras almacenadas a distintas temperaturas. La Figura 7 presenta la evolución del dióxido de carbono y el oxígeno a 4°C, 10°C y 15°C.

Las muestras almacenadas a 4°C son las que alcanzan menos concentración de CO₂ y su evolución parece lineal. Partió de la concentración atmosférica al ser envasada, 0% de CO₂ y 20.9% de O₂ aproximadamente, y ya en el primer punto de muestreo, el tiempo 0 del experimento, la concentración gaseosa había variado a 9% de CO₂ y 10% de O₂ y alcanzó al final del período de experimentación un 28 % de CO₂. (Figura 7, y Anexo I, Tabla 14).

A 10°C, si bien la concentración inicial era la misma, el CO₂ describió una línea ligeramente curva ascendente hasta llegar a 43% (Figura 7, y Anexo I, Tabla 15).

En las muestras almacenadas a 15°C es donde se alcanzaron las mayores concentraciones de CO₂. La evolución describió una curva polinómica que a las 204 horas de observación alcanzó cerca del 61% (Figura 7, y Anexo I, Tabla 16).

El oxígeno dejó de detectarse a las 60 horas, en las muestras almacenadas a 4°C, a las 48 horas en las de 10°C, y a las 36 horas en las almacenadas a 15°C (Anexo I, Tablas 14 al 16).

En las muestras almacenadas a 15°C se observa que los recuentos de bacterias psicrotrofas comenzaron a disminuir cuando la concentración de CO₂ alcanzó el 52.67% (Tabla 3 y Anexo I, Tabla 16). En las primeras horas del almacenamiento de estas muestras, y al llegar a las 72 horas se estabilizó el número de bacterias acidolácticas, momento en que la concentración de CO₂ era aproximadamente de 52% (Tabla 1 y Anexo I, Tabla 16).

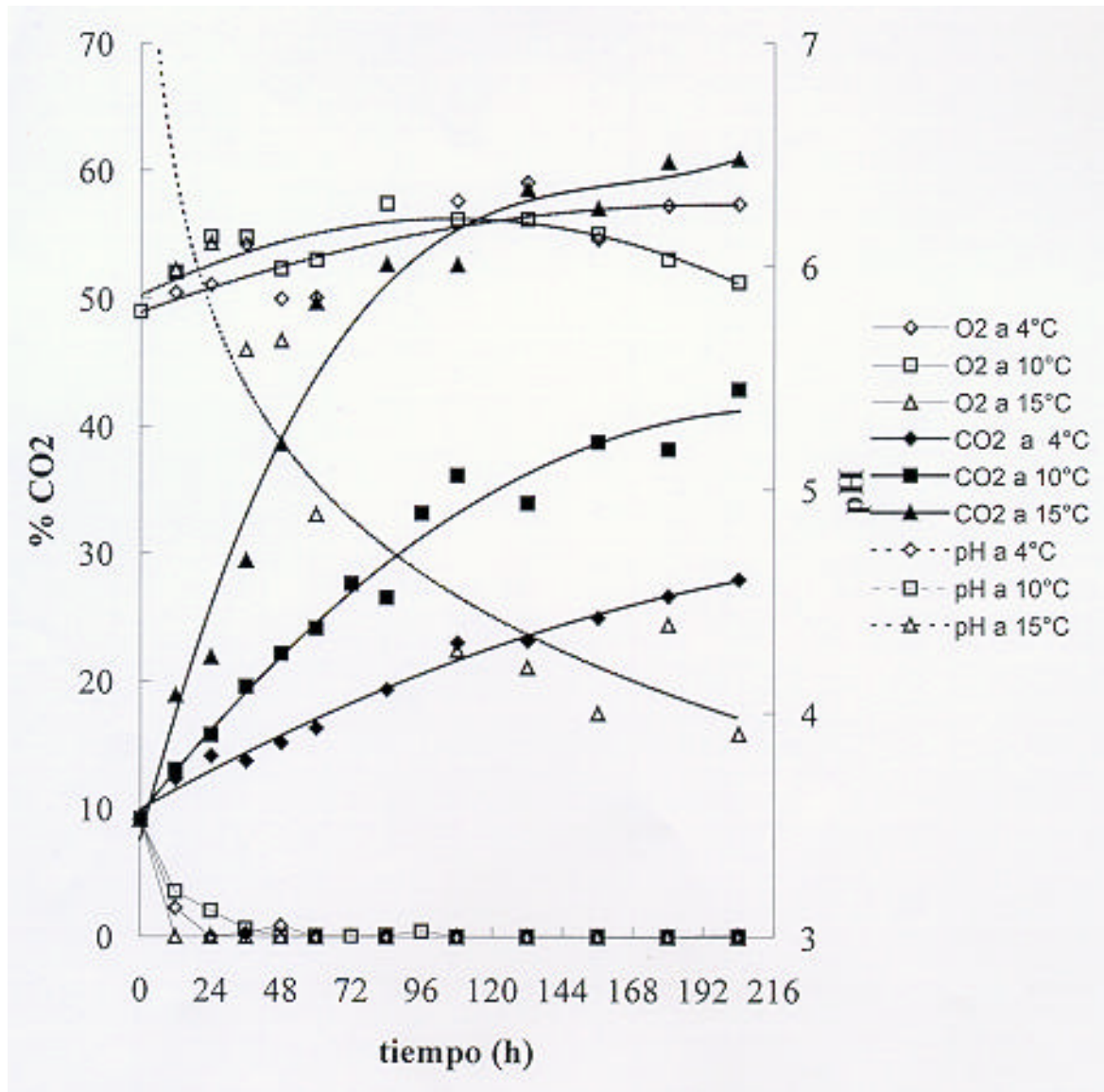


Figura 7. Evolución del PH y de las concentraciones de gases en ensaladas almacenadas a diferentes temperaturas

Se observó la estabilización de los recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* cuando el CO₂ sobrepasó el 50% en las muestras almacenadas a 4°C y 15 °C (Anexo I, Tabla 17).

En las muestras almacenadas a 4 °C y 15 °C se observó un descenso de los recuentos de *Pseudomonas fluorescens* desde el comienzo del experimento, sin embargo a 15°C sufrió un brusco descenso y dejó de detectarse a las 132 horas lo que coincidió con un 56% de CO₂ (Anexo I, Tabla 18).

La evolución de la concentración de los gases no inhibió el desarrollo de *Listeria monocytogenes*.

Los recuentos de *Aeromonas hydrophila* en muestras almacenadas a 4°C se mantienen en la concentración inicial y apenas crecen, alcanzando al final del período de experimentación 33 % de CO₂ y ausencia de oxígeno. Sin embargo, en las muestras almacenadas a 15°C, se observa su inhibición cuando el CO₂ alcanza el 23.13 % (24 horas) y a las 12 horas ya no se detecta oxígeno (Anexo I, Tabla 19).

Las diferencias halladas entre la evolución gaseosa de las muestras inoculadas y controles, y a diferentes temperaturas, y fueron altamente significativas ($p < 0.0001$) (Anexo I, Tablas 20 y 21). Sin embargo no se detectaron diferencias significativas entre las muestras inoculadas con diferentes microorganismos .

4.2 Evolución del pH en los envases durante el almacenamiento a diferentes temperaturas

El pH se mantuvo constante en las muestras almacenadas a 4 y 10°C alrededor de 6, en cambio se observó un descenso a 15°C ya a las 12 horas con valores de pH de 4 (Anexo I, Tabla 22). Mediante análisis de varianza se comprobó la diferencia significativa entre las temperaturas (Anexo I. Tabla 23).

En la Figura 7 se puede observar la relación entre CO₂, O₂ y pH a diferentes temperaturas.

4.3 Características organolépticas

Durante el almacenamiento de las ensaladas a diferentes temperaturas se observó las características del aspecto en general, el color, si presentaban

pardeamiento en la superficie de corte, textura e hinchazón de la bolsa como se describe en Métodos.

En general, se aprecia gran diferencia de apariencia entre las ensaladas almacenadas a 4°C y a 15°C (Anexo I, Tabla 24). El análisis de varianza no paramétrico por el método de Kruskal-Wallis confirmó diferencias significativas. A 4°C apenas disminuye un poco la apariencia de muy buena a buena a las 60 horas, en cambio en las almacenadas a 15°C en ese mismo tiempo ya pasa a un aspecto general malo. En cuanto al verdor a las 108 horas empieza a ser pálido a 4°C, y las 60 horas a 15°C. Se observa poco pardeamiento en los cortes en general. En las de 15°C se observa ablandamiento de las hojas a las 84 horas pero no aparece en las de 4°C. A las 84 horas a 15°C la hinchazón de la bolsa es muy manifiesta, en cambio a 4°C se observa hinchada a las 180 horas.

Si comparamos, mediante análisis de varianza por Kruskal-Wallis, aquellas que estaban inoculadas y las no inoculadas no se detectaron diferencias significativas.

En las Figuras 8 y 9 se puede observar la evolución de las características a las dos temperaturas. Se observa que los atributos evolucionan paralelamente, lo que se comprueba al realizar un test de coeficientes por rangos ($p < 0.0001$) (Anexo I, Tabla 25). Se calcularon las medias de los valores de los atributos para el estudio de su evolución en el tiempo.

5. Aplicación de modelos predictivos

5.1 Modelos de crecimiento bacteriano

5.1.1 Programa Dmodel (Baranyi y Roberts, 1994, Baranyi et al., 1993) :

Se aplicó el programa DModel a todas las curvas de crecimiento y muerte que fueron denominadas de la siguiente forma: para bacterias psicrotrofas a 4°C, “PSI04”, a 10°C “PSI10”, y a 15°C “PSI15”, para bacterias acidolácticas a 4°C “LAB04”, a 10°C “LAB10”, y “LAB15” a 15°C, para *Aeromonas hydrophila* a 4°C “AER04”, y a 15°C, “AER15”, para *Leuconostoc mesenteroides* inoculado a 4°C, “LEU04”, y a 15°C, “LEU15”, para

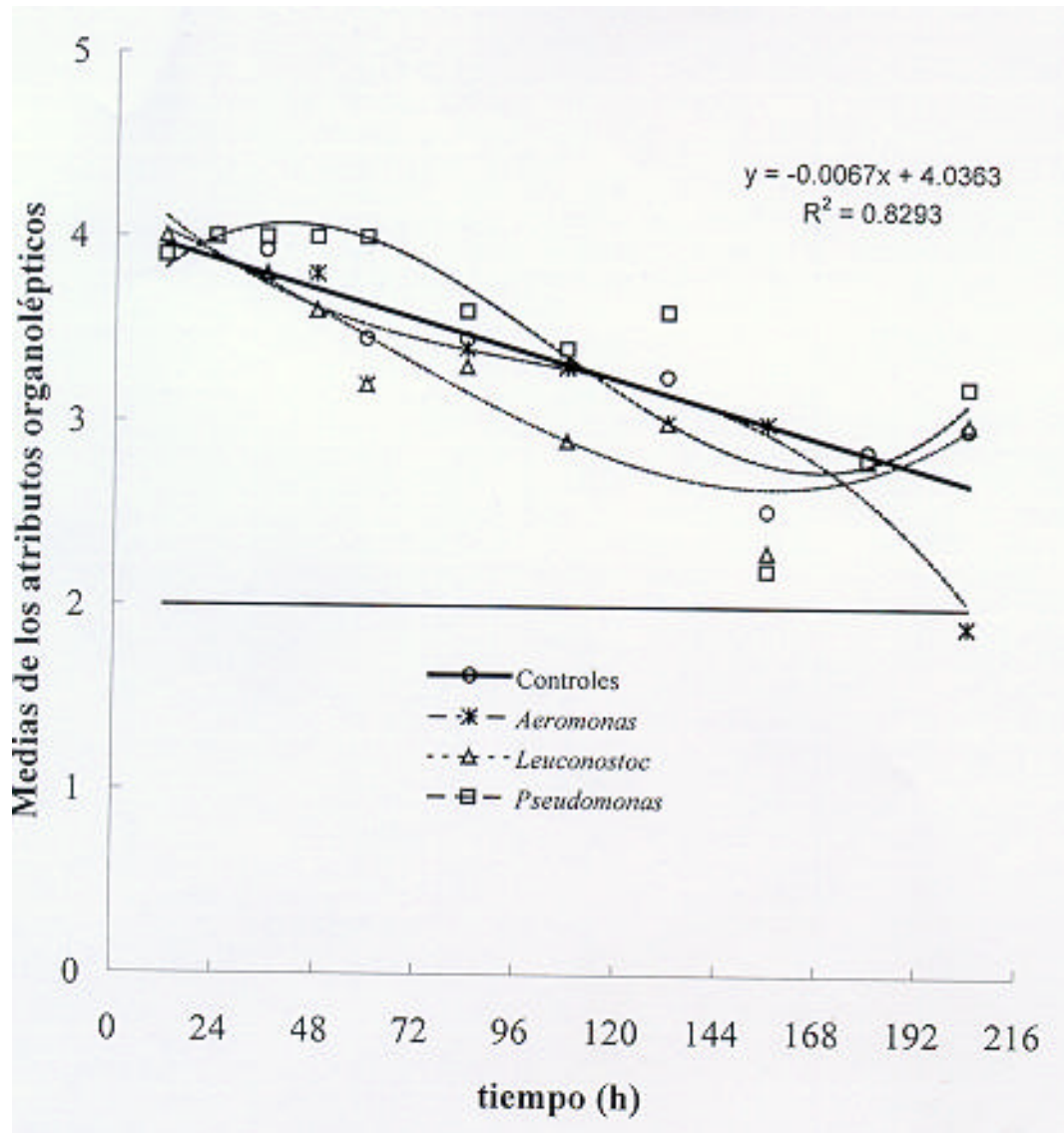


Figura 8. Evolución de las características sensoriales de las ensaladas inoculadas y no inoculadas almacenadas a 4° C

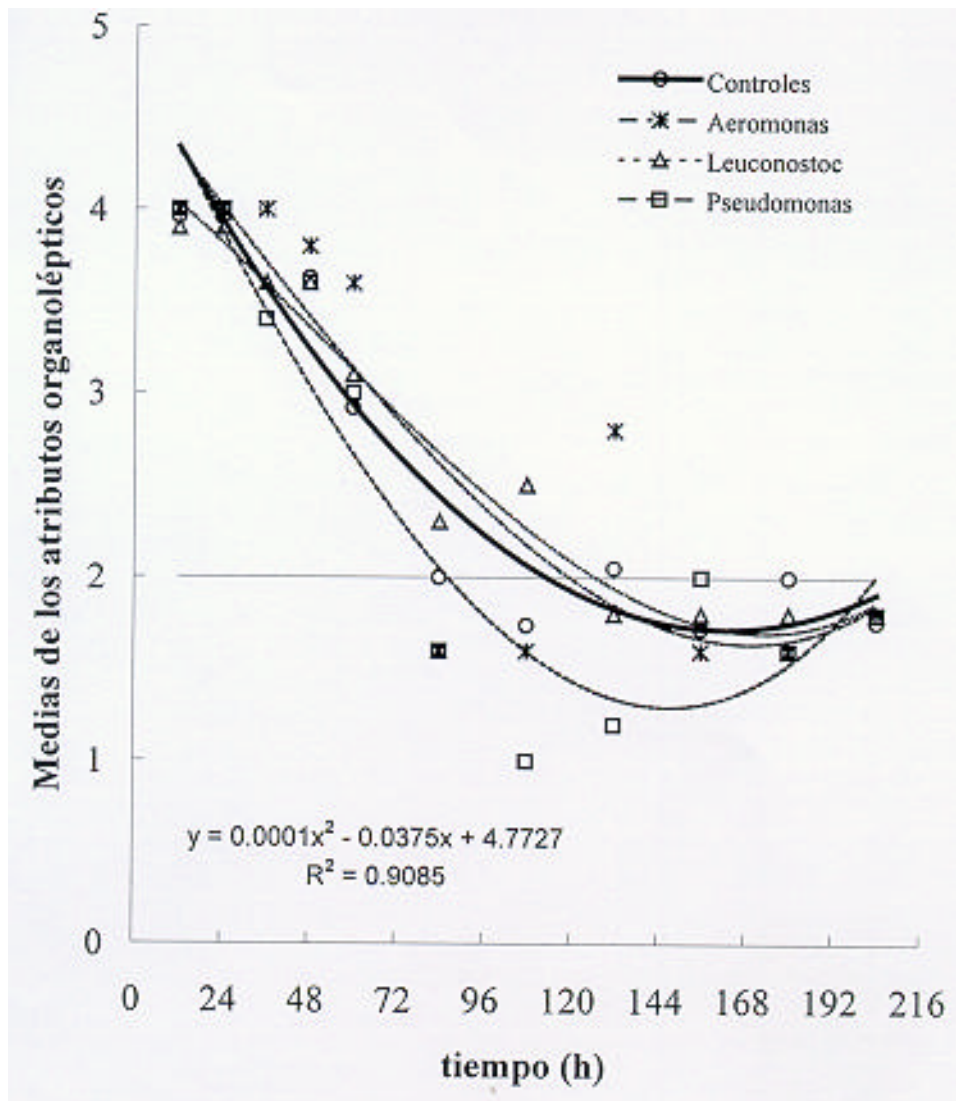


Figura 9. Evolución de las características sensoriales de las ensaladas inoculadas y no inoculadas almacenadas a 15° C

Leuconostoc mesenteroides no inoculado a 4°C, “LEU4CON”, y a 15°C, “LEU15CON”, para *Pseudomonas fluorescens* inoculadas a 4°C “PSE04”, y a 15°C, “PSE 15”, para *Pseudomonas fluorescens* no inoculado a 4°C, “PSE4CON”, y a 15°C, “PSE15CON”, y finalmente para *Listeria monocytogenes* “LIS04” (Tabla 10).

Los parámetros de curvatura “n” y “m” se fijaron en la forma expresada en el Tabla 11:

Tabla 11. Valores de los parámetros de curvatura “n” y “m” fijados para el Programa DModel

Microorganismos	T°C	n	m
Bacterias psicrotrofas	4	0	1
	10	0	1
	15	0	1
Bacterias acidolácticas	4	0	0
	10	1	1
	15	0	1
<i>Leuconostoc</i> (no inoculado)	4	0	0
	15	0	0
<i>Leuconostoc</i> (inoculado)	4	0	1
	15	0	1
<i>Pseudomonas</i> (no inoculado)	4	1	1
	15	1	1
<i>Pseudomonas</i> (inoculado)	4	1	1
	15	1	1
<i>Aeromonas</i> (inoculado)	4	0	0
	15	1	1
<i>Listeria</i> (inoculado)	4	0	0

Los parámetros calculados de las curvas de crecimiento se resumen en la Tabla 3. Las Tablas 26 a 54 del Anexo I y las Figuras 1 a 8 del Anexo II describen los valores predictivos y el ajuste de las curvas de crecimiento predictivo para los microorganismos estudiados.

5.1.2 Programa “Gomplamu” de Cupper (1993)

Este programa informático permite el ajuste de los datos a la función de Gompertz. Los resultados obtenidos son iguales entre este y el programa DModel

Tabla 10 . Parámetros de crecimiento obtenidos por el programa DModel

curve	nv	ydatmin	tlast	ydatmax	se(LN)	err	modelcode	mumax	se(mumax)	p2	se(p2)	y0	se(y0)	ymax	se(ymax)
PSI04	12	11,58	204	16,50	0,64	0	31000	0,061	0,02	0	0	12,13	0,50	15,47	0,28
PSI10	13	11,10	204	18,68	0,68	0	31000	0,090	0,02	0	0	12,07	0,51	17,74	0,29
PSI15	8	12,92	84	17,45	0,30	0	31000	0,124	0,02	0	0	13,10	0,27	17,39	0,17
LAB04	12	6,56	204	13,76	0,23	0	30000	0,035	0,00	0	0	6,69	0,11	999	0,00
LAB10	10	6,03	132	15,53	0,57	0	31010	0,176	0,03	1,25	1,21	6,02	0,56	14,75	0,29
LAB15	13	7,03	204	18,09	0,33	0	31000	0,167	0,01	0	0	7,31	0,25	17,84	0,13
AER04	12	5,13	204	8,10	0,71	0	30000	0,009	0,00	0	0	5,65	0,34	999	0,00
LEU04	12	7,54	204	13,45	0,40	0	31000	0,183	0,03	0	0	7,76	0,37	12,78	0,14
LEU15	12	7,54	204	16,60	0,65	0	31000	0,266	0,04	0	0	7,91	0,59	16,21	0,22
LEU4CON	11	8,76	192	11,68	0,28	0	31000	0,207	0,05	0	0	8,75	0,28	11,35	0,10
LEU15CON	11	6,86	192	16,28	0,68	0	31000	0,281	0,04	0	0	7,49	0,63	15,58	0,25
LIS04	12	7,42	300	9,56	0,54	0	30000	0,003	0,00	0	0	8,40	0,24	999	0,00

“curve”= nombre del fichero donde se encuentran los datos;

“nv”= números de datos experimentales considerados;

“ydatmin”= valor mínimo de la curva expresados en logaritmos naturales

“tlast”= último tiempo de la curva

“se(LN)”= RMSE= error estandar de regresión expresado en logaritmos natural

“err”= código de error estandar de regresión

“modelcode”= códigos según el modelo elegido

“mumax”= la tasa de crecimiento específica máxima

“p2”= estimación del tiempo de adaptación

“y₀” e “y_{max}”= asíntota inferior y superior estimada, respectivamente, expresada en logaritmo natural

en la opción 1, pero este tiene el inconveniente de tener que darle los valores iniciales de partida de los parámetros.

5.1.3 Programa MFSmodel (Whiting y Buchanan, 1994)

El Programa solo permite optar por una serie de parámetros fijados por él. Los datos obtenidos para *Listeria monocytogenes* se obtuvieron fijando los parámetros de temperatura a 4°C, medio anaerobio, sin sal y sin nitritos, con un nivel de inoculación de $1.66 \cdot 10^3$ ufc/ml. Para *Aeromonas hydrophila* se obtuvieron fijando los parámetros de temperatura a 4°C y luego a 15°C, medio anaerobio, sin sal y sin nitritos, con un nivel de inoculación de 676 ufc/ml.

Se obtuvieron los valores de los parámetros de la función de Gompertz en la Tabla 12 y que se representan en las Figuras 10 y 11.

Aplicando el modelo de inhibición que contiene el programa para *Listeria monocytogenes* con las condiciones de crecimiento anaerobio, 0.5% cloruro sódico (no admite menos), 0% de nitrito sódico, pH de 6, se obtuvo que tardaría más de 92 días en disminuir 4 logaritmos.

5.2 Curvas de inhibición y muerte celular

La evolución de *Aeromonas hydrophila* a 15°C y la *Pseudomonas fluorescens* describen curvas de muerte en vez de crecimiento. Esto hace que no puedan ser modeladas de igual forma que los restantes microorganismos.

La función empleada por DModel da un buen ajuste a los puntos, sin embargo los parámetros calculados no todos tienen sentido. Solo escogeremos el valor de la tasa específica de crecimiento máxima para calcular los valores de T_1 (tiempo de adaptación) y D, tiempo en disminuir un logaritmo decimal (Tabla 13).

Se realizó otro ajuste aproximado utilizando rectas de regresión, a partir de los cuales se calcularon los parámetros de tiempo de adaptación o resistencia previa a la inhibición (T_1), el valor D (Tabla 13) y se corroboró la ecuación de la curva de inhibición descrita en Métodos obteniendo los siguientes resultados:

Aeromonas hydrophila inoculadas almacenadas a 15°C, para los tiempos comprendidos entre 12 y 120 horas:

$$\log N = t \cdot -0.038 + 8.1831 \quad r^2 = 0.97$$

Tabla 12. Valores de los parámetros de la función de Gompertz obtenidos por el Programa MFSmodel en condiciones anaerobias para microorganismos patógenos

Microorganismos	A	C	B	M	EGR	GT	LPD	MPD
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,22	6,12	0,0157	119,79	0,033	9,2	56,3	9,3
<i>Aeromonas hydrophila</i> a 4°C	2,85	7,34	0,0153	124,38	0,037	8,1	59	10,2
<i>Aeromonas hydrophila</i> a 15°C	2,85	7,34	0,0732	27,72	0,177	1,7	14,1	10,2

A, C, M, y B son coeficientes de la función

EGR = tasa de crecimiento exponencial

(no inoculado) a 4°C

LPD = densidad mínima de la población

MPD = densidad máxima de la población

(no inoculado) a 15°C

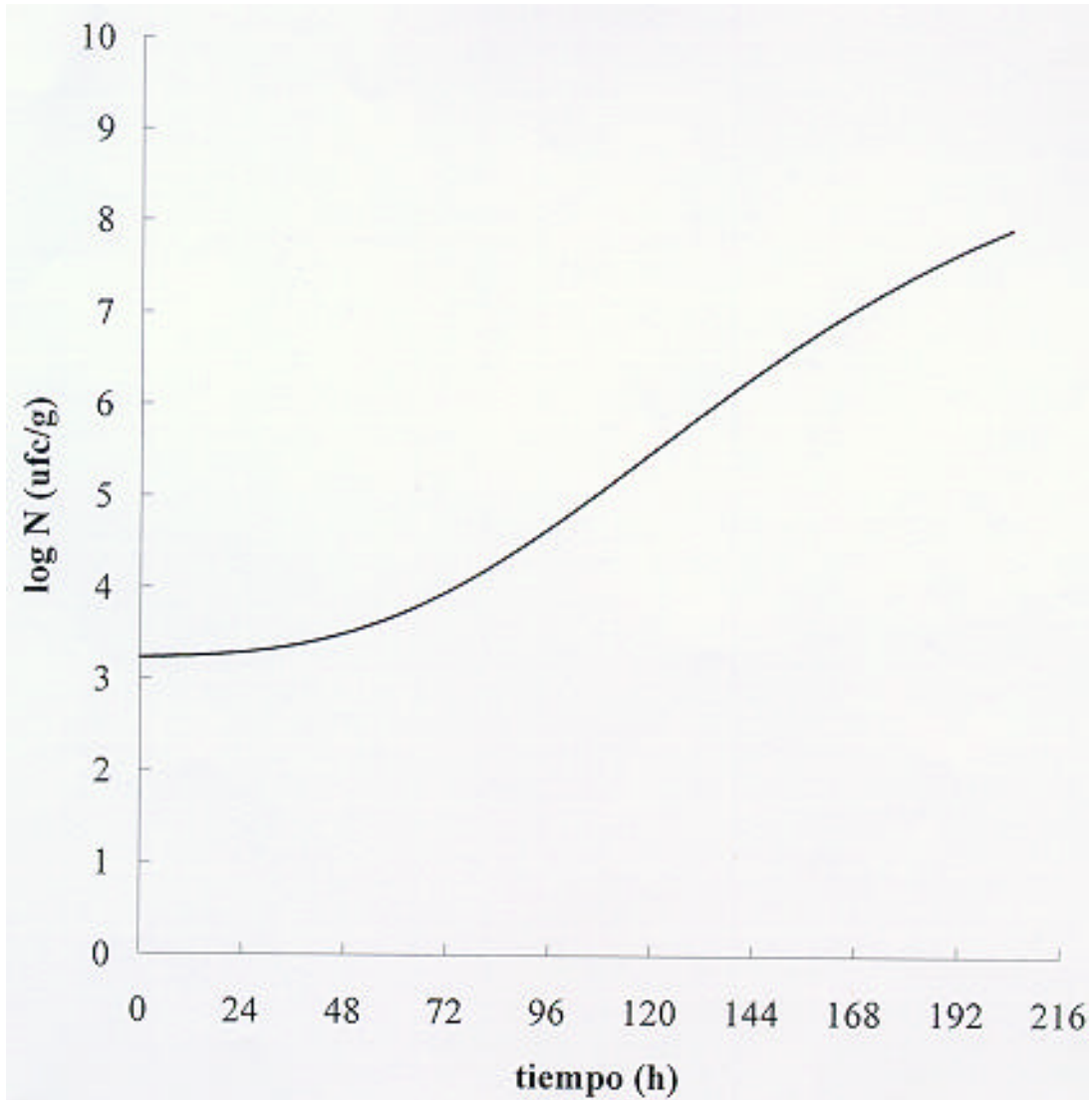


Figura 10. Curva predictiva del crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 4°C en medio anaerobio según el programa MFSModel

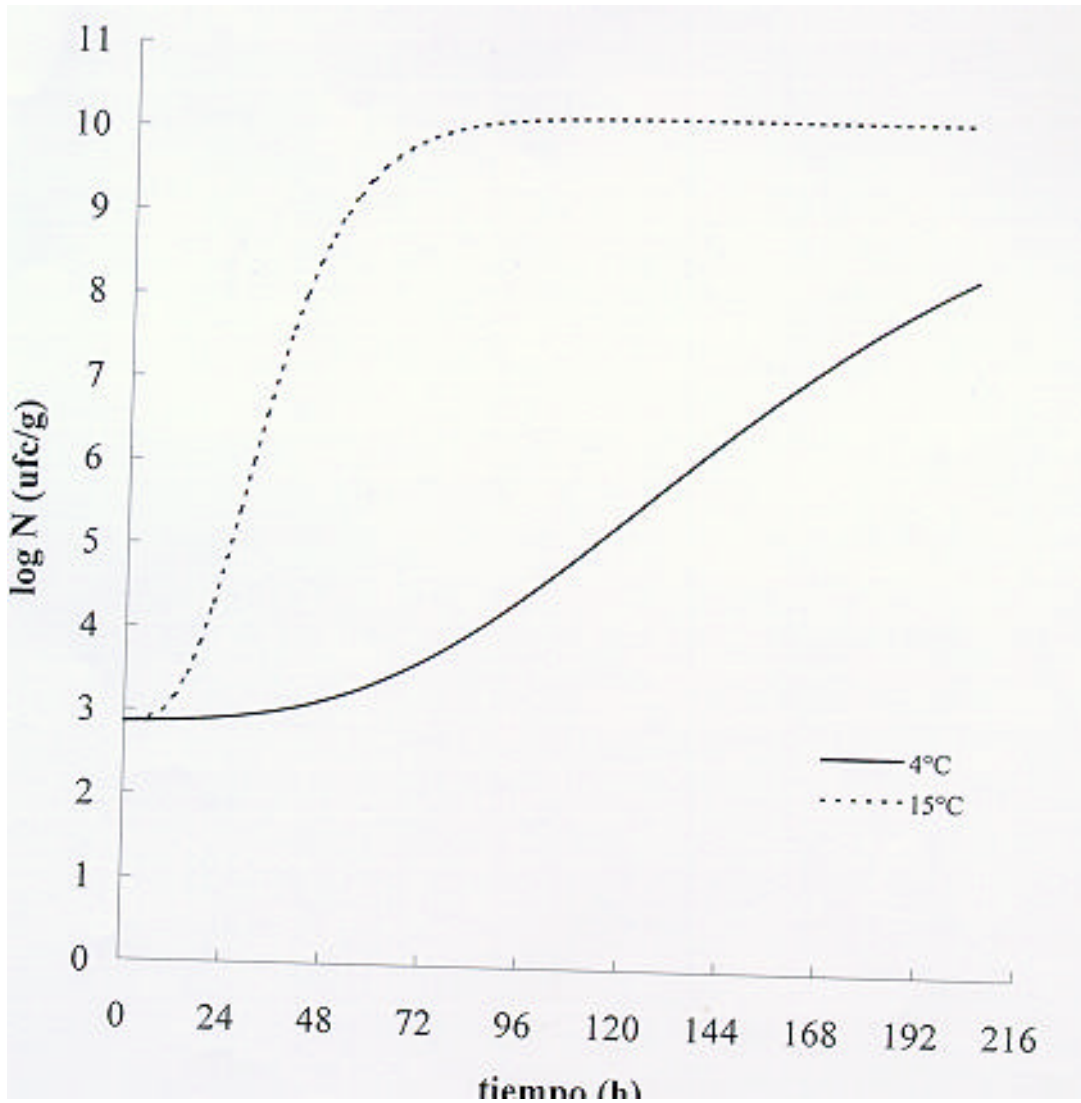


Figura 11. Curva predictiva del crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 4°C y a 15°C en medio anaerobio según el programa MFSModel

Tabla 13. Ajustes de las curvas de inhibición y los valores de tasa específica de crecimiento (μ_{max}), tiempo de adaptación (T_1), recuento inicial (N_0) y el valor D

Curvas de inhibición	Intervalos de predicción	Modelo	μ_{max} (h^{-1})	T_1 (h)	D(h)	N_0
<i>Aeromonas hydrophila</i> a 15°C	0-120 h	Dmodel	-0,136	31,86	7,35	16,79
	12-120 h	Inactivación lineal	-0,088	23,44	11,36	7,29
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (no inoculado) a 4°C	0-204 h	Dmodel	-0,144	45,09	6,94	14,37
	0-204 h	Inactivación lineal	-0,007	0,00	142,86	6,20
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (no inoculado) a 15°C	0-144 h	Dmodel	-0,120	36,17	8,33	14,60
	30.96-156 h	Inactivación lineal	-0,094	26,04	10,64	6,53
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (inoculado) a 4°C	0-192 h	Dmodel	-0,070	33,29	14,29	20,31
	0-72 h	Inactivación lineal	-0,085	0,00	27,09	8,41
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (inoculado) a 15°C	0-96 h	Dmodel	-0,080	55,45	12,50	21,99
	12-96h	Inactivación lineal	-0,062	12,00	16,13	7,28

Pseudomonas fluorescens inoculadas almacenadas a 4°C, para los tiempos comprendidos entre 0 y 72 horas:

$$\log N=t*-0.0374+8.4129 \quad r^2=0.93$$

Pseudomonas fluorescens inoculadas almacenadas a 15°C, para los tiempos comprendidos entre 12 y 96 horas:

$$\log N=t*-0.0272+7.6022 \quad r^2=0.935$$

Pseudomonas fluorescens no inoculado almacenadas a 4°C, para los tiempos comprendidos entre 0 y 204 horas:

$$\log N=t*-0.0027+6.2013 \quad r^2=0.30$$

Pseudomonas fluorescens no inoculado almacenadas a 15°C,, para los tiempos comprendidos entre 31 y 156 horas:

$$\log N=t*-0.0409+7.3051 \quad r^2=0.97$$

(Ver Figuras 1 al 8 en el Anexo II)

5.3 Ajuste de la evolución del CO₂

Los datos de la evolución gaseosa fueron ajustados a rectas de regresión. Partiendo de la base de que no hay diferencias significativas del contenido gaseoso entre las muestras inoculadas, se buscó una ecuación para cada temperatura para toda ellas. En la Figura 12 se describen las ecuaciones de regresión obtenidas y el ajuste realizado.

Las ecuaciones halladas para las muestras no inoculadas fueron las siguientes:

Para CO₂ a 4°C:

$$\text{CO}_2 (t)=0.0847*t+11.65 \quad r^2=0.98$$

Para CO₂ a 10°C:

$$\text{CO}_2 (t)=0.1583*t+13.51 \quad r^2=0.92$$

Para CO₂ a 15°C, hasta las 132 horas:

$$\text{CO}_2 (t)=0.3389*t+18.94 \quad r^2=0.86$$

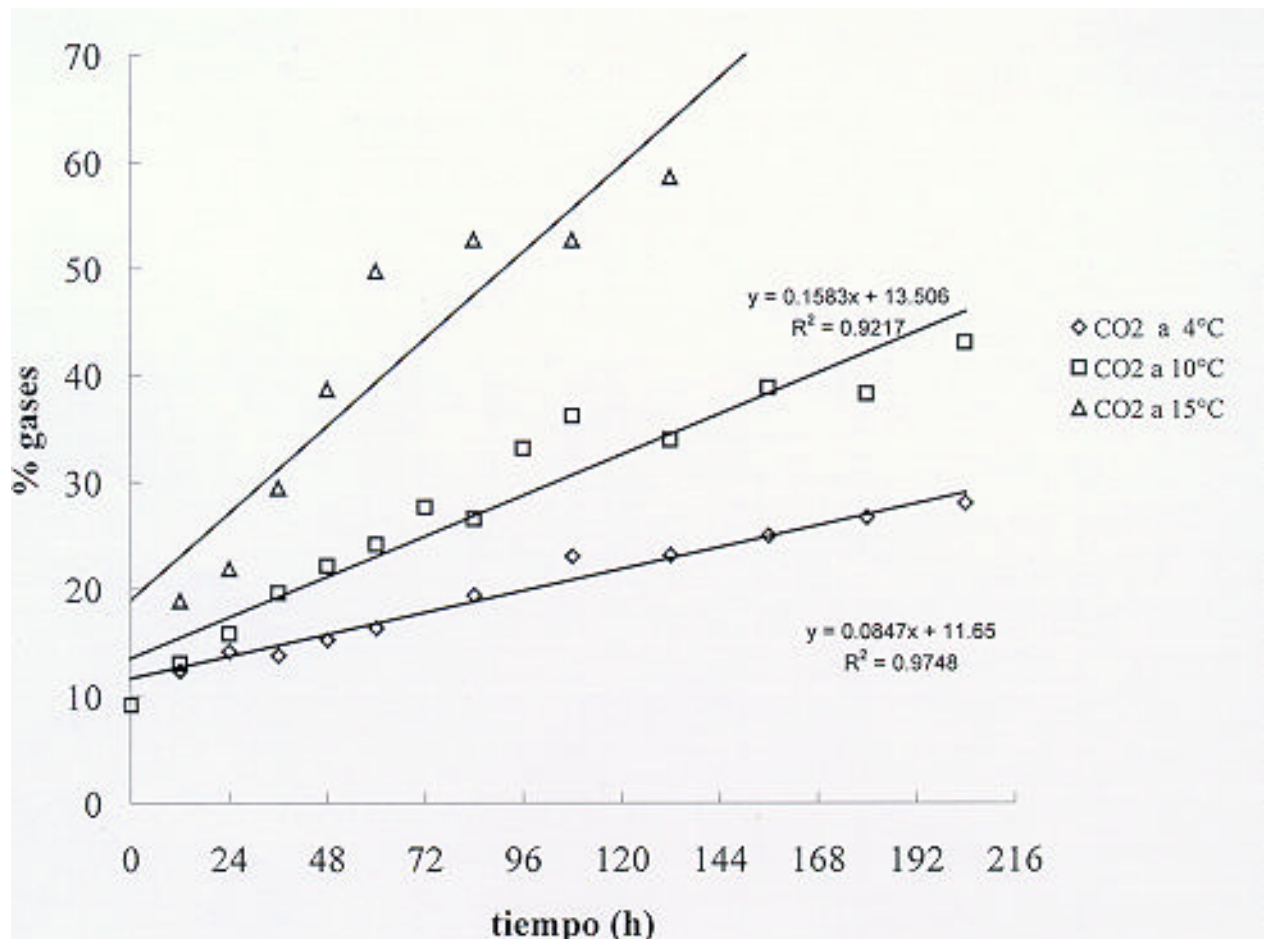


Figura 12. Rectas de regresión de la evolución de la concentración de los gases en el interior del envase de ensalada durante el almacenamiento a diferentes temperaturas

Ajuste de la evolución del pH

El ajuste de las rectas de regresión dió los resultados siguientes (Anexo II, Figura 9):

pH a 4°C:

$$\text{pH}=0.0023*t+5.8773 \quad r^2 = 0.61$$

pH a 10°C

$$\text{pH}=0.0004*t+6.036 \quad r^2 = 0.04$$

pH a 15°C

$$\text{pH}=-0.0171*t+6.2791 \quad r^2 = 0.92$$

5.5 Relación lineal con la temperatura

Se representó gráficamente diferentes transformaciones de la tasa específica de crecimiento (tasa, $\sqrt{\text{tasa}}$, $\ln(\text{tasa})$) frente a la temperatura o su inversa a partir de las rectas de regresión halladas se obtuvieron las siguientes fórmulas:

Las ecuaciones, aplicando la ecuación de Arrhenius serían:

Para bacterias acidolácticas :

$$\ln \mu=39.522-11818*1/T \quad r^2 = 0.78$$

Para bacterias psicrotrofas:

$$\ln \mu=15.501-5067*1/T \quad r^2 = 0.99$$

Para *Leuconostoc mesenteroides* no inoculado:

$$\ln \mu=6.3797-2203*1/T$$

Para *Leuconostoc mesenteroides* inoculado:

$$\ln \mu=8.1306-2723*1/T$$

Aplicando la ecuación de Ratkowsky serían:

$$\sqrt{\mu}=b*(T-T_{\min})$$

Para bacterias acidolácticas con una T_{\min} de 266.11°K

$$\sqrt{\mu}=0.0209*(T-266.11) \quad r^2 = 0.76$$

Para bacterias psicrotrofas con una T_{\min} de 250.85°K

$$\sqrt{\mu}=0.0094*(T-250.85) \quad r^2 = 0.998$$

Para *Leuconostoc mesenteroides* no inoculado, con una T_{\min} de 209.53°K

$$\sqrt{\mu}=0.0068*(T- 209.53)$$

Para *Leuconostoc mesenteroides* inoculado, con una T_{\min} de 224.36°K.

$$\sqrt{\mu}=0.008*(T- 224.36)$$

Para *Pseudomonas fluorescens* y *Aeromonas hydrophila* no pudo calcularse pues son curvas de inhibición y sus tasa específica de crecimiento son negativas. Las relaciones lineales obtenidas en función de la temperatura fueron las siguientes:

Para *Pseudomonas fluorescens* no inoculado:

$$\mu=0.0022*T^{\circ}K-0.751$$

Para *Pseudomonas fluorescens* inoculado:

$$\mu=-0.0009*T^{\circ}K+0.1818$$

Para *Aeromonas hydrophila* :

$$\mu=-0.0132*T^{\circ}K+3.6562$$

Una vez obtenida la ecuación que nos relaciona la tasa específica de crecimiento con la temperatura, se calcularon las tasas específicas de crecimiento predictivas a diferentes temperaturas. Para esto se escogió la ecuación de Ratkowsky, la más utilizada en temperatura de refrigeración. Para el cálculo del valor de la asíntota superior o valor máximo alcanzado se aplicó la fórmula

$$A = b * \left[1 - \exp\left[c * \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\max}} \right) \right] \right]$$

donde

b es el nivel final alcanzado a bajas temperaturas, en el presente trabajo se tomó el valor tal que $b = 21.58 - \ln(N_0)$, o sea, 14.67 en el caso de bacterias acidolácticas donde N_0 fue igual a 10^3 ufc/g.

c es un parámetro para ajustar la ecuación, y vale 1.25

T es la temperatura considerada

T_{\max} es la temperatura de crecimiento del microorganismo

Para bacterias acidolácticas, el valor de T_{\max} 316°K. Este último valor junto al valor de c, fueron tomados de los hallados por Ratkowsky para *Lactobacillus plantarum*, debido a que en este estudio no se sometieron las muestras a altas temperatura para conocer estos valores.

Se comprobó que el valor de A no varía de forma considerable con la temperatura según lo expresado por Zwietering et al. (1991) para *Lactobacillus plantarum* y se mantuvo a 14.57 (ln).

Sustituyendo los valores de tasa específica de crecimiento y valor máximo alcanzado (A o y_{max}) predictivos obtenidos en las respectivas fórmulas de ajuste (DModel), se obtuvieron curvas de evolución predictivas para diferentes temperatura que se describen en la Figura 13.

Si se representan los valores de las pendientes de la evolución del CO₂ (rc), y de pH (rpH) frente a la temperatura, se obtienen las siguiente ecuaciones de regresión:

$$rc = 0.0228 * T (^{\circ}K) - 6.2372 \quad r^2 = 0.92$$

$$rpH = -0.0017 * T (^{\circ}K) + 0.4802 \quad r^2 = 0.78$$

Una vez obtenida la ecuación que nos relaciona las pendientes de la evolución del CO₂ (rc) y de las pendientes de la evolución del pH (rpH) con la temperatura, se calcularon las pendientes predictivas a diferentes temperaturas. Las rectas resultantes se pueden observar en las Figuras 14 y 15.

5.6 Efecto inhibitorio del CO₂ y del pH

Se representaron los datos de recuentos de todos los microorganismos en función del % de CO₂, observándose que con excepción de las pseudomonas todos

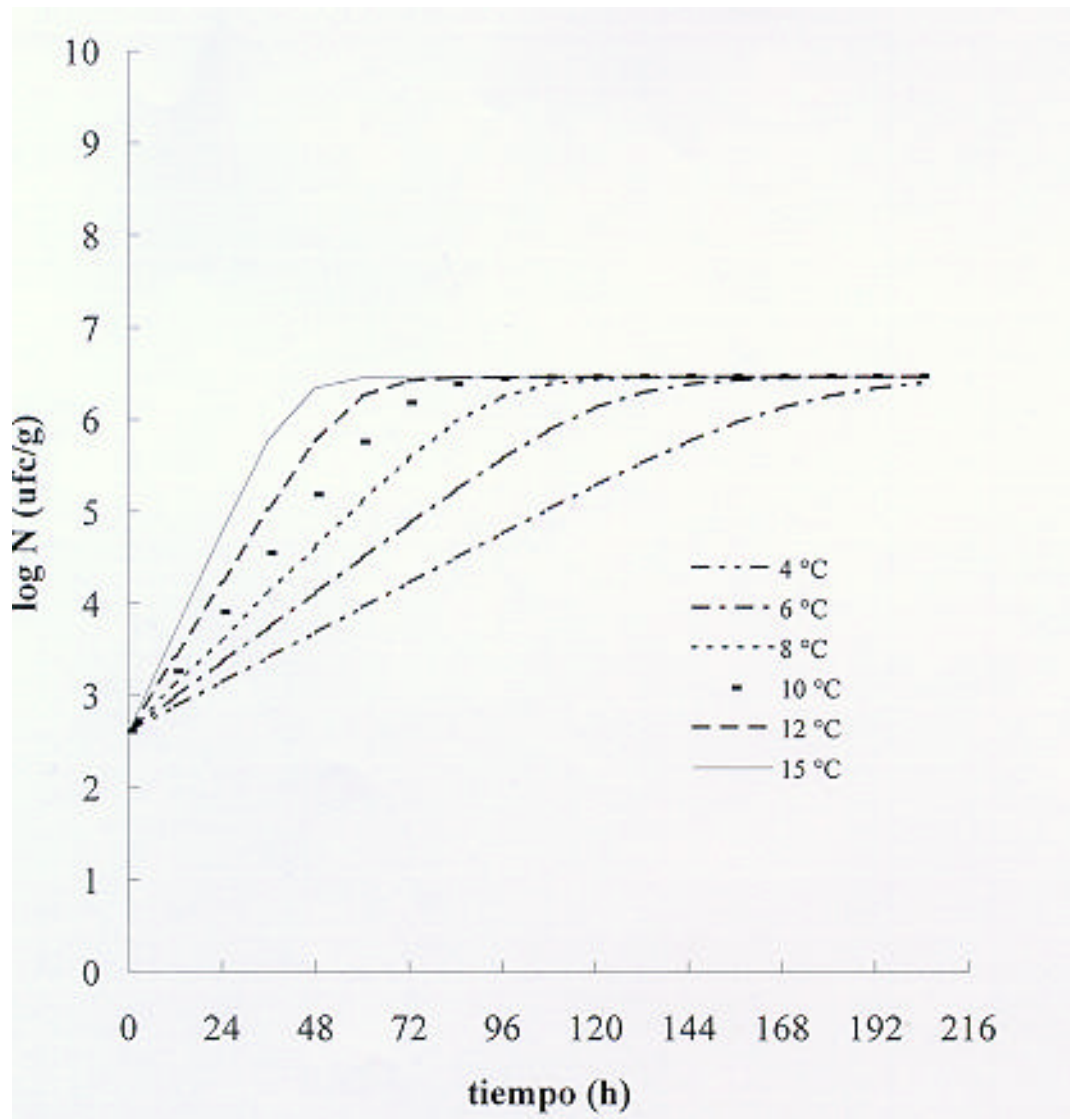


Figura 13. Curva predictiva de la evolución de bacterias acidolácticas a diferentes temperaturas en ensaladas

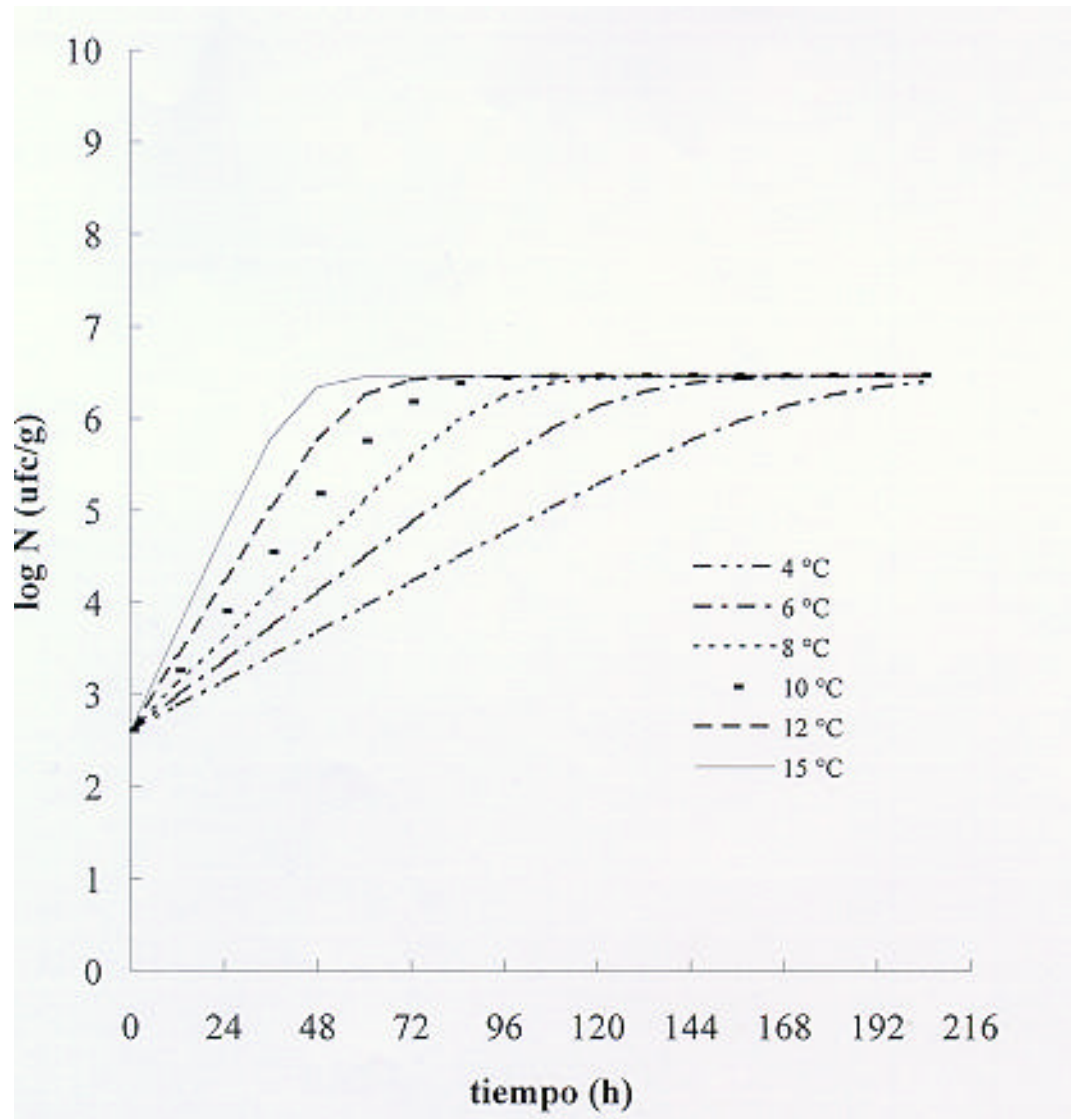


Figura 14. Rectas predictivas de la evolución de CO_2 a diferentes temperaturas

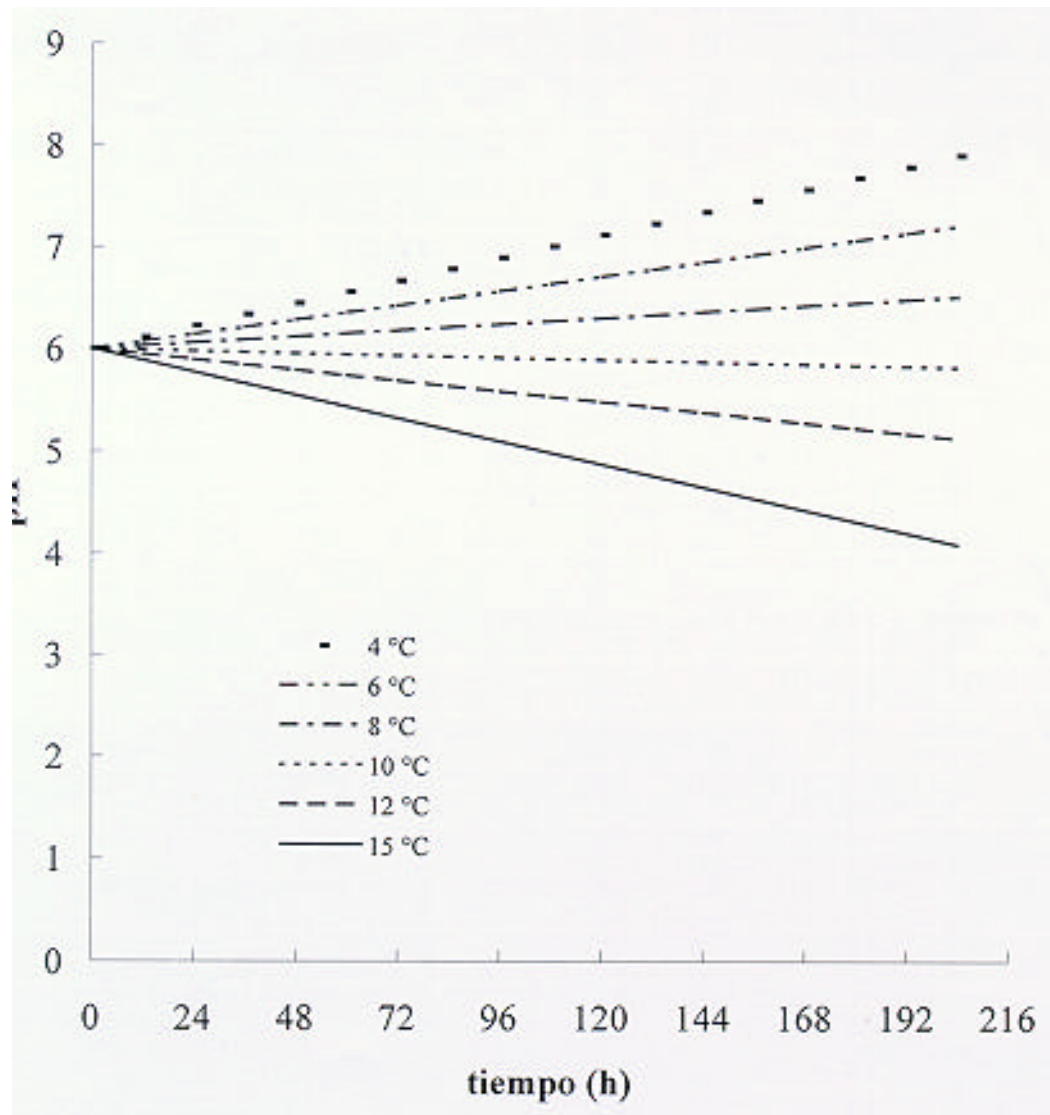


Figura 15. Valores predictivos de la evolución del PH a diferentes temperaturas

los microorganismos presentan una relación de crecimiento ascendente a 4°C (Figura 16).

En la Figura 17 las bacterias acidolácticas y psicrotrofas ascienden de forma curvilínea y en la Figura 18 se observa que a 15°C asciende la curva de las bacterias acidolácticas y *Leuconostoc*, y tienden a estabilizarse al final mientras que la bacterias psicrotrofas y *Pseudomonas fluorescens* descienden hasta no detectarse

Se representaron los datos de recuentos de todos los microorganismos en función pH, observándose que con excepción de las pseudomonas todos los microorganismos presentan una relación de crecimiento ascendente a 4°C (Figura 19). En la Figura 20, en las muestras almacenadas a 10°C, se observa una relación lineal entre ambos parámetros. En las muestras mantenidas a 15°C se ve claramente como al ir disminuyendo el pH en la ensalada aumentan los recuentos de bacterias acidolácticas y *Leuconostoc mesenteroides* pero las bacterias psicrotrofas y *Pseudomonas fluorescens* disminuyen (Figura 21). Los recuentos de *Aeromonas hydrophila* en ensaladas almacenadas a 4°C simplemente se mantienen. A 15°C este microorganismo se inhibe hasta dejar de detectarse a los pH más bajos (Figura 22).

En la Figura 23 se puede observar la relación entre las pendientes a diferentes temperaturas del CO₂ (rc) con las tasa específica de crecimiento (μ_{\max}) y la ecuaciones de regresión lineal.

En la Figura 24 se puede observar la relación entre las pendientes de la evolución del pH (rpH) y las tasa específica de crecimiento (μ_{\max}).

5.7 Determinación del período de vida comercial. Relación existente entre las alteraciones organolépticas y fisicoquímicas con la presencia de bacterias alterantes y patógenas

Se calcularon los tiempos en que la media de los atributos sensoriales analizados en las ensaladas alcanzarían el valor 2 de la escala hedónica. Las diferencias estadísticas entre las ensaladas inoculadas y controles no fueron significativas por lo que se calcularon a partir de las muestras no inoculadas (Anexo I, Tabla 24).

En las ensaladas almacenadas a 4°C no se halló deterioro a las 204 horas, fin del período experimental, por lo que se tomó este valor como el tiempo de fin

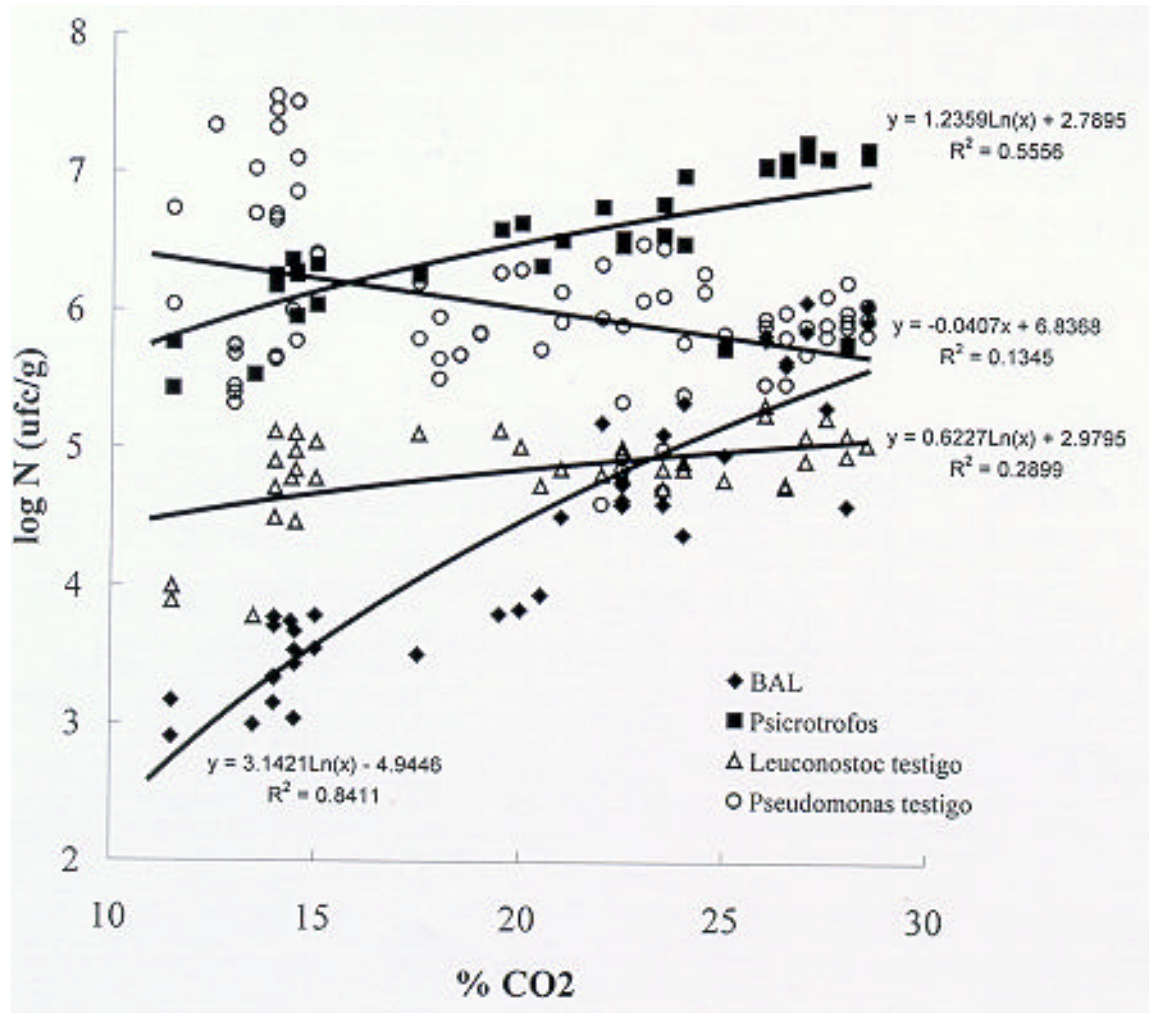


Figura 16. Correlación entre la evolución del recuento de microorganismos y la concentración de CO₂ almacenados a 4°C

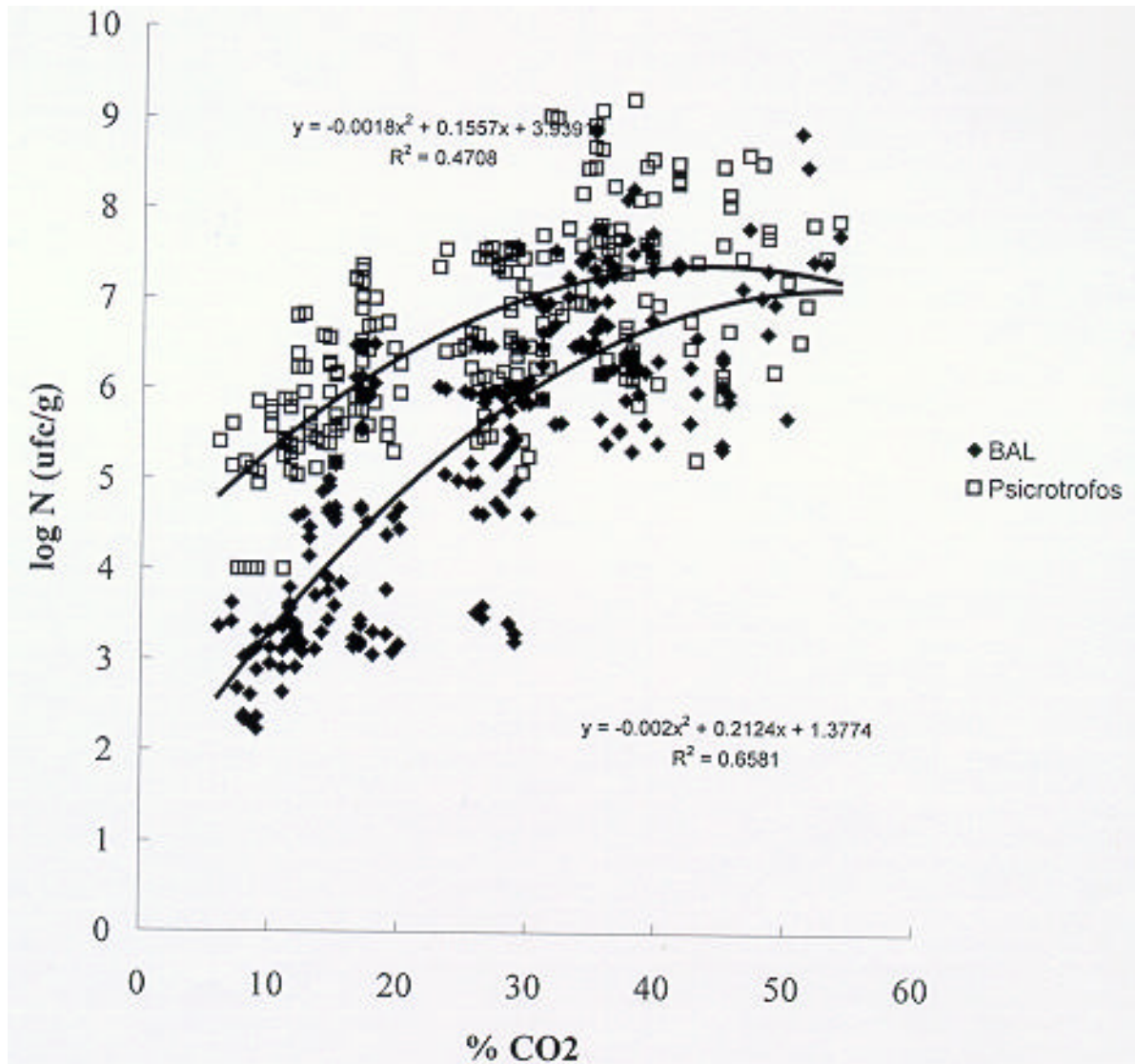


Figura 17. Correlación entre la evolución del recuento de microorganismos y la concentración de CO₂ en ensaladas almacenadas a 10°C

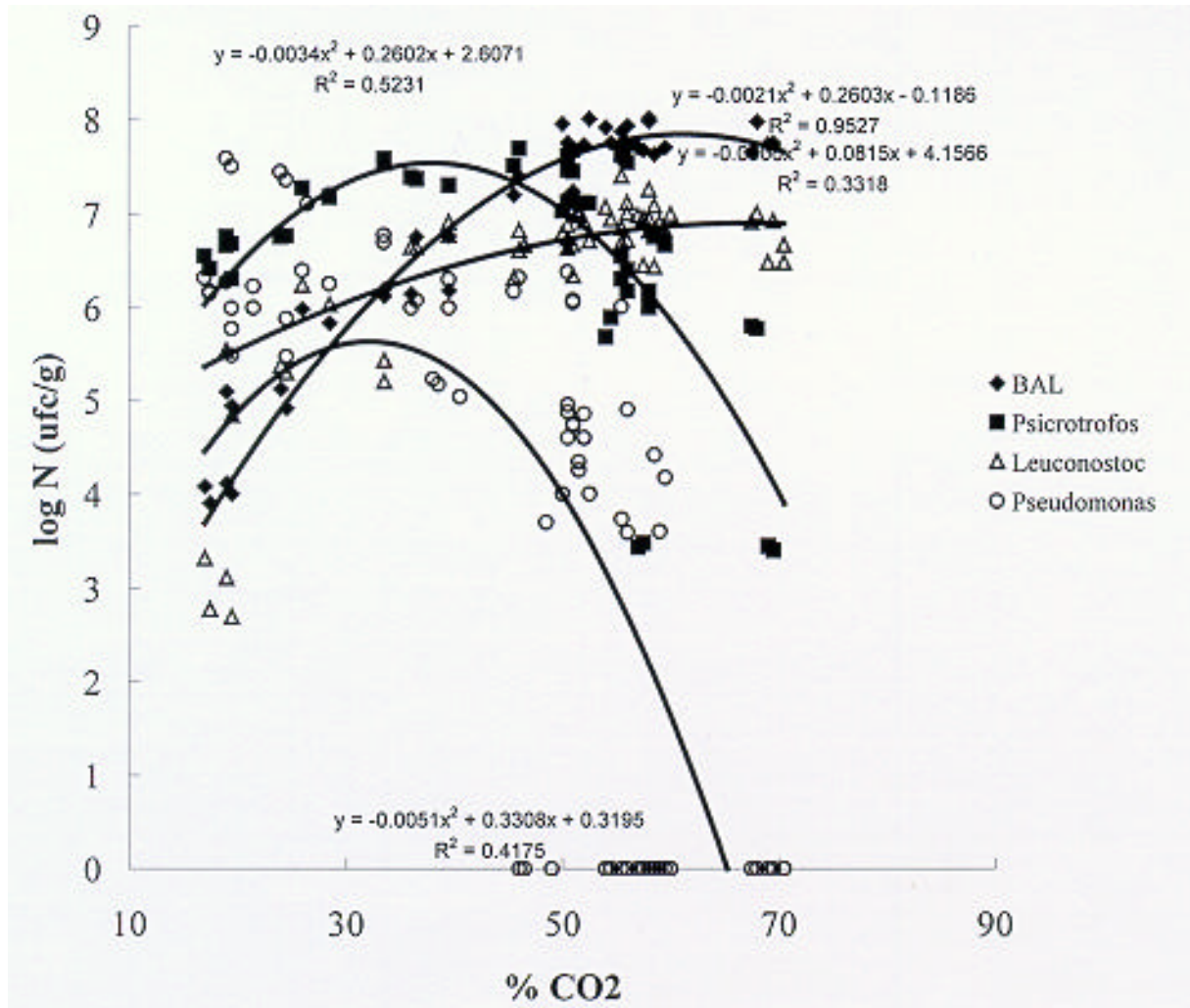


Figura 18. Correlación entre la evolución del recuento de microorganismos y la concentración de CO₂ en ensaladas almacenadas a 15°C

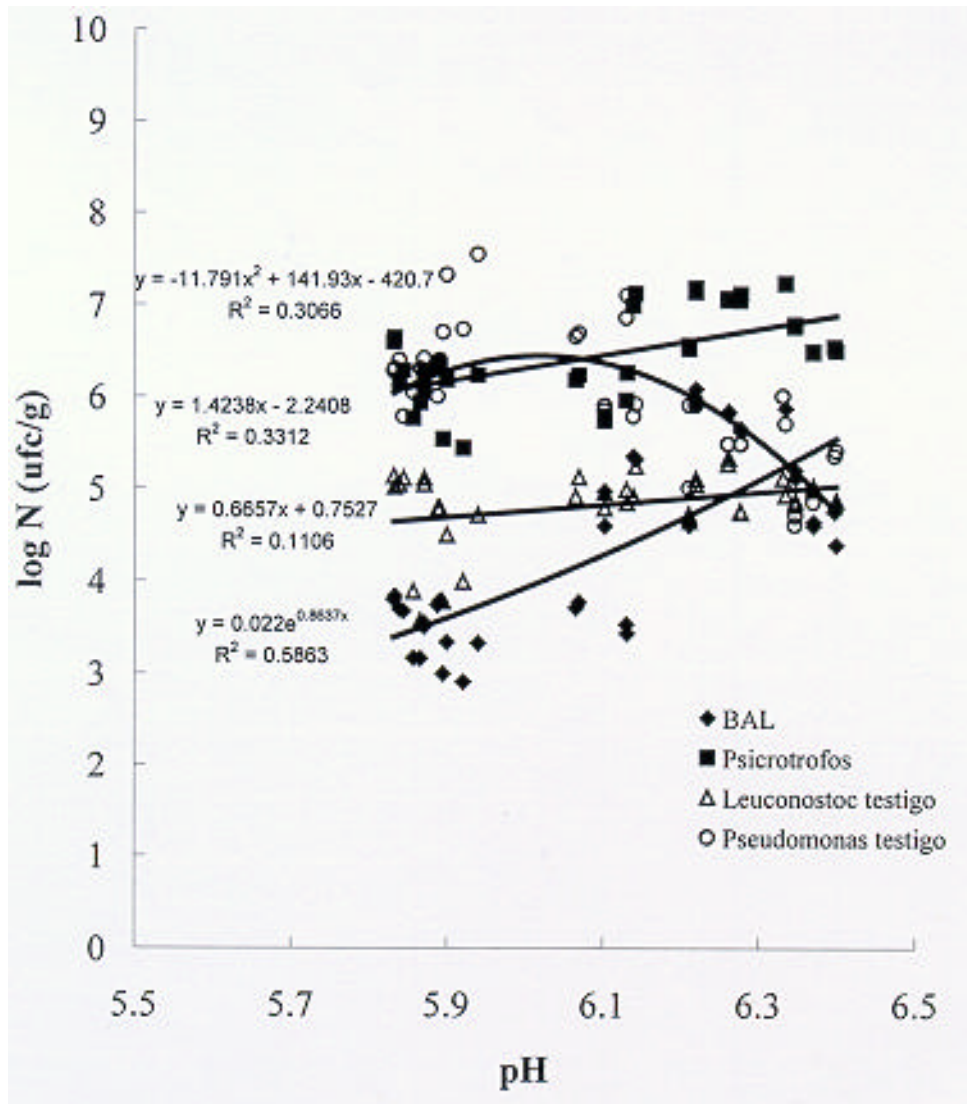


Figura 19. Correlación entre la evolución de los recuentos de los microorganismos y el PH almacenadas a 4°C

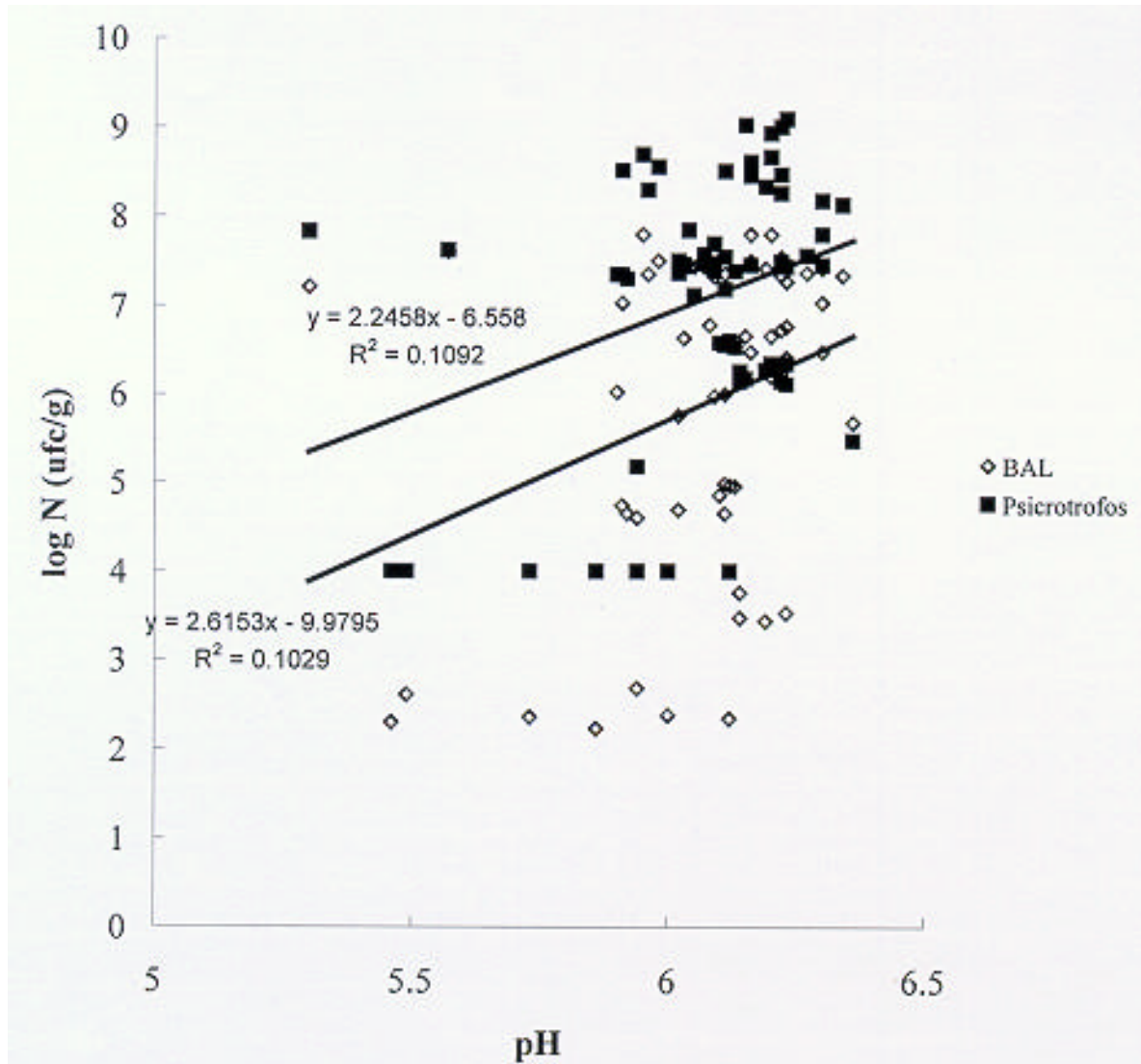


Figura 19. Correlación entre la evolución de los recuentos de los microorganismos y el PH almacenadas a 10°C

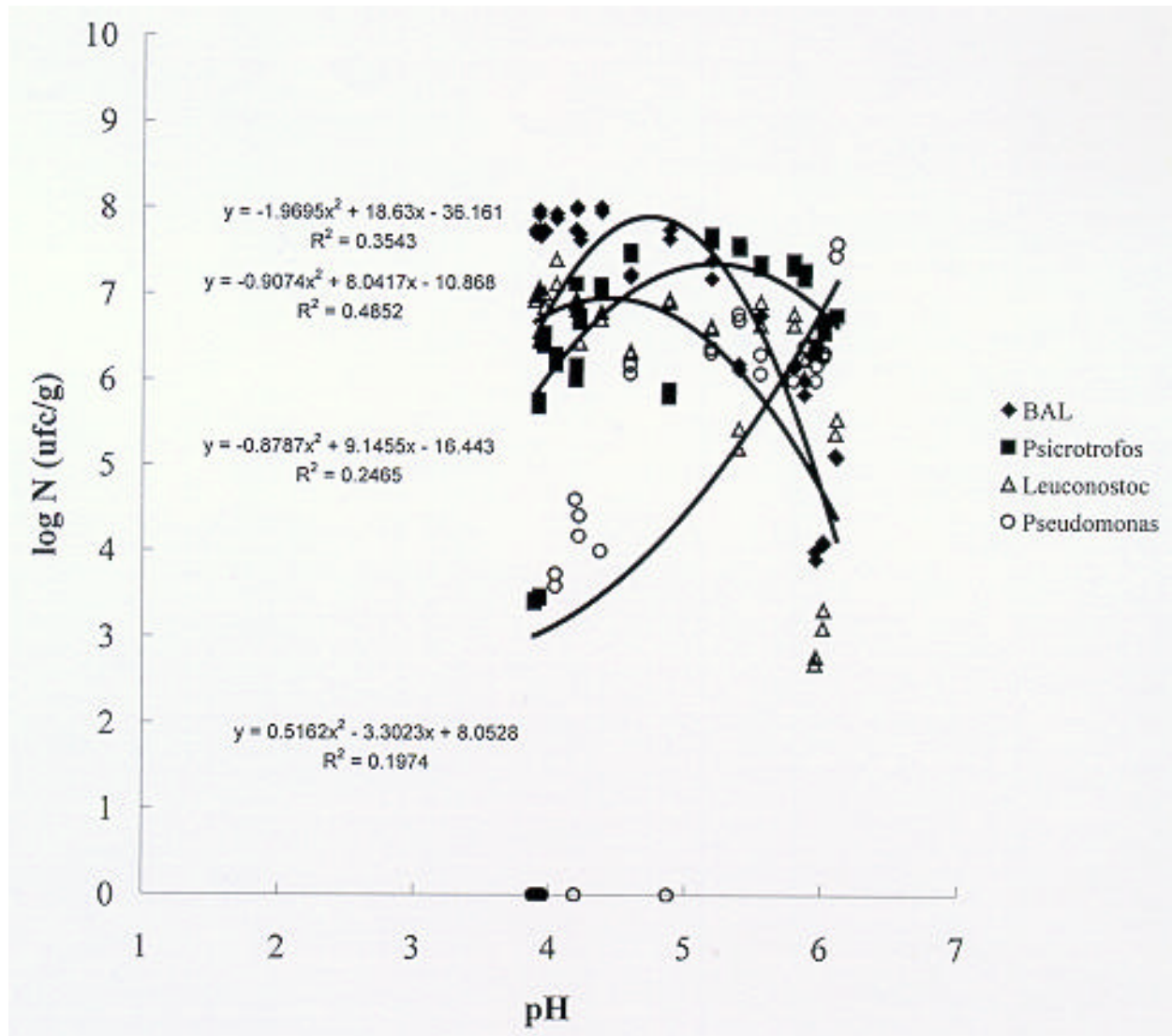


Figura 19. Correlación entre la evolución de los recuentos de los microorganismos y el PH almacenadas a 15°C

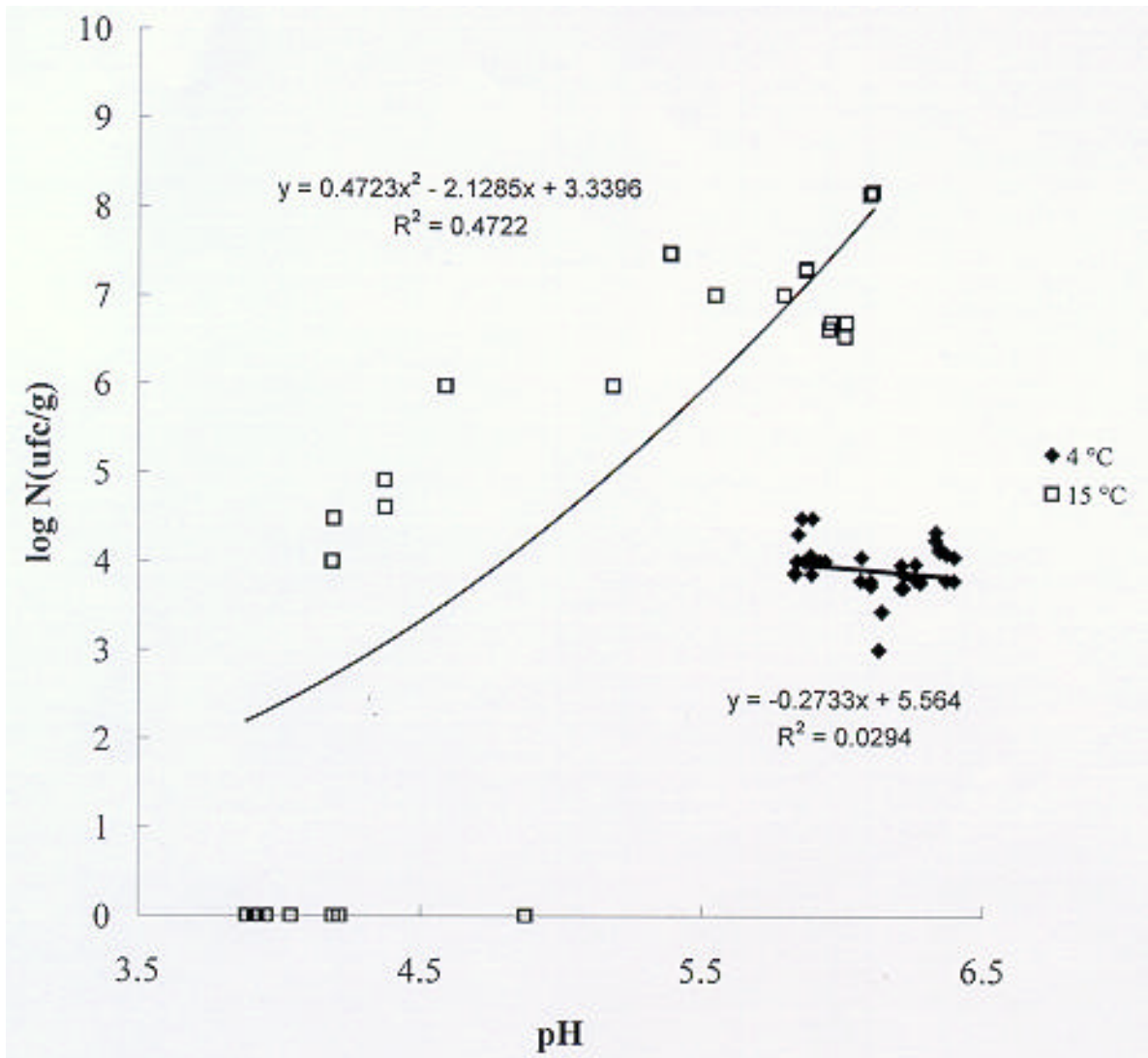


Figura 19. Correlación entre la evolución de los recuentos de *Aeromonas hydrophila* y el PH en ensaladas almacenadas a 4°C y a 15°C

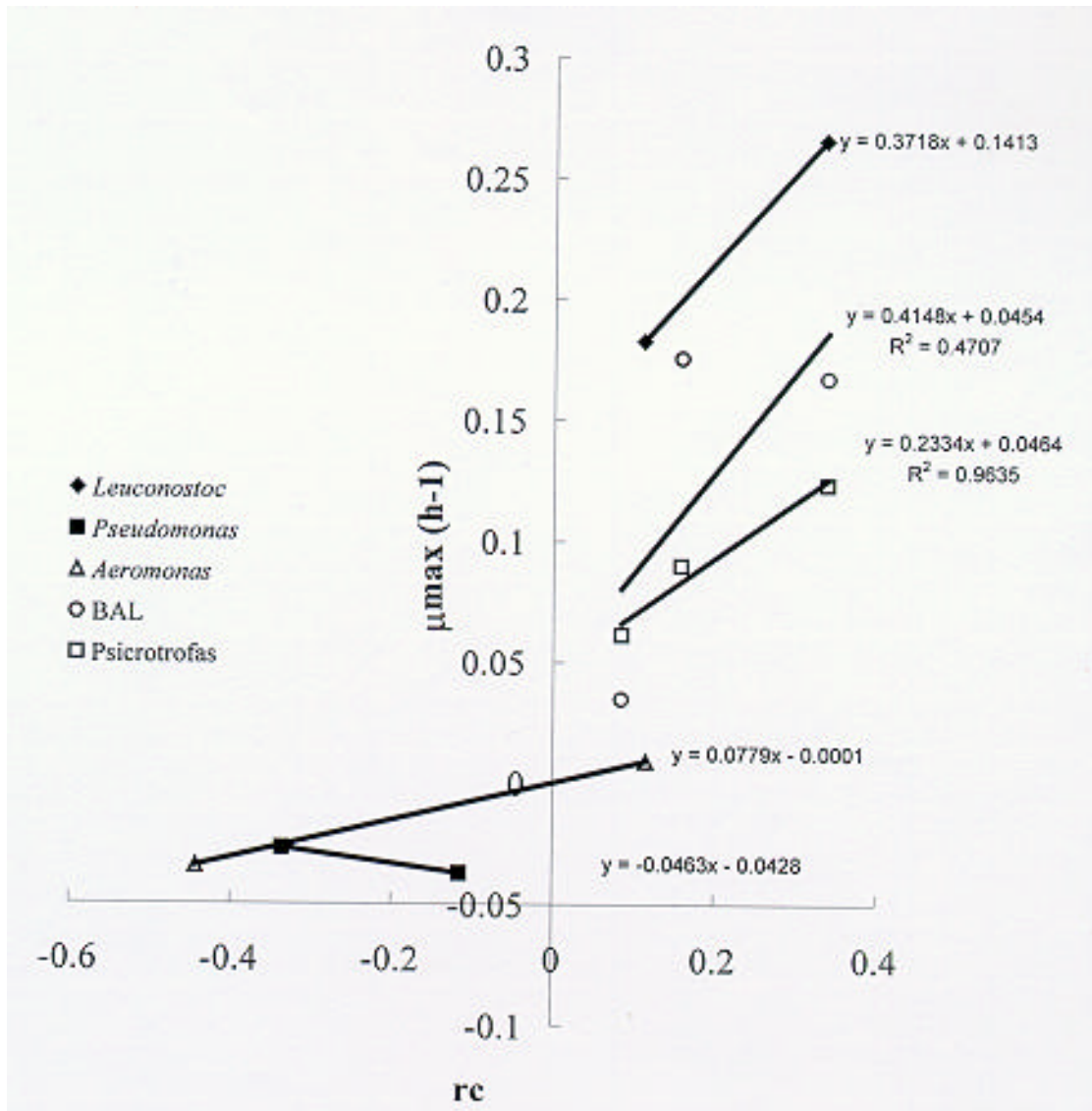


Figura 23. Rectas de regresión entre las tasas específicas de crecimiento (μ_{max}) y la pendiente de la evolución del CO_2 (rc) para cada microorganismo

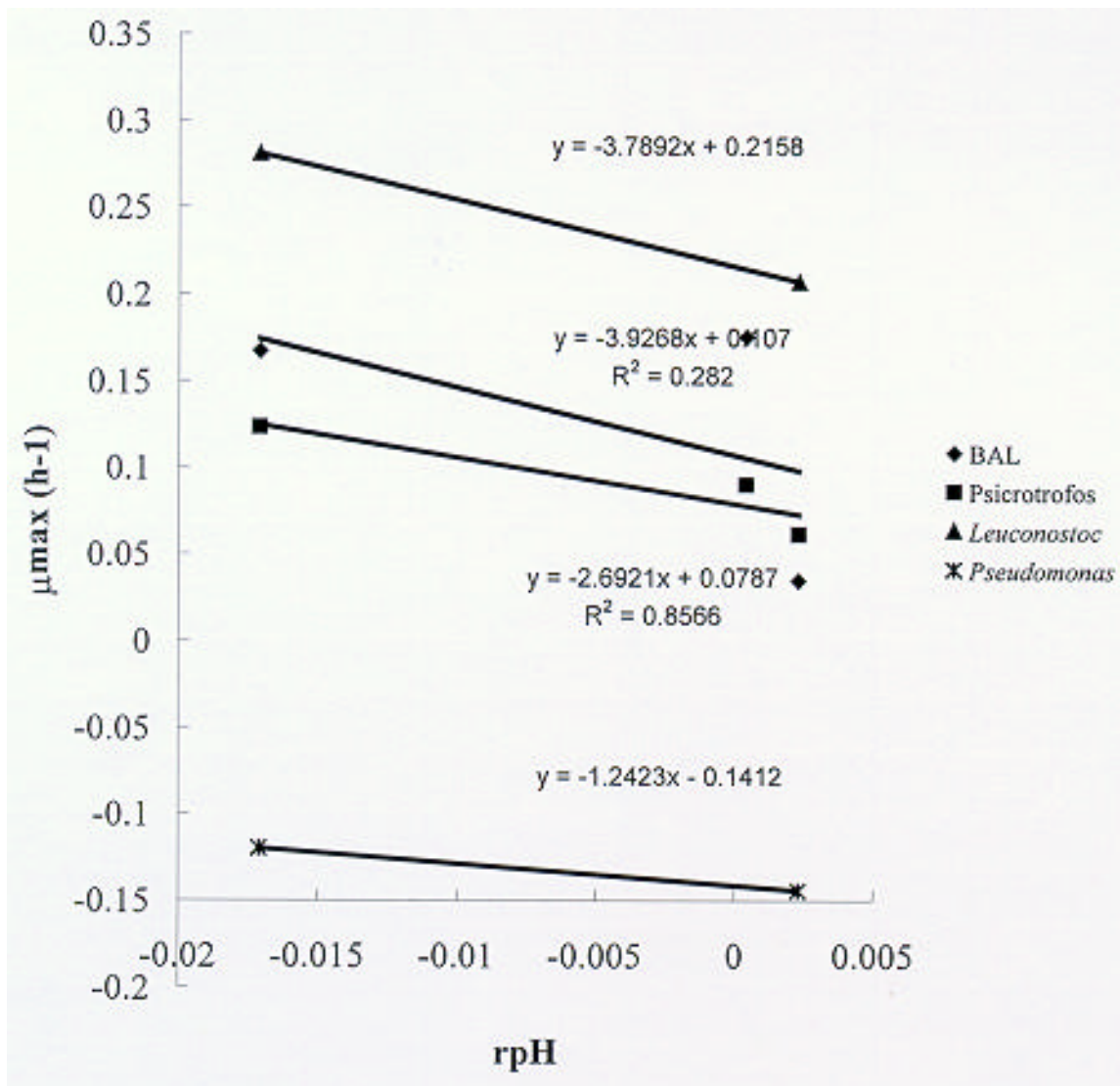


Figura 23. Rectas de regresión entre las tasas específicas de la evolución del PH (rpH) y las tasas específicas de crecimiento (μ_{max}) para cada microorganismo

de vida útil a 4°C. En las ensaladas almacenadas a 15°C alcanzó el valor 2 a las 84 horas.

Posteriormente se calcularon los niveles de recuentos de los microorganismos en las ensaladas a 4°C y 15°C en los tiempos de fin de vida media hallados (204 horas a 4°C y 84 horas a 15°C) a partir de las ecuaciones predictivas del crecimiento microbiano ya descritas. Los resultados, expresados en logaritmos decimales, fueron los siguientes:

	4°C	15°C
Psicrotrofos	6.72	7.55
Bacterias acidolácticas	5.97	7.74
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> no inoculado	4.93	6.77
<i>Pseudomonas fluorescens</i> no inoculado	6.04	3.87

Se representó gráficamente la evolución durante el almacenamiento de los microorganismos, el CO₂ y las medias de los atributos sensoriales a 4 y 15°C (Figuras 25 y 26). Se puede observar en las Figuras 8 y 9, una línea transversal a la altura del número 2 que indicaría el fin de la vida útil del producto y la ecuación de ajuste de los atributos en las ensaladas controles.

A partir de estos ajustes de curva se calcularon los tiempos de vida media para alcanzar el valor 2 y se obtuvo a 4°C un tiempo de 304 horas y a 15°C de 101 horas. Si se recalculan los niveles de recuentos previstos en estos nuevos tiempos se obtienen los siguientes valores expresado en logaritmos decimales:

	4°C	15°C
Psicrotrofos	6.72	7.55
Bacterias acidolácticas	7.48	7.75
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> no inoculado	4.93	6.77
<i>Pseudomonas fluorescens</i> no inoculado	5.38	3.18

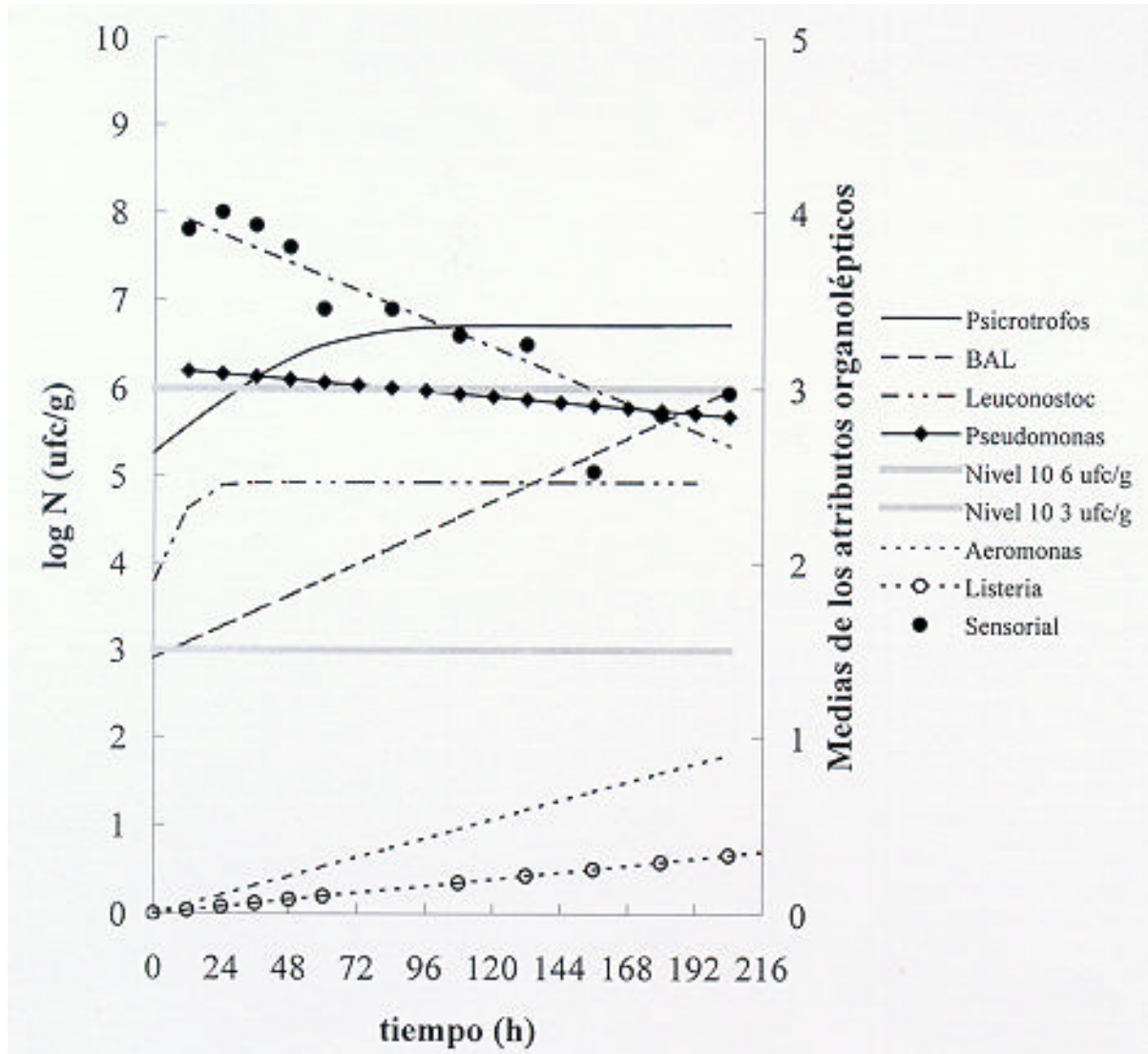


Figura 25. Evolución predictiva de los microorganismos y de las características organolépticas en ensaladas almacenadas a 4°C

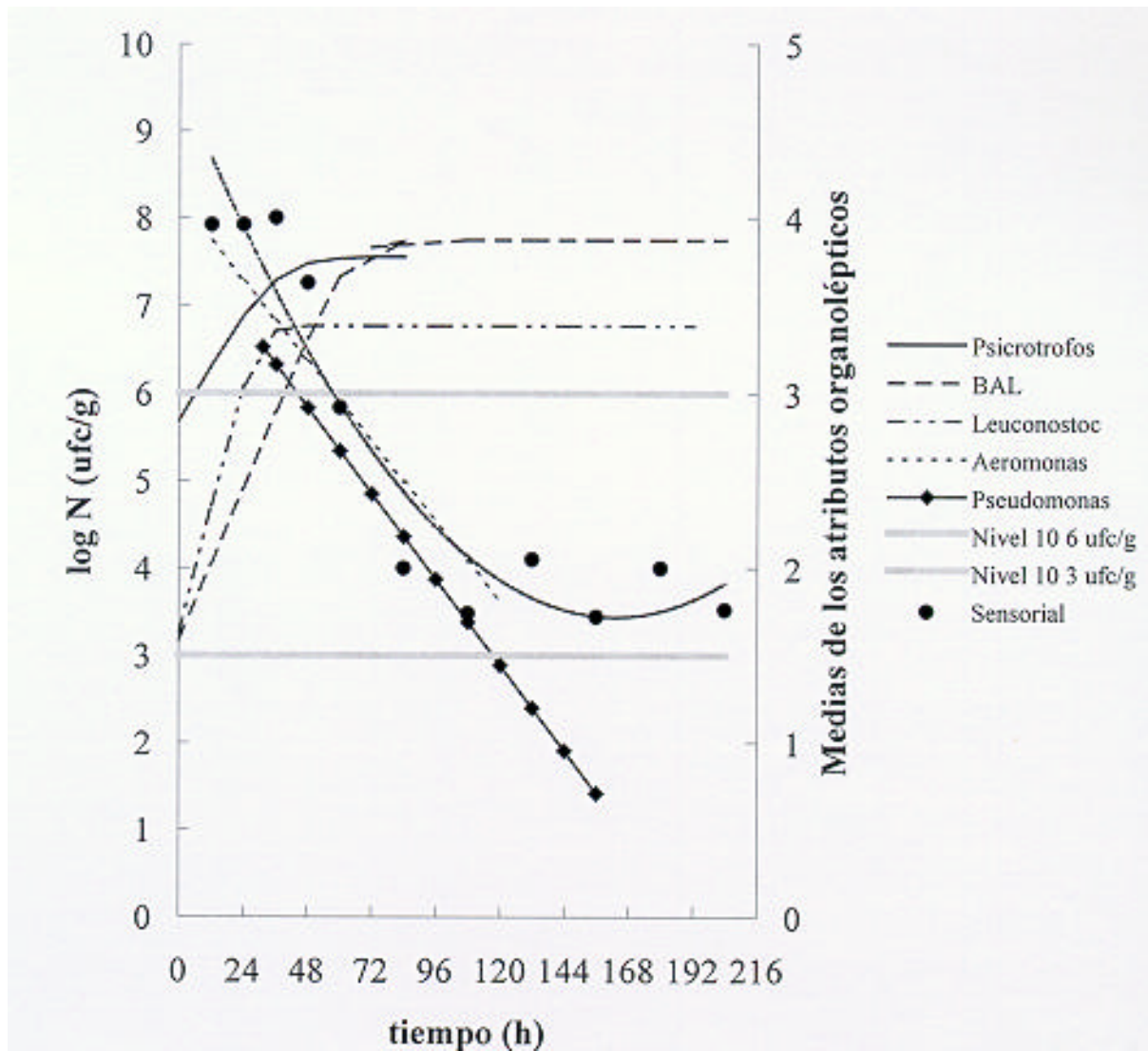


Figura 26. Evolución predictiva de los microorganismos y de las características organolépticas en ensaladas almacenadas a 15°C

En el momento en que la ensalada almacenada a 15°C se considera inaceptable (84 horas) el recuento de bacterias psicrotrofas y bacterias acidolácticas se encuentran entre $3.55 \cdot 10^7$ y $5.50 \cdot 10^7$ ufc/g respectivamente, por lo tanto el nivel de microorganismos límite a detectar como indicador de próxima alteración del alimento debe ser menor a este valor. Los recuentos de bacterias psicrotrofas y bacterias acidolácticas en las ensaladas almacenadas a 4°C que a las 204 horas todavía se encontraban en condiciones aceptables, oscilaban entre $9.33 \cdot 10^5$ - $5.25 \cdot 10^6$ ufc/g. Por lo tanto el valor de 10^6 ufc/g sugerido por diversos autores parece ser un valor de acuerdo con estos datos.

Se calculó el tiempo que tardaría en alcanzar 10^6 ufc/g cada microorganismo, a partir de la ecuación de ajuste de las curvas, considerando este punto como el fin de la vida media. En el caso de los microorganismos patógenos se determinó el tiempo en alcanzar 10^3 ufc/g. Los datos se pueden observar en la Tabla 14. En el caso de *Leuconostoc mesenteroides* a 4°C no alcanzó dicho nivel por lo que se expresa el tiempo en alcanzar su valor máximo que se corresponde con $3.56 \cdot 10^5$ ufc/g en las inoculadas y $8.5 \cdot 10^4$ ufc/g en las no inoculadas. Estos tres datos no fueron incluidos en el gráfico de vida media (Figura 27).

Tabla 14. Tiempo (horas) (ts) necesario para alcanzar el nivel de 10^6 ufc/g por los microorganismos analizados en función de la temperatura

Microorganismo	Temperatura (°C)	Nivel a alcanzar (ufc/g)	Tiempo (ts)(horas)
Bacterias psicrotrofas	4	10^6	30.26
	10	10^6	19.62
	15	10^6	5.91
Bacterias acidolácticas	4	10^6	205.69
	10	10^6	87.69
	15	10^6	39.03
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4	$<10^5$	48.85
	15	10^6	23.21
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	incred. 10^3	781.85
<i>Listeria monocytogenes</i>	4	incred. 10^3	2157.00

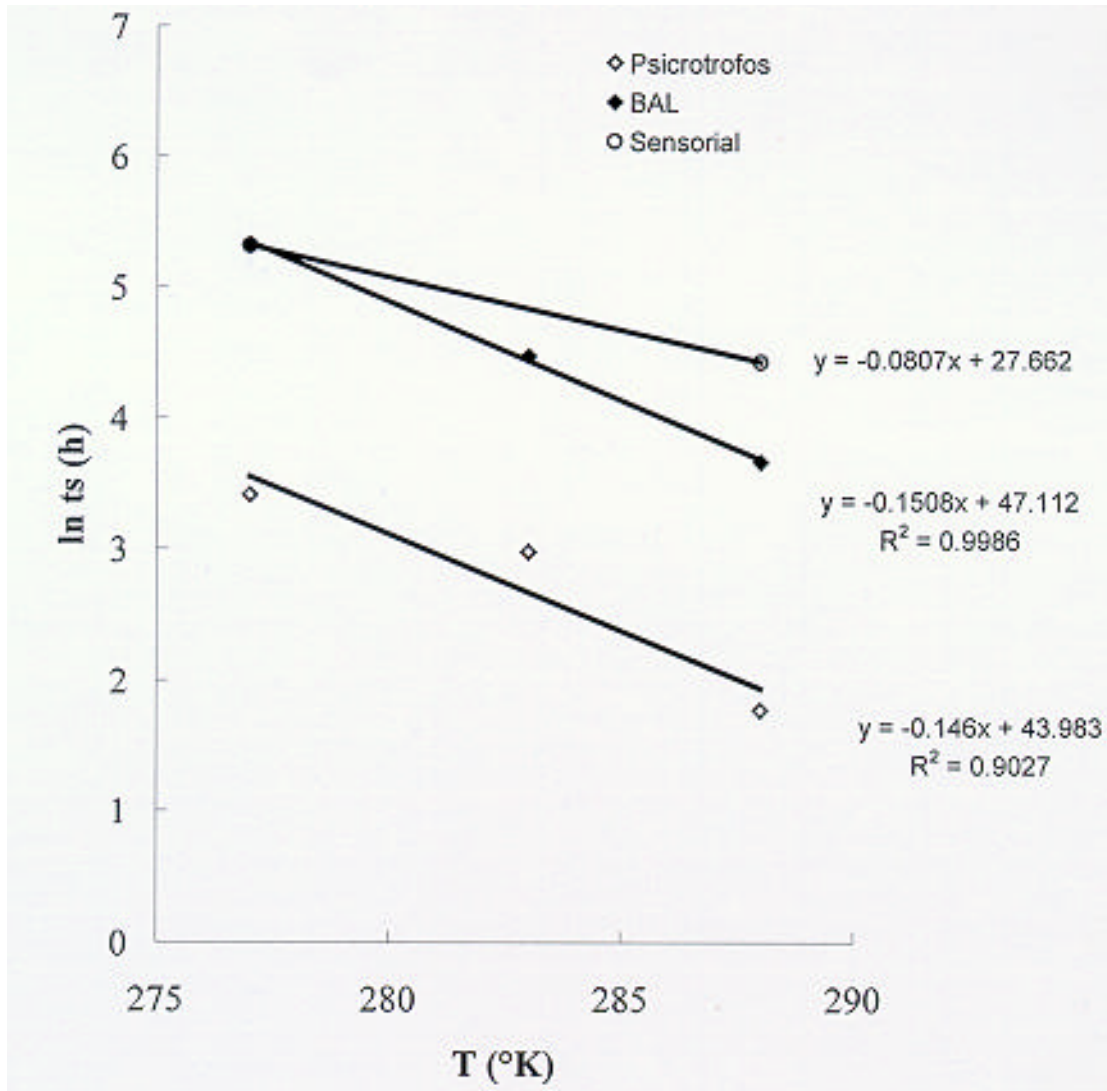


Figura 27. Recta de regresión lineal del tiempo de vida media ($\ln t_s$) para cada microorganismo y características sensoriales en función de la temperatura

En la Figura 27 se pretende relacionar el tiempo de vida media con la temperatura para poder predecir este parámetro a temperatura diferentes a las analizadas. Como ya se ha descrito en Métodos se partió de la base de que la representación del logaritmo neperiano del tiempo de vida media (ts) frente a la temperatura describe en una recta, tal que :

$$ts=t_0 * e^{-a*(T-T_0)}$$

donde t_0 es el tiempo de vida media de la temperatura de referencia, que se fijó a 4°C, T es la temperatura considerada en grados Kelvin y T_0 la temperatura de referencia y a es la pendiente

Adaptando los datos de las ecuaciones de regresión (Figura 27) se obtienen las siguiente fórmulas :

Según las característica organolépticas (para 204 horas a 4°C y 84 horas a 15°C):

$$ts=201.97 * e^{-0.0807*(T-277)}$$

Según las bacterias psicrotrofas (ver Tabla 14):

$$ts=34.50 * e^{-0.146*(T-277)}$$

Según bacterias acidolácticas (ver Tabla 14):

$$ts=208.60 * e^{-0.1508*(T-277)}$$

Los valores predictivos obtenidos se pueden ver en el Anexo I Tabla 55 y 56.

1. EVOLUCIÓN DE LA MICROFLORA NATURAL EN LA ENSALADA ALMACENADA EN REFRIGERACIÓN (4°C).....	129
1.1 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS (BAL).....	129
1.2 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS AEROBIOS PSICROTROFOS.....	129
1.3 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS Y MOHOS.....	129
1.4 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE E. COLI. Y COLIFORMES TOTALES Y FECALES	129
1.5 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES	129
1.6 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SALMONELLA	129
1.7 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CLOSTRIDIOS SULFITO REDUCTORES	129
1.8 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE AEROMONAS HYDROPHILA	129
1.9 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENTEROCOCOS	129
1.10 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS	129
1.11 RECUENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE YERSINIA ENTEROCOLÍTICA.....	129
2. COMPORTAMIENTO Y MONITORIZACIÓN DE BACTERIA ACIDOLÁCTICAS Y PSICROTROFAS EN ENSALADAS ENVASADAS CON ATMÓSFERA MODIFICADA DURANTE SU ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	129
2.1 BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS.....	129
2.2 BACTERIAS PSICROTROFAS	129
3. COMPORTAMIENTO Y MONITORIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS INOCULADOS EN CONDICIONES DE REFRIGERACIÓN Y ENVASADO	129
3.1 PSEUDOMONAS FLUORESCENS	129
3.2 LEUCONOSTOC MESENTEROIDES.....	129
3.3 LISTERIA MONOCYTOGENES	129
3.4 AEROMONAS HYDROPHILA.....	129
4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y ORGANOLÉPTICOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE ENSALADAS ENVASADAS CON ATMÓSFERA MODIFICADA.....	129
4.1 CONCENTRACIÓN DE GASES EN EL INTERIOR DEL ENVASE DURANTE EL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	129
4.2 EVOLUCIÓN DEL PH EN LOS ENVASES DURANTE EL ALMACENAMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS	129
4.3 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	129
5. APLICACIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS.....	129
5.1 MODELOS DE CRECIMIENTO BACTERIANO	129
5.1.1 Programa Dmodel (Baranyi y Roberts, 1994, Baranyi et al., 1993) :	129
5.1.2 Programa "Gomplamu" de Cupper (1993).....	129
5.1.3 Programa MFSmodel (Whiting y Buchanan, 1994).....	129
5.2 CURVAS DE INHIBICIÓN Y MUERTE CELULAR.....	129
5.3 AJUSTE DE LA EVOLUCIÓN DEL CO ₂	129
5.4 AJUSTE DE LA EVOLUCIÓN DEL PH	129
5.5 RELACIÓN LINEAL CON LA TEMPERATURA	129
5.6 EFECTO INHIBITORIO DEL CO ₂ Y DEL PH.....	129
5.7 DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE VIDA COMERCIAL. RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LAS ALTERACIONES ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICOQUÍMICAS CON LA PRESENCIA DE BACTERIAS ALTERANTES Y PATÓGENAS	129

Tabla 14. Tiempo (horas) (ts) necesario para alcanzar el nivel de 10^6 ufc/g por los microorganismos analizados en función de la temperatura

Microorganismo	Temperatura (°C)	Nivel a alcanzar (ufc/g)	Tiempo (ts)(horas)
Bacterias psicrotrofas	4	10^6	30.26
	10	10^6	19.62
	15	10^6	5.91
Bacterias acidolácticas	4	10^6	205.69
	10	10^6	87.69
	15	10^6	39.03
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4	$<10^5$	48.85
	15	10^6	23.21
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	incr., 10^3	781.85
<i>Listeria monocytogenes</i>	4	incr. 10^3	2157.00

VI. DISCUSSION

VI. DISCUSION

1. Evolución de los microorganismos en las ensaladas durante su almacenamiento en refrigeración a 4 °C

El contenido inicial de microorganismos en el alimento es un factor importante a controlar, pues a mayor número de microorganismos más rápidamente se degradará la ensalada y acortará su vida útil. En las ensaladas almacenadas a 4 °C el recuento inicial de bacterias psicrotrofas fue de $3.15 \cdot 10^5$ ufc/g y $8 \cdot 10^2$ ufc/g de bacterias acidolácticas (Tablas 1 y 3). No se detectaron levaduras en los cultivos iniciales y solo a partir de las 156 horas se logró detectar 10^3 ufc/g.

Es difícil la comparación de los resultados obtenidos con los descritos por otros autores debido a la diversidad de ensaladas, utilización de atmósfera modificada o controlada, diferentes concentraciones iniciales de gases, diferentes películas plásticas con distintas permeabilidades además de otros factores.

Los recuentos de microorganismos obtenidos en este estudio son relativamente bajos comparados con los niveles hallados por Marchetti et al. (1992) quienes en ensalada mixta, encontraron 10^8 ufc/g de bacterias psicrotrofas, 10^4 a 10^5 ufc/g de levaduras, 10^5 a 10^7 ufc/g de bacterias acidolácticas, y $10^{4.45}$ a $10^{6.51}$ ufc/g de coliformes totales.

En general los niveles de bacterias psicrotrofas y bacterias acidolácticas hallados fueron inferiores a los descritos por otros autores. Carlin et al. (1989) encontraron en ensaladas de zanahoria niveles iniciales de 10^4 ufc/g de bacterias acidolácticas, algo superiores a los hallados en este trabajo y en el caso de levaduras muy superiores, pues apenas se pudo detectar su presencia en este estudio. Garg et al. (1990) encontraron niveles iniciales de bacterias psicrotrofas de $1.8 \cdot 10^5$ ufc/g en ensalada de col, $2.7 \cdot 10^5$ ufc/g en lechuga y $9.5 \cdot 10^4$ ufc/g en zanahoria. Estos mismos autores hallaron $1.4 \cdot 10^3$ ufc/g de bacterias acidolácticas en ensalada de zanahoria lo que si coincide con este estudio.

Las diferencias en el contenido inicial de recuentos de los diferentes grupos microbianos pueden ser debidas fundamentalmente a que se trabajó con ensaladas de diferente composición, con diferentes cargas iniciales de materia

prima, y con envases de diferentes películas plásticas, utilización de atmósfera modificada o controlada y diferentes concentraciones iniciales de gases. Las técnicas del procesado también tienen gran influencia ya que, entre otros factores, el lavado contribuye a la eliminación de una cantidad considerable de microorganismos (Hobbs y Gilbert, 1978, Adams et al., 1989, Garg et al., 1990).

1.1 Bacterias acidolácticas y psicrotrofas

Las bacterias acidolácticas que partieron de aproximadamente $7 \cdot 10^2$ ufc/g ascendieron linealmente hasta el final del período de análisis donde alcanzaron $9.6 \cdot 10^5$ ufc/g en muestras mantenidas a 4 °C (Tabla 1). Estos microorganismos parecen encontrar un medio muy propicio para su desarrollo, e incluso crecieron en mayor medida que las bacterias psicrotrofas, pues se incrementaron en tres logaritmos en lugar de dos que alcanzaron los psicrotrofos. Probablemente las bacterias acidolácticas se vieron favorecidas por el aumento del contenido de CO₂ dentro del envase. Marchetti et al. (1992) describieron la evolución de bacterias acidolácticas a 5 °C en ensaladas de zanahoria que partieron de 5.5 logaritmos decimales hasta alcanzar casi 8 a los 7 días (168 horas). Estos mismos autores hallaron menor desarrollo de dichos microorganismos en ensalada mixta (zanahoria, achicoria roja y blanca, y oruga) que partieron de aproximadamente $7 \cdot 10^6$ ufc/g hasta alcanzar $5 \cdot 10^7$ ufc/g. Manvell y Ackland (1986) observaron que en ensaladas mixtas (lechuga, zanahoria, col, cebolla y pimientos) almacenadas a 7 °C las bacterias acidolácticas ascendieron desde 3 logaritmos decimales hasta aproximadamente 8 logaritmos a los 8 días (192 horas).

Entre la bacterias acidolácticas se aisló en mayor proporción *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus brevis* (Tabla 2). Esto coincidiría con lo hallado por Carlin et al. (1989) quienes además observaron que *Leuconostoc mesenteroides* alteraba en mayor medida las ensaladas de zanahorias debido a las fermentaciones lácticas.

El recuento de bacterias psicrotrofas observado partió de $1.07 \cdot 10^5$ ufc/g y ascendió lentamente hasta alcanzar $1.48 \cdot 10^7$ ufc/g al final del periodo de observación en las muestras mantenidas a 4 °C (Tabla 3). En el estudio realizado por Abdul-Raouf et al. (1993) los niveles alcanzados por las bacterias psicrotrofas en ensaladas en atmósfera modificada oscilaron alrededor de 10^9 ufc/g a los 14 días partiendo de $10^{4.89}$ ufc/g. Manvell y Ackland (1986) observaron que en ensaladas almacenadas a 7 °C las bacterias psicrotrofas

ascendían desde 5 logaritmos decimales hasta aproximadamente 9 logaritmos a los 8 días (192 horas).

Los microorganismos aislados inicialmente en las ensaladas, descritos en Resultados (Tabla 2), señalan la predominancia del género *Pseudomonas* entre las bacterias psicrotrofas, lo que coincide con lo descrito por varios autores (Marchetti et al., 1992, Willcox et al., 1993).

En el estudio de la evolución de los microorganismos se hallaron diferencias significativas en el recuento de bacterias acidolácticas y bacterias psicrotrofas entre octubre y noviembre con las muestras elaboradas en abril-mayo, encontrando en estas últimas de 0.5 a 2 logaritmos más elevados. Estas diferencias pueden deberse a la diferente carga microbiana inicial que contienen los vegetales en cada estación del año y al incremento de la temperatura ambiente, esto coincidiría con los resultados hallados en verdura fresca por García-Villanova Ruiz et al. (1987) en el mercado granadino.

1.2 Levaduras y mohos

No se detectó la presencia de mohos en las ensaladas, debido posiblemente a la atmósfera modificada donde el CO₂ ascendió rápidamente y el O₂ se consumió a alrededor de las 48 horas o antes, inhibiendo su desarrollo esta ausencia de oxígeno. Otros autores como Manvell y Ackland (1986) sí los aislaron.

La presencia de las levaduras fue escasa comparado con otros estudios. Marchetti, et al. (1992) hallaron niveles iniciales de alrededor 10⁵ y 7*10⁶ ufc/g y ascendieron hasta alrededor 5*10⁶ y 7*10⁸ ufc/g según el tipo de ensalada. Manvell y Ackland (1986) hallaron que el 17 % de los aislamientos de ensaladas fueron levaduras frente al 78 % de bacterias y el 5 % de mohos. Sin embargo Garg et al. (1990) hallaron pocas levaduras y mohos, alrededor de 10² ufc/g.

Las levaduras, presentes en la microflora vegetal de la materia prima, son eliminadas con mayor facilidad durante el lavado debido probablemente a la acción del hipoclorito.

1.3 *Escherichia coli* y coliformes totales

Se encontraron oscilaciones muy grandes en los recuentos, desde apenas detectar 10 células hasta alcanzar 5 logaritmos en algunos puntos de análisis

(Tabla 4). Probablemente se pueda deber a la técnica utilizada pues los coeficientes de variación hallados son amplios (5.42 % - 91 %). Manvell y Ackland (1989) describieron recuentos de coliformes totales que partiendo de 4 logaritmos decimales alcanzaron 8 a los 8 días.

En contra de lo descrito por Brocklehurst et al. (1987) que aislaron *Escherichia coli* de ensaladas, en el presente estudio todas las muestras fueron negativas a *E. coli*. Abdul-Raouf et al. (1993) demostraron la posibilidad de que este microorganismo se desarrolle en ensaladas envasadas en atmósfera modificada. El no haberlo detectado aquí, podría interpretarse que fue debido a un buen procesamiento del alimento. El lavado de los vegetales con hipoclorito reduce las poblaciones bacterianas (Adams et al., 1989, Garg et al., 1990). Hobbs y Gilbert (1978) recomendaron lavar los vegetales con 60-80 mg de hipoclorito por litro para retirar los posibles patógenos entéricos.

1.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes fue aislado del 26 % de las muestras almacenadas (Tabla 5). Este es un porcentaje elevado teniendo en cuenta que se trata de un microorganismo patógeno que debería ser eliminado durante el lavado e inhibido por el hipoclorito. También es elevado en comparación con los hallazgos de Sizmur y Walker (1988), en el 7 % de las muestras vegetales contaminadas y Steinbruegge et al. (1988) en el 9 % en cabezas de lechuga. Heisick et al. (1989) encontraron el 1 % de coles crudas contaminadas con *Listeria monocytogenes*. Otros autores no hallaron *Listeria monocytogenes* en vegetales crudos (Petran et al., 1988, Farber et al., 1989)

Se debe resaltar que el método utilizado, por el que se logró aislar *Listeria monocytogenes* incluyó preenriquecimiento y doble enriquecimiento selectivo, pues por siembra directa no se logró aislar ($<10^2$ ufc/g). Ello indica que el nivel de recuento es muy bajo, por lo que en este nivel no se puede asegurar que constituyera un riesgo inminente para la salud, aunque no ha sido determinado cual es la cantidad de células capaces de desarrollar la enfermedad en la población. Si bien el agua con que fueron lavados los vegetales contenía hipoclorito sódico (100 ppm) no fue suficiente para eliminar este microorganismo.

Podría pensarse que la fuente de contaminación pudo proceder de los vegetales que habrían sido obtenidos en tierras fertilizadas con abono animal o

bien regadas con aguas contaminadas con residuos fecales. Sin embargo, Van Renterghem et al. (1991) no aislaron *Listeria monocytogenes* de muestras de abono animal y tierra y sugirieron que este microorganismo podría permanecer en la rizosfera de la planta. Ralovich (1984) sugirió que sería importante considerar la transmisión por manipuladores. Müller (1990) detectó 0.8 % de heces humanas de individuos sanos contaminadas con *Listeria monocytogenes*.

Es de considerable importancia controlar la ausencia de este microorganismo en productos que se van a consumir crudos y serán destinados en gran parte a restauración colectiva. Son varios los casos de brotes asociados a la ingestión de vegetales, entre los que cabe destacar los siguientes: el ocurrido en 1979 en Massachusetts, asociado a la ingestión de lechuga, tomate y apio, donde la cepa aislada fue *4b* (Ho et al. , 1986), en Canadá en 1981, asociado al “coleslaw” (ensalada vegetal con mayonesa) (Schlech et al., 1983), en Australia (Souëf y Walters, 1981) y en Austria en 1986 (Allerberger, 1988), por consumo de vegetales crudos.

La cepa aislada en nuestro estudio fue la *3a* y *3b*. Sizmur y Walker (1988) aislaron entre otras la cepa *4b* de ensaladas listas para su consumo y Ho et al. (1986) de “coleslaw” causante del brote registrado en Boston (Massachusetts). Steinbruegge et al. (1988) aislaron el serotipo *I* de las ensaladas de lechuga y Heisick et al. (1989) aislaron el serotipo *1a* de coles.

1.5 Salmonella, Staphylococcus aureus, Aeromonas hydrophila, Yersinia enterocolítica, clostridios sulfitorreductores y enterococos

De las muestras almacenadas no se detectó ninguno de estos microorganismos a excepción de *Aeromonas hydrophila* en una muestra. La falta de aislamiento de este microorganismo es un indicio de que el control de producción y la calidad higiénica de la materia prima eran adecuados.

Marchetti et al. (1992) describieron niveles de $10^{5.74}$ ufc/g de *Aeromonas hydrophila* en ensalada mixta y 10^6 ufc/g en ensalada de zanahoria. Berrang et al. (1989c) han descrito el crecimiento de *Aeromonas hydrophila* en vegetales crudos almacenados a 4 °C.

Yersinia enterocolítica fue aislada de ensaladas por Brocklehurst et al. (1987) aunque en baja proporción, pero estos investigadores no aislaron ni enterococos ni *Staphylococcus aureus*.

2. Comportamiento y monitorización de bacterias acidolácticas y psicrotrofas en ensaladas durante su almacenamiento a 10 y 15 °C

Las muestras fueron almacenadas a 4 °C (descrito en el punto anterior), 10°C y 15 °C donde se vio claramente el efecto que tiene la temperatura sobre el crecimiento de los microorganismos (Tablas 1 y 3).

Se observó que el recuento de bacterias acidolácticas fue mayor al aumentar la temperatura, mientras que el aumento de la concentración de CO₂ no pareció limitar el crecimiento e incluso pareció estimularlo. Esto concuerda con las observaciones realizadas por otros autores (Jones, 1989, Carlin et al. 1990a) donde la atmósfera modificada podría favorecer el desarrollo de las bacterias acidolácticas. En este caso la temperatura parece ser el factor limitante y no el CO₂. Carlin et al. (1989) hallan recuentos finales (14 días) que oscilaron entre 10⁴ y 10⁸ ufc/g ensaladas mantenidas a 10 °C. Esta gran variabilidad no fue observada en el presente trabajo donde los coeficientes de variación oscilaron entre 0.5 % y 21 % a lo largo del almacenamiento.

La diferencia significativa entre los lotes analizados en mayo y abril con los de octubre y enero, puede ser debida al aumento de la temperatura en primavera que favorece el mayor desarrollo microbiano, lo que coincide con lo observado por Marchetti et al. (1992).

En este estudio no se observó el efecto inhibitorio de la col sobre bacterias acidolácticas descrito por Kyung y Fleming (1994) posiblemente debido a que en las coles troceadas no se libera dicho factor o bien la concentración del mismo es insuficiente para inhibir el crecimiento bacteriano.

Si comparamos el crecimiento de las bacterias psicrotrofas a 4 °C y a 15°C observamos que partiendo de la misma concentración (aprox. 10⁵ ufc/g), se llegó, en las ensaladas almacenadas a 4 °C, a niveles superiores a 10⁷ ufc/g mientras que a 15 °C disminuyeron hasta 10^{3.44} ufc/g. Aquí influyen varios factores, entre ellos la concentración de CO₂, el pH y la temperatura. La concentración del CO₂ alcanzada parece ser la causante de este descenso sumado al efecto causado por la bajada del pH que también se produce. Este descenso del pH en alimentos con atmósfera modificada también fue descrito por Daniels et al. (1985), Farber (1991) y Abdul- Raouf et al. (1993).

3. Evolución de microorganismos alterantes inoculados en la ensalada

3.1 *Pseudomonas fluorescens*

Las ensaladas inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* almacenadas a 4°C y a 15 °C, partieron con un recuento inicial de aproximadamente 9 logaritmos decimales, debido a la suma del inóculo más la flora natural de la ensalada. En ambas temperaturas los recuentos descendieron, y de forma más pronunciada a 15 °C (Tabla 6).

El recuento de *Pseudomonas fluorescens* en las ensaladas no inoculadas almacenadas a 4 °C es semejante al recuento de microorganismos psicrotrofos hasta las 48 horas. A partir de este momento continúa en ligero descenso y transcurre en forma parecida al recuento de *Pseudomonas fluorescens* inoculado (Anexo II, Figuras 1, 6 y 7). El contenido gaseoso en el interior de la ensalada a las 48 horas de almacenamiento a 4 °C era del 19 % de CO₂ y ausencia de O₂ (Anexo I, Tabla 18). En las ensaladas almacenadas a 15 °C el recuento de *Pseudomonas fluorescens* inoculado descendió rápidamente y a partir de las 36 horas de almacenamiento el descenso de *Pseudomonas fluorescens* inoculado fue prácticamente paralelo al de *Pseudomonas fluorescens* control. A las 36 horas el contenido de CO₂ era de 30 % y 0 % de O₂. El microorganismo dejó de detectarse a partir de las 132 horas en las ensaladas inoculadas mientras que en las no inoculadas fue a las 180 horas (Anexo II, Figuras 1, 6 y 7). Eyles et al. (1993) describieron un descenso ligero del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* a 5°C, pH 5.5 y con 40 % CO₂ similar al observado en el presente trabajo en las ensaladas no inoculadas, sin embargo a 15 °C observaron crecimiento en las mismas condiciones.

Posiblemente los porcentajes observados de CO₂ constituyan un factor inhibitorio del crecimiento de este microorganismo. Diversos autores afirman que el efecto inhibitorio del CO₂ aumenta al disminuir la temperatura (Gill y Tan, 1979, Enfors y Molin, 1981). Si esto fuese así, a 4 °C debería inhibirse antes que a 15 °C, sin embargo, lo observado, fue que muere antes a 15 °C porque la concentración era mucho mayor, posiblemente debido a que si bien a menor temperatura la solubilidad del CO₂ es mayor, la concentración final acumulada a 15 °C sigue superándola. Willocx et al. (1993) observaron un efecto sinérgico del CO₂ y de la temperatura sobre la tasa de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*. Otro factor que puede haber contribuido es el descenso rápido del

pH que se produce a 15 °C. Eyles et al. (1993) encontraron un efecto sinérgico entre el CO₂ y el descenso del pH, además de la temperatura, no encontrando apenas diferencias entre el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en medios aerobios con pH de 5.5 y 6.8 y sí en cambio observaron un efecto inhibitorio más pronunciado cuando se almacenaron con 40 % de CO₂.

En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas de los atributos organolépticos entre aquellas muestras inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* y las no inoculadas, tanto en las almacenadas a 4°C como a 15 °C. Esto está de acuerdo con lo descrito por Carlin et al. (1989) quienes no encontraron relación entre la presencia de *Pseudomonas fluorescens* y el deterioro de las ensaladas de zanahoria. Esto contrasta con las afirmaciones de que pseudomonas serían las principales alterantes de estas ensaladas (Denis y Picoche, 1986, Brocklehurst, et. al., 1987). Incluso Willocx et al. (1993) sugirieron que el contenido de *Pseudomonas fluorescens* podría ser indicador de alteración de ensaladas de IV Gama.

En la evolución de *Pseudomonas fluorescens* control e inoculadas y el grupo de bacterias psicrotrofas (Anexo II, Figuras 1, 6 y 7), se observó que a 4°C descendió el número de *Pseudomonas fluorescens* mientras que aumentaron las bacterias psicrotrofas. A 15 °C ambas curvas son descendentes pero *Pseudomonas fluorescens* comienza a inhibirse mucho antes que el grupo de los microorganismos psicrotrofos. Esto hace pensar que este microorganismo es sustituido por otro al final del almacenamiento, hecho que se hace más acusado a 15 °C. Los microorganismos aislados al final del almacenamiento fueron *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas putrida* y *Enterobacter intermedium*. Según Eyles et al. (1993), *Ps. putrida* es menos sensible a la concentración de CO₂ que *Ps. fluorescens*. Carlin et al. (1989) aislaron *Pseudomonas fluorescens* a los 14 días de almacenar ensalada de zanahoria pero en mayor proporción *Erwinia herbicola*, *Enterobacter intermedium* y otras Enterobacteriaceas.

Las pseudomonas necesitan oxígeno para crecer, pueden multiplicarse con 1 % de oxígeno y según Parry (1993), altas concentraciones de CO₂ las inhiben. Sin embargo, Wells (1974) señala que *Pseudomonas* es una bacteria anaerobia facultativa y en determinadas condiciones puede crecer en ausencia de oxígeno. La disminución e inhibición que sufre *Pseudomonas fluorescens* en nuestro estudio fue observada también por Carlin et al. (1989). Así también, Clark y

Burki (1972), observaron que las pseudomonas disminuían con ausencia de O₂ desde 10⁴ ufc/g hasta dejar de detectarse a las 80 horas a 22 °C.

El 55 % de CO₂ parece decisivo en la reducción brusca de la bacterias psicrotrofas a 15 °C (Figura 7). El número de *Pseudomonas fluorescens* inoculada desciende desde el primer momento y parece adaptarse cuando llega a 35 % de CO₂ a 4 °C y en este caso el interior del envase no supera el 40 % de CO₂ (Anexo I, Tabla 18). A 15 °C deja de detectarse *Pseudomonas fluorescens* a las 108 horas lo que coincide con una concentración de CO₂ de aproximadamente 50 %. Eyles et al. (1993) observaron que niveles de 20 % de CO₂ a 5 °C o a 15 °C inhibía el desarrollo de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putrida*.

En nuestro estudio se observa que la concentración de CO₂ afecta el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* inoculada, provocando la inhibición desde el inicio del almacenamiento. Esta inhibición desde el principio del experimento podría ser debida a problemas de adaptación de la cepa inoculada al nuevo medio con un pH por debajo del óptimo, (según Zwietering et al., 1992a) el pH óptimo sería 7.8 y mínimo de 4.7) y un incremento constante del CO₂. Por otro lado, Enfors y Molin (1981) consideran que la inhibición del CO₂ no está influida por el rango de pH de 5.7 a 6.7, rango que comprende el pH de las ensaladas a 4 °C. Palleroni (1986) describe que *Pseudomonas* inhibe su crecimiento a pH 4.5. Este pH es alcanzado en las ensaladas almacenadas a 15 °C a las 108 horas coincide con el último tiempo de detección de *Pseudomonas fluorescens* inoculada y podría ser la causa determinante de esta inhibición.

3.2 *Leuconostoc mesenteroides*

En las ensaladas almacenadas a 4 °C el recuento de *Leuconostoc mesenteroides* inoculado describió un ascenso hasta alcanzar los 5.5 logaritmos, coincidiendo con un 18 % de CO₂ y la ausencia de oxígeno, para luego estabilizarse (Anexo II, Figura 4).

La evolución de *Leuconostoc mesenteroides* a 15 °C se ve favorecida por la temperatura y se incrementa rápidamente hasta estabilizarse alrededor del logaritmo 7, que coincide con el momento en que el CO₂ alcanza el 30 %. El CO₂ a esa temperatura siguió aumentando hasta alcanzar el 60 %. Esto concuerda con lo observado por Carlin et al. (1990a) donde *Leuconostoc mesenteroides* alcanzó mayor desarrollo cuando las ensaladas fueron envasadas en atmósfera

modificada que cuando se envasaron en aire, lo que demuestra que el CO₂ favorece su desarrollo.

Leuconostoc mesenteroides produce ácido láctico y acético, etanol y CO₂ por lo que se le ha considerado como microorganismo alterante de las ensaladas (Carlin et al., 1989). Sin embargo en este estudio, no se observaron diferencias significativas entre la apariencia de las ensaladas inoculadas y las control.

Garvie (1986) describe que a pH 4.8 *Leuconostoc mesenteroides* no crece, sin embargo la ensalada alcanza ese pH a las 60 horas de almacenada a 15°C y los recuentos de este microorganismo se mantienen en torno a 7 unidades logarítmicas. Podría ser que el hecho de encontrarse en una atmósfera modificada lo protegiese del efecto inhibitorio del pH de la misma forma que la presencia de CO₂ favorece su crecimiento (Carlin et al., 1990a).

4. Evolución de microorganismos patógenos inoculados en ensalada

4.1 *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila se estabilizó durante el almacenamiento de la ensalada a 4 °C en torno al logaritmo 3.5. El efecto de la temperatura junto con el aumento de la concentración de CO₂ parecen inhibir su desarrollo si bien permiten que sobreviva.

Marchetti et al. (1992) observaron evoluciones similares de *Aeromonas hydrophila* en ensaladas no inoculadas a partir de 10^{4.2} ufc/g que luego de un pequeño ascenso a las 48 horas se estabilizó alrededor 4 unidades logarítmicas. Berrang et al. (1989c) describen niveles de 10⁷ ufc/g en ensaladas no inoculadas y en las inoculadas subieron 4 logaritmos a lo largo del almacenamiento.

A 15 °C describió un ascenso brusco, rozando los 10⁸ ufc/g a las 24 horas del análisis para luego descender hasta dejar de detectarse a las 156 horas. El descenso se hizo aparente a partir de las 36 horas cuando el contenido de CO₂ era del 28 %. El contenido de CO₂ pudo ser determinante en el descenso, y el porcentaje final de CO₂ a 4 °C coincidió con el descenso de pH que, a 15 °C alcanzó a bajar hasta 3.91.

El 100 % de CO₂ no inhibe el crecimiento de *Aeromonas hydrophila* según Jones (1989), por lo que la atmósfera modificada no sería la causante del

descenso, sino el pH en la ensalada que sí podría ser el causante de esta inhibición celular. Se ha descrito que *Aeromonas hydrophila* es sensible a partir de pH 6 (Palumbo, 1988) y en nuestro estudio presentaba valores de 5.63 a las 36 horas del almacenamiento a 15 °C.

4.2 *Listeria monocytogenes*

Se utilizaron dos técnicas de recuento directo, como se ha descrito en Métodos, con el fin de conocer si la técnica del NMP utilizando medio Fraser podría ser un método adecuado en este alimento para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* y así facilitar la posibilidad de su uso como control en la industria. Se observó que su sensibilidad es mucho menor que la siembra directa en Oxford, detectándose en todo momento un logaritmo por debajo del Oxford.

El hecho de que durante el tiempo de almacenamiento apenas remontara un logaritmo al final de las 300 horas de análisis demuestra que *Listeria monocytogenes* sobrevive perfectamente en las condiciones de atmósfera modificada de la ensalada pero que no crece en gran medida. Esto concuerda con los estudios realizados por otros autores donde la atmósfera modificada parece tener poco o ningún efecto sobre el desarrollo de *Listeria monocytogenes* (Beuchat et al., 1986, Berrang et al., 1989b, Beuchat y Brackett, 1990, Kallander et al., 1991). Beuchat et al. (1986) y Conner et al. (1986) describieron la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 5 °C en jugo de coles en medio aerobio, por lo que debe existir un factor inhibitorio en este vegetal. También se han descrito otros efectos inhibitorios que ejerce la zanahoria frente a este microorganismo (Nguyen-the y Lund, 1991, Beuchat et al., 1994) y algunas bacteriocinas producidas por bacterias acidolácticas (Lewus et al., 1991).

No se observó deterioro de la ensalada antes del período de la fecha de caducidad (144 horas) indicada por el fabricante. Esto hace que el riesgo de que se desarrolle este microorganismo aumente ya que este sistema de almacenamiento en atmósfera modificada permite almacenar el alimento más tiempo sin deteriorarse y daría tiempo a que crezca *Listeria monocytogenes* (Ryser y Marth, 1991).

5. Determinación de los parámetros fisicoquímicos y organolépticos de la ensalada durante el almacenamiento en refrigeración

5.1 Concentración de gases en el interior del envase durante el almacenamiento a diferentes temperaturas

Las muestras almacenadas a 4 °C son las que alcanzan menor concentración de CO₂ al final del período de experimentación, un 28 % de CO₂. A 10 °C, si bien la concentración inicial era la misma, los gases describieron una línea ligeramente curva ascendente hasta llegar a 43 % de CO₂ y a 15 °C se alcanzaron las mayores concentraciones de CO₂, cerca del 61 %.

El aumento de la concentración de CO₂ en el interior del envase se debe fundamentalmente a dos factores, la respiración vegetal y el metabolismo microbiano, que aumentan al aumentar la temperatura. Incluso algunos autores han demostrado que es aun mayor en vegetales troceados que enteros (Bolin et al., 1977). Pero también influye de forma importante la permeabilidad de la película plástica que permite mayor o menor intercambio gaseoso.

Estudios realizados por Brocklehurst et al. (1987) en ensaladas con diferentes ingredientes (lechuga, col, zanahoria, cebolla y pimiento) almacenadas a 7 °C describen concentraciones detectadas al final de la vida útil comercial de 4 a 6 % de CO₂ y 10 a 17 % O₂ y en otro tipo de ensalada (col, zanahoria, maíz dulce, apio, pimientos y berros) la concentración fue de 8 a 16 % de CO₂ y 0 a 3 % de O₂, que contrasta con los datos obtenidos en nuestro estudio (Anexo I, Tablas 14 y 15). Probablemente estas diferencias se deban por un lado a la diferente composición y por otro a la diferente permeabilidad de la película plástica. En ensaladas de zanahoria almacenadas a 10 °C se ha descrito que el O₂ disminuyó desde 21 % a 1.5 % de O₂ a los 14 días, fecha de caducidad. El CO₂ aumentó desde un 0.03 % a 10 % y 35 % (Carlin et al., 1989)

Se compararon las bolsas inoculadas con las no inoculadas y se detectaron diferencias significativas ($p < 0.001$) en el contenido gaseoso. Sin embargo, entre todas las ensaladas inoculadas con algún microorganismo no se detectaron diferencias significativas. Ninguno de los microorganismos parece ejercer un efecto significativo sobre la producción del gas. La fermentación láctica de *Leuconostoc*, donde se libera CO₂, no parece tener un efecto importante en el aumento del gas. Tampoco se observó que *Aeromonas hydrophila* tuviera efecto

sobre la producción de gas como se esperaba. El hecho de que existan diferencias simplemente entre las muestras no inoculadas e inoculadas puede ser debido al hecho de contener mayor número de microorganismos en su interior.

Se podría deducir que la respiración vegetal es el mayor contribuyente en la producción de gases.

5.2 Evolución del pH en los envases durante el almacenamiento a diferentes temperaturas

El pH se mantuvo constante, alrededor de 6, en las muestras almacenadas a 4 °C y 10 °C, en cambio se observó un pronunciado descenso en aquellas almacenadas a 15 °C, que a las 12 horas llegó a valores de pH de 4 (Anexo I Tabla 22). A pH igual o menor a 6 el ácido carbónico se disocia en bicarbonato e ion hidrógeno produciendo un ligero descenso del pH (Jones, 1989, Kader et al., 1989). Por otro lado las fermentaciones lácticas de las bacterias acidolácticas también contribuyen a este descenso del pH.

El descenso del pH observado, en las ensaladas almacenadas a 15 °C, aunque más moderado, coincide con lo descrito por Abdul-Raouf et al. (1993) en ensaladas zanahoria donde a los 7 días alcanza el pH 4 a 12 °C y en la lechuga se mantiene alrededor de 7.

Este descenso del pH en alimentos con atmósfera modificada también fue descrito por Daniels et al., (1985) y Farber (1991).

5.3 Características organolépticas

Durante el almacenamiento de las ensaladas a diferentes temperaturas se observó las características del aspecto en general, el color, si presentaban pardeamiento en la superficie de corte, textura e hinchazón de la bolsa como se describe en Métodos.

En general, se apreció gran diferencia de apariencia entre las ensaladas almacenadas a 4 °C y a 15 °C deteriorándose más rápidamente al aumentar la temperatura de almacenamiento como era de esperar y como han observado Abdul-Raouf et al. (1993). Estos autores no observaron deterioro en la ensalada de zanahoria almacenada a 4 °C hasta los 14 días, y apenas un poco deterioradas las almacenadas a 12 °C, y a los 3 días las almacenadas a 21 °C ya estaban claramente alteradas (Anexo I, Tabla 24).

No se encontraron diferencias significativas entre las ensaladas inoculadas y control. Este hecho hace que se replantee el papel alterativo de los microorganismos (*Pseudomonas fluorescens* y *Leuconostoc mesenteroides*) a los que otros autores atribuyen dicho papel (Denis y Pinoche, 1986, Brocklehurst et al., 1987, Carlin et al., 1990a, Willocx et al., 1993).

6. Aplicación de modelos predictivos de crecimiento

6.1 Determinación del período de vida comercial. Relación existente entre las alteraciones organolépticas y fisicoquímicas con la presencia de bacterias alterantes y patógenas.

La vida comercial de la ensalada de IV Gama varía de 6 a 14 días según el fabricante y dependiendo de los ingredientes. Las muestras analizadas en este estudio tienen asignada una vida comercial de 7 días. Según Huxsoll et al. (1989) la vida media en vegetales desde el punto de vista organoléptico debería determinarse como el tiempo en el que uno de los atributos sensoriales se vuelve inaceptable. Basándonos en esto, a 4 °C y a las 156 horas de almacenamiento, las características de color dejan de ser aceptables. Sin embargo ya a las 48 horas las bolsas almacenadas a 15 °C presentaban abombamiento excesivo por lo que estos tiempos tendrían que ser considerados como fin de la vida útil del producto a estas temperaturas.

En este estudio se tomó como referencia de aceptación por parte del consumidor del producto cuando las medias de los atributos sensoriales analizados alcanzaran el valor 2. Así resultó que en las ensaladas no inoculadas almacenadas a 4 °C a las 204 horas aún era aceptable (fin del período de experimentación) y a las 84 horas de almacenamiento a 15 °C dejaron de ser atractivas. Bolin et al. (1977) describieron que a los 17 días las ensaladas de lechugas troceadas almacenadas a 5 °C y a los 11 días las mantenidas a 10 °C perdían las características sensoriales óptimas para su venta.

Las medias de los valores sensoriales a lo largo del almacenamiento de las ensaladas no inoculadas fueron ajustados a ecuaciones de regresión. A partir de estas ecuaciones se calculó el tiempo en que los valores de los atributos organolépticos alcanzara el valor 2. Por lo tanto, la vida media de las ensaladas almacenadas a 4 °C sería de 304 horas (aprox. 13 días) (Figuras 8 y 9). A 15 °C

sería de menos de 101 horas (aprox. 4 días). Otros autores han establecido el valor medio de 6 en una escala hedónica del 1 al 9 (King et al., 1986) o el valor 5 (Bolin et al., 1977). Si comparamos los tiempos obtenidos a partir de la ecuación de regresión y los obtenidos a partir del análisis sensorial, se aprecia una gran diferencia, por lo que no parece recomendable en este estudio utilizar los primeros (a partir de la regresión) para posteriores consideraciones.

En el momento en que la ensalada almacenada a 15 °C se considera inaceptable (84 horas), los recuentos de bacterias psicrotrofas y bacterias acidolácticas se encontrarían entre $3.55 \cdot 10^7$ y $5.5 \cdot 10^7$ ufc/g respectivamente, por lo tanto el nivel máximo de microorganismos a detectar como indicador de próxima alteración del alimento debe ser inferior a este valor. En las ensaladas almacenadas a 4 °C, a las 204 horas, todavía en condiciones aceptables, los recuentos oscilaron entre $9.33 \cdot 10^5$ y $5.25 \cdot 10^6$ ufc/g. Por lo tanto, el valor de 10^6 ufc/g sugerido como valor microbiológico para determinar el fin de vida útil del producto, por diversos autores, concuerda con los datos obtenidos.

Comparando los resultados sensoriales con el crecimiento microbiano (Figura 25) se observa que a las 144 horas (caducidad del producto según la casa comercial) el nivel de bacterias psicrotrofas alcanza cerca de 10^7 ufc/g, bacterias acidolácticas y *Leuconostoc mesenteroides* se encuentran alrededor de 10^5 ufc/g, *Pseudomonas fluorescens* alrededor de 10^6 ufc/g, *Aeromonas hydrophila* se incrementó respecto a su nivel inicial, en un logaritmo y *Listeria monocytogenes* alrededor de medio logaritmo. A las 204 horas, tiempo final de este estudio, el nivel de bacterias psicrotrofas y *Leuconostoc mesenteroides* es el mismo que el descrito a las 144 horas, las bacterias acidolácticas llegan a 10^6 ufc/g, y *Pseudomonas fluorescens* está por debajo de 10^6 ufc/g *Aeromonas hydrophila* se habría incrementado en dos unidades logarítmicas y *Listeria monocytogenes* en cerca de una.

Para determinar cual sería el nivel microbiano y su técnica de detección que sirvan para establecer el final de la vida útil comercial sería necesario primero identificar los principales microorganismos alterantes. En el presente trabajo no se pudo verificar que fuesen *Pseudomonas fluorescens* y *Leuconostoc mesenteroides* los principales causantes del deterioro de las ensaladas, como han citado otros autores (Carlin et al., 1989, Membre y Burlot, 1994). Christiansen y King (1971) hallaron en el 36 % de las muestras de ensaladas envasadas en atmósfera modificada niveles de mesófilos superiores a 10^6 ufc/g. Anderson et al.

(1989) reconocen que este nivel de 10^6 ufc/g es arbitrario y que se deben tener en cuenta muchos factores del alimento en cuestión. En su estudio observan que para aceptar el 80 % del muestreo de diferentes alimentos, el nivel límite debía ser 10^7 ufc/g y establecer entre 10^6 y 10^7 ufc/g como margen. Notermans et al. (1993) mencionan como norma general el rechazo del producto con un recuento igual o superior a 10^6 ufc/g.

Las ensaladas almacenadas a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, presentaban alteraciones a las 84 horas con niveles de bacterias psicotrofas y bacterias acidolácticas superiores a las 7.5 unidades logarítmicas (Figura 26).

En la Figura 27 se representa el logaritmo natural de los tiempos de vida media (ts) frente a la temperatura. Los valores alcanzados por bacterias acidolácticas coinciden, o son los más próximos, con el momento de alteración del alimento. Se obtienen predicciones de vida media tales que a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sería de 202 horas, el cual sobrepasaría con el establecido por el fabricante de 144 horas (7 días desde su fabricación) (Anexo I, Tabla 55).

Por todos estos resultados se podría establecer como nivel indicador de principio de alteración el llegar al nivel 10^6 ufc/g de bacterias acidolácticas que en las muestra almacenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ no se alcanzó durante el período de estudio y a 15°C se alcanzó rápidamente.

6.2 Evolución de bacterias psicotrofas y acidolácticas

Los datos ajustados por la ecuación del Programa DModel dieron menor error residual cuadrado que el de Gompertz, por ello el ajuste elegido fue el primero.

Los modelos de crecimiento que mejor se ajustan a la temperatura de refrigeración son los descritos por Arrhenius (McMeekin et al., 1993) y Ratkowsky et al. (1982), que son los que se han aplicado en este trabajo. Al no tener suficientes puntos, solo tres correspondientes a las tres temperaturas, no se puede valorar cual de ellos es mejor, pero la segunda ecuación se ha descrito como la más adecuada para crecimiento de microorganismos a temperatura de refrigeración (Stannard et al., 1985) ya que mantiene una relación lineal entre la temperatura óptima de crecimiento y la mínima (Ratkowsky et al., 1982). El rango de temperatura de este trabajo, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ está por debajo de la temperatura óptima de ambos grupos microbianos. Así aplicando la ecuación de

Ratkowsky obtenemos que la temperatura mínima (T_{\min}) calculada fue de 266.11°K (7°C) para bacterias acidolácticas y 250.85 °K (-22 °C) para bacterias psicrotrofas. Ratkowsky et al. (1982) clasifica los microorganismos en cuatro grupos según la temperatura mínima de crecimiento calculada (T_{\min}) por su ecuación. Así los microorganismos psicrófilos tendrían T_{\min} menores que 261° K (-12 °C), en los psicrotrofos oscilaría este valor entre 261 °K y 269 °K (-12 a -4°C), en los mesófilos entre 270°K y 280°K (-3 °C y 7 °C) y en los termófilos entre 290 °C y 296 °C (17 °C y 23°C). Los valores de T_{\min} calculados suelen ser de 2 a 3 °C menores que la temperatura a la cual el crecimiento es realmente observado, por ello se denomina temperatura conceptual (McMeekin et al., 1993). Las bacterias acidolácticas se encuentran dentro del rango de los psicrotrofos pero el valor hallado para las bacterias psicrotrofas en las ensaladas se encuentran por debajo por lo que pertenecerían al rango de los psicrófilos. El valor de T_{\min} hallado para las bacterias psicrotrofas puede ser debido a la exactitud del modelo realizado y debido a que sería necesario tener más puntos para definir mejor la recta.

Los modelos predictivos hallados en la literatura científica están basados en el crecimiento de microorganismos en medios de cultivo, pero pocos son los que han utilizado mezcla de ellos y menos en los que se haya intentado obtener modelos a partir de un grupo heterogéneo de bacterias psicrotrofas o acidolácticas como el contenido en la ensalada.

6.3 Evolución de *Pseudomonas fluorescens*

Los datos obtenidos en el experimento fueron ajustados adecuadamente por el Programa DModel. Buchanan et al (1993b) sugieren el uso de un modelo lineal de inactivación o supervivencia, realizando un regresión lineal, que aplicado da los resultados expuestas en las Tablas 50 a 54 del Anexo I y en las Figuras 6 y 7 del Anexo II. Las predicciones son semejantes por ambos modelos. Los parámetros generados por el DModel no tuvieron sentido al tratarse de una curva de inhibición en vez de crecimiento, a excepción de la tasa específica de crecimiento, la cual adquiere un valor negativo, por ello se escogieron los valores predictivos hallados por el modelo de inactivación lineal. El propio autor del Program DModel no recomienda el uso de este programa en curvas de inhibición debido a que la base teórica de su ecuación se basa en el crecimiento microbiano. La diferencia del valor D, tiempo que tarda la población bacteriana en disminuir

una unidad logarítmica, en *Pseudomonas fluorescens* inoculado, 5 veces más que los no inoculados en las muestras almacenadas a 4°C es importante. *Pseudomonas fluorescens* no inoculado tarda más en ser inhibido lo que puede deberse a su mejor adaptación al medio vegetal. En las muestras almacenadas a 15°C el valor de D es similar, 10 a 16 horas.

A muy bajas temperaturas el sistema se encuentra en un estado de transición entre el crecimiento y la inhibición, y desde el punto de vista matemático se puede describir como una zona de caos, que aparece de forma aleatoria y donde los resultados obtenidos son irregulares (Peterson, 1988). Las tasas específicas calculadas para *Pseudomonas fluorescens* no inoculado son mayores, a ambas temperaturas que las halladas en las ensaladas inoculadas. Esto probablemente sea debido a la adaptación al medio vegetal que ya poseen las bacterias presentes naturalmente en las ensaladas (Tabla 13).

Se están realizando estudios sobre el efecto que puede tener la fase (de adaptación, exponencial o estacionaria) en que se encuentre la población bacteriana al ser inoculada, sobre el crecimiento posterior en el medio. Este podría ser otro factor que influyera en el desarrollo del microorganismo en la ensalada .

Marchetti et al. (1992) realizaron estudios en jugos de zanahoria y lechuga inoculados con este microorganismo, pero en medio aerobio, por lo que obtuvieron tasas específicas de crecimiento de 0.56 h⁻¹ en zanahoria y 0.72 h⁻¹ en lechuga. Estos mismos autores hallaron crecimiento negativo de *Pseudomonas fluorescens* en jugos de achicoria roja, lo que indica el efecto de los ingredientes sobre la tasa específica de crecimiento y la densidad máxima alcanzada en la ensaladas.

Las diferencias observadas entre las tasas específicas de crecimiento obtenidas por otros autores en medios de cultivo, con atmósfera modificada y las halladas en este estudio pueden ser debidas en primer lugar al diferente medio en donde crecen los microorganismos, alimento y medio de cultivo. En segundo lugar por la atmósfera modificada que varía durante el almacenamiento de la ensalada y no es controlada como en el caso de los otros estudios, todo lo cual hace que los datos obtenidos sean de difícil comparación (Gill y Tan, 1979).

Eyles et al. (1993) observaron que la atmósfera modificada hacía disminuir la tasa específica de crecimiento y la población máxima a alcanzar,

pero no afectaba al tiempo de adaptación. En cambio, Willocx et al. (1993), observaron que el efecto del CO₂ sobre *Pseudomonas fluorescens* era sobre el tiempo de adaptación y la mejor forma de alargarlo y disminuir la población máxima era a través de la temperatura.

Enfors y Molin (1981) describen un efecto inhibitorio del CO₂ (RI) sobre la tasa específica de crecimiento casi del 90 % a 5 °C y de 68 % a 15 °C para *Pseudomonas fragi*, observando que el efecto aumenta al disminuir la temperatura. El efecto del CO₂ parece más eficaz al disminuir la temperatura debido a que el gas se disuelve mejor en el alimento o medio. Enfors y Molin (1981) describieron la solubilidad del CO₂ (Cs) tal que, RI/Cs, el efecto inhibitorio del CO₂ era independiente de la temperatura. Estos autores obtuvieron valores cercanos al 60 % para *Pseudomonas fragi*. Hao y Brackett (1993) sí observaron crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en atmósfera controlada con 10 % de CO₂ y 5 % de O₂ en medio de cultivo, mientras que Eyles et al. (1993) observaron que con 20 % y 40 % de CO₂ *Pseudomonas fluorescens* era inhibido. A pesar de que pseudomonas son microorganismos aerobios, pueden crecer en alimentos o medios complejos donde las concentraciones de O₂ son de 0.1 % (Clark y Burki, 1972). Eyles et al. (1993) sugieren que la atmósfera modificada ejerce un doble efecto donde el CO₂ reduce la tasa específica de crecimiento y la poca cantidad de O₂ reduce la población final. El pH puede tener su efecto sinérgico con el gas sobre pseudomonas, que a 15 °C descendió bruscamente, lo que coincidiría con lo expresado por Eyles et al. (1993).

Willocx et al. (1993) relacionaron mediante una regresión exponencial o lineal la tasa específica de crecimiento con el % de CO₂ controlado en el medio. En nuestro trabajo se trata de una atmósfera que se modifica en el tiempo por lo que se relacionó la tasa específica de crecimiento con las pendientes de la evolución del gas.

6.4 Evolución de *Leuconostoc mesenteroides*

Los datos ajustados por la ecuación del Programa DModel dieron menor error residual cuadrado que el de Gompertz, por ello el ajuste elegido fue el primero.

Carlin et al. (1990a) estimaron el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* en medio de jugo de zanahoria y atmósfera controlada. Calculando μ_{max} a partir de sus gráficas obtenemos que a 10 °C es igual a 0.12 h⁻¹. Este

valor es incluso menor que el obtenido en el presente estudio a 4 °C (0.18h^{-1}) y a 15 °C (0.27h^{-1}). Esto concuerda con lo afirmado por Carlin et al. (1990a) donde el CO_2 estimularía el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* en vez de inhibirlo, si bien el número final de microorganismos sí se ve afectado por la temperatura, alcanzando menor número a menor temperatura.

A partir de las ecuaciones de Arrhenius y Ratkowsky (ver Resultados) se puede obtener la predicción en la ensalada analizada a 10 °C, con el valor de 0.21h^{-1} , menor que los 0.12h^{-1} obtenido por Carlin et al. (1990a) donde la atmósfera contenía menor concentración de CO_2 .

6.5 Evolución de *Aeromonas hydrophila*

Lo mismo que para *Leuconostoc mesenteroides* el error residual cuadrado del ajuste de los datos por la ecuación del programa DModel fue inferior al obtenido en el modelo de Gompertz.

Si comparamos los valores predictivos obtenidos por DModel a 4 y 15 °C, 0.01h^{-1} y -0.087h^{-1} respectivamente, con los valores predichos por el programa MFSmodel, 0.037h^{-1} y 0.177h^{-1} , respectivamente (Tabla 12), se observa un comportamiento completamente diferente. Lo único semejante es el rápido ascenso que sufre a 15 °C aunque no llega a niveles tan altos como los predichos.

Marchetti et al. (1992) realizaron estudios en jugos de zanahoria y lechuga inoculado con este microorganismo pero en medio aerobio por lo que obtuvieron tasa específica de crecimiento a 5 °C de 2.51h^{-1} en zanahoria y 1.77h^{-1} en lechuga, al igual que Palumbo et al. (1992) que obtuvieron una tasa específica de crecimiento de 0.322h^{-1} .

6.6 Evolución de *Listeria monocytogenes*

Se eligió la ecuación del Programa DModel por su menor error residual en comparación con la función de Gompertz.

A través del programa MSFmodel se obtuvo una predicción de tasa específica de crecimiento muy superior a la hallada experimentalmente, 0.033h^{-1} frente al 0.003h^{-1} hallado, debido entre otras cosas al diferente medio, medio de cultivo, en que esta basado el model y la presencia de factores inhibidores en los ingredientes de la ensalada y descritos por otros autores (Nguyen y Lund, 1991, Beuchat et al., 1994).

Las tasas específicas de crecimiento halladas contrastan con las observadas o calculadas por otros autores en medio aerobio, 0.02 h^{-1} (Buchanan et al., 1989), 0.0207 h^{-1} (Petran y Zottola, 1989), 0.0213 h^{-1} (Wijtzes et al., 1993) y anaerobio 0.07 h^{-1} (Buchanan et al., 1989). El comportamiento de este microorganismo en medio de cultivo no parece ser fácilmente extrapolable a un medio como la ensalada en atmósfera modificada. El conjunto de factores que interviene parece ser más complejo que los factores analizados hasta ahora en la literatura científica.

Este alimento puede considerarse como de alto riesgo dentro de la clasificación de alimentos realizada por la ICMSF, por su consumo directo en fresco y donde *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila* pueden desarrollarse y multiplicarse. Otro factor a tener en cuenta es que estos alimentos en gran parte van destinados a comedores y restauración colectiva por lo que llegarían a hospitales, colegios, asilos, etc. Si bien es cierto que *Listeria monocytogenes* es un microorganismos ubicuo frecuente en el medio ambiente y por lo tanto no se puede garantizar su ausencia en este tipo de productos, sería recomendable la determinación sistemática de *Listeria monocytogenes* y constatar su ausencia en 25g de muestra, teniendo en cuenta el tipo de alimento de que se trata, de consumo directo y a la población a la que suele llegar.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

PRIMERA. Las ensaladas de IV Gama pueden considerarse como de alto riesgo dentro de la clasificación de alimentos de ICMSF, por su consumo directo en fresco y donde *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophila* pueden desarrollarse y multiplicarse. Otro factor a tener en cuenta es que estos alimentos en gran parte van destinados a restauración colectiva (hospitales, colegios, asilos) que constituyen una población de riesgo importante. Si bien es cierto que *Listeria monocytogenes* es un microorganismo ubicuo, frecuente en el medio ambiente y que por lo tanto no se puede garantizar su ausencia en este tipo de productos, sería recomendable la determinación sistemática de *Listeria monocytogenes* y constatar su ausencia en 25g de muestra.

SEGUNDA. El hecho de haber aislado *Listeria monocytogenes* de las ensaladas, sugiere que se debe exigir más atención en el control de la higiene en general durante todo el proceso de elaboración de las ensaladas de IV Gama. La materia prima debe ser controlada además de por su calidad, también por su procedencia, constatando que el suelo no haya sido fertilizado con abono contaminado y que en el riego no se han usado aguas residuales contaminadas, lo que debería convertirse en una exigencia por parte de la industria al productor.

TERCERA. Consideramos esencial el control del lavado de los vegetales con cloro activo (100 mg/l fue el utilizado por el fabricante), como único paso importante destinado a la disminución de la población bacteriana inicial, aunque no es suficiente garantía de la ausencia de gérmenes patógenos como se ha podido comprobar en este estudio.

CUARTA. Se corroboró el efecto de la temperatura en la vida útil comercial de las ensaladas, resaltando la importancia que tiene el mantenimiento de la cadena de frío durante el procesado, distribución y venta. La refrigeración de los productos terminados deben mantenerse a 4 °C o inferior. A 4°C las muestras presentaron características organolépticas aceptables hasta las 204 horas, y a 15°C a las 84 horas ya dejan de ser aceptables.

QUINTA. Los microorganismos aislados con mayor frecuencia en las muestras de ensaladas de IV Gama fueron, entre las bacterias acidolácticas, el *Leuconostoc mesenteroides* y entre las bacterias psicrotrofas *Pseudomonas fluorescens*, no habiéndose podido comprobar el papel alterativo atribuido a estos dos microorganismos.

SEXTA. La concentración en gases en muestras inoculadas no presentan diferencias significativas, entre ellas que nos permitan deducir el papel de cada uno de los diferentes microorganismos inoculados en la producción del gas. La fermentación láctica producida por *Leuconostoc mesenteroides*, con liberación de CO₂, no parece tener un efecto importante en el aumento de la concentración del gas. Se podría deducir entonces que la respiración vegetal es el mayor contribuyente en la producción de gases.

SEPTIMA. La concentración de CO₂, ausencia de oxígeno y descenso del pH en el interior de los envases ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los microorganismos presentes, a excepción de bacterias acidolácticas y *Leuconostoc mesenteroides* que parece favorecer su crecimiento. *Pseudomonas fluorescens* deja de detectarse y las bacterias psicrotrofas disminuyen su nivel en las ensaladas almacenadas a 15°C, tras alcanzar en su interior un 50 % de CO₂, ausencia de O₂, y un valor de pH alrededor de 4.2.

Aeromonas hydrophila a esa misma temperatura es inhibido a partir del 23 % de la concentración de CO₂ y la ausencia de O₂, momento en que el pH se sitúa en torno a 5.8. Los mohos no se desarrollan en este alimento debido probablemente al consumo rápido del oxígeno en el interior del envase durante el almacenamiento. La levaduras apenas fueron detectadas a las 156 horas de almacenamiento por lo que no parecen formar parte importante de la microflora alterante.

OCTAVA. En general las tasas específicas de crecimiento halladas no coinciden con las descritas en la literatura científica. Esto podría ser debido a que el conjunto de factores que intervienen afectando al crecimiento microbiano en este alimento varía con el tiempo, por lo que el comportamiento de los microorganismos es diferente al que tendrían si cada variable estuviese fija. Esto pone de manifiesto la gran necesidad que existe de crear un modelo predictivo dinámico que se adecue a estas variaciones durante el almacenamiento.

NOVENA. El tiempo de vida útil comercial de las ensaladas podría ser determinado utilizando como indicador de proximidad de alteración del alimento, el nivel de 10⁶ ufc/g de bacterias acidolácticas. La predicción obtenida del tiempo de vida útil comercial fue de 202 horas en ensaladas almacenadas a 4°C, por lo que se deduce que teóricamente se podría alargar la vida útil del producto alrededor de dos días más que los establecidos por el fabricante, lo que concuerda con lo observado en el análisis sensorial.

DECIMA. El Programa DModel permite un fácil y rápido ajuste de los datos, la presentación de gráficos con las curvas predictivas y la determinación si se desea o no que se incluya en el cálculo, el tiempo de adaptación o la asíntota superior, lo que repercute en un mejor ajuste de los datos a la curva predictiva, por lo que se obtuvieron

valores residuales menores, que los obtenidos por la función de Gompertz. Las curvas donde se produce muerte celular, si bien se ajustan mejor que el modelo de inactivación lineal, no es recomendado su uso en curvas que no sean de crecimiento, debido a que todos los valores de los parámetros calculados, a excepción de la tasa específica de crecimiento negativa dieron valores erróneos, ya que la base mecanística con la que fue confeccionado el modelo partió del concepto de crecimiento y no de inhibición.

DECIMOPRIMERA. Los valores de las temperaturas mínimas calculadas (T_{\min}) halladas por el modelo de Ratkowsky indican que se necesitan mayor número de puntos (más de tres temperaturas) para asegurarse de obtener resultados correctos a partir de la ecuación desarrollada por éste.

DECIMOSEGUNDA. El modelo de Baranyi y Roberts (DModel) se ajusta con mayor precisión a la evolución de *Pseudomonas fluorescens*. Sin embargo, no es recomendado su uso en curvas que no sean de crecimiento.

DECIMOTERCERA. La base de datos del Programa MFSmodel está confeccionada a partir del crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo donde las variables son fijas durante la incubación. No se ha podido validar los datos hallados en este estudio con los resultados obtenidos por el programa debido probablemente a que en la ensalada las variables a considerar (gases y pH) no pueden ser fijados durante el tiempo de almacenamiento.

VIII. RESUMEN

VIII. RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la evolución de los diferentes grupos microbianos presentes naturalmente en ensaladas envasadas con atmósferas modificadas almacenadas en temperatura de refrigeración (4°C), como así también, el efecto de la temperatura (10 °C y 15 °C) en el crecimiento de los dos grupos microbianos predominantes, bacterias acidolácticas y psicrotrofas, con lo que se comprobó la importancia de mantener la cadena de frío en este tipo de alimento durante su distribución y venta. Al mismo tiempo se monitorizó la evolución de las características organolépticas, de la concentración de los gases y del pH.

Las ensaladas fueron inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* y *Leuconostoc mesenteroides* para estudiar con mayor facilidad el comportamiento de las bacterias psicrotrofas y acidolácticas respectivamente, a dos temperaturas, 4 y 15°C y así poder utilizar estos datos para la modelización. No se pudo comprobar el efecto alterativo de *Pseudomonas fluorescens* y *Leuconostoc mesenteroides* atribuido por otros autores. *Listeria monocytogenes* fue aislada de la ensalada de IV Gama naturalmente mediante doble preenriquecimiento, lo que indica que se debe prestar más atención a este microorganismo en este tipo de producto destinado en parte a la restauración colectiva, para conocer cual era la posibilidad de que este microorganismos se desarrolle en este alimento. Varios lotes de muestras fueron inoculadas con *Listeria monocytogenes* y almacenadas a 4°C, observando que sobreviven pero no crecen rápidamente. Otros lotes de muestras fueron inoculadas con otro microorganismo patógeno, *Aeromonas hydrophila*. Este microorganismo sobrevivió en las ensalada mantenidas a 4°C pero fue inhibido a 15°C. La concentración de CO₂, la ausencia de oxígeno y el descenso del pH en el interior del envase de las ensaladas ejercieron un efecto inhibitorio sobre todos los microorganismos en general excepto en el caso de las bacterias acidolácticas y *Leuconostoc mesenteroides* que se vieron favorecidas.

A partir de los datos de crecimiento microbiano obtenidos de las muestras inoculadas o no inoculadas se calcularon las curvas predictivas mediante el Programa DModel para posteriormente aplicar el modelo de Ratkowsky. Se obtuvieron predicciones de vida media en función de la temperatura de almacenamiento, siendo de 202 horas en ensaladas mantenidas a 4 °C y de 84 horas en las mantenidas a 15 °C.

IX. BIBLIOGRAFÍA

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Raouf, U., Beuchat, L. y Ammar, M. (1993). Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 on Salad Vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1999-2006.
- Abeyta, C., Kaysner, C., Wekell, M., Sullivan, J. y Stelma, G. (1986). Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an outbreak of foodborne illness. *J. Food Prot.*, 49, 643-646.
- Adair, C. y Briggs, P. (1993). The concept and application of expert systems in the field of microbiological safety. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 263-267.
- Adair, C., Kilsby, D. y Whittall, P. (1989). Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the Square Root model for predicting bacteria growth in foods. *Food Microbiol.* 6, 7-18.
- Adams, M., Hartley, A. y Cox, L. (1989). Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiol.*, 6, 69-77.
- Adams, M., Little, C. y Easter, M. (1991). Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.*, 71, 65-71.
- Agbonlahor, D., Shonekanm R., Kazak, W. y Coker, A. (1982). *Aeromonas* food poisoning in Nigeria: a case report. *Cent. Afr. J. Med.*, 28, 36-38.
- Agger, W. (1986). Diarrhea associated with *Aeromonas hydrophila*. *Pediatr. Infect. Dis.*, 5 (Suppl.), S106-S108.

- Agger, W., McCormick, J. y Gurwith, M. (1985). Clinical and microbiology features of *Aeromonas hydrophila* -associated diarrhea. J. Clin. Microbiol., 21, 909-913.
- Allerberger, F. (1988). Listeriosis in Austria - Report of an outbreak in Austria 1986. Tenth Int. Symp. on Listeriosis, Pecs, Hungary, , 22-26 de Agosto, Abstr. 20.
- Altewegg, M. y Geiss, H. (1989). *Aeromonas* as a human pathogen. CRC Crit. Rev. Microbiol., 16, 253-286.
- Altewegg, M., Martinelli-Lucchini, G., Lüthy-Hottenstein, J. y Rohrbach, M. (1991). *Aeromonas* -associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 10, 44-45.
- Alli, I. (1993). Quality control of MAP products. Cap.5, 101-113. Parry, R., eds. Principles and applications of modified atmosphere packaging of food. Blackie Academic & Professional. London.
- Anderson, P, Rutenberg, G. y Bowen, N. (1989). Assessing Food Quality. The difficulty in establishing microbiological standards. J. Environ. Health, September/October, 79-82
- Avery, S., Hudson, J. y Penney, N. (1994). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on Normal Ultimate pH Beef (pH 5.3-5.5) at Abusive Storage Temperatures by Saturated Carbon Dioxide Controlled Atmosphere Packaging. J. Food Prot., 57, 4, 331-333, 336.
- Baker, D. y Genigeorgis, C. (1990). Predicting the Safe Storage of Fresh Fish Under Modified Atmospheres with Respect to *Clostridium botulinum* Toxigenesis by Modeling Length of the Lag Phase of Growth. J. Food Prot., 53, 2, 131-140.
- Baranyi, J. y Roberts, T. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol., en vías de publicación

- Baranyi, J., McClure, P., Sutherland, J. y Roberts, T. (1993a). Modeling bacterial growth responses J. Ind. Microbiol. 12, 190-194
- Baranyi, J., Roberts, T. y McClure, P. (1993b). Some properties of a nonautonomous deterministic growth model describing the adjustment of the bacterial population to a new environment. IMA. J. Math. Appl. Med. Biol. 10, 293-299.
- Baranyi, J., Roberts, T. y McClure, P. (1993c). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. Food Microbiol., 10, 43-59
- Becroft, D., Farmer, K., Seddon, R., Sowden. R., Stewart, J, Vines, A. y Wattie, D. (1971). Epidemic listeriosis in the newborn. Br. Med. J., 3, 747-751.
- Berrang, M., Brackett, R. y Beuchat, L. (1989a). Growth of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on controlled atmosphere stored refrigerated fresh vegetables. Ann. Mtg., Inst. Food Technol., Chicago, IL, June 25-29, Abstr. 470.
- Berrang, M., Brackett, R. y Beuchat, L. (1989b). Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. J. Food Prot., 52, 702-705.
- Berrang, M., Brackett, R. y Beuchat, L. (1989c). Growth of *Aeromonas hydrophila* on Fresh Vegetables Stored under a Controlled Atmosphere. Appl. Environ. Microbiol., 55, 9, 2167-2171.
- Beuchat, L. (1991). Behavior of *Aeromonas* species at refrigeration temperatures. Int. J. Food Microbiol., 13, 217-224.
- Beuchat, L. y Brackett, R. (1990). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on Lettuce as Influence by Shredding, Chlorine Treatment, Modified Atmosphere Packaging and Temperature. J. Food Sci., 55, 755-758, 870.

- Beuchat, L., Berrang, M. y Brackett, R. (1990). Presence and public health implications of *Listeria monocytogenes* on vegetables. Cap. 25, 175-181. En: Miller, A., Smith, J. y Somkuti, G., eds. Topics in Industrial Microbiology. Foodborne Listeriosis. Elsevier. Amsterdam.
- Beuchat, L., Brackett, R., Hao, D. y Conner, D. (1986). Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. Can. J. Microbiol., 32, 791-795.
- Beuchat, L., Brackett, R. y Doyle, M. (1994). Lethality of Carrot Juice to *Listeria monocytogenes* as Affected by pH, Sodium Chloride and Temperature. J. Food Prot., 57, 6, 470-474.
- Bhaduri, S., Smith, P., Palumbo, S., Turner-Jones, C., Smith, J., Marmer, B., Buchanan, R., Zaikam, L. y Williams, A. (1991). Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry. Food Microbiol., 8, 75-78.
- Bhunja, A., Johnson, M. y Ray, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacterium produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol., 65, 261-268.
- Bille, J., Rocourt, J., Mean, F., Glauser, M. y el grupo "Listeria-Vaud". (1988). Epidemic foodborne listeriosis in Western Switzerland. II. Epidemiology, Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Los Angeles, CA, Oct. 23-26, Abstr. 1107.
- Blickstad, E. y Molin, G. (1983). Carbon dioxide as a controlled of the spoilage flora of pork with special reference to temperature and sodium chloride. J. Food Prot., 46, 756-763.
- Blickstad, E. y Molin, G. (1984). Growth and end-product formation in fermented cultures of *Brochothrix thermophacta* ATCC11509 and two psychrotrophic *Lactobacillus* spp. in different gaseous atmosphere. J. Appl. Bacteriol., 57, 213-220.

- Bolin, H., Stafford, A., King, A. y Huxsoll, C. (1977). Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. *J. Food Sci.*, 42, 5, 1319-1321.
- Bourne, M. (1989). Applications of Chemical Kinetic Theory to the Rate of Thermal Softening of Vegetables Tissue. Cap. 9, 98-110. *Quality Factors of Fruits and Vegetables*. Am. Chem. Soc.
- Brackett, R. (1987). Antimicrobial Effects of Chlorine on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 50, 12, 999-1003.
- Brackett, R. (1992). Shelf Stability and Safety of Fresh Produce as Influenced by Sanitation and Desinfection. *J. Food Prot.*, 55, 10, 808-814.
- Bratchell, N., McClure, P., Kelly, T. y Roberts, T. (1990). Predicting microbial growth: graphical methods for comparing models. *Int. J. Food Microbiol.*, 11, 279-288.
- Brocklehurst, T., Zaman-Wong, C. y Lund, B. (1987). A note on the microbiology of retail packs of prepared salad vegetables. *J. Appl. Bacteriol.*, 63, 409-415.
- Brody, A. (1993). The market. Cap. 2, 19-40. Parry, R., eds. *Principles and applications of modified atmosphere packaging of food*. Blackie Academic & Professional. London.
- Broughall, J. y Brown, C. (1984). Hazard analysis applied to microbial growth in foods: Development and application of three dimension models to predict bacterial growth. *Food Microbiol.*, 1, 13-22
- Broughall, J., Anslow, P. y Kilsby, D. (1983). Hazard analysis applied to microbial growth in foods: Development of mathematical models describing the effect of water activity. *J. Appl. Bacteriol.*, 55, 101-110.

- Brown, W. (1922). On the germination and growth of fungi at various temperatures and in various concentrations of oxygen and carbon dioxide. *Ann. Bot.*, 36, 257-283. Citado por Parry (1993)
- Buchanan, R. (1991). Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. *J. Food Safety*, 11, 123-134.
- Buchanan, R. (1992). Predictive Microbiology. Mathematical of Microbial Growth in Foods. *Food Safety Assessment*, 484, 250-260.
- Buchanan, R. y Golden, M. (1994). Interaction of Citric Acid Concentration and pH on the Kinetics of *Listeria monocytogenes* Inactivation. *J. Food Prot.*, 57, 7, 567-570.
- Buchanan, R. y Klawitter, L. (1990). Effect of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *J. Food Sci.* 55. 6, 1754-1756
- Buchanan, R. y Klawitter, L. (1991). Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *Int. J. food Microbiol.*, 12, 235-246
- Buchanan, R. y Palumbo, S. (1985). *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. *J. Food Safety*, 7, 15-29.
- Buchanan, R. y Phillips, J. (1990). Response Surface Model for Predicting the Effects of Temperature pH, Sodium Chloride Content, Sodium Nitrite Concentration and Atmosphere on the Growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 53, 5, 370-376
- Buchanan, R., Bagil. K., Goins, R. y Phillips, J. (1993a). Response surface models for the growth kinetics of *Escherichia coli* 0157:H7 *Food Microbiol.*, 10, 303:315

- Buchanan, R., Golden, M. y Whiting, R. (1993b). Differentiation of the effects of pH and lactic acid or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *J. Food Prot.*, 56, 474-478, 484.
- Buchanan, R., Smith, J., McColgan, C., Marmer, B., Golden, M. y Dell, B. (1993c). Response surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus* 196E. *J. Food Safety*, 13, 3, 159-175.
- Buchanan, R., Stahl, H. y Whiting, R. (1989). Effects and Interactions of Temperature, pH, Atmosphere, Sodium Chloride, and Sodium Nitrite on the Growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 52, 12, 844-851.
- Bula, Ch., Bille, J., Mean, F., Glauser, M. y el grupo "Listeria-Vaud" (1988). Epidemic food-borne listeriosis in Western Switzerland. I. Description of the 58 adult cases. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Los Angeles, CA. Oct. 23-26, Abstr. 1106.
- Burke, V., Robinson, J., Gracey, M., Peterson, D. y Patridge, K. (1984). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 361-366.
- Callister, S. y Agger, E. (1987). Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 249-253.
- Canfield, M., Walterspiel, J., Edwards, M., Baker, C., Wait, R. y Urteaga, J. (1984). An epidemic of perinatal listeriosis serotype 1b in Hispanics in a Houston Hospital. *Pediatr. Infect. Dis.* 4, 106.
- Carbonell, X. (1989). La IV Gama en España. *Horticultura*, 59, 33-46.
- Carbonnelle, B., Cottin, J., Parvery, F., Chambreuil, G., Kouyoumdjian, S., Lirzin, M. y Vincent, F. (1978). Epidemic de listeriose dans l'ouest de la France (1975-1976). *Revue Epidémiologique et de Sante Publique (Paris)*,

26, 451-467. (En McLauchlin, J. 1987. A review- *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans, J. Appl. Bacteriol. 63, 1-11).

Carlin, F., Nguyen-The, C., Cudennec, P. y Reich, M. (1989). Microbiology spoilage of fresh, ready-to-use grated carrots. Sci. Aliments., 9, 2, 371-386.

Carlin, F., Nguyen-The, C., Chambroy, Y. y Reich, M. (1990a). Effects of controlled atmospheres on microbial spoilage, electrolyte leakage and sugar content of fresh 'ready to used' grated carrots. Int. J. Food Sci. Technol, 25, 110-119.

Carlin, F., Nguyen-The, C., Hilbert, G. y Chambroy, Y. (1990b). Modified Atmosphere Packaging of Fresh, "Ready-to-use" Grated Carrots in Polymeric Films. J. Food Sci., 55, 4, 1033-1038.

CICYT ALI90-1216-E (1990): Flair: Concerted Action N°5 (COST 905) "Predictive modelling of microbial growth and survival in food". Crecimiento microbiano en espárragos (*asparagus officinalis*) refrigerados y envasados al vacío

CICYT ALI93-0216 (1993): Modelos para predecir la utilidad de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en la descontaminación de superficies cárnicas.

CICYT ALI93-0327. (1993): Modelos predictivos de crecimiento microbiano en ensaladas refrigeradas y envasadas en atmósferas modificadas.

CICYT ALI94-0079. (1994): Desarrollo de modelos matemáticos para predecir y garantizar la calidad y seguridad de productos obtenidos de especies piscícolas cultivadas.

- CICYT AMB94-0352 CO2-O2. (1994): Estudio de biosistemas mediante la simulación y la teoría de sistemas dinámicos complejos: aplicación a sistemas microbianos de interés agroalimentario.
- Clark, D. y Burki, T. (1972). Oxygen requirements of strains of *Pseudomonas* and *Achromobacter*. *Can. J. Microbiol.*, 18, 321-326.
- Collins-Thompson, D. y Rodríguez-López, R. (1980). Influence of sodium nitrite, temperature and lactic acid bacteria on the growth of *Brochothrix thermophacta* under anaerobic conditions. *Can. J. Microbiol.*, 26, 1416-1421.
- Conner, D., Brackett, R. y Beuchat, L. (1986). Effect of Temperature, Sodium Chloride and pH Growth of *Listeria monocytogenes* in Cabbage Juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1, 59-63.
- Cordier, J., Putallaz, T. y Cox, L. (1989). Impedimetric determination of activity of disinfectants and detergents on *Listeria*, Preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.*, 8, 293-297.
- Chandler, R. y McMeekin, T. (1985). Temperature function integration and the prediction of the shelf-life of milk. *Austral. J. Dairy Technol.*, March, 10-13.
- Charm, S., Learson, R., Ronsivalli, L. y Schwartz, M. (1972). Organoleptic technique predicts refrigeration shelf-life of fish. *Food Technol.*, 26, 65-68
- Chinnan, M. (1989). Modeling Gaseous Environment and Physiochemical Changes of Fresh Fruits and Vegetables in Modified Atmospheric Storage. *Quality Factors of Fruits and Vegetables. Am. Chem. Soc.*, 15, 189-20.
- Christiansen, L. y King, N. (1971). The Microbial Content of Some Salads and Sandwiches at Retail Outlets. *J. Milk Food Technol.*, 34, 289-293.

- Daniels, J., Krishnamurthi, R. y Rizvi, S. (1985). A Review of effects of Carbon Dioxide on Microbial Growth and Food Quality. *J. Food Prot.*, 48, 6, 532-537.
- Daud, H., McMeekin, T. y Olley, J. (1978). Temperature function integration and the development and metabolism of poultry spoilage bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 650-654
- Davey, K. (1991). Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 253-257
- Day, B. (1993). Fruit and vegetables. Cap. 6, 114-133. Parry, R., eds. Principles and applications of modified atmosphere packaging of food. Blackie Academic & Professional. London.
- De Simon, M., Pellicer, T. y Ferrer, M. (1994). Aislamiento de *Aeromonas spp.* en hortalizas frescas, 161. En: Resumen de Ponencias y Comunicaciones. 9º Congreso de Microbiología de Alimentos. SEM. Lérida.
- Denis, C. y Picoche, B. (1986). Microbiologie des légumes frais prédecoupés. *Ind. Aliment. Agric.*, Junio, 547-553.
- Dickson, J., Siraguag, G. y Wray, J. (1992). Predicting the growth of *Salmonella typhimurium* on Beef by Using the Temperature Function Integration Technique. *Appl. Environ., Microbiol.*, 58,3482-3487.
- Duh, Y. y Schaffner, D. (1993). Modeling the Effect of Temperature on the Growth Rate and Lag Time of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 56, 3, 205-210
- Eklund, T. y Jarmund, T. (1983). Microculture model studies on the effect of various gas atmospheres on microbial growth at different temperatures. *J. Appl. Bacteriol.*, 55, 119-125.

- El-Kest, S. y Marth, E. (1988). Inactivation of *Listeria monocytogenes* by chlorine. J. Food Prot., 51, 520-524.
- Eley, R. (1994). Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana. Acribia. Zaragoza.
- Enfors, S. y Molin, G. (1980). The effect of different gases on the activity of microorganisms. Cap. 24, 335-343.
- Enfors, S. y Molin, G. (1981). The influence of temperature on the growth inhibitory effects of carbon dioxide on *Pseudomonas fragi* and *Bacillus cereus*. Can. J. Microbiol., 27, 15-19.
- Enfors, S., Molin, G. y Ternström, A. (1979). Effect of packaging under carbon dioxide, nitrogen on air on the microbial flora of pork at 4°C, J. Appl. Bacteriol., 47, 197-208.
- Ercolani, G. (1976). Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. Appl. Environ. Microbiol., 31, 847-852.
- Eskin, M. (1989). Quality and Preservation of vegetables. CRC Press , Inc. Boca Raton, Florida
- Extrait du Bulletin Officiel de la République Française.(1992) Guide de Bonnes Pratiques Hygiéniques concernant les produits végétaux dits de la "Ive Gamme".
- Eyles, M., Moir, C. y Davey, J. (1993). The effects of modified atmospheres on the growth of psychotrophic pseudomonads on a surface in a model system. Int. J. Microbiol., 20, 97-107.
- Faoagali, J. y Schousboe, M. (1985). Listeriosis in Christchurch 1967-1984. New Zeal. Med. J. 98, 64-66.

- Farber, J. (1986). Predictive Modeling of Food Deterioration and Safety, 57-90. En: Pierson, M. y Stern, W., eds. Foodborne microorganisms y their toxins. Marcel Dekker Inc., Nueva York
- Farber, J. (1991). Microbiology aspects of modified atmosphere packing technology. A review. J. Food Prot., 54, 58.
- Farber, J., Sanders, G. y Johnston, M. (1989). A Survey of Various foods for the Presence of *Listeria* Species. J. Food Prot., 52, 7, 456-458.
- Farber, J., Warburton, D., Laffey, P., Purvis, U. y Gour, L. (1993). Modified-atmosphere Packaged Pasta. A microbiology quality assessment. Ital. J. Food Sci., 2, 157-167.
- Farrag, S. y Marth, E. (1989). Behavior of *Listeria monocytogenes* when incubated together with *Pseudomonas* species in tryptose broth at 7 and 13°C. J. Food Prot., 52, 536-539.
- Fernández, A., Reguera, J., Pedrero, M. y Gonzalo, M. (1994). Incidencia de Enterobacterias y *Pseudomonas* asiladas de lechugas, 94. En: Resumen de Ponencias y Comunicaciones. 9º Congreso de Microbiología de Alimentos. SEM. Lérida.
- Fischer, M. (1962). Listeriose- Häufung in Raume Bremen in den Jahren 1960 und 1961. Dtsch. med. Wochenschr., 87, 2682-2684.
- Flow Linkage Agro-Industrial Research, FLAIR (1993). Periodic Progress Report "Predictive Modelling of Microbial Growth and Survival in Foods" IFR.
- Fleming, D., Cochi, S., MacDonald, K., Brondum, J., Hayes, P., Plicaytis, B., Homes, M., Audurier, A., Broome, C. y Reingold, A. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. New Engl. J. Med. 312, 404-407.

- Foegeding, P y Busta, F (1983). Effect of carbon dioxide, nitrogen and hydrogen gases on germination of *Clostridium botulinum* spores. J. Food Prot, 46, 987.
- Foster, J. (1887). Ueber einige Eigenschaften leuchtender Bakterien. Centr. Bakteriolog. Parasitenk., 2, 337-340.
- Foster, J. (1892). Ueber die Entwicklung von Bakterien bei niederen Temperaturen. Centr. Bakt., 12, 431-436.
- Fraser, J. y Sperber, W. (1988). Rapid Detection of *Listeria* spp. in Food and Environmental Samples by Esculin Hydrolysis. J. Food Prot., 51, 10, 762-765.
- Frederickson, A., Rammkrishna, D. y Tshuya, H. (1967). Statistics and dynamics of procaryotic cell populations. Math. Biosc., 45, 159-173.
- Fu, B., Taoukis, P. y Labuza, T. (1991). Predictive Microbiology for Monitoring Spoilage of Dairy Products with Time-Temperature Integrators. J. Food Sci., 56, 5, 1209-1215
- García-Villanova Ruiz, B., Gálvez Vargas, R., García-Villanova, R. (1987). Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. Int. J. Food Microbiol. 4, 285-291.
- Gardini F., Castellari L. y Guerzoni M. (1990). Suitability of three instrumental methods for evaluating yeast cell viability in enology. Ital. J. Sci., 2, 103-111.
- Garg, N., Curey, J. y Splittstoesser, D. (1990). Effect of Processing Conditions on the Microflora of Fresh - Cut Vegetables. J. Food Prot., 33, 8, 701-703.
- Garvie, E. (1986). Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198^{AL} emend mut. char. Hucker and Pederson 1930, 66^{AL}, 1071-1075. En: Sneath, P., Mair,

N., Sharpe, M. y Holt, J, eds. 9th edición. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Genigeorgis, C. (1985). Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. *Int. J. Food Microbiol.*, 1, 237-251.

Genigeorgis, C., Martin, S., Franti, C. y Riemann, H. (1971a). Initiation of staphylococcal growth in laboratory media. *Appl. Microbiol.*, 21, 934-939

Genigeorgis, C., Nychas, S. y Loullis, C. (1977). Interaction of *Salmonella* with food environments. Proceedings, 7th Int. Symp., World Assoc. Vet. Food Hygienists, I, 269-274

Genigeorgis, C., Savoukidis, M. y Martin, S. (1971b). Initiation of staphylococcal growth in processed meat environments. *Appl. Microbiol.*, 21, 940-942.

George S., Lund, B. y Brocklehurst, T. (1988). The effect of pH and temperatures on inactivation of growth of *Listeria monocytogenes* . *Lett. Appl. Microbiol.*, 6, 153-156.

Gibson, A. y Roberts, T. (1982). Factors controlling the growth of *Clostridium* types A and B in pasteurized cured meats. IV The effect of pig breed, cut and batch of pork. *J. Food Technol.*, 17, 471-482

Gibson, A. y Roberts, T. (1986a). The effects of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of *Escherichia coli* and salmonellae in a laboratory medium. *Int. J. Food Microbiol.*, 3, 183-194.

Gibson, A. y Roberts, T. (1986b). The effects of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of *Clostridium perfringens* and faecal streptococci in a laboratory medium. *Int. J. Food Microbiol.*, 3, 195-210.

- Gibson, A., Bratchell, N. y Roberts, T. (1987). The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. Appl. Bacteriol.*, 62, 479-490
- Gibson, A., Bratchell, N. y Roberts, T. (1988). Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 6, 155-178
- Gibson, D. (1985). Predicting the shelf life of packaged fish from conductance measurements. *J. Appl. Bacteriol.*, 58, 465-470.
- Gilbert, R., Hall, S. y Taylor, A. (1989). Listeriosis update. *Public Health Laboratory Service Digest*, 6, 33-37.
- Gill, C. y Tan, K. (1979). Effects of Carbon Dioxide on Growth of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 2, 237-240.
- Gimenez, M. (1991). Recuento, aislamiento e identificación de microorganismos presentes en conservas de espárragos. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- Gluskin, I., Batash, D., Shoseyov, D., Mor, A., Kazak, R., Azizi, E. y Boldur, I. (1992). A 15-year study of the role of *Aeromonas* spp. in gastroenteritis in hospitalised children. *J. Med. Microbiol.*, 37, 315-318.
- Gorczyca, E., Sumner, J., Cohen, D. y Brady, P. (1985). Mesophilic fish spoilage. *Food Technol. Aust.*, 37, 24-26.
- Gracey, M., Burke, V. y Robinson, J. (1982). *Aeromonas* - associated gastroenteritis. *Lancet* II, 1304-1306.
- Gram, L., Trolle, G. y Huss, H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *Int. J. Food Microbiol.*, 4, 65-72.

- Gray, M. (1960). A possible link in the relationship between silage feeding and listeriosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 136, 205-208.
- Gray, M. y Killinger, A. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* 30, 309-382.
- Greengrass, J. (1993). Films for MAP of foods. Cap. 4, 63-101. Parry, R., eds. Principles and applications of modified atmosphere packaging of food. Blackie Academic & Professional. London.
- Griffiths, M. y Phillips, J. (1988). Prediction of the shelf-life of pasteurized milk at different storage temperature. *J. Appl. Microbiol.* 65, 269-278
- Gudkova, E. y Voronina, T. (1956). Diagnosis of listeric angina. *Ah. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 33, 31-39.
- Guerzoni, M., Gardini, F., y Duan J. (1990). Interactions between inhibition factors on microbial stability of fruit-based systems. *Int. J. Food Microbiol.*, 10,1-18.
- Guerzoni, M., Marchetti, R. y Caballero, M. (1991). Microbiology quality of minimally processed foods. III Congreso Mundial de Tecnología de los Alimentos. Barcelona
- Guerzoni, M., García, R., Cassadei, M., Sinigaglia, M., y Zurera, G.(1992). Influencia de los ingredientes y su proporción relativa en el crecimiento microbiano en ensaladas de cuarta gama. VIII Reunión Científica del Grupo de Microbiología de los Alimentos. Cáceres.
- Hao, Y. y Brackett, R. (1993). Influence of Modified Atmosphere on Growth of Vegetable Spoilage Bacteria in Media. *J. Food Prot.*, 56, 3, 223-228.
- Harris, L., Daeschel, M., Stiles, M. y Klaenhammer, T. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* . *J. Food Prot.*, 52, 3786-3787.

- Hazen, T. Fliermans, C., Hirsch, R. y Esch, G. (1978). Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 731-738.
- Heisick, J, Wagner, D., Nierman, M. y Peeler, J. (1989). *Listeria* spp. Found on Fresh Market Produce. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 8, 1925-1927.
- Hintlian, C. y Hotchkiss, J. (1986). The Safety of Modified Atmosphere Packaging, A review. *Food Technol.*, 70-76.
- Hintlian, C. y Hotchkiss, J. (1987). Comparative growth of spoilage and pathogenic organisms on modified atmosphere-packaged cooked beef. *J. Food Prot.*, 50, 218-223.
- Hird, D. (1987). Review of evidence for zoonotic listeriosis. *J. Food Prot.*, 50, 429-433.
- Ho, J., Shands, K., Friedland, G., Eckind, P., Fraser, D. (1986). An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Int. Med.* 146, 520-524.
- Hobbs, B. y Gilbert, R. (1978). *Food poisoning and food hygiene*. 4th de. Eward Arnold, London.
- Hoigne, J y Bader, H. (1979). The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. *Water Res.*, 10, 377-386.
- Hoover, D., Dishart, K. y Hermes, M. (1989). Antagonistic effect of *Pediococcus* spp. against *Listeria monocytogenes* . *Food Biotechnol.*, 3, 182-196.
- Hudson, J. (1992a). Construction of and Comparison Between Response Surface Models for *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 and a Food Isolate Under Aerobic Conditions. *J. Food Prot.*, 55, 12, 968-972.

- Hudson, J. (1992b). Variation in growth kinetics and phenotype of *Aeromonas* spp. from clinical, meat processing and fleshfood sources. *Int. J. Food Microbiol.*, 16, 131-139.
- Hughey, V., Wilger, P. y Johnson, E. (1989). Antibacterial Activity of Hen Egg White Lysozyme against *Listeria monocytogenes* Scott A in Foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 3, 631-638.
- Huxsoll, C., Bolin, H. y King, A. (1989). Physicochemical Changes and Treatments for Lightly Processed Fruits and Vegetables. *Am. Chem. Soc.*, 16, 201-215.
- ICMSF (1982) Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico. Elliot, R., Clark, D., Lewis, K., Lundbeck, H., Olson, J. y Simonsen, B., eds. Acribia. Zaragoza.
- ICMSF (1991). El Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos. Su aplicación a las industrias de alimentos. Silliker, J., Baird-Parker, A., Bryan, F., Christian, J., Roberts, T. y Tompkin, R., eds. Acribia, S.A. Zaragoza.
- Jacobs, M., Stein, H., Buqwane, Dubb, A., Segal, F., Rabinowitz, L., Ellis, U., Freman, I., Witcomb, M. y Vallabh, V. (1978). Epidemic listeriosis-Report of 14 cases detected in 9 months. *S. Afr. Med. J.*54, 389-392.
- Jacquet, C. y Reynaud, A. (1994). Differences in the sensibility to eight disinfectants of *Listeria monocytogenes* strains as related to their origin (short note). *Int. J. Food Microbiol.*, 22, 79-83.
- James, D. y Olley, J. (1971). Spoilage of shark. *Aust. Fish.* 30, 11-14
- Janda, J. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4, 397-410.

- Janda, J. y Duffey, P. (1988). Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification and infectious disease spectrum. *Rev. Infect. Dis.*, 10, 980-997.
- Jánossy, G. y Tarjan, V. (1980). Enterotoxigenicity of *Aeromonas* strains in suckling mice. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 27, 63-69.
- Jarvis, B. y Patel, M. 1979. The occurrence and control of *Clostridium botulinum* in foods. Leatherland Fd. R. A. Res. Rep. N0686
- Jay, J. (1991). *Modern Food Microbiology*. Fourth Edition. AVI, Van Nostrand Reinhold, New York.
- Jiang, Z., Nelson, A., Mathewson, J., Ericsson, C. y DuPont, H. (1991). Intestinal secretory immune response to infection with *Aeromonas* species and *Pleisiomonas shigelloides* among students from the United States in Mexico. *J. Infect. Dis.*, 164, 979-982.
- Jones, J. (1993). A real-time database/models base/expert system in predictive microbiology. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 268-272.
- Jones, J. y Walker, S. (1993). Advances in modelling microbial growth. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 273-276.
- Jones, M. (1989). Modified Atmospheres. In: Gould G. W. Mechanisms of action of food preservation procedures. Elsevier Applied Science. London and New York. Cap. 10, 247-283.
- Junttila, J. y Bramder, M. (1989). *Listeria monocytogenes* septicemia associated with consumption of salted mushrooms. *Scand. J. Infect. Dis.*, 21, 339-342.
- Junttila, J., Niemelä, S. y Him, J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.*, 65, 321-327.

- Kader, A., Zagory, D., Kerbel, E. (1989). Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nut.* , 28,1, 1-30
- Kalina, G. (1977). Aeromonads in food products and their possible role as causative agents of food poisoning. *Gigiena I Sanitariia (Moskva)*, 8, 97-100.
- Kallander, K., Hitchins, A., Lancette, G., Schmiege, J., García, G., Solomon, H., Sofos, J. (1991). Fate of *Listeria monocytogenes* in Shredded Cabbage Stored at 5 and 25°C under a Modified Atmosphere. *J. Food Prot.*, 54, 4, 302-304.
- Keteleer, A. y Tobback, P. (1994). Modified atmosphere storage of respiring produce. Food Preservation by Combined Processes. Final Report FLAIR Concerted Action 7, Subgroup B, EUR15776EN. Ed. Leistner y Gorris.
- Kidd, F. and West, C. (1927). Gas Storage Fruit. Food Investigation Special Report N°. 30. Dept. of Sci and Ind. Res. (UK). Citado por Parry (1993)
- King, G., Henderson, K. y Lill, R. (1986). Asparagus, effect of controlled atmosphere storage on shelf-life of four cultivars. *New Zealand J. Experim. Agric.*, 14, 421-424.
- Kirov, S. (1993). The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 20, 179-198.
- Knight, M., Black, J. y Wood, D. (1988). Industry perspectives on *Listeria monocytogenes* . *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 682-683.
- Knøchel, S.(1990). Growth characteristics of motile *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.*, 10, 235-244.
- Kobayashi, K. y Ohnaka, T. (1989). Food poisoning due to newly recognized pathogens. *Asian Med. J.*, 32, 1-12.

- Kuijper, E., Bol, P., Peeters, M., Steigerwalt, A. Zanen, H. y Brenner, J. (1989). Clinical and epidemiologic aspects of members of *Aeromonas* DNA hybridization groups isolated from human feces. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1531-1537.
- Kuijper, E., van Alpen, L., Peeters, M. y Brenner, J. (1990). Human serum antibody response to the presence of *Aeromonas* spp. in the intestinal tract. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 584-590.
- Kyung, K. y Fleming, H. (1994). Antibacterial Activity of Cabbage Juice Against Lactic Acid Bacteria. *J. Food Sci.* 59,1, 125-129.
- Labuza, T., Fu, B. y Taokis, P. (1992). Prediction for Shelf Life and Safety of Minimally Processed CAP, MAP chilled Food, A Review. *J. Food Prot.*, 55, 9, 741-750.
- Lee, W. y McClain, D. (1986). Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52,1215-1217.
- Len, P. (1987). Mesophilic fish spoilage of marine fish: bay trout (*Arripis trutta*), bream (*Acanthopagrus butcheri*) and millet (*Aldrichetta forsteri*).
- Lennon, D., Lewis, B., Mantell, C., Becroft, D., Dove, B., Farmer, K., Tonkin, S., Yeats, N., Stamp, R. y Mickleson, K. (1984). Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatr. Infect. Dis.* 3, 30-34.
- Lewus, C., Kaiser, A. y Montville, T. (1991). Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic acid Bacteria Isolated from Meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 6, 1683-1688.
- Linnan, M, Mascola, L., Lou, X., Giuker, S., May, S., Salminen, C., Hird, D., Yonkura, M., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B., Fannin, S., Kleks, A. y Broome, C. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New Engl. J. Med.*, 319, 823-828.

- Little, C., Adams, M., Anderson, W. y Cole, M. (1994). Application of a log-logistic model to describe survival of *Yersinia enterocolitica* at suboptimal pH and temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 22, 63-71.
- Lopes, J. (1986). Evaluation of dairy and food plant sanitizers against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.*, 69, 2791-2796.
- Lovett, J., Francis, D. y Bradshaw, J. (1988). Outgrowth of *Listeria monocytogenes* in foods. *Soc. Ind. Microbiol., Comprehensive Conference on Listeria monocytogenes*, Rohnert Park, CA, Oct. 2-5, Abstr., 1-26.
- Mackenzie, K. y Skerman, V. (1982). Microbial spoilage in unpasteurized liquid whole egg. *Food Technol. Aust.* 34, 524-528.
- Manvell, P. y Ackland, M. (1986). Rapid detection of microbial growth in vegetable salads at chill and abuse temperatures. *Food Microbiol.* 3, 59-65.
- Marchetti, R., Casadei, M. y Guerzoni, M. (1992). Microbial population dynamics in ready-to-use vegetable salads. *Ital. J. Food Sci.*, 2, 97-108.
- Marshall, D. y Schmidt, R. (1988). Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk preincubated with selected pseudomonads. *J. Food Prot.*, 51, 277-282.
- Mascola, L., Chun, L., Thomas, J., Bibe, W., Schwartz, B., Salminen, C. y Heseltine, P. (1988). A case-control study of a cluster of perinatal listeriosis identified by an active surveillance system in Los Angeles County. *Proc., Soc. Ind. Microbiol.- Comprehensive Conference on Listeria monocytogenes*, Rohnert Park, CA, Oct. 2-5, Abstr. P-10.
- Mayeux, J., Sandine, W. y Elliker, P. (1962). A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 45, 5, 655-656.

- McClure, P. y Roberts, T. (1987). The effect of incubation time and temperature on growth of *Escherichia coli* on gradient plates containing sodium chloride and sodium nitrite. *J. Appl. Bacteriol.*, 63, 401-407.
- McKellar, R., Modler, H., Couture, H., Hughes, A., Mayers, P., Gleeson, T. y Ross, W. (1994). Predictive Modeling of Alkaline Phosphatase Inactivation in a High-Temperature Short-Time Pasteurizer. *J. Food Prot.*, 57, 5, 424-430.
- McLauchlin, J., Audurier A. y Taylor, A. (1986). Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britain 1967-1984; the use of serotyping and phage typing. *J. Med. Microbiol.*, 22, 367-377.
- McLauchlin, J., Croft, N. y Campbell, D. (1989). A possible outbreak of listeriosis caused by an unusual strain of *Listeria monocytogenes*. *J. Infect.*, 18, 179-187.
- McMeekin, T. y Olley, J. (1986). Predictive microbiology. *Food Technol. Aust.*, 38, 8, 331-334.
- McMeekin, T., Olley, J., Ross, J. y Ratkowsky, D. (1993). En: Sharpe, A. Predictive microbiology. Theory and application. Research Studies Press Ltd., Taunton.
- Membré, T. y Burlot, P. (1994). Effects of Temperature, pH, and NaCl on Growth and Pectolytic Activity of *Pseudomonas marginalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 6, 2017-2022.
- Merson, M., Morris, G., Sack, D., Wells, J., Feeley, J., Sack, R., Creech, W., Kapikian, A. y Gangarosa, E. (1976). Travelers' diarrhea in Mexico. *New Engl. J. Med.*, 294, 1299-1305.
- Mohr, P. y Krawiec, S. (1980). Temperature Characteristic and Arrhenius Plots for Nominal Psychrophiles, Mesophiles, and Termophiles. *J. General Microbiol.*, 121, 311-317.

- Moir, C., Eyles, M. y Davey, J. (1993). Inhibition of pseudomonads in cottage cheese by packaging in atmospheres containing carbon dioxide. *Food Microbiol.*, 10, 345-351.
- Morita, R. (1975). Psychrophilic Bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 39, 2, 144-167.
- Muir, D. y Phillips, J. (1984). Prediction of the shelf-life of raw milk during refrigerated storage. *Milchwissenschaft*, 39, 7-11
- Müller, H. (1990). *Listeria* Isolations from Feces of Patients with Diarrhea and from Healthy Food Handlers. *Infection* 18, 2, 97-100.
- Mustapha, A. y Liewen, M. (1989). Destruction of *Listeria monocytogenes* by hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers. *J. Food Prot.*, 52, 306-311.
- Nderu, F. y Genigeorgis, C. (1975). Prediction of staphylococcal growth on meats. *Proc. 20th World Vet. Congr.* 1, 812-813
- Nguyen-the, C. y Lund, B. (1991). The letal effect of carrot on *Listeria* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 479-488.
- Nicolai, B., Van Impe, J., Vaerlinden B., Martens, T., Vanderwalle, J. y De Beerdemaeker, J. (1993). Predictive modelling of surface growth of lactic acid bacteria in vaccum-packed meat. *Food Microbiol.*, 10, 229-238.
- Nicolai-Scholten, M., Potel, J., Natzschka, J. y St. Pekker. (1985). High incidence of listeriosis in Lower Saxony, 1983. *Immun. Infekt.*, 13, 76-77.
- Nishikawa, Y. y Kishi, T. (1988). Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens. *Epidemiol. Onfect.*, 101, 213-223.
- Notermans, S., in't Veld, P., Wijtzes, T. y Mead, G. (1993). A user's guide to microbial challenge testing for ensuring the safety and stability of food products. *Food Microbiol.*, 10, 145-157.

- Olley, J y Ratkoswky, D. (1973). Temperature function integration and its importance in the storage and distribution of flesh foods above the freezing point. *Food Technol. Aust.*, 25, 66-73
- Ooraikul, B. (1990a). Further research in modified atmosphere packaging. Cap. 9, 261-282. Ooraikul, B. y Stiles, M., eds. *Modified atmosphere packaging of food*. Ellis Horwood. New York.
- Ooraikul, B. (1990b). Technological considerations in modified atmosphere packaging. Cap. 3, 26-48. Ooraikul, B. y Stiles, M., eds. *Modified atmosphere packaging of food*. Ellis Horwood. New York.
- Ortel, S. (1968). Bakteriologische, serologische und epidemiologische Untersuchungen während einer Listeriose- Epidemie. *Dtsch. Gesundheitswesen*, 23, 753-759.
- Palumbo, S. (1986). Is refrigeration Enough to Restrain Foodborne Pathogens? *J. Food Prot.*, 49, 12, 1003-1009.
- Palumbo, S. (1988). The growth of *Aeromonas hydrophila* K144 in ground pork at 5°C. *Int. J. Food Microbiol.*, 7, 41-48
- Palumbo, S. y Buchanan, R. (1988). Factors affecting growth or survival of *Aeromonas hydrophila* in foods. *J. Food Safety*, 9, 37-51.
- Palumbo, S., Maximo, F., Williams, A., Buchanan, R. y Thayer D. (1985). Starch-Ampicillin Agar for the Quantitative Detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 4, 1027-1030.
- Palumbo, S., Williams, A., Buchanan, R. y Phillips, J. (1991). Model for the Aerobic Growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *J. Food Prot.*, 54, 429-435.

- Palumbo, S., Williams, A., Buchanan, R. y Phillips, J. (1992). Model for the Anaerobic Growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *J. Food Prot.*, 55, 4, 260-265.
- Palleroni, N. (1986). Family I. *Pseudomonadaceae* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 555^{AL}. 141-199. En: Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M. y Holt, J, eds. 9th edición. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Pappalardo, G., Siegrist, H. y Francioli, P. (1990). Activite in vitro sur *Listeria monocytogenes* de differents produits desinfectans compatibles avec les aliments. *Microbiol. Alim. Nut.*, 8, 165-170.
- Parry, R. (1993). Introduction. Cap. 1, 1-18. Parry, R., eds. *Principles and applications of modified atmosphere packaging of food*. Blackie Academic & Professional. London.
- Peterson, I. (1988). The mathematical tourist. *Snapshots of Modern Mathematics*. Freeman and Co. New York, Cap. 6, 144-149.
- Petran, R. y Zottola, E. (1989). A Study of Factors Affecting Growth and Recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Sci.*, 54, 2, 458-460.
- Petran, R., Zottola, E. y Gravani, R. (1988). Incidence of *Listeria monocytogenes* in Market Samples of Fresh and Frozen Vegetables. *J. Food Sci.*, 53, 4, 1238-1240.
- Pooni, G. y Mead, G. (1984). Prospective use of temperature function integration for predicting the shelf-life of non-frozen poultry-meat products. *Food Microbiol*, 1, 67-78
- Potel, J. (1952/1953). Über die diaplazentare Übertragung von *Listeria Infantoseptica*. *Wiss. Z. Martin.Luther Univ. Halle-Wittenberg*, 2, 15-47.

- Powrie, W. y Skura, B. (1990). Modified atmosphere packaging on fruits and vegetables. Cap. 7, 169-245. Ooraikul, B. y Stiles, M., eds. Modified atmosphere packaging of food. Ellis Horwood. New York.
- Pucci, M., Vedamuthu, E., Kunka, B. y Vandenberg, P. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PAZ-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. Appl. Environ. Microbiol., 54, 2349-2353.
- Quevedo F. (1992). The role of HACCP and predictive microbiology in the efforts of WHO to improve food safety. 2nd Int. Conf. on Predictive Microbiol., 10-11 June, Francia
- Quevedo, F. (1993). *Listeria* en alimentos, posición de la OMS y de la ICMSF. ILE Enero-febrero, 26-34.
- Raccach, M. y Geshell, D. (1993). The inhibition of *Listeria monocytogenes* in milk by pediococci. Food Microbiol., 10, 181-186.
- Raeuori, M y Genigeorgis, C (1975). Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. Appl. Microbiol., 29, 68-73
- Ralovich, B. (1984). Listeriosis Research- Present Situation and Perspective, Akademiai Kiado, Budapest.
- Ratkowsky, D., Lowry, R., McMeekin, T., Stokes, A. y Chandler, R. (1983). Model for Bacterial Culture Growth Rate Throughout the Entire Biokinetic Temperature Range. J. Bacteriol., 154, 3, 1222- 1226.
- Ratkowsky, D., Olley, J., McMeekin, A. y Ball, A. (1982). Relationship Between Temperature and Growth Rate of Bacterial Culture. J. Bacteriol., 149, 1, 1-5.

*Real Decreto N° 2519, del 9 de agosto de 1974. Reglamentación Técnico Sanitaria para la elaboración , circulación y comercio de platos preparados.

*Real Decreto N° 2817/83, B.O.E: 270, 11 noviembre de 1983. Comedores colectivos

Real Decreto N° 1125/1982, de la Presidencia del Gobierno, de 30 de abril, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de materiales poliméricos en relación con los alimenticios y alimentarios (B.O.E. núm. 133, de 4 e junio de 1982).

Real Decreto N° 1425/1988 del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, de 25 de noviembre, por el que se modifica el ámbito de aplicación del Real Decreto anterior (B.O.E. núm. 288, 1 de diciembre de 1988).

Real Decreto N° 668/1990, del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, por el que se modifica la Reglamentación Técnico Sanitaria anterior (B.O.E. núm. 130, 31 de mayo de 1990).

Real Decreto N° 221/1992, de 6 de marzo, del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo (B.O.E. núm. 72, de 24 de marzo de 1992).

Orden de 3 de julio de 1985, del Ministerio de Sanidad y Consumo, por el que se modifica la lista positiva de sustancias destinadas a la fabricación de compuestos macromoleculares y la lista de migraciones máximas, en pruebas de cesión, de componentes de los materiales poliméricos en contacto con los alimentos (B.O.E. núm 166, de 12 de julio de 1985).

- Real Decreto N° 1769/1993, de 8 de octubre, del Ministerio de la Presidencia, por el que se modifica el Real Decreto N° 221/1992, de 6 de marzo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo (B.O.E. núm. 266, 6 noviembre de 1993).
- Reiss, H., Potel, J. y Krebs, A. (1951). Granulomatosis Infantiseptica eine durch eine spezifischen Erreger hervorgerufene fetale Sepsis. Klin. Wschr., 29, 29.
- Roberts, T. (1994). Control microbiológico de la producción de alimentos. Cap. 9, 178-182. En: Eley, R., eds. Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana. Acribia. Zaragoza.
- Roberts, T. y Ingram, M. (1973). Inhibition of growth of *Cl. botulinum* at different pH values by sodium chloride and sodium nitrite. J. Food Technol., 8, 467-475
- Roberts, T. y Jarvis, B. (1983). Predictive Modelling of Food Safety with Particular Reference to *Clostridium botulinum* in Model Cured Meat Systems, 85-95. En: Roberts, T. y Skinner, F., eds. Food Microbiology: Advances and Prospects. Academic Press
- Roberts, T., Gibson, A. y Robinson, A. (1981a). Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meat. I Growth in pork slurries prepared from "low" pH meat (pH range 5.5-6.3). J. Food Technol., 16, 239-266.
- Roberts, T., Gibson, A. y Robinson, A. (1981b). Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meat. II Growth in pork slurries prepared from "high" pH meat (pH range 6.3-6.8). J. Food Technol., 16, 267-281

- Roberts, T., Gibson, A. y Robinson, A. (1981c). Prediction of toxin production by *Clostridium* in pasteurized pork slurry. *J. Technol.* 16, 337-355
- Roberts, T., Gibson, A. y Robinson, A. (1982). Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meat. The effect of potassium sorbate. *J. Food Technol.*, 17, 307-326
- Rödel, W., Ponert, H. y Leistner, L. (1976). Einstufung von Fleischerzeugnissen in leicht verderbliche und lagerfähige Produkte. *Fleischwirtschaft*, 56, 417-418
- Rosas, I., Báez, A. y Coutino, M. (1984). Bacteriological quality of crops irrigated with waste water in the Xochimilco plots, Mexico City, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1074-1079.
- Rothgardt, N., Samuelsson, S., Carvajal, A. y Fredericksen, W. (1988). Human listeriosis en Denmark 1981-1987. Tenth Int. Symp. on Foodborne Listeriosis, Pecs, Hungary, 22-26, Abstr. P-27.
- Russel, S., Fletcher, D. y Cox, N. (1992). A Model for Determining Differential growth at 18 and 42°C of Bacteria Removed from Broiler Chicken Carcasses. *J. Food Prot.*, 55, 3, 167-170
- Ryser, E. y Marth, E. (1991). *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Saguy, I. (1992). Simulated Growth of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated Foods Stored at Variable Temperatures. *Food Technol.*, 69-71
- Samuelsson, S., Rothgardt, N., Christensen, A. y Fredericksen, W. (1988). A epidemiological study of human listeriosis en Denmark 1981-1987 including the outbreak Noviembre 1985-Marzo 1987. Tenth Int. Symp. on Foodborne Listeriosis, Pecs, Hungary, 22-26, Abstr. P-19.

- San Joaquin, V. y Pickett, D. (1988). *Aeromonas* -associated gastroenteritis children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 7, 53-57.
- Schlech, W., Lavigne, P., Bortolussi, R., Allen, A., Haldane, E., Wort, A., Hightower, A., Johnson, S., King, H., Nicholls, E. y Broome, C. (1983). Epidemic listeriosis: Evidence for transmission by food. *New Eng. J. Med.*, 308, 203-206.
- Schoolfield, R., Sharpe, P. y Magnuson, C. (1981). Non-linear Regression of Biological Temperature-dependent Rate Models Based on Absolute Reaction-rate Theory. *J. Theor. Biol.*, 88, 719-731.
- Schubert, R. (1991). *Aeromonads* and their significance as potential pathogens in water. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, 20, 131S-135S.
- Schwartz, B., Broome, C., Brown, G., Hightower, A., Ciesielski, C., Gaventa, S., Gellin, B., Mascola, L. y the Listeriosis Group. (1988). Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. *Lancet II*, 779-782.
- Seeliger, H. (1961). *Listeriosis*. Hafner Publishing Co., New York.
- Seeliger, H. (1990). Listeriosis- available risk? Cap. 1, 1-3. En: Miller, A., Smith, J. y Somkuti, G., eds. *Topics in Industrial Microbiology. Foodborne Listeriosis*. Elsevier. Amsterdam.
- Seeliger, H. y Jones, D. (1986). Genus *Listeria* Pirie, 1940, 383., 1235-1245. En: Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M. y Holt, J, eds. 9th edición. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Seideman, S. y Durland, P. (1984). The utilization of modified atmosphere packaging for the fresh meat: A Review. *J. Food Qual.*, 6, 239.

- Sheldon, B. y Brown, A. (1986). Efficiency of ozone as a disinfectant for poultry carcasses and chill water. *J. Food Sci.*, 51, 305-309.
- Silliker, J. y Wolfe, S. (1980). Microbiology safety consideration in controlled atmosphere storage of meats. *Food Technol.*, 34, 3, 59.
- Singh, R. (1994). Scientific principles of shelf life evaluation. Cap 1, 1-26. En: Man, C y Jones, A., eds. *Shelf life evaluation of foods*. Blackie Academic & Professional. London.
- Sizmur, K. y Walker, C. (1988). *Listeria* in prepacked salads. *Lancet* i, 1167.
- Smith, R. Nickelson, R., Martin, R. y Finne, G. (1984). Bacteriology of indole production in shrimp homogenates held at different temperatures. *J. Food Prot.*, 47, 861-864.
- Souëf, P., Le, N. y Walters, B. (1981). Neonatal listeriosis- a summer outbreak. *Med. J. Aust.*, 2, 188-191.
- Stannard, C., Williams, A. y Gibbs, P. (1985). Temperature, growth relationships for psychrotrophic food-spoilage bacteria. *Food Microbiol.*, 2, 115-122
- Steinbruegge, E., Burt Maxcy, R. y Liewen, M. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* on Ready to Serve Lettuce. *J. Food Prot.*, 51, 8, 596-599.
- Strugnell, R. (1988). Increasing the self-life of prepackaged vegetables. *Irish J. Food Sci. Technol.*, 12, 81-84.
- Sutherland, J. y Bayliss, A. (1994). Predictive modelling of growth of *Yersinia enterocolitica*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int. J. Food Microbiol.*, 21, 197-215.
- Sutherland, J., Bayliss, A. y Roberts T. (1994). Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int. J. Food Microbiol.*, 21, 217-236.

- Thompson, D. y Busta F. (1981). Modeling Microbial Populations During Meat Cooking and Cooling. Transactions of the ASAE., 1664-1670.
- Todd, I., Hardy, J., Stringer, M. y Bartholomew, B. (1989). Toxin production by strains of *Aeromonas hydrophila* grown in laboratory media and prawn pure. Int. J. Food Microbiol., 9, 145-156.
- Toule, G. y Murphy, O. (1978). A study of bacteria contaminating refrigerated cooked chicken; their spoilage potential and possible origin. J. Hyg. Cambridge, 81, 161-169.
- Tulzer, G. Bauer, R., Daubek-Puza, W., Eitelberg, F., Grabner, C., Heinrich, E., Hohenauer, L., Stojakovic, M. y Wilk, F. (1987). A local epidemic of neonatal listeriosis in Austria- report of 20 cases. Klin Pädiat., 199, 325-328.
- Urbach, H. y Schabinski (1955). Zur Listeriose des Menschen. A. Hyg., 141, 239-248.
- Van Impe, J., Nicolai, B., Martens, T., Baerdemaeker, J. y Vandewalle J. (1992). Dynamic Mathematical Model To Predict Microbial Growth and Inactivation during Food Processing. Appl. Environ. Microbiol., Sept., 58, 9, 2901-2909
- Van Renterghem, B., Huysman, F., Rygole, R. y Verstraete, W. (1991). Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. J. Appl. Bacteriol., 71, 211-217.
- Varoquaux, P. (1987). Fruits et legumes de quatrième gamme. Rev. Prat. Froid Cond. Air, 654, 161-164.
- Voyer, R. y McKellar, R. (1993). MKES Tools: A microbial kinetics expert system for developing and assessing food production systems, J. Ind. Microbiol., 12, 256-262.

- Wang, C. y Watada, A. (1992). Controlled atmospheres for fresh fruits and vegetables. Hui, Y., de. Encyclopedia of Food Science and Technology, 1, Wiley-Interscience Public . New York.
- Wells, J. (1974). Growth of *Erwinia carotovora*, *E. atroseptica* and *Pseudomonas fluorescens* in Low Oxygen and High Carbon Dioxide Atmospheres. *Phytopathol.*, 64, 1012-1015.
- Whiting, R. y Buchanan, R. (1993). A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiol.*, 10, 175-177.
- Whiting, R. y Buchanan, R. (1994). Microbial Modeling. *Food Technol.*, 48, 6, 113-120.
- Whiting, R. y Cygnarowicz-Provost, M. (1992). A quantitative model for bacterial growth and decline. *Food Microbiol.*, 9, 269-277.
- Wijtzes, T., McClure, P., Zwietering, M. y Roberts, T. (1993). Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 18, 139-149.
- Wilcox, M., Cook, A., Eley, A. y Spencer, R. (1992). *Aeromonas* spp. as a potential cause of diarrhoea in children. *J. Clin. Pathol.*, 45, 959-963.
- Wilkens, P., Bourgeois, R. y Murray, R. (1972). Psychrotrophic properties of *Listeria monocytogenes* . *Can. J. Microbiol.*, 18, 543.
- Willox, F., Mercier, M., Hendrickx, M. y Tobback, P. (1993). Modelling the influence of temperature and carbon dioxide upon the growth of *Pseudomonas fluorescens*. *Food Microbiol.*, 10, 159-173.
- Yip, B. y Genigeorgis, C. (1981). Interactions of *Clostridium perfringens* and certain curing factors in laboratory media. Proceedings World Congress of Foodborne Infections and Intoxications, Berlin 1980. Paul Parey Publishers.

- Zagory, D. y Kader, A. (1988). Modified atmosphere packaging of fresh produce. *Food Technol.*, 42, 9, 70-77.
- Zagory, D. y Kader, A. (1989). Quality Maintenance in Fresh Fruits and Vegetables by Controlled Atmospheres. *Quality Factors of Fruits and Vegetables. Am. Chem. Soc.*, 405, 174-187.
- Zamora, M. y Zaritzky, N. (1985). Modeling of Microbial Growth in Refrigerated Packaged Beef. *J. Food Sci.*, 50, 1003-1013.
- Zanoni, B., Peri, C., Pierucci, S. y Barattini, A. (1993). Predictive modelling of Bologna sausage cooking. *Ital. J. Food Sci.*, 4, 311-323
- Zurera-Cosano, G., Rincón-León, F., Moreno-Rojas, R., Pozo-Lora, R. (1988). Microbial growth in vacuum packaged frankfurters produced in Spain. *Food Microbiol.*, 5, 213-218.
- Zwietering, M., Cuppers, H., de Witt, J. y Van't Riet, K. (1994a). Evaluation of Data Transformations and validation of a Model for the Effect of Temperature on Bacterial Growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1, 195-203.
- Zwietering, M., de Witt, J., Cuppers, H. y Van't Riet, K. (1994b). Modeling of Bacterial Growth with Shifts in Temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1, 204-213.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F. y Van't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 1875-1881
- Zwietering, M., Koos, J., Hansenack, B., Witt, J. y Van't Riet, K. (1991). Modeling of Bacterial Growth as a Function of Temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 4, 1094-1101

Zwietering, M., Rombouts, F. y Van't Riet, K. (1992a). Comparison of definition of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 139-145

Zwietering, M., Wijtzes, T., Wit, J. y Van't Riet, K. (1992b). A Decision Support System for Prediction of the Microbial Spoilage in Foods. *J. Food Prot.*, 55, 12, 973-979.

ANEXO I

Tabla 1. Análisis de varianza de la evolución de bacterias acidolácticas en ensaladas almacenadas a diferentes temperaturas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
FACTOR PRINCIPAL:					
temperatura	137,93	2	68,97	149,629	< 0.0001
tiempo	889,77	12	74,15	160,87	< 0.0001
ERROR	218,47	474	0,46		
TOTAL	1252,58	488			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 2. Análisis de varianza de la evolución de bacterias acidolácticas en ensaladas almacenadas a diferentes temperaturas en distintas estaciones del año

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE:					
tiempo	756,66	1	756,66	1109,53	< 0.0001
temperatura	146,56	1	146,56	215,00	< 0.0001
FACTOR PRINCIPAL:					
mes	37,44	3	12,48	18,31	< 0.0001
ERROR	329,26	483	0,68		
TOTAL	1252,58	488			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 3. Análisis de varianza de los recuentos de bacterias acidolácticas en ensaladas almacenadas a 10°C en diferentes meses

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE: tiempo	634,87	1	634,87	888,41	< 0.0001
FACTOR PRINCIPAL: mes	36,95	2	18,47	25,85	< 0.0001
ERROR	275,12	385	0,71		
TOTAL	932,31	388			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 4. Análisis de varianza de los recuentos de bacterias psicrotrofas en ensaladas almacenadas a diferentes temperaturas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
FACTOR PRINCIPAL:					
temperatura	6,67	2	3,33	5,52	0,0043
tiempo	199,65	12	16,64	27,56	< 0.0001
ERROR	286,19	474	0,60		
TOTAL	491,40	488			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 5. Análisis de varianza de los recuentos de bacterias psicrotrofas en ensaladas almacenadas en diferentes temperaturas y meses del año

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE:					
temperatura	1,60	1	1,60	2,59	0,108
tiempo	141,38	1	141,38	229,73	< 0.0001
FACTOR PRINCIPAL:					
mes	61,48	3	20,49	33,30	< 0.0001
ERROR	297,25	483	0,62		
TOTAL	491,40	488			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 6. Análisis de varianza de los recuentos de bacterias psicrotrofas en ensaladas almacenadas a 4 °C en diferentes meses del año

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE: tiempo	186,20	1	186,20	419,918	< 0.0001
FACTOR PRINCIPAL: mes	60,32	2	30,16	68,011	< 0.0001
ERROR	170,72	385	0,44		
TOTAL	404,14	388			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 7. Análisis de varianza de los recuentos de *Pseudomonas fluorescens*, inoculados y control, durante el almacenamiento de ensaladas a diferentes temperaturas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE:					
tiempo	503,03	1	503,03	293,92	< 0.0001
FACTOR PRINCIPAL:					
tipo	20,53	1	20,53	12,00	0,0006
temperatura	244,94	1	244,94	143,12	< 0.0001
ERROR	444,98	260	1,71		
TOTAL	1213,47	263			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 8. Análisis de varianza de los recuentos de *Pseudomonas fluorescens*, inoculados y controles, y bacterias psicrotrofas durante el almacenamiento de ensaladas a diferentes temperaturas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE:					
tiempo	4,443	1	4,443	2,851	0,0969
temperatura	4,730	1	4,730	3,035	0,087
FACTOR PRINCIPAL:					
tipo	23,538	1	23,538	15,102	0,0003
ERROR	87,282	56	1,559		
TOTAL	120,776	59			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 9. Análisis de varianza de los recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* durante el almacenamiento de ensalada a diferentes temperaturas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE:					
tiempo	35,48	1	35,48	90,05	< 0.0001
tipo	14,46	1	14,46	36,71	< 0.0001
FACTOR PRINCIPAL:					
temperatura	111,52	1	111,52	283,04	< 0.0001
ERROR	88,26	224	0,39		
TOTAL	267,50	227			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 10. Análisis de varianza de los recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* inoculados y controles durante el almacenamiento de ensaladas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE:					
tiempo	35,48	1	35,48	90,05	< 0.0001
temperatura	111,52	1	111,52	283,04	< 0.0001
FACTOR PRINCIPAL:					
tipo	14,46	1	14,46	36,71	< 0.0001
ERROR	88,26	224	0,39		
TOTAL	267,50	227			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 11. Análisis de varianza de los recuentos de *Leuconostoc mesenteroides* inoculados y controles, y bacterias acidolácticas durante el almacenamiento de ensaladas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE:					
tiempo	57,98	1	57,98	80,40	< 0.0001
temperatura	42,90	1	42,90	59,49	< 0.0001
FACTOR PRINCIPAL:					
tipo	0,78	1	0,78	1,08	0,3027
ERROR	41,83	58	0,72		
TOTAL	143,39	61			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 12. Análisis de varianza de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en ensalada realizados en diferentes medios de cultivo

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
FACTOR PRINCIPAL:					
tiempo	5,83	11	0,53	2,70	0,0039
medio	34,71	1	34,71	177,00	< 0.0001
ERROR	22,75	116	0,20		
TOTAL	63,20	128			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 13. Análisis de varianza de los recuentos de *Aeromonas hydrophila* en ensaladas almacenadas a diferentes temperaturas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE: tiempo	35,55	1	35,55	11,74	0,0008
FACTOR PRINCIPAL: temperatura	64,60	1	64,60	21,34	< 0.0001
ERROR	438,97	145	3,03		
TOTAL	545,99	147			

Todos los cálculos fueron realizados con los logaritmos decimales de los recuentos

Tabla 14. Contenido gaseoso de ensaladas no inoculadas almacenadas a 4°C

Tiempo (h)	CO₂(%)	D.T.	C.V. (%)	O₂ (%)	D.T.	C.V. (%)
0	9,14	1,82	19,95	9,12	2,53	27,72
12	12,31	1,19	9,69	2,23	1,64	73,63
24	14,13	0,25	1,77	0,00	0,00	0,00
36	13,75	0,71	5,14	0,25	0,46	185,16
48	15,17	2,16	14,24	0,86	1,43	166,89
60	16,30	2,81	17,25	0,00	0,00	0,00
84	19,33	1,17	6,05	0,00	0,00	0,00
108	23,00	1,04	4,50	0,00	0,00	0,00
132	23,13	0,64	2,77	0,00	0,00	0,00
156	24,94	2,48	9,96	0,00	0,00	0,00
180	26,63	0,58	2,19	0,00	0,00	0,00
204	27,94	0,62	2,23	0,00	0,00	0,00

Tabla 15. Contenido gaseoso de ensaladas no inoculadas almacenadas a 10°C

Tiempo	CO₂(%)	D.T.	C.V. (%)	O₂ (%)	D.T.	C.V. (%)
0	9,14	1,82	19,9548	9,12	2,53	27,71
12	13,05	2,67	20,45	3,49	2,68	76,81
24	15,79	3,30	20,90	2,02	2,27	112,33
36	19,57	5,81	29,71	0,62	0,76	121,34
48	22,14	5,82	26,30	0,00	0,00	0,00
60	24,14	5,03	20,85	0,00	0,00	0,00
72	27,61	1,17	4,23	0,00	0,00	0,00
84	26,50	0,50	1,89	0,00	0,00	0,00
96	33,11	2,25	6,79	0,00	0,00	0,00
108	36,13	1,51	433,50	0,00	0,00	0,00
132	33,90	4,89	14,42	0,00	0,00	0,00
156	38,74	4,67	12,05	0,00	0,00	0,00
180	38,17	6,55	17,17	0,00	0,00	0,00
204	42,90	6,56	15,29	0,00	0,00	0,00

Tabla 16. Contenido gaseoso de ensaladas no inoculadas almacenadas a 15°C

Tiempo	CO₂(%)	D.T.	C.V. (%)	O₂ (%)	D.T.	C.V. (%)
0	9,14	1,82	19,92	9,12	2,53	27,72
12	18,88	1,83	9,68	0,00	0,00	0,00
24	21,88	2,68	12,26	0,00	0,00	0,00
36	29,42	3,32	11,30	0,00	0,00	0,00
48	38,63	1,71	4,42	0,00	0,00	0,00
60	49,69	2,48	4,99	0,00	0,00	0,00
84	52,67	2,42	4,60	0,00	0,00	0,00
108	52,63	4,31	8,19	0,00	0,00	0,00
132	58,50	0,71	1,21	0,00	0,00	0,00
156	57,00	1,41	2,48	0,00	0,00	0,00
180	60,58	6,08	10,03	0,00	0,00	0,00
204	60,81	10,56	17,36	0,00	0,00	0,00

Tabla 17. Evolución de las concentraciones de CO₂ y O₂ en ensaladas inoculadas con *Leuconostoc mesenteroides*

Tiempo (horas)	4°C				15 °C			
	CO₂(%)	D.T.	O₂ (%)	D.T.	CO₂(%)	D.T.	O₂ (%)	D.T.
0	9,14	1,82	9,12	2,53	9,14	1,82	9,12	2,53
12	11,25	1,19	3,85	1,79	17,13	0,25	0,00	0,00
24	14,50	0,41	0,00	0,00	19,63	0,48	0,00	0,00
36	17,50	0,91	0,00	0,00	25,38	1,03	0,00	0,00
48	17,75	2,90	0,20	0,23	28,00	2,61	1,18	1,36
60	15,25	0,29	0,00	0,00	40,25	0,29	0,00	0,00
84	21,00	4,34	1,03	1,18	46,88	2,46	0,00	0,00
108	26,00	3,76	0,00	0,00	53,50	0,41	0,00	0,00
132	27,38	0,25	0,00	0,00	57,75	5,20	0,00	0,00
156	26,25	0,29	0,00	0,00	61,75	5,20	0,00	0,00
180	34,13	5,65	0,00	0,00	62,75	0,29	0,00	0,00
204	32,38	0,48	0,00	0,00	60,00	1,47	0,00	0,00

Tabla 18. Evolución de las concentraciones de CO₂ y O₂ en ensaladas inoculadas con *Pseudomonas fluorescens*

Tiempo (horas)	4°C				15 °C			
	CO ₂ (%)	D.T.	O ₂ (%)	D.T.	CO ₂ (%)	D.T.	O ₂ (%)	D.T.
0	9,14	1,82	9,12	2,53	9,14	1,82	9,12	2,53
12	10,88	0,48	6,23	1,32	22,13	1,03	0,00	0,00
24	13,38	1,03	2,75	1,21	25,88	0,48	0,00	0,00
36	16,75	0,87	0,00	0,00	32,13	0,75	0,00	0,00
48	18,50	0,58	0,00	0,00	32,50	1,47	0,00	0,00
60	19,38	0,48	0,00	0,00	42,50	3,34	0,00	0,00
84	23,38	0,25	0,00	0,00	50,00	1,73	0,00	0,00
108	26,25	0,29	0,00	0,00	51,13	0,25	0,00	0,00
132	30,50	4,04	0,00	0,00	56,00	0,41	0,00	0,00
156	28,50	1,73	0,00	0,00	59,00	2,61	0,00	0,00
180	31,38	0,75	0,00	0,00	54,50	1,47	0,00	0,00
204	32,25	0,65	0,00	0,00	58,63	0,75	0,00	0,00

Tabla 19. Evolución de las concentraciones de CO₂ y O₂ en ensaladas inoculadas con *Aeromonas hydrophila*

Tiempo (horas)	4°C				15 °C			
	CO ₂ (%)	D.T.	O ₂ (%)	D.T.	CO ₂ (%)	D.T.	O ₂ (%)	D.T.
0	9,14	1,82	9,12	2,53	9,14	1,82	9,12	2,53
12	9,85	1,78	6,87	3,75	18,63	0,48	0,00	0,00
24	11,38	0,48	3,93	0,34	23,13	0,75	0,18	0,21
36	14,15	1,13	0,88	0,98	28,13	3,33	0,10	0,12
48	16,25	0,65	0,00	0,00	32,50	1,47	0,00	0,00
60	15,90	2,40	0,00	0,00	40,63	0,75	0,00	0,00
84	19,35	0,67	0,00	0,00	49,25	1,44	0,00	0,00
108	23,45	1,01	0,01	0,03	58,13	2,17	0,00	0,00
132	27,45	1,94	0,00	0,00	58,25	2,63	0,00	0,00
156	26,80	1,42	0,00	0,00	61,88	1,89	0,00	0,00
180	28,25	2,97	0,00	0,00	-	-	-	-
204	32,70	2,46	0,00	0,00	70,50	6,07	0,00	0,00

Tabla 20. Análisis de varianza de dióxido de carbono durante el almacenamiento de ensaladas a diferentes temperaturas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE:					
tiempo	73041,53	1	73041,53	2044,13	< 0.0001
tipo	47,50	1	47,50	1,33	0,249
FACTOR PRINCIPAL:					
temperatura	64736,43	2	32368,21	905,85	< 0.0001
ERROR	25512,94	714	35,73		
TOTAL	161822,27	718			

Tabla 21. Análisis de varianza de dióxido de carbono de ensaladas no inoculadas e inoculadas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE:					
tiempo	74592,13	1	74592,13	1891,94	< 0.0001
temperatura	62060,90	1	62060,90	1574,10	< 0.0001
FACTOR PRINCIPAL:					
tipo	2537,21	3	845,74	21,45	< 0.0001
ERROR	28110,87	713	39,43		
TOTAL	161822,27	718			

Tabla 22. Evolución del pH durante el almacenamiento de ensaladas a diferentes temperaturas

Tiempo (horas)	4°C		10°C		15°C	
	pH	D.T.	pH	D.T.	pH	D.T.
0	5,80	0,25	5,80	0,25	5,80	0,25
12	5,88	0,03	5,98	0,11	5,98	0,03
24	5,92	0,03	6,13	0,11	6,11	0,01
36	6,10	0,04	6,13	0,08	5,63	0,28
48	5,86	0,02	5,99	0,09	5,67	0,14
60	5,86	0,03	6,03	0,09	4,89	0,34
84	-	-	6,28	0,08	-	-
108	6,29	0,09	6,21	0,03	4,28	0,11
132	6,37	0,03	6,21	0,03	4,20	0,01
156	6,12	0,02	6,14	0,13	4,00	0,05
180	6,27	0,01	6,03	0,29	4,39	0,55
204	6,28	0,07	5,93	0,24	3,91	0,02

Tabla 23. Análisis de varianza de la evolución del pH en ensaladas almacenadas a diferentes temperaturas

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	p
COVARIANTE: tiempo	2,38	1	2,38	13,08	0,0004
FACTOR PRINCIPAL: temperatura	43,19	2	21,60	118,54	< 0.0001
ERROR	27,33	150	0,18		
TOTAL	73,86	153			

Tabla 24. Valores de los atributos sensoriales analizados en la ensaladas durante su almacenamiento a diferentes temperaturas

Tiempo (horas)	4°C				Media	15°C				Media
	C	P	T	H		C	P	T	H	
12	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
24	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
36	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4
48	4	4	4	3	4	4	4	4	2	4
60	3	4	4	3	4	2	4	4	2	3
84	3	4	4	3	4	2	2	2	1	2
108	2	4	4	3	3	2	2	2	1	2
132	2	4	4	3	3	2	4	2	2	2
156	1	2	4	3	2	1	4	1	1	2
180	1	4	4	2	3	1	4	2	1	2
204	2	4	4	2	3	1	4	2	1	2

C=color; P= pardeamiento; T= textura y H=hinchazón del envase

Tabla 25. Correlaciones por rangos de Spearman de las características organolépticas

	tiempo	tipo	temp	C	P	T	H	CO	O
tiempo	1 ^a	0,0147	-0,0104	-0,863	-0,2198	-0,4487	-0,6851	0,6973	-0,3314
	[378] ^b	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]
	1 ^c	0,7747	0,8393	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
tipo	0,0147	1	-0,0111	0,0588	0,0057	-0,0122	-0,0389	0,0291	-0,0403
	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]
	0,7747	1	0,8297	0,2533	0,9116	0,8129	0,4499	0,5716	0,4334
temp	-0,0104	-0,0111	1	-0,1478	-0,1679	-0,6169	-0,4549	0,6478	-0,2706
	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]
	0,8393	0,8297	1	0,0041	0,0011	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C	-0,863	0,0588	-0,1478	1	0,2544	0,597	0,6946	-0,7172	0,3094
	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]
	<0.0001	0,2533	0,0041	1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
P	-0,2198	0,0057	-0,1679	0,2544	1	0,4076	0,3864	-0,301	0,0878
	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]
	<0.0001	0,9116	0,0011	<0.0001	1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,0884
T	-0,4487	-0,0122	-0,6169	0,597	0,4076	1	0,7093	-0,7759	0,2269
	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]
	<0.0001	0,8129	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1	<0.0001	<0.0001	<0.0001
H	-0,6851	-0,0389	-0,4549	0,6946	0,3864	0,7093	1	-0,8278	0,3003
	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]
	<0.0001	0,4499	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1	<0.0001	<0.0001
CO	0,6973	0,0291	0,6478	-0,7172	-0,301	-0,7759	-0,8278	1	-0,4327
	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]
	<0.0001	0,5716	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1	<0.0001
O	-0,3314	-0,0403	-0,2706	0,3094	0,0878	0,2269	0,3003	-0,4327	1
	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]	[378]
	<0.0001	0,4334	<0.0001	<0.0001	0,0884	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1

^a Coeficiente ^b (número de muestras) ^c nivel de significación

C=color; P= pardeamiento; T= textura y H=hinchazón del envase

Tabla 26. Valores observados y predictivos de bacterias psicrotrofas a 4°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	5,03	11,58	12,13	5,27
12	5,66	13,04	12,83	5,57
24	6,15	14,17	13,49	5,86
36	6,15	14,17	14,09	6,12
48	6,19	14,25	14,58	6,33
60	6,48	14,92	14,95	6,49
84	6,42	14,78	15,32	6,65
108	6,51	14,98	15,43	6,70
132	6,64	15,29	15,46	6,71
156	6,40	14,74	15,46	6,71
180	7,06	16,26	15,46	6,71
204	7,17	16,5	15,47	6,72

Tabla 27. Parámetros estimados de bacterias psicrotrofas a 4°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior (95%)	superior (95%)
μ_{max} (h^{-1})	0,061	0,020	0,017	0,106
y_{max} (ln N)	15,465	0,279	14,834	16,097
t. duplicación (h)	11,287	3,623	3,092	19,482

RMSE (del LN de ufc)= 0.64

Tabla 30. Valores observados y predictivos de bacterias psicrotrofas a 15°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	5,61	12,92	13,1	5,69
12	6,48	14,93	14,54	6,31
24	6,74	15,52	15,84	6,88
36	7,39	17,02	16,78	7,29
48	7,34	16,90	17,22	7,48
60	7,56	17,42	17,35	7,54
72	7,58	17,45	17,38	7,55
84	7,58	17,44	17,39	7,55

Tabla 31. Parámetros estimados de bacterias psicrotrofas a 15°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior(95%)	superior (95%)
μ_{max} (h^{-1})	0,124	0,017	0,080	0,167
y_{max} (ln N)	17,392	0,170	16,955	17,830
t. duplicación (h)	5,610	0,762	3,651	7,568

RMSE (del LN de ufc)= 0.30

Tabla 34. Valores observados y predictivos de bacterias acidolácticas a 10°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	2,62	6,03	6,02	2,61
12	3,11	7,16	7,14	3,10
24	3,71	8,54	9,02	3,92
36	5,08	11,69	11,07	4,81
48	5,69	13,11	13,01	5,65
60	5,96	13,72	14,30	6,21
72	6,15	14,16	14,68	6,38
84	6,51	14,98	14,74	6,40
108	6,32	14,54	14,75	6,41
132	6,75	15,53	14,75	6,41

Tabla 35. Parámetros estimados de bacterias acidolácticas a 10°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior(95%)	superior (95%)
μ_{max} (h^{-1})	0,176	0,027	0,110	0,241
y_{max} (ln N)	1,247	1,212	-1,735	4,228
h_0	14,747	0,285	14,045	15,449
t. duplicación (h)	3,947	0,602	2,467	5,428

RMSE (del LN de ufc)= 0.57

Tabla 38. Valores observados y predictivos de *Aeromonas hydrophila* a 4°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	2,85	6,57	5,65	2,45
12	2,62	6,03	5,76	2,50
24	2,50	5,76	5,86	2,54
36	2,23	5,13	5,97	2,59
48	2,54	5,84	6,07	2,64
60	2,45	5,65	6,18	2,68
84	2,43	5,59	6,39	2,78
108	2,95	6,80	6,60	2,87
132	3,52	8,10	6,82	2,96
156	3,12	7,20	7,03	3,05
180	3,31	7,62	7,24	3,14
204	2,93	6,74	7,45	3,24

Tabla 39. Parámetros estimados de *Aeromonas hydrophila* a 4°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior(95%)	superior (95%)
μ_{max} (h^{-1})	0,009	0,003	0,002	0,016
t. duplicación (h)	78,452	27,624	17,016	139,889

RMSE (del LN de ufc)= 0.71

Tabla 42. Valores observados y predictivos de *Leuconostoc mesenteroides* inoculados a 15°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	3,27	7,54	7,91	3,44
12	5,21	11,99	11,10	4,82
24	5,82	13,41	14,15	6,15
36	7,20	16,59	15,96	6,93
48	7,05	16,24	16,19	7,03
60	6,52	15,00	16,21	7,04
84	7,06	16,25	16,21	7,04
108	7,18	16,52	16,21	7,04
132	7,05	16,24	16,21	7,04
156	7,21	16,60	16,21	7,04
180	7,17	16,50	16,21	7,04
204	6,9	15,88	16,21	7,04

Tabla 43. Parámetros estimados de *Leuconostoc mesenteroides* inoculados a 15°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior(95%)	superior (95%)
μ_{max} (h^{-1})	0,266	0,039	0,177	0,354
y_{max} (ln N)	16,206	0,223	15,700	16,711
t. duplicación (h)	2,608	0,384	1,740	3,476

RMSE (del LN de ufc)= 0.65

Tabla 46. Valores observados y predictivos de *Leuconostoc mesenteroides* no inoculado a 15°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	2,98	6,86	7,49	3,25
12	5,27	12,13	10,85	4,71
24	5,73	13,19	14	6,08
36	6,74	15,52	15,45	6,71
48	6,47	14,9	15,58	6,77
72	6,72	15,47	15,58	6,77
96	6,82	15,71	15,58	6,77
120	6,77	15,58	15,58	6,77
144	7,07	16,28	15,58	6,77
168	6,87	15,83	15,58	6,77
192	6,68	15,38	15,58	6,77

Tabla 47. Parámetros estimados de *Leuconostoc mesenteroides* no inoculado a 15°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior (95%)	superior (95%)
μ_{max} (h^{-1})	0,281	0,045	0,177	0,384
y_{max} (ln N)	15,581	0,247	15,009	16,152
t. duplicación (h)	2,471	0,395	1,558	3,383

RMSE (del LN de ufc)= 0.68

Tabla 28. Valores observados y predictivos de bacterias psicrotrofas a 10°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	4,82	11,1	12,07	5,24
12	5,93	13,66	13,14	5,71
24	6,47	14,9	14,2	6,17
36	6,71	15,45	15,23	6,61
48	7,05	16,24	16,16	7,02
60	7,08	16,3	16,9	7,34
72	7,43	17,12	17,37	7,54
84	7,45	17,15	17,6	7,64
108	7,44	17,14	17,72	7,70
132	7,83	18,03	17,74	7,70
156	8,03	18,48	17,74	7,70
180	8,11	18,68	17,74	7,70
204	7,42	17,09	17,74	7,70

Tabla 29. Parámetros estimados de bacterias psicrotrofas a 10°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior(95%)	superior (95%)
μ_{max} (h ⁻¹)	0,090	0,016	0,054	0,126
y_{max} (ln N)	17,740	0,286	17,104	18,375
t. duplicación (h)	7,702	1,403	4,583	10,822

RMSE (del LN de ufc)= 0.68

Tabla 32. Valores observados y predictivos de bacterias acidolácticas a 4°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	2,85	6,56	6,69	2,91
12	3,06	7,03	7,11	3,09
24	3,21	7,40	7,52	3,27
36	3,61	8,31	7,94	3,45
48	3,61	8,30	8,35	3,63
60	3,79	8,73	8,77	3,81
84	4,25	9,79	9,60	4,17
108	4,61	10,60	10,43	4,53
132	4,85	11,18	11,26	4,89
156	5,05	11,62	12,09	5,25
180	5,72	13,18	12,93	5,62
204	5,98	13,76	13,76	5,98

Tabla 33. Parámetros estimados de bacterias acidolácticas a 4°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior(95%)	superior (95%)
μ_{max} (h^{-1})	0,035	0,001	0,032	0,037
t. duplicación (h)	20,014	0,587	18,708	21,320

RMSE (del LN de ufc)= 0.23

Tabla 36. Valores observados y predictivos de bacterias acidolácticas a 15°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	3,05	7,03	7,31	3,17
12	4,02	9,27	9,31	4,04
24	5,02	11,56	11,32	4,92
36	6,03	13,90	13,32	5,78
48	6,46	14,87	15,26	6,63
60	7,25	16,69	16,87	7,33
84	7,50	17,27	17,81	7,73
72	7,64	17,59	17,64	7,66
108	7,86	18,09	17,84	7,75
132	7,83	18,02	17,84	7,75
156	7,82	18,00	17,84	7,75
180	7,82	18,00	17,84	7,75
204	7,71	17,76	17,84	7,75

Tabla 37. Parámetros estimados de bacterias acidolácticas a 15°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior(95%)	superior (95%)
μ_{max} (h^{-1})	0,167	0,008	0,150	0,184
y_{max} (ln N)	17,843	0,130	17,553	18,132
t. duplicación (h)	4,144	0,190	3,721	4,568

RMSE (del LN de ufc)= 0.33

Tabla 40. Valores observados y predictivos de *Leuconostoc mesenteroides* inoculados a 4°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	3,27	7,54	7,76	3,37
12	4,48	10,32	9,9	4,30
24	5,00	11,51	11,72	5,09
36	5,37	12,37	12,59	5,47
48	5,54	12,76	12,76	5,54
60	5,45	12,55	12,78	5,55
84	5,50	12,66	12,78	5,55
108	5,41	12,45	12,78	5,55
132	5,83	13,43	12,78	5,55
156	5,45	12,54	12,78	5,55
180	5,48	12,62	12,78	5,55
204	5,84	13,45	12,78	5,55

Tabla 41. Parámetros estimados de *Leuconostoc mesenteroides* inoculado a 4°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior(95%)	superior (95%)
μ_{max} (h ⁻¹)	0,183	0,028	0,118	0,247
y _{max} (ln N)	12,783	0,138	12,470	13,096
t. duplicación (h)	3,797	0,589	2,464	5,129

RMSE (del LN de ufc)= 0.40

Tabla 44. Valores observados y predictivos de *Leuconostoc mesenteroides* no inoculado a 4°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	3,81	8,76	8,75	3,80
12	4,59	10,57	10,64	4,62
24	4,96	11,42	11,27	4,89
36	5,07	11,68	11,34	4,92
48	4,92	11,34	11,35	4,93
72	4,7	10,82	11,35	4,93
96	4,84	11,13	11,35	4,93
120	4,84	11,13	11,35	4,93
144	4,97	11,44	11,35	4,93
168	5,01	11,55	11,35	4,93
192	5,04	11,6	11,35	4,93

Tabla 45. Parámetros estimados de *Leuconostoc mesenteroides* no inoculado a 4°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior(95%)	superior (95%)
μ_{max} (h^{-1})	0,207	0,051	0,089	0,325
y_{max} (ln N)	11,350	0,096	11,128	11,573
t. duplicación (h)	3,348	0,826	1,440	5,255

RMSE (del LN de ufc)= 0.28

Tabla 48. Valores observados y predictivos de *Listeria monocytogenes* a 4°C

Tiempo (horas)	Valores observados		Valores predictivos	
	log10	ln	ln	log10
0	3,22	7,42	8,4	3,65
12	3,7	8,53	8,44	3,67
24	4,02	9,25	8,48	3,68
36	3,5	8,06	8,52	3,70
48	3,8	8,74	8,56	3,72
60	3,79	8,72	8,6	3,73
108	3,65	8,41	8,75	3,80
132	4,03	9,27	8,83	3,83
156	3,99	9,19	8,9	3,87
180	4,15	9,56	8,98	3,90
204	3,88	8,93	9,06	3,93
300	3,83	8,82	9,37	4,07

Tabla 49. Parámetros estimados de *Listeria monocytogenes* a 4°C

Parámetros estimados	Estimación	Error estandar	Límites de confianza	
			inferior(95%)	superior (95%)
μ_{max} (h^{-1})	0,003	0,002	-0,001	0,007
t. duplicación (h)	216,436	118,904	-48,006	480,879

RMSE (del LN de ufc)= 0.54

Tabla 50. Valores observados y predictivos de *Aeromonas hydrophila* en ensaladas almacenadas a 15°C

Tiempo (horas)	Valores observados (log₁₀ N)	Valores predictivos Dmodel (log₁₀ N)	Valores predictivos por Inactivación lineal
0	6,64	7,29	7,29
6	-	7,28	7,29
12	7,89	7,27	7,73
18	-	7,24	7,50
24	7,39	7,18	7,27
30	-	7,06	7,04
36	7	6,88	6,81
42	-	6,63	6,58
48	5,97	6,33	6,35
54	-	6,01	6,13
60	-	5,67	5,90
66	-	5,34	5,67
72	5,07	5,02	5,44
78	-	4,73	5,21
84	-	4,49	4,98
90	-	4,32	4,75
96	4,54	4,22	4,53
102	-	4,17	4,30
108	-	4,14	4,07
114	-	4,13	3,84
120	3,88	4,13	3,61

Tabla 51. Valores observados y predictivos de *Pseudomonas fluorescens* inoculado en ensaladas almacenadas a 4°C

Tiempo (horas)	Valores observados (log₁₀ N)	Tiempo de predicción (horas)	Valores predictivos Dmodel (log₁₀ N)	Valores predictivos por Inactivación lineal
0	8,82	0	8,82	8,41
12	7,76	9,6	7,88	8,05
24	7,25	19,2	7,46	7,69
36	6,94	28,8	7,13	7,34
48	6,62	38,4	6,84	6,98
72	5,91	48	6,57	6,62
96	5,93	57,6	6,33	6,26
120	5,36	67,2	6,12	5,90
144	5,36	96	5,71	-
168	5,64	144	5,58	-
192	5,84	192	5,58	-

Tabla 53. Valores observados y predictivos de *Pseudomonas fluorescens* no inoculado en ensaladas almacenadas a 4°C

Tiempo (horas)	Valores observados (log₁₀ N)	Tiempo de predicción (horas)	Valores predictivos Dmodel (log₁₀ N)	Valores predictivos por Inactivación lineal
0	6,00	0	6,24	6,23
12	6,55	9,6	6,24	6,21
24	6,63	19,2	6,24	6,18
36	5,79	28,8	6,22	6,16
48	5,98	48	6,05	6,10
72	5,87	76,8	5,85	6,03
96	5,71	96	5,85	5,97
120	5,65	124,8	5,85	5,90
144	5,90	144	5,85	5,85
168	5,71	163,2	5,85	5,79
192	5,95	192	5,85	5,72

Tabla 52. Valores observados y predictivos de *Pseudomonas fluorescens* inoculado en ensaladas almacenadas a 15°C

Tiempo (horas)	Valores observados (\log_{10} N)	Tiempo de predicción (horas)	Valores predictivos Dmodel (\log_{10} N)	Valores predictivos por Inactivación lineal
0	9,55	0	9,55	-
12	7,66	14,4	7,37	10,94
24	6,77	24	6,95	10,61
36	6,43	38,4	6,43	10,13
48	6,20	48	6,12	9,80
72	5,54	72	5,50	8,99
96	5,19	96	5,22	8,18

Tabla 54. Valores observados y predictivos de *Pseudomonas fluorescens* no inoculado en ensaladas almacenadas a 15°C

Tiempo (horas)	Valores observados (\log_{10} N)	Tiempo de predicción (horas)	Valores predictivos Dmodel (\log_{10} N)	Valores predictivos por Inactivación lineal
0	6,17	0	6,34	6,53
12	6,57	14,4	6,32	6,53
24	6,49	28,8	6,2	6,53
36	5,61	36	6,05	5,81
48	5,52	50,4	5,53	5,21
72	4,85	72	4,47	4,30
96	3,31	93,6	3,36	3,39
120	1,82	122,4	2,02	2,19
144	1,67	144	1,58	1,28
168	ND			
192	ND			

ND, no se detectaron

Tabla 55. Valores de predicción del tiempo de vida media (horas) en función de la temperatura de almacenamiento como tiempo necesario para alcanzar el nivel 10^6 ufc/g de bacterias psicrotrofas y acidolácticas y la pérdida de las características óptimas sensoriales

T°K	Sensorial	Psicrotrofos	BAL
277	202	35	209
278	186	30	179
279	172	26	154
280	159	22	133
281	146	19	114
282	135	17	98
283	124	14	84
284	115	12	73
285	106	11	62
286	98	9	54
287	90	8	46
288	83	7	40

Tabla 56. Valores predictivos de mmax de bacterias acidolácticas (BAL), psicrotrofas, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, a diferentes temperaturas

T°K	T°C	BAL	Psicrotrofas	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeromonas</i>
277	4	0,052	0,060	0,226	-0,068	0,000
278	5	0,062	0,065	0,234	-0,068	-0,013
279	6	0,073	0,070	0,242	-0,069	-0,027
280	7	0,084	0,075	0,250	-0,070	-0,040
281	8	0,097	0,080	0,258	-0,071	-0,053
282	9	0,110	0,086	0,266	-0,072	-0,066
283	10	0,125	0,091	0,274	-0,073	-0,079
284	11	0,140	0,097	0,283	-0,074	-0,093
285	12	0,156	0,103	0,291	-0,075	-0,106
286	13	0,173	0,109	0,300	-0,076	-0,119
287	14	0,191	0,115	0,309	-0,077	-0,132
288	15	0,209	0,122	0,318	-0,077	-0,145

ANEXO II

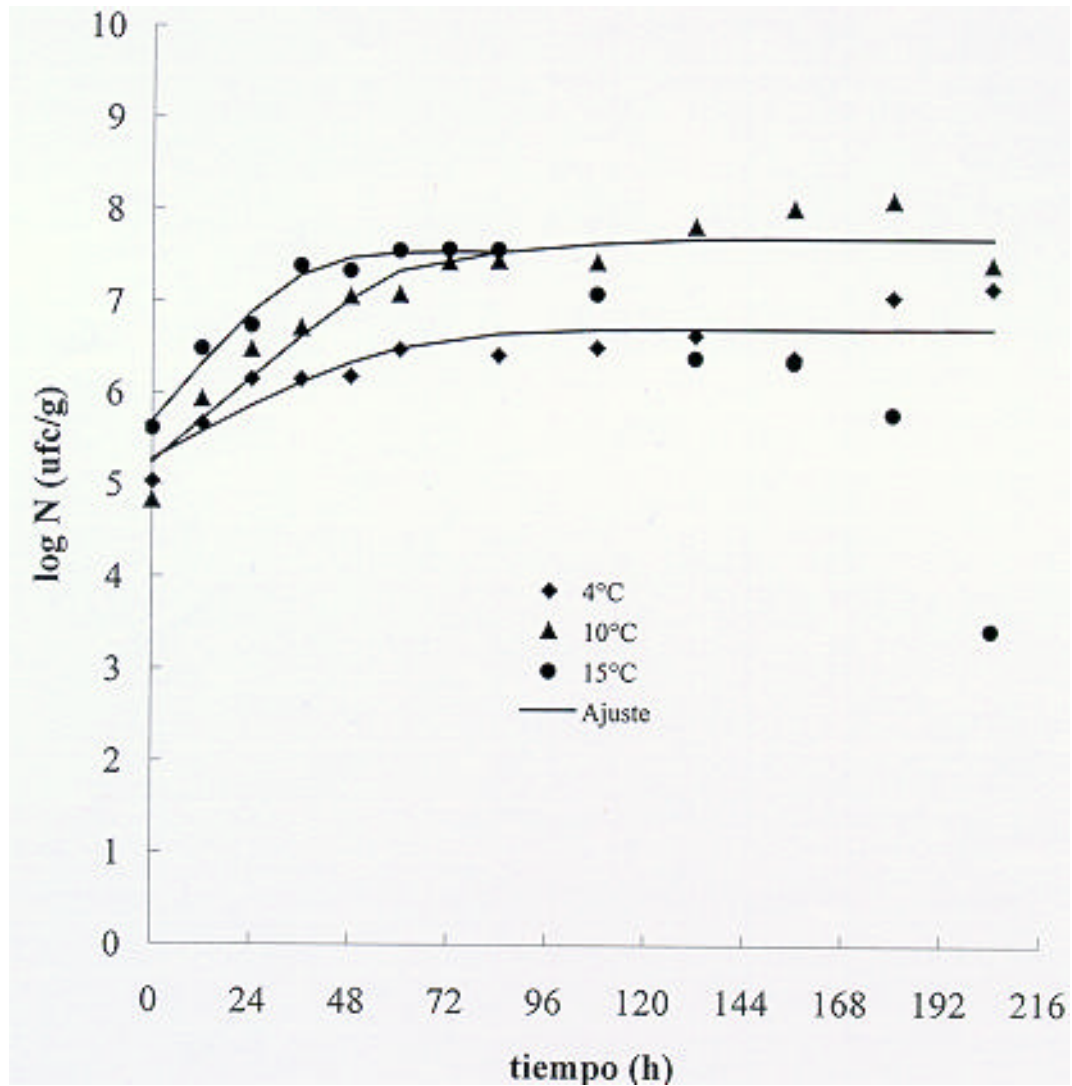


Figura 1. Curvas de crecimiento de bacterias psicotrofas a 4, 10, 15°C, según el programa DModel

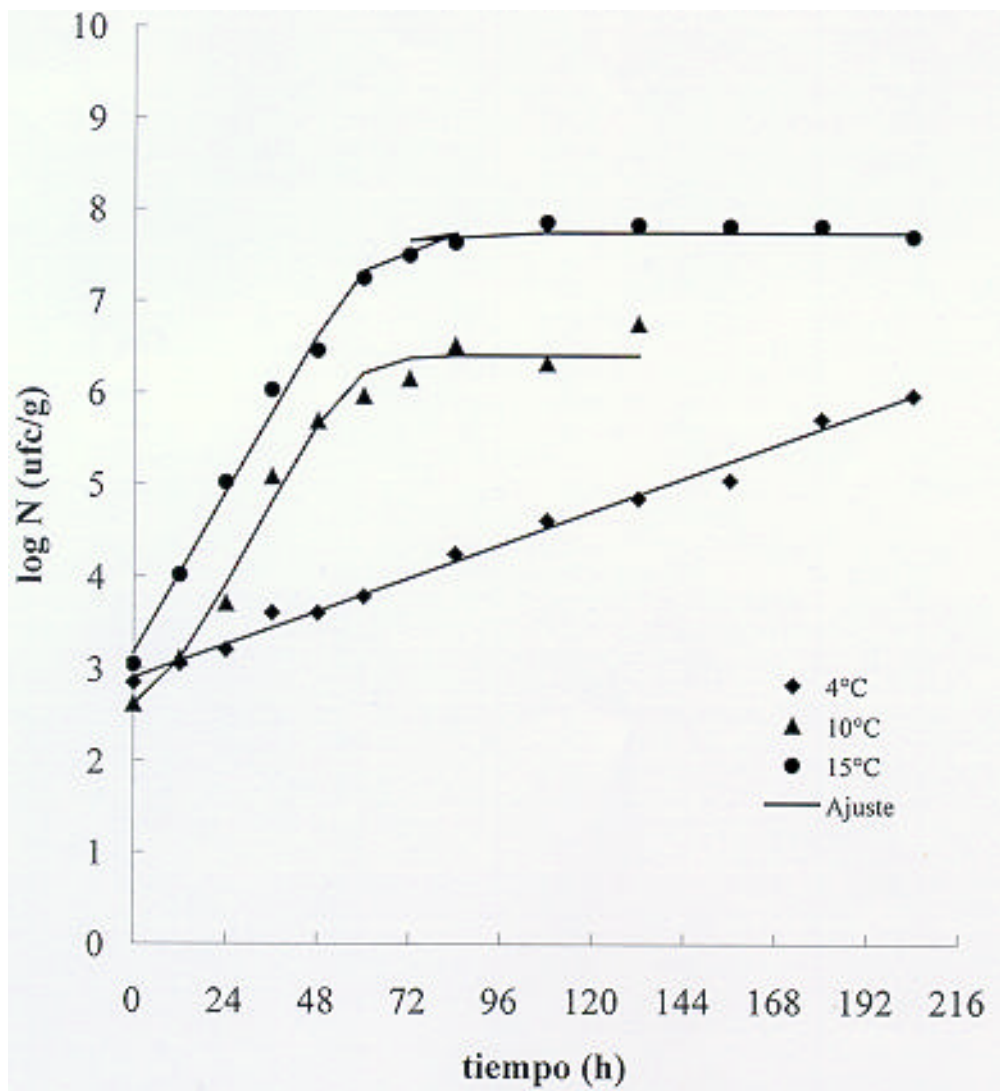


Figura 2. Curvas de crescimento de bactérias acidolácticas a 4, 10, 15°C, según el programa DModel

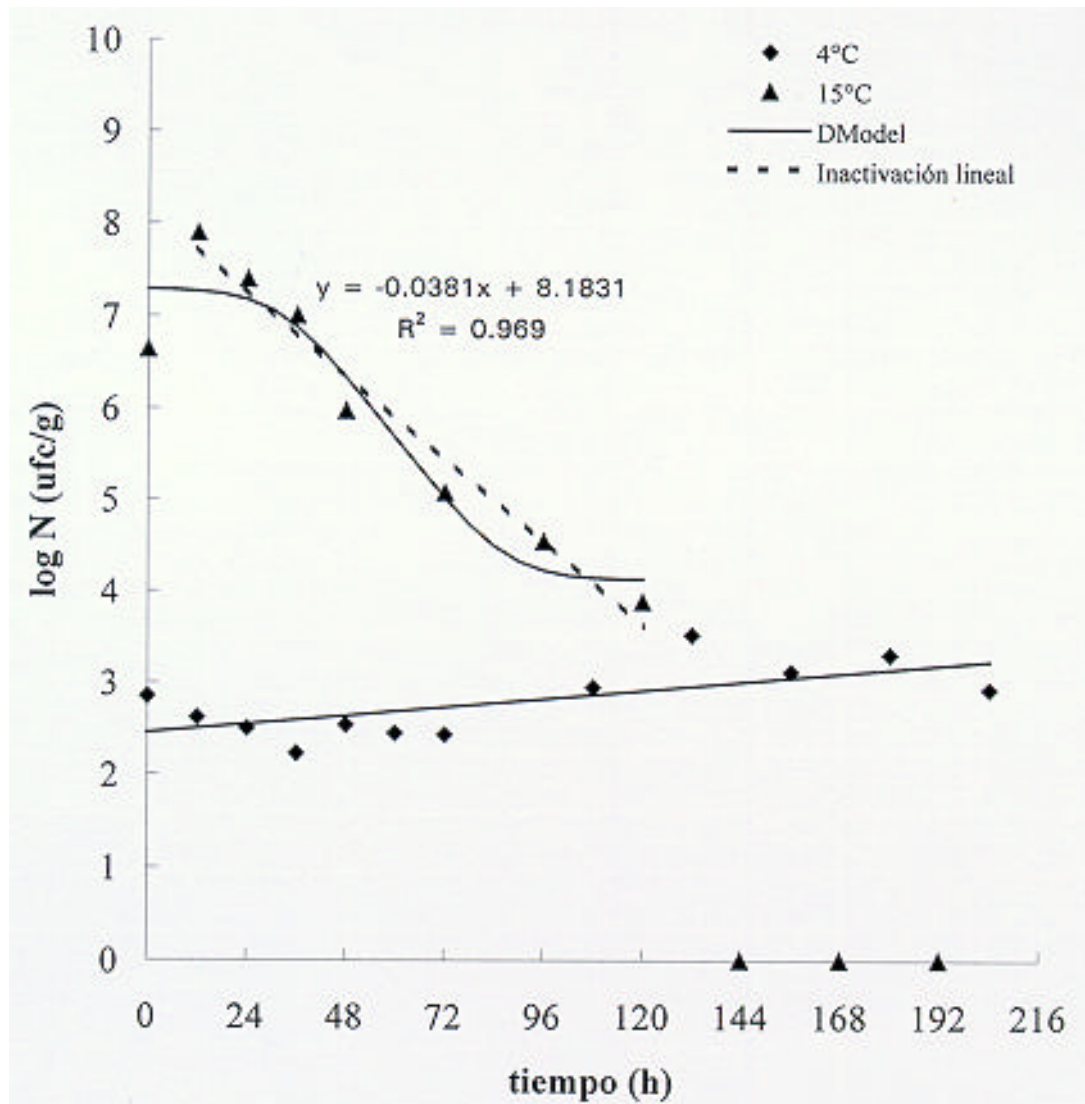


Figura 3. Curvas de crecimiento y de inhibición de *Aeromonas hydrophila* a 4°C y 15°C, según el Programa DModel y el modelo de inactivación lineal

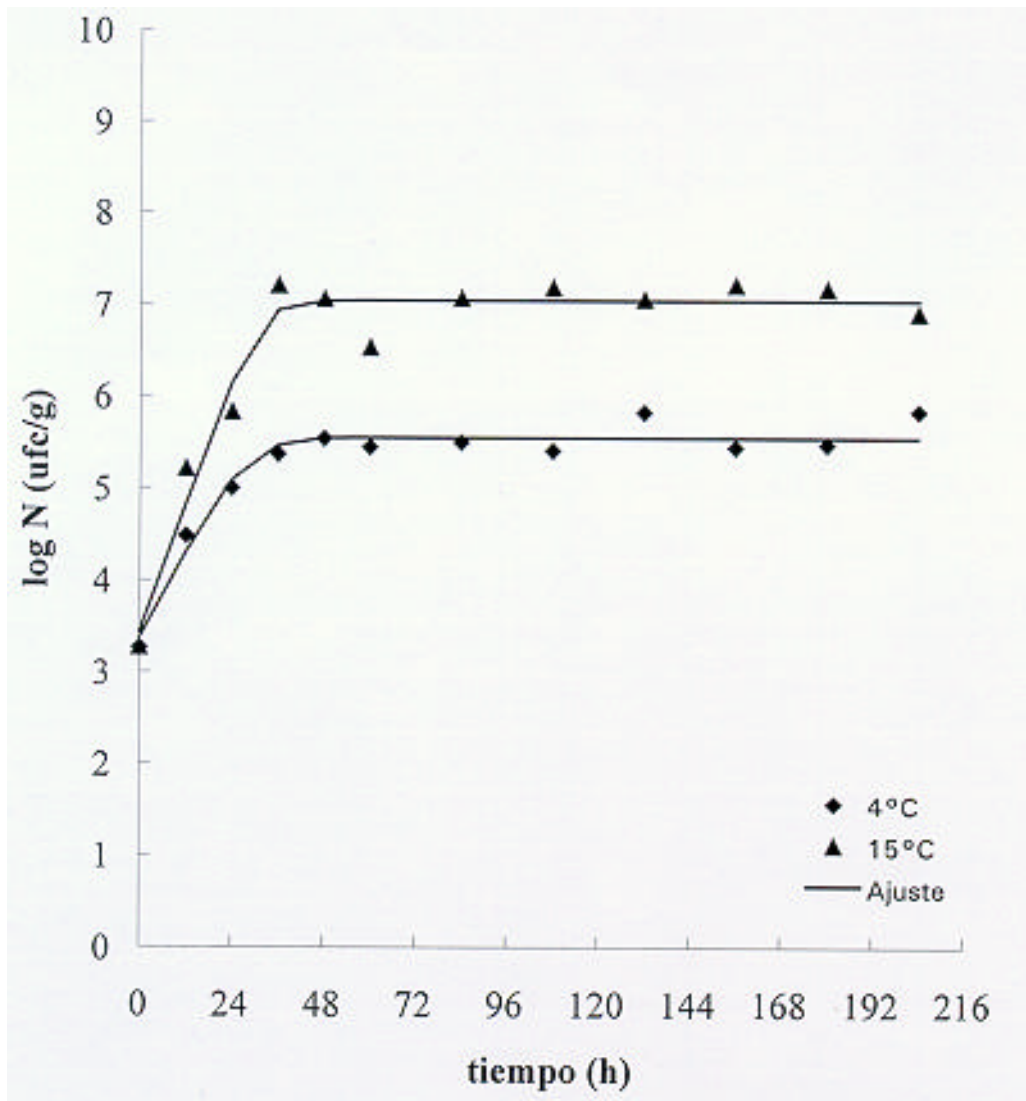


Figura 4. Curvas de crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* inoculado a 4 y 15°C según el programa DModel

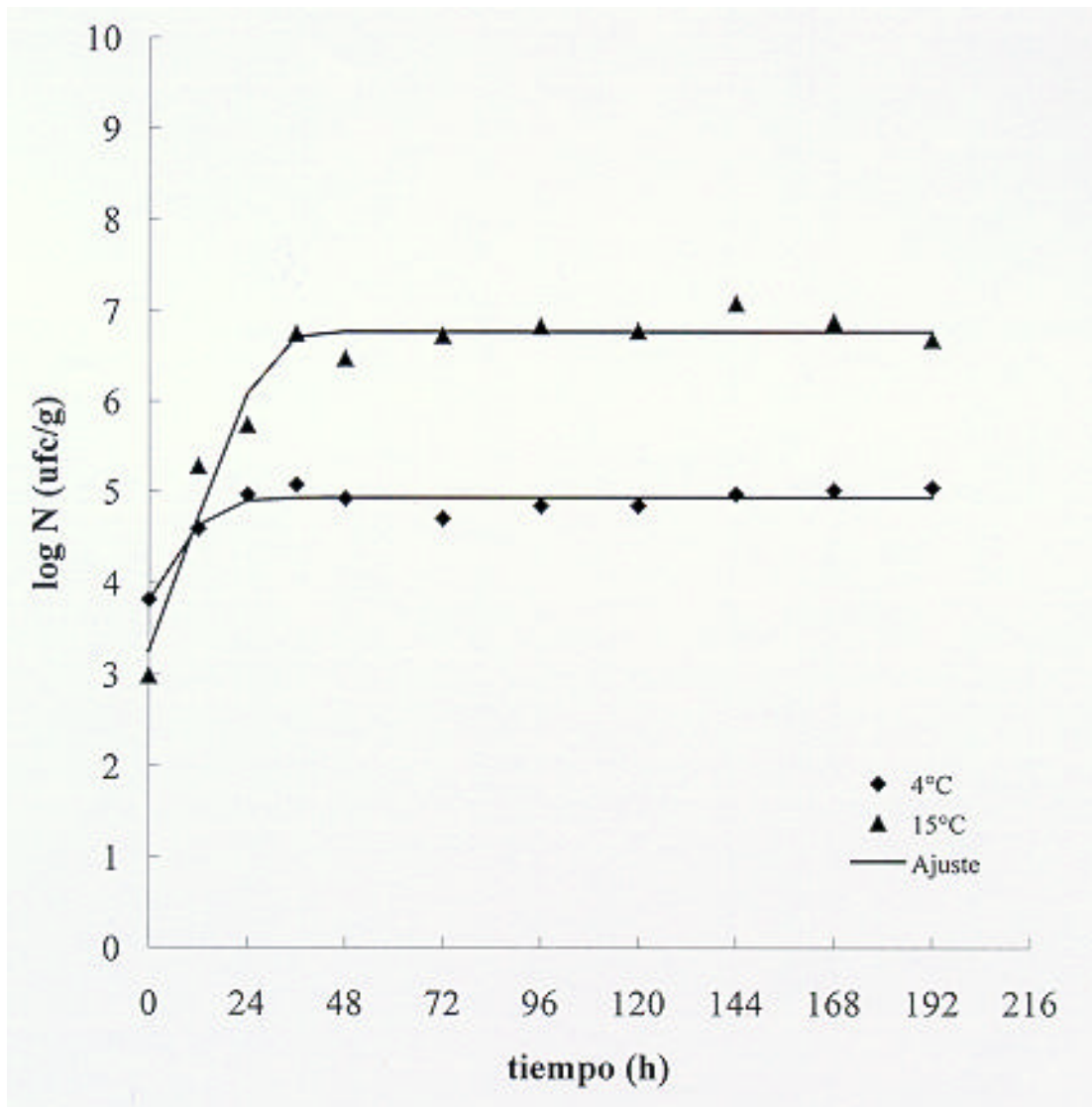


Figura 5. Curvas de crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* no inoculado a 4 y 15°C según el programa DModel

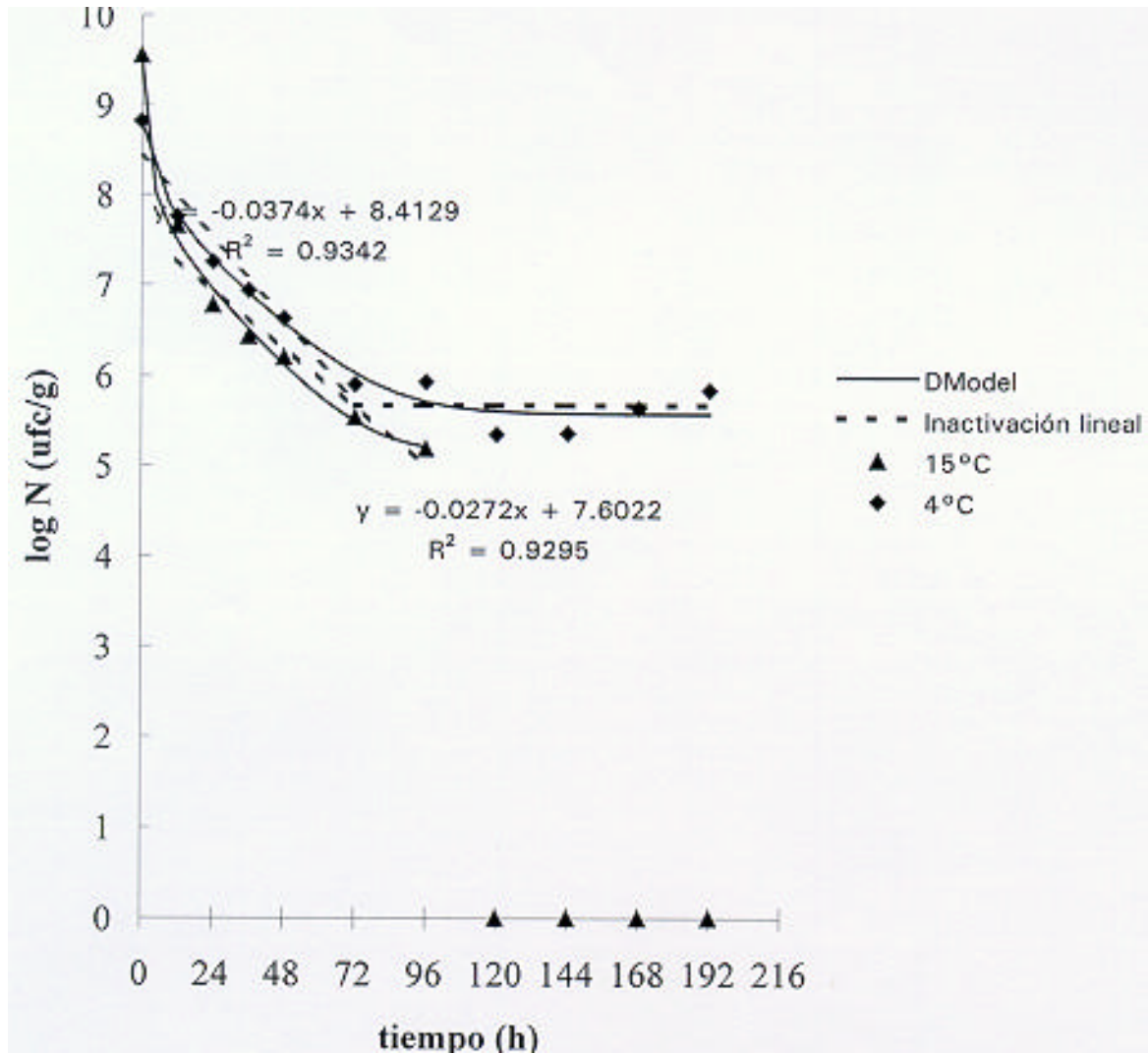


Figura 6. Curvas de inhibición de *Pseudomonas* inoculado a 4 y 15°C según el programa DModel y el modelo de inactivación lineal

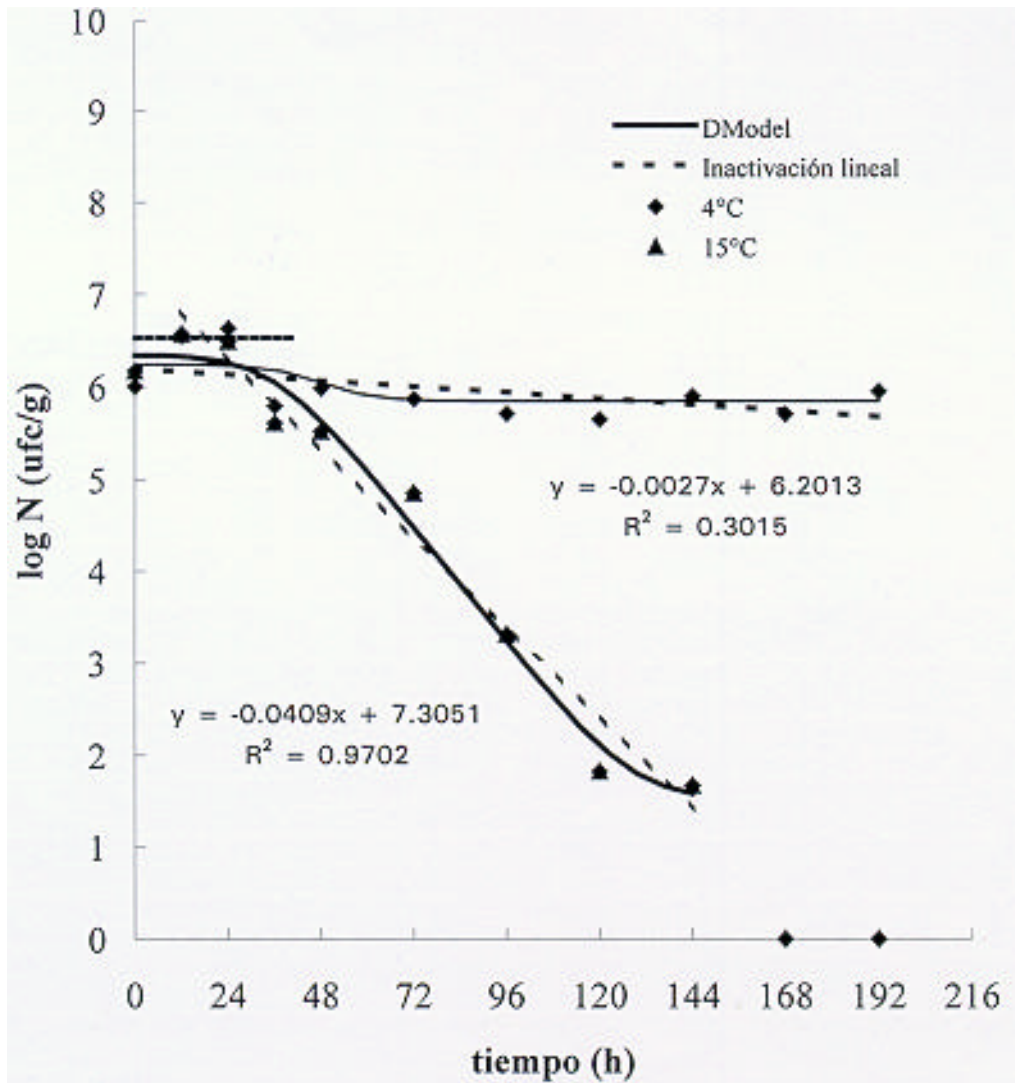


Figura 7. Curvas de inhibición de *Pseudomonas fluorescens* no inoculado a 4 y 15°C según el programa DModel y el modelo de inactivación lineal

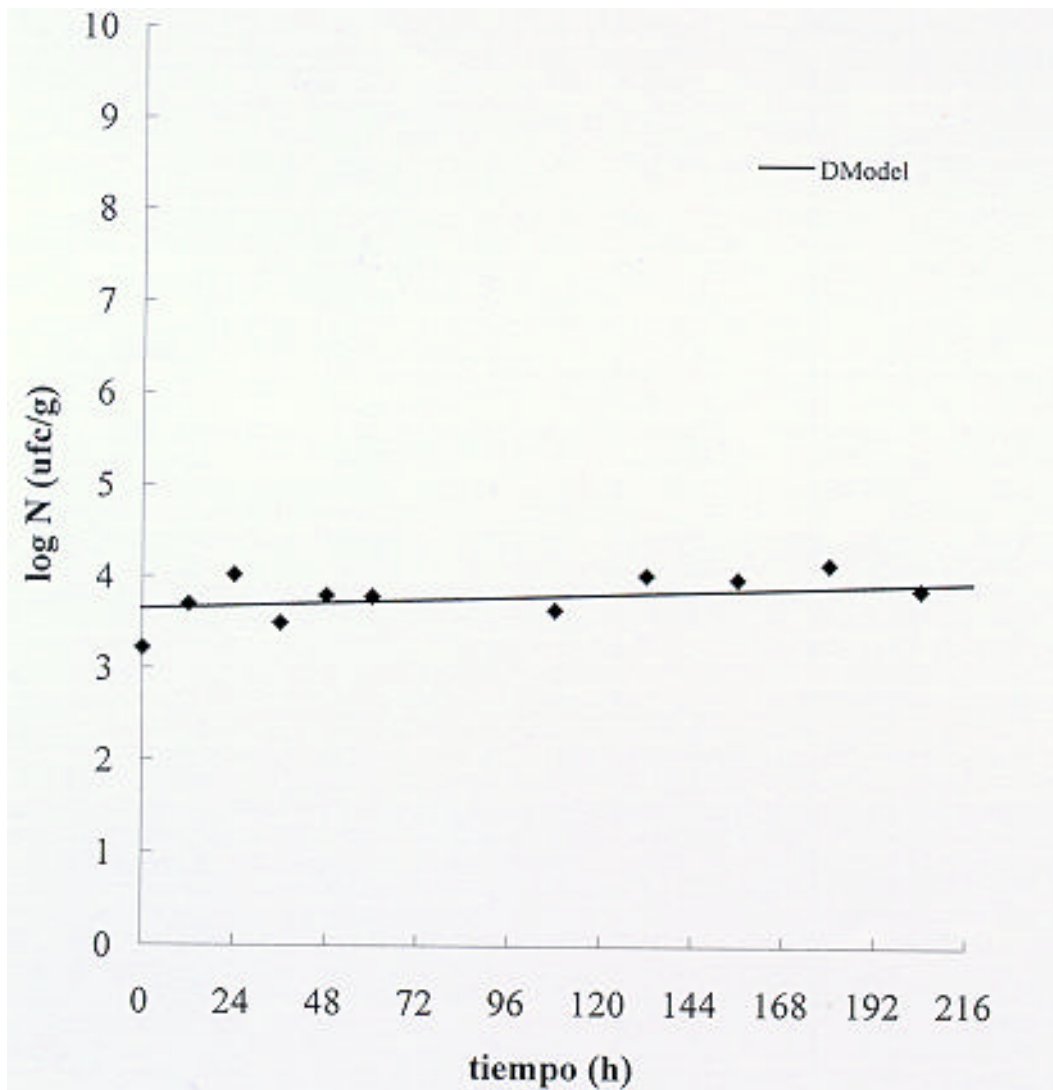


Figura 8. Curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 4°C según el programa DModel

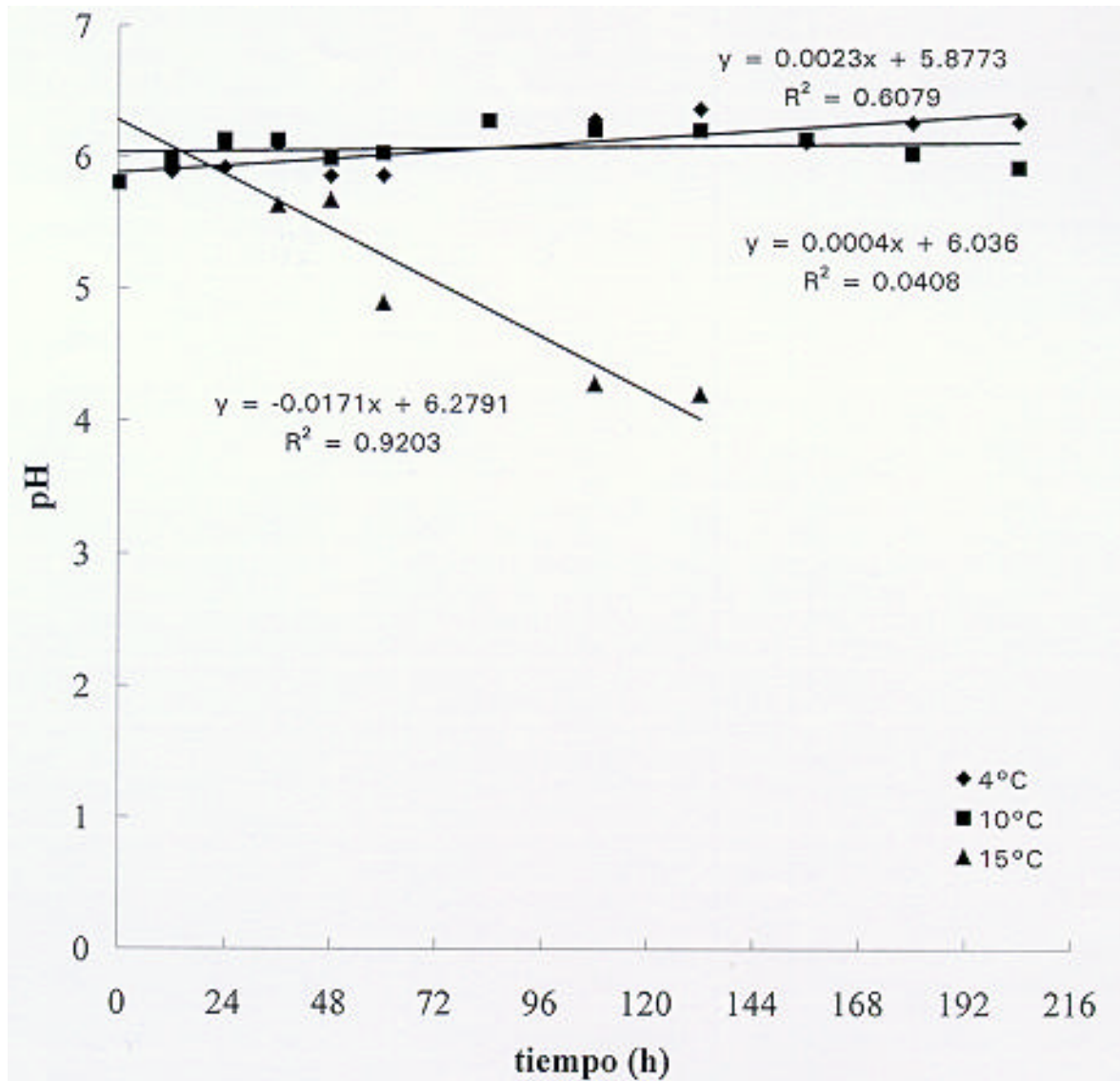


Figura 9. Rectas de regresión de la evolución del PH en ensaladas mantenidas a diferentes temperaturas