

## Artículo Científico

### Efectos de los tratamientos subletales en la variabilidad de las fases de latencia de *salmonella enterica serovar enteritidis* y *listeria innocua*

#### Effects of sublethal treatments on the variability of the lag phases in *salmonella enterica serovar enteritidis* and *listeria innocua*

María Rosa Rodríguez Vargas 1.

Juan Salvador Aguirre García 2.

1. Docente del Departamento de Medicina. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Privada del Valle. Sede Cochabamba. mrrodrig2569@gmail.com
2. Profesor asistente del Departamento Agroindustrias y Enología. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. juan.aguirre@u.uchile.cl

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación estudió la variabilidad de la fase de latencia en células individualizadas de *Salmonella enterica serovar Enteritidis* y *Listeria innocua* después de recibir tratamientos inactivantes de acidificación, irradiación y calor. Una vez establecido el protocolo de los ensayos experimentales; el Bioscreen determinó previamente: la cantidad de bacterias que generan una turbidez de 0,20 de densidad óptica, el tiempo de detección y la tasa específica de máximo crecimiento; datos que indican las fases de latencia en condiciones experimentales. Sin embargo, para afinar aún más la estimación del número de células por pocillo y así calcular la fase de latencia de células individuales, se planteó dos estrategias: 1) que todas las muestras con crecimiento contenían una célula; 2) que un cierto número de muestras contendrán uno, dos o más células. Así, si hay dos o n células viables, la fase de latencia de la población será paulatinamente más corta y, es de esperar, menos variable. Los datos analizados concluyeron que la variabilidad de los microorganismos en estudio, aumentan cuando el substrato de crecimiento del microorganismo es más complejo y cuando la temperatura de crecimiento se aleja de la óptima. Desde el punto de vista de la variabilidad de la fase de latencia, la acidificación es la más variable, en cambio la irradiación es una excelente alternativa a los tratamientos térmicos porque, tanto para la inactivación como para la fase de latencia de los microorganismos supervivientes irradiados los resultados son más homogéneos y menos variables.

**Palabras clave:** Variabilidad. Tratamientos subletales. Fase de latencia. Células individuales. Distribución de Poisson.

## ABSTRACT

This research work studied the variability of the lag phase in individual *Salmonella enterica serovar Enteritidis* and *Listeria innocua* cells after receiving inactivating acidification, irradiation and heat treatments. Once the protocol of experimental trials has been established; Bioscreen previously determined: the number of bacteria that generate a turbidity of 0,20 optical density, the detection time and the specific maximum growth rate; data indicating the lag phases in experimental conditions. However, to further refine the estimation of cells number per well and then calculate the lag phase of individual cells. Two strategies were proposed: 1) that all the growing samples contained a cell; 2)

than a certain number of samples will contain one, two or more cells. So, if there are two, three or  $n$  viable cells, the lag phase of the population will be gradually shorter and, hopefully, less variable. The analyzed data concluded that the variability of the microorganisms under study increases when the growth substrate of the microorganism is more complex and when the growth temperature moves away from the optimum. From the lag phase point of view acidification is the most variable, instead irradiation is an excellent alternative to thermal treatment because, both for inactivation and for the lag phase of irradiated surviving microorganisms the results are more homogeneous and less variable.

**Keywords:** Variability. Sublethal treatments. Lag phase. Poisson distribution. Individual cells.

## INTRODUCCIÓN

Vivimos en un mundo en el que los avances tecnológicos y científicos nos llevan a una espiral evolutiva, cambiante, sin precedentes, no siendo los microorganismos y su interacción con nuestros alimentos y nuestra salud ajenos a ellos. El pequeño tamaño de los microorganismos, su velocidad de crecimiento, plasticidad fenotípica y variabilidad genética hacen que tengan una gran capacidad de adaptación y por tanto, pueden beneficiarse de tales cambios (1). Es así, que cualquier proceso que asegure la inactivación de bacterias patógenas, esporas y/o reducir la flora natural en productos vegetales y animales, son esenciales en la industria alimentaria.

Actualmente, se dispone de variados procesos conservantes de alimentos para reducir al mínimo la probabilidad de supervivencia de los microorganismos patógenos y alterantes. El método más utilizado que logra tal inactivación microbiana continúa siendo el proceso térmico (2). Sin embargo, uno de los objetivos de la industria alimentaria, ha sido precisamente encontrar procesos alternativos y tecnologías de conservación que sean ambientalmente amigables, de bajo costo y capaces de preservar los atributos de calidad del alimento (3). Los mayores avances en este campo se han conseguido en el desarrollo de métodos fisicoquímicos, que afectan la viabilidad de los microorganismos, sin un incremento sustancial de la temperatura del alimento. Estos métodos denominados “no térmicos” no afectan, o lo hacen mínimamente a las características nutritivas y sensoriales de los alimentos (2), logrando alcanzar los objetivos de inocuidad alimentaria (FSO, Food Safety Objective) establecida para un proceso definido.

Entre las tecnologías de naturaleza no térmica destacan las altas presiones hidrostáticas (APH), ultrasonidos bajo presión (MS), radiaciones UV-C, irradiación, manotermosonificación (MTS), ácidos orgánicos con capacidad antimicrobiana, así como pulsos de campos eléctricos de alto voltaje (PEAV), campos eléctricos pulsantes (CEP), cavitación hidrodinámica, plasma frío, campos magnéticos oscilantes y luz blanca de alta intensidad (4). Estos métodos no-térmicos no sólo alcanzan la FSO establecida, sino que además alargan la fase de latencia de los posibles microorganismos sobrevivientes; ya que tardan mucho más en reparar los daños estructurales que sufren por estos métodos (5).

Asimismo, la respuesta de los microorganismos frente a cualquier tratamiento conservante es variable (5). Si analizamos los riesgos que implica esta variabilidad en la inocuidad alimentaria, diríamos que las consecuencias son graves e inaceptables si, por ejemplo, un patógeno sobrevive en el alimento después de un tratamiento. Dicha supervivencia, puede ser una fuente significativa de variabilidad microbiana.

Por otra parte, en los últimos años muchos autores han confirmado la importancia de incluir dentro del modelado de inactivación los parámetros de variabilidad e incertidumbre (6) (7) (8) (9). Los modelos cinéticos y probabilísticos aquí estudiados contemplan estos dos parámetros, en los cuales la respuesta microbiana es considerada como una distribución de valores. Dentro de este mismo contexto, en el año 2011, Aguirre, estudió el efecto de la irradiación en la fase de latencia de células individualizadas y posteriormente contrastó esos resultados con la respuesta frente a tratamientos térmicos. Siendo el efecto de la irradiación la más perjudicial para la supervivencia de las bacterias tratadas (10). Sin embargo, se sabe muy poco del efecto de la acidificación en la variabilidad de la fase de latencia de células individualizadas (9). Por tanto, entender mejor la eficacia de estos procesos de conservación de los productos alimenticios, quizás permitan mejorar la precisión de los modelos predictivos, especialmente en lo que respecta a la fase de latencia.

Al respecto indicar, que aún no hay tratamiento que inactive a todas las bacterias presentes en un alimento y a su vez conserve su calidad organoléptica y nutritiva, el objetivo global del presente trabajo, es el estudio de la variabilidad de la fase de latencia de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y *Listeria innocua* supervivientes a tratamientos subletales de acidificantes, irradiación y calor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Revitalización y preparación del inóculo bacteriano

Las cepas de *Listeria innocua* (ATCC 33090) y *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* (ATCC 13076), se mantuvieron en congelación a -20°C en caldo tripticaseína soja (TSB; Pronadisa, España) con un 10% de glicerol (Panreac Chemistry S.A., España). Se revitalizaron 40 µl de la cepa en estudio, mediante un pase a tubos con 9 ml de TSB estéril se resembró dos veces consecutivas a 37°C durante 24 h. Tras este pase, se sembró 1 ml en tubos de centrifuga estériles con 20 ml de TSB, incubándose por 24 horas a las condiciones antes mencionadas para concluir con la revitalización. El cultivo de 24 h fue dejado y los tubos fueron colocados en una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B a 14000 rpm a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  para el tratamiento acidificante, 8000 rpm a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  tratamiento térmico, ambos durante 9 minutos y 12000 rpm  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 min para los tratamientos de irradiación. Para homogenizar las células sedimentadas se re-suspendieron en 10 ml de solución salina estéril (0,80% NaCl). Esta operación se repitió dos vez para arrastrar más células. Finalmente el volumen de suspensión celular se llevó hasta 50 ml con solución salina estéril; la concentración inicial aproximada de cada microorganismo en dicho volumen fue de 108 a 109 ufc/ml, utilizada en las diferentes experiencias. Este protocolo se siguió estrictamente en todos los ensayos experimentales de inactivación a tratamientos térmicos, irradiación y acidificación.

### Condiciones experimentales de tratamiento subletal

Los valores de inactivación fueron estimados experimentalmente para acidificación (11) irradiación (10) y calor (9), para los cuales se aplicaron valores de reducción logarítmica (D-value) de 0, 1, 2, 3, 4 ciclos logarítmicos en las cepas antes mencionadas, con el fin de obtener inóculos finales entre 0,1-10 células/ml, de esa manera se obtuvieron los datos de inactivación subletal a la que se sometieron las bacterias en estudio (datos no mostrados).

### Curva de calibración de la fase de latencia en Bioscreen

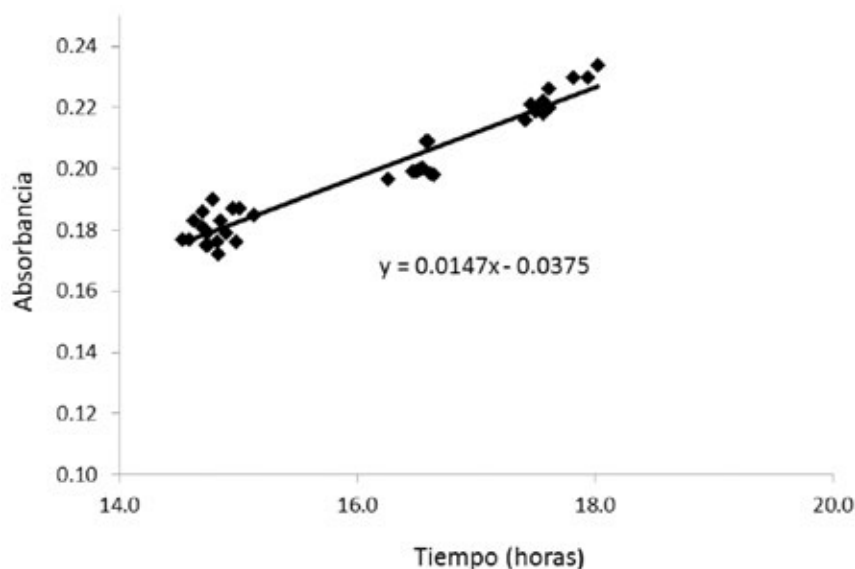
Para determinar la fase de latencia en el equipo de Bioscreen (C equipment, Labsystems, Helsinki, Finlandia) fue imprescindible determinar la cantidad de bacterias ( $N_d$ ) que generan una turbidez arbitrariamente elegida (0,20) de densidad óptica (DO), el tiempo de detección ( $T_d$ ) y la tasa específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Lag = T_d - \left( \frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu_{max}} \right) \quad (1)$$

Para determinar la turbidez de una determinada tasa microbiana  $\ln(N_d)$  se hicieron curvas de calibración diluyendo un cultivo con crecimiento microbiano en TSB estéril (desde 101 hasta 106 ufc/ml). Para los tratamientos de acidificación y calor se utilizó TSB y para la irradiación se aplicó en placas de agar soja tripticaseína (TSA, Pronadisa, España) previamente esterilizado por irradiación, en la planta de irradiación IONISOS S.A. (Tarancón, España).

Las muestras se mantuvieron en refrigeración durante el transporte hasta el laboratorio. Posteriormente se sembraron 300  $\mu$ l de las distintas concentraciones celulares diluidas en 15 pocillos de Bioscreen (12). Siendo este método por el que se obtuvo las curvas de calibración; que expresan la relación existente entre las medidas DO con una concentración microbiana la cual se ajusta a una ecuación lineal. Las absorbancias seleccionadas estaban comprendidas en los intervalos 0,20 de absorbancia en la banda 420 - 580 nm de longitud de onda. Los datos de las curvas de calibración, estaban expresados en medidas de absorbancia que fueron transformadas a recuentos celulares (ufc/ml). Obteniéndose, al menos, 4 o 8 puntos, representados gráficamente. La recta de dicha gráfica es la recta de regresión (ajustada por el método de los cuadrados mínimos) que permite estimar los tiempos de incubación que se espera para cada absorbancia. Sustituyendo la variable “y” por 0,20 y despejando “x” en la ecuación de la recta se obtienen los valores  $T_d$ . La Fig. 1 es un ejemplo de la representación gráfica de la ecuación al que hacemos referencia.

Figura N°1. Ejemplo de ecuación de la recta



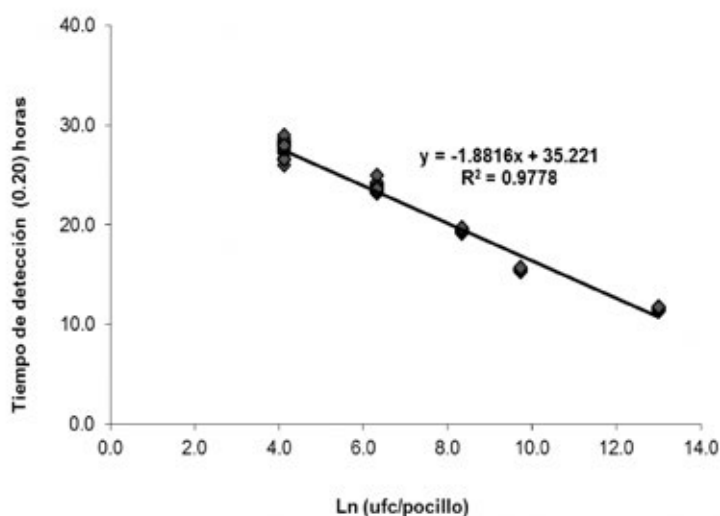
Fuente: Elaboración propia. 2019.



La Figura 1 es un ejemplo de la estimación del tiempo de detección ( $T_d$ ) de *S. Enteritidis* en TSB a 20 °C. Las regresiones lineales muestran el tiempo versus diferentes inóculos. Esto permite estimar  $T_d$  en una basorbanancia arbitraria de 0,20 (la cual es una concentración de 107 ufc/ml, datos no mostrados).

Por otra parte, la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) se calculó a partir de mediciones DO obtenidos en el Bioscreen (13); que implica sembrar diferentes concentraciones microbianas en un número representativo de pocillos (al menos 20) de esa manera se calculó los tiempos que tardan tales diluciones en llegar al tiempo de detección ( $T_d$ ). Seguidamente, los datos son representados gráficamente, la recta de regresión de tales puntos y el inverso del valor absoluto de la pendiente de la recta resultante es igual a la tasa específica de máximo crecimiento tal como observa a manera de ejemplo en la Figura 2.

Figura N° 2. Recta de regresión



Fuente: Elaboración propia. 2019.

En la Figura 2 se observan las diluciones seriadas y el tiempo de detección de cada inóculo para alcanzar una OD= 0,20 en el equipo de Bioscreen para estimar la tasa máxima de crecimiento de *S. Enteritidis* en TSB a 20 °C.

Así mismo, para calcular la tasa máxima de crecimiento en alimentos irradiados se aplicó el siguiente método; inicialmente las muestras lonchadas de jamón cocido (El Pozo Alimentación S.A., Murcia, España) de 1 mm de espesor y aproximadamente 4 cm de diámetro son irradiadas (6 kGy). Todas las muestras se mantuvieron en condiciones de refrigeración mientras eran transportados a la planta de irradiación. Posteriormente, en condiciones de esterilidad fueron inoculados por inmersión en suspensiones bacterianas con aproximadamente 102 a 109 ufc/loncha distribuidas en varias bolsas de Stomacher estéril y sellado por calor, cada una de las diluciones fueron irradiadas con dosis de 0 a 3.5 kGy (30 bolsas/dosis) e incubados a 7°C. Para determinar el número de supervivientes se tomaron 5 muestras al azar y se añadían 5 ml de solución salina estéril y homogeneizadas en Stomacher (Seward Laboratory, London, UK) (10). Los recuentos de las alícuotas sembradas en placas de TSA indicaron el número de células supervivientes, proceso repetido durante bastantes días hasta que el cultivo llegara a la fase estacionaria. Entonces, el logaritmo natural del número de células versus

sus correspondientes tiempos de muestreo durante la fase exponencial fueron representados gráficamente usando Graphing Assistant Add-In Microsoft Excel y a partir de la pendiente de la recta de la curva de sobrevivencia ( $\mu = 1/\text{pendiente}$ ) se calculó la tasa de  $\mu_{\text{max}}$  del determinado alimento.

La variabilidad del estado fisiológico de las células (en los pocillos) estimadas experimentalmente a través del  $N_d$ ,  $T_d$  y  $\mu_{\text{max}}$  son funciones de la fase de latencia en células individuales a determinadas condiciones, y de acuerdo con la ecuación (1), puede transformarse fácilmente en fases de latencia (tal como se explica en el siguiente apartado).

### Fase de latencia en células individuales

De acuerdo con la línea de investigación de este trabajo, la fase de latencia de células individualizadas es definida como el tiempo transcurrido desde que se inicia la incubación hasta que la célula se divide (14). El método aquí utilizado para calcular la fase de latencia fue a partir de las curvas de crecimiento descrito en el apartado 2,3, tal como fue descrito por varios autores (14) (15). Para esto, tras revitalizar los microorganismos como se describe en el apartado 2,1, se realizaron diluciones decimales en solución salina hasta lograr una concentración aproximada 104 ufc/ml. 10 ml de la concentración 104 ufc/ml se diluye en 90 ml de TSB estéril manteniéndose los tiempos suficientes para lograr inactivaciones a tratamientos acidificantes, térmicos (entre 0 y 4 ciclos logarítmicos) y de irradiación (0 a 3,5 kGy). Para los controles, se sigue el mismo protocolo, excepto que no se aplica tratamiento microbicida alguno (datos mostrados en la Tabla 1). Pasados los tiempos de inactivación las bacterias supervivientes de *S. Enteridis* y *L. Innocua* son diluidas consecutivamente en TSB estéril hasta lograr 1 célula en 300  $\mu\text{l}$ , cantidad que se transfieren correctamente homogeneizados en condiciones de esterilidad a 100 pocillos de la primera microplaca del Bioscreen. En los pocillos de la segunda microplaca se depositaron 300  $\mu\text{l}$  de una dilución decimal de la muestra empleada para la primera microplaca y así tener la garantía de que en una de las placas hubiera un porcentaje significativo de pocillos sin células y otro contuviera sólo 1 célula. Se midió el tiempo necesario para que la multiplicación de una única célula genere una población, cuya turbidez alcanzaba a 0,20 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 420 – 580 nm. La distribución de los  $T_d$ , se ajustó a la función de la densidad de probabilidad ( $f(x)$ ) de una distribución gamma (15). Siendo la distribución gamma la que mejor se ajustó a la mayoría de los datos.

Los datos obtenidos a diferentes tratamientos inactivantes eran registrados en hojas de cálculo Excel y la representación gráfica indicaba la distribución de tiempos de detección, que era la función de la fase de latencia (Lag) de las células individualizadas según la ecuación (1). Donde  $T_d$ , es aproximadamente 107-8 ufc/ml a 420 – 580 nm de longitud de onda,  $\ln(N_d)$  es el número de bacterias que generan turbidez,  $\ln(N_0)$  es el número inicial del inóculo bacteriano y  $\mu_{\text{max}}$  obtenido en condiciones experimentales. Sin embargo, para afinar aún más la estimación del número de células en cada pocillo y calcular con precisión la fase de latencia de células individuales, se planteó las siguientes dos estrategias: 1) estrategia que asume que todas las muestras con crecimiento contenían una célula (1C), tal como lo indicaron Francois et al. (2005) (12), Aguirre et al. (2006) (16); 2) estrategia basada en la distribución de frecuencias de la función de Poisson (P), en la cual un cierto número de muestras contenía uno, dos, tres, o más células, en función del porcentaje de muestras que presenten crecimiento. Por ejemplo, si hay dos, tres o n células viables, la fase de latencia de la población será paulatinamente más corta y, es de esperar, menos variable método propuesto por Aguirre et al. (2012) (16). Los datos obtenidos de esta etapa se muestran más adelante en las Figuras 6 y 7.

## Análisis de datos

La prueba chi-cuadrada fue aplicada para encontrar el mejor ajuste de los datos experimentales, siendo gamma la distribución que mejor se ajusta y describe matemáticamente la variabilidad biológica de la fase de latencia (véase Figuras 6 y 7); cálculo realizado en Microsoft Excel (15) (16).

Las varianzas en las distribuciones de la fase de latencia fueron comparadas con el test de permutación de acuerdo Aguirre et al. (15 y 16), prueba robusta que compara distribuciones no normales para ello se utilizó el software R 2.7.2 (2008). El valor p corregido de Holm-Bonferroni fue aplicado para determinar la significancia del valor ( $\mu$ ) de las varianzas en las distribuciones de cada microorganismo y sustrato (17).

## RESULTADOS

La Tabla 1 resume los recuentos de las bacterias *L. innocua* y *S. Enteritidis* sometidas a tratamientos de calor (9), irradiación (10) y acidificación (11). Dichos tratamientos inactivantes redujeron el elevado porcentaje de población microbiana, haciendo que estos mueran, otros sufren daños y, necesiten de un tiempo para repararse y poder volver a multiplicarse o simplemente permanezcan viable mas no cultivable (10) (11).

Tabla N° 1. Bacterias supervivientes en diferentes sustratos después de aplicar tratamientos acidificantes, calor e irradiación

Bacterias	Condiciones de crecimiento	Inactivación microbiana (pH/°C)	N° Total de muestras	Inactivación esperada	Tiempo de tratamiento (min)	Inactivación lograda (log ufc/ml)	Promedio de supervivientes (log ufc/ ml)	Sd*	Min*	Max <sup>b</sup>	CV (%)
<i>L. innocua</i>	Peptona/ ácido acético	pH 3,48	24	0	0,0	0,0	7,7	0,15	7,4	8,0	1,9
			75	2	36,1	2,6	5,1	0,39	4,3	5,9	7,7
			75	3	54,2	3,4	4,4	0,44	3,5	5,2	10,2
			75	4	72,2	4,0	3,7	0,60	2,5	4,9	16,2
	Caldo de pollo/ ácido acético	pH 3,13	15	0	0,0	0,0	8,5	0,04	8,4	8,6	0,5
			75	2	16,1	1,9	6,5	0,10	6,3	6,7	1,6
			75	3	24,2	2,8	5,7	0,26	5,2	6,2	4,6
			75	4	32,2	3,8	4,7	0,29	4,1	5,3	6,2
	Leche entera	54 °C	10	0	0,0	-	7,95	0,03	7,91	7,98	0,37
			78	2	28,0	-	5,82	0,13	5,48	6,00	2,23
			77	3	42,0	-	4,77	0,23	3,89	4,99	4,82
			75	4	56,0	-	3,98	0,41	3,39	4,91	10,30
	Jamón cocido	-	10	0	-	0,0	8,32	0,065	8,22	8,41	0,8
			-	99	2	2,11	6,21	0,221	5,61	6,61	3,6
			-	100	4	3,97	4,35	0,282	3,70	5,16	6,5
			-	94	6	5,88	2,44	0,579	1,70	3,48	23,7
<i>S. Enteritidis</i>	Peptona/ ácido acético	pH 3,80	11	0	0,0	0,0	7,2	0,13	7,0	7,5	1,8
			75	2	60,0	1,3	5,9	0,23	5,4	6,3	3,9
			75	3	90,1	2,7	4,5	0,34	3,8	5,2	7,5
			75	4	120,1	3,4	3,8	0,37	3,1	4,5	9,7
	Caldo de pollo/ ácido acético	pH 3,40	18	0	0,0	0,0	7,5	0,17	7,1	7,8	2,3
			75	2	70,1	2,2	5,3	0,29	4,7	5,9	5,5
			75	3	105,2	3,5	4,0	0,42	3,1	4,8	10,6
			75	4	140,2	4,6	2,9	0,48	2,0	3,8	16,6
	Leche entera	53 °C	9	0	0,0	-	7,13	0,07	7,05	7,25	0,98
			76	2	6,6	-	4,48	0,09	4,00	4,56	2,00
			74	3	8,8	-	3,40	0,30	2,84	3,97	8,82
			74	4	12,0	-	2,49	0,31	1,84	2,97	12,45
	Jamón cocido	-	10	0	-	0,00	8,71	0,076	8,63	8,89	0,9

Sd\*Desviación estándar

Min\* Concentración mínima en una muestra (log ufc/ml)

Max\* Concentración máxima en una muestra (log ufc/ml)

CV Coeficiente de variación (%)(100\*Sd/media).

Fuente: Elaboración propia. 2019.

Las bacterias supervivientes a los tratamientos inactivantes de 0 a 4 ciclos logarítmicos mostradas en la Tabla 1, fueron diluidas para obtener células individualizadas para su inoculación en microplacas de Bioscreen. Las dos temperaturas del Bioscreen fueron 20°C para acidificación y 16°C calor e irradiación durante el tiempo necesario para que sobrepase el valor de absorbancia 0.20 unidades, los resultados obtenidos son valores experimentales de Td, Ln (Nd) y  $\mu_{max}$  que son constantes. Ln (N0) se determinó con la distribución de Poisson (P). Estos valores son reemplazados en la ecuación (1), facilitando así el cálculo matemático de la fase de latencia de células individualizadas.

La Tabla 2 muestra los valores de la tasa  $\mu_{max}$  de células supervivientes a calor y acidificación obtenidas experimentalmente. Los tasas de  $\mu_{max}$  muestran la rapidez con la que se duplica la micropoblación superviviente, así por ejemplo las tasas de  $\mu_{max}$  a tratamientos acidificantes (mayores a 0.461) indican que las células se dividen más rápidamente comparado a tratamientos térmicos (menores a 0,312).

Tabla N° 2. Tasa específica de máximo crecimiento, calculados experimentalmente en TSB para estimar las fases de latencia que se muestran en la Tabla N° 4.

Bacterias	Sustrato y temperatura (°C)	Tratamientos	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	SE
<u>Listeria innocua</u>	TSB, 20 °C	Acidificación	0,461	0.99	0.028
	TSB, 16 °C	Temperatura	0,312	0.99	0.051
<u>Salmonella Enteritidis</u>	TSB, 20 °C	Acidificación	0,532	0.98	0.029
	TSB, 16 °C	Temperatura	0,252	0.99	0.078

$\mu_{max}$ : Tasa específica de máximo crecimiento

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación

SE: Error estándar de  $\mu_{max}$

Fuente: Elaboración propia. 2019.

La variabilidad de las fases de latencia se muestra en la Tabla 3, los resultados evidencian que las fases de latencia de las células de L. Innocua y S. Enteritidis supervivientes a tratamientos estresantes, se caracterizan por ser más largas y más variables ya que los valores de Sd son más elevados que las del control (0 reducciones logarítmicas). Además, cuanto más intenso es el tratamiento, la media de la fase de latencia es mayor. Dicha Tabla también muestra los coeficientes de variación (CV), una media porcentual que considera la Sd y la media de la distribución (100\*Sd/media), en todos los casos las Sd aumenta proporcionalmente a la intensidad del tratamiento aplicado. No obstante, se aprecian ciertas diferencias entre datos, caracterizando al tratamiento acidificante de mucho más variable comparado con los otros dos tratamientos. Al respecto, la variabilidad de las fases de latencia depende del tratamiento inactivante aplicado, de la temperatura de incubación o tiempo de almacenamiento.

Tabla N° 3. Fases de latencia de células individuales de *L. innocua* y *S. Enteritidis* en diferentes sustratos, después de recibir tratamientos subletales.

Bacterias	Tratamientos	N° total de muestras	No. de muestras con crecimiento	N° esperado de reducciones Log	Condiciones de crecimiento	No promedio de células por muestra <sup>a</sup>	Estimación asumiendo 1 célula por muestra			Estimación asumiendo la Distribución de Poisson		
							Media fase lag (h)	Sd (h)	CV (%)	Media fase lag (h)	Sd (h)	CV (%)
<i>L. innocua</i>	Acidificación	100	54	0,0	TSB, 20 °C	0,8	18,8	4,6	24,4	20,0	4,0	20,0
		100	62	1,8		1,0	40,2	8,1	20,1	41,6	6,5	15,6
		100	66	3,2		1,1	45,4	9,6	21,1	47,0	8,1	17,2
	Temperatura	100	48	3,9	TSB, 16 °C	0,7	92,0	25,9	28,1	93,0	24,9	26,8
		100	54	0,0		0,8	25,0	4,7	18,8	25,8	3,8	14,8
		100	54	2,0		0,8	52,7	12,6	23,9	53,5	11,7	21,8
	Irradiación	100	67	3,0	TSB, 16 °C	1,1	70,5	16,5	23,4	71,4	15,3	21,4
		100	65	4,0		1,0	123,9	21,3	17,2	125,1	20,0	16,0
		100	54	0,0		0,8	24,53	4,2	17,2	25,4	3,3	12,9
	Acidificación	100	39	1,1	TSB, 16 °C	0,5	46,44	13,7	29,5	46,9	13,3	28,4
		100	80	2,2		1,6	56,96	15,5	27,2	58,7	14,6	24,8
		100	59	4,3		0,9	130,7	22,2	17,0	131,7	21,4	16,2
<i>S. Enteritidis</i>	Acidificación	100	64	0,0	TSB, 20 °C	1,0	11,8	5,4	45,8	13,4	4,1	30,6
		100	56	3,2		0,8	26,8	14,9	55,6	28,0	13,5	48,2
		100	62	2,1		1,0	37,4	18,7	50,0	38,6	17,3	44,8
	Temperatura	100	60	4,6	TSB, 16 °C	0,9	49,6	22,2	44,8	50,8	20,8	40,9
		100	49	0,0		0,7	36,1	3,9	10,8	37,0	3,1	8,4
		100	44	1,0		0,6	59,4	10,0	16,8	60,2	9,4	15,6
	Irradiación	100	73	2,0	TSB, 16 °C	1,3	81,9	15,2	14,8	83,6	10,6	12,7
		100	37	3,0		0,5	101,6	17,4	17,4	102,2	16,7	16,3
		100	49	0,0		0,7	34,5	3,9	11,3	35,4	3,1	8,8
	Acidificación	100	50	2,4	TSB, 16 °C	0,7	89,8	6,1	6,7	90,7	5,2	5,7
		100	75	4,8		1,4	150,1	8,9	5,9	152,0	7,7	5,0
		100	52	5,6		0,7	187,33	13,4	7,2	188,4	12,4	6,6

<sup>a</sup> Cálculo a partir de la tabla de distribución de Poisson.

SD: Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación % (100 Sd/media).

Fuente: Elaboración propia. 2019

Así, por ejemplo, las fase de latencia más cortas corresponden a los tratamientos acidificantes, en cambio fases de latencia significativamente más largas corresponden a irradiación seguida del tratamiento térmico. A este respecto, podría atribuirse que dicha variabilidad está asociada al tipo de tratamiento aplicado que causan diferentes tipos de lesiones a la estructura celular de la bacteria. En la acidificación, el mecanismo de acción actúa contra dianas metabólicas específicas que dañan la membrana plasmática (18) y debido a que el metabolismo es una red entrelazada, a menudo es difícil determinar con exactitud el grado de inactivación del microorganismos (3). Sin embargo, la bacteria verá reducida su actividad fisiológica “normal” y, dejará de multiplicarse o, al menos verá cómo se prolonga su fase de latencia (15).

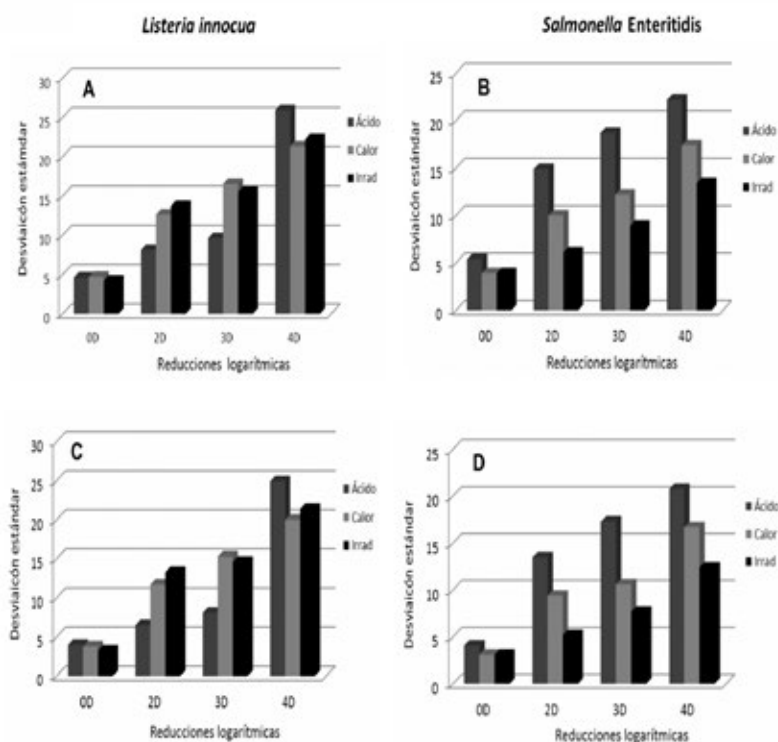
Por otra parte, se ha sugerido que la desnaturalización de las proteínas que causa el tratamiento por temperatura o calor es el mecanismo que causa la muerte de las bacterias o al menos está estrechamente asociada con este fenómeno (10). En el caso de los microorganismos irradiados, se produce una degradación química del ADN y del ARN que desestabiliza la síntesis proteica que también puede afectar la membrana celular y como resultado global, los microorganismos mueren o, al menos sufren daños que podrán repararse o no, ya que la reparación del ADN es más difícil, desde luego la fase de latencia se extenderá más en el tiempo (10). Estos resultados contribuyen a corroborar la hipótesis de que cualquier método conservante que afecte el ADN extendería aún más la fase de latencia (16).



También se observó que a medida que el tratamiento se hace más estresante la variabilidad de la fase de latencia aumenta. Por lo tanto, tratamientos intensos llevan a fases de latencia más largos y más variables. El sustrato también influye en la variabilidad de la fase de latencia. Como era de esperar, la variabilidad fue mayor en sustratos ricos en nutrientes que en TSB. Por otra parte, la efectividad de la intensidad de tratamiento aplicado se verá reflejada en el número medio de células supervivientes que iniciaran la fase de latencia.

Considerando todos estos factores puede entenderse que la fase de latencia sea peculiar para cada microorganismo y condición por la que haya pasado y en la que se encuentre, lo que dificulta considerablemente su predicción y la comparación entre los hallazgos de diferentes autores como Koutsomanis y Sofos (2004) (19) y Aguirre et al. (15) (16) (17). Asimismo, el análisis de la variabilidad de la fase de latencia puede también realizarse en función de la desviación estándar (Sd) que no se ve afectada por los valores absolutos de los datos, tal como se ven en los histogramas de la Figura 3. Esta figura muestra que la Sd va incrementándose conforme aumenta la intensidad del tratamiento, que causa la inactivación sub-letal o daño (reparable o irreparable) de las células y que pueden calificarse como similares a los publicados por otros autores como Koutsomanis y Sofos (2003), Aguirre et al. (2013a y 2015) y Métris et al. (2008) (15) (16) (13). Por otra parte, las desviaciones estándar permite observar que al asignar diferentes inóculos a cada muestra (distribución de Poisson), la variabilidad es siempre menor (comparada con la Sd calculada asumiendo que hay 1 sola célula) porque al asignar a las muestras tiempos de detección más cortos, los inóculos más elevados, al ser mayor a 1, el logaritmo es mayor a cero, con lo que la fase de latencia aumenta y se acerca a la media disminuyendo de esta manera la variabilidad de la fase de latencia (16).

Figura N° 3. Desviación estándar en células individuales de la fase de latencia de *L. innocua* y *S. Enteritidis* en TSB



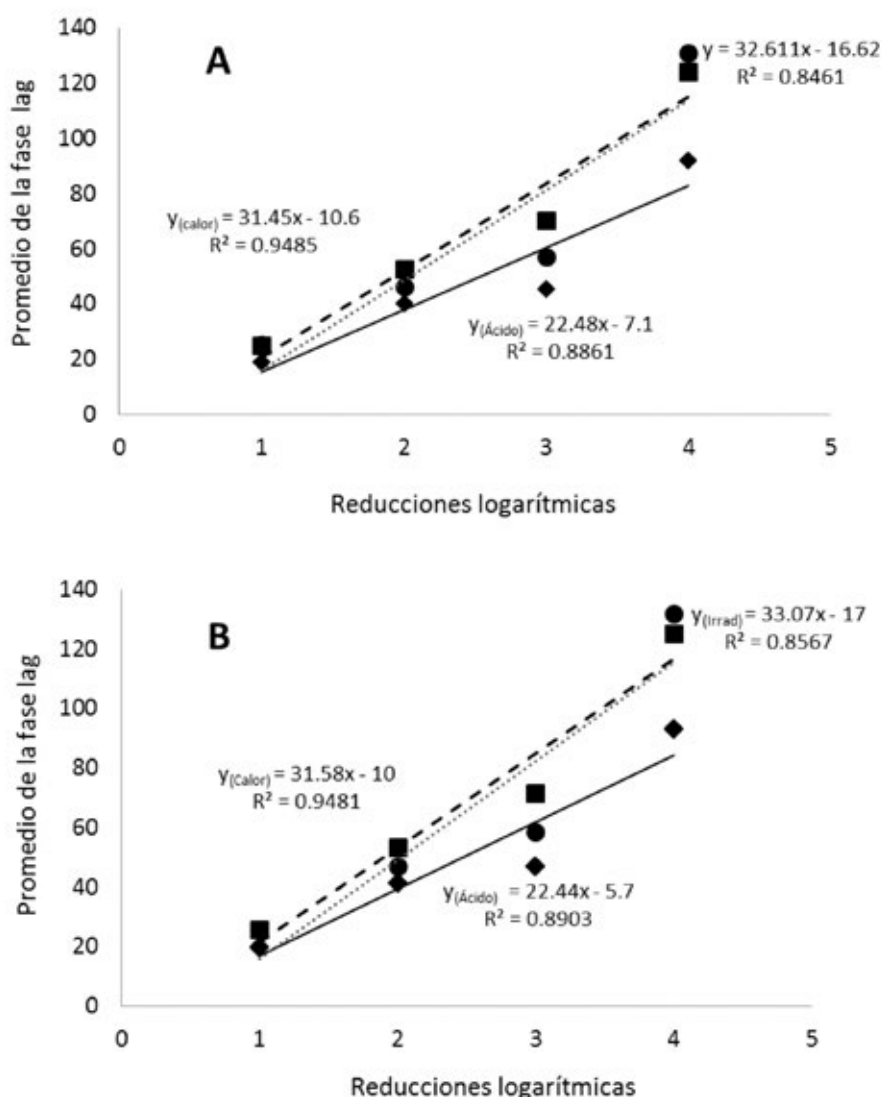
Fuente: Elaboración propia. 2019.



La Figura 3 muestra la desviación estándar en células individuales de la fase de latencia de *L. Innocua* y *S. Enteritidis* en TSB a 16 °C (tratamientos de calor e irradiación) a 20 °C (tratamientos acidificación). Las Figuras A y B fueron estimadas asumiendo 1 célula; mientras que C y D fueron estimadas asumiendo una distribución de Poisson de 1 célula/pocillo.

Dentro de este mismo contexto, las Figuras 4 y 5 resume muy bien los promedios de las fases de latencia tras aplicar tratamientos subletales.

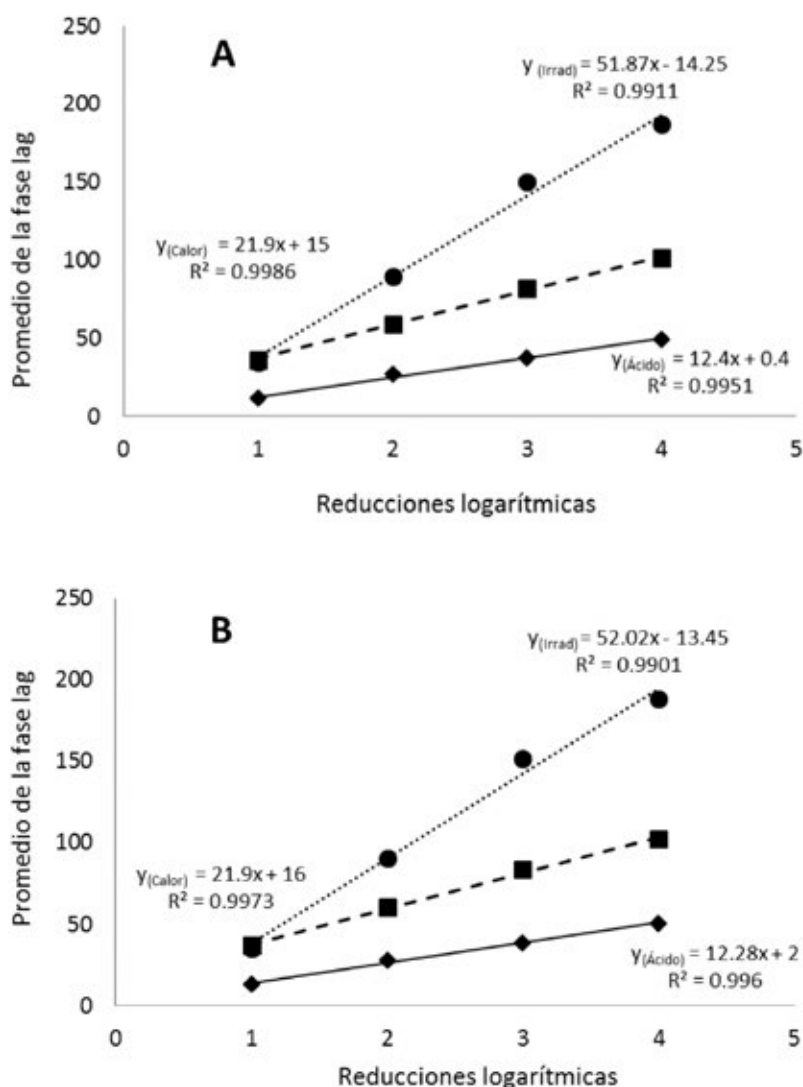
Figura N° 4. Comparación del promedio de las fases de latencia en células individuales de *L. Innocua*



Fuente: Elaboración propia. 2019.

La Figura 4 muestra la comparación del promedio de las fases de latencia en células individuales de *L. Innocua* sobrevivientes a diferentes reducciones logarítmicas a tratamientos de acidificación (diamante), calor (cuadrado) e irradiación (círculo). Cálculo realizado siguiendo la alternativa de 1 célula por muestra (A) o distribución de Poisson (B). Datos mostrados en Tabla 4.

Figura N° 5. Comparación del promedio de las fases de latencia en células individuales de *S. Enteritidis*



Fuente: Elaboración propia. 2019.

La Figura 5 muestra la comparación del promedio de las fases de latencia en células individuales de *S. Enteritidis* sobrevivientes a diferentes reducciones logarítmicas a tratamientos de acidificación (diamante), calor (cuadrado) e irradiación (círculo). Cálculo realizado siguiendo la alternativa de 1 célula por muestra (A) o distribución de Poisson (B). Datos mostrados en Tabla 4.

La temperatura de incubación también es crucial para la fase de latencia y se encuentra entre los factores más críticos (16). Temperaturas elevadas aceleran la velocidad de crecimiento, porque la velocidad de una reacción metabólica es catalizada por enzimas, como cualquier reacción química, duplicándose la velocidad de crecimiento por cada incremento de 10°C. El crecimiento en ambientes fríos en cambio, es necesario la adaptación homeoviscosa que permitirá a las células mantener la fluidez de su membrana. A temperaturas bajas, la célula bacteriana sintetiza cantidades crecientes de ácidos grasos mono-insaturados y di-insaturados para que sus lípidos tengan una fluidez

compatible con un metabolismo activo que retarda la velocidad de crecimiento o, lo que es similar da lugar a un crecimiento lento (10) (11). No cabe duda de que variaciones en la temperatura de crecimiento también afectan a la media de la fase de latencia tal como observamos a 20°C con fases de latencias que están entre 18,8 a 93,0 horas y Sd 4,0 a 24,9 horas. A 16°C las medias de las fases de latencia corresponde de 25,4 a 131,7 horas y Sd de 3,1 a 22,2 horas (véase Tabla 4). Estos valores nos permiten entrever que una población surgida en teoría de una única célula, la misma genética, tenga respuestas variables ante un determinado tratamiento y temperatura de crecimiento, porque habrá algunas células supervivientes que necesiten mucho más tiempo para repararse y quedar en disposición de multiplicarse o por el contrario células menos dañadas (resistentes) que se dividan más velozmente.

## DISCUSIÓN

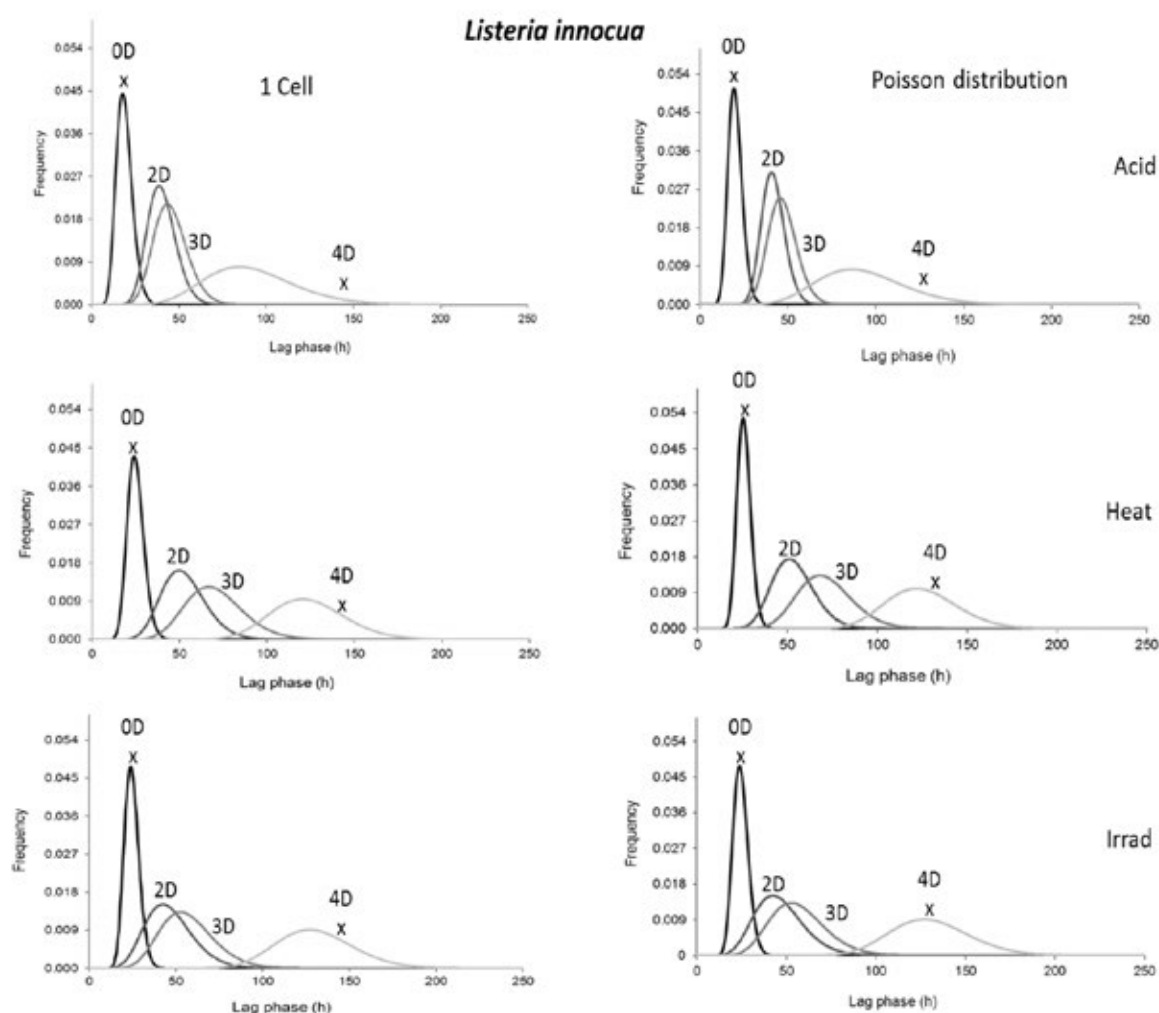
Las dos alternativas utilizadas en este estudio para la estimación de la fase de latencia asumiendo que se tiene 1 célula/pocillo o por el contrario asumiendo que sigue una distribución de Poisson también producen diferencias en los valores calculados. Analizando, la premisa de una célula por pocillo (1C), las fases de latencia son más cortas, mientras que las predicciones estimadas con la distribución de Poisson (P) siempre son largas que las primeras tal como puede comprobarse en la Tabla 4. Entonces ¿Qué datos deben ser más fiables? El análisis de todos los datos recabados, indican que los menos fiables serán los de “1 célula” (1C) porque obviamente, en algunos pocillos con crecimiento habrá una sola célula, pero los datos de los pocillos donde se tenga más de una, siempre serán algo erróneos y, evidentemente, cuantos más pocillos con crecimiento se tengan en un experimento, mayor será el error que se cometa porque más muestras contendrán dos, tres, etc. células viables. *A priori*, parece que la asignación de mayores inóculos predicho por Poisson (P) a las muestras más rápidas en alcanzar el nivel de detección es realista y debería ser el más cercano a la precisión. Pero, no puede garantizarse que la existencia de dos o más células en un pocillo indique que comiencen a crecer antes. Por una parte, cabe la posibilidad que una exista una célula más rápida en iniciar el desarrollo y este aislada en una muestra, sin compañeras o también es probable que las muestras con mayor número de células iniciales contengan las células más rápidas en iniciar su duplicación. El hecho, que la fase de latencia sea más corta conforme aumenta el tamaño del inóculo ha sido corroborado por otros investigadores como Aguirre et al. (2012) (16) e incluso fue modelado por Métris et al. (2003) (20).

Al respecto, señalar que cabe la posibilidad de que el efecto del tamaño del inóculo no sólo se debe a un efecto numérico, probabilístico, también a algo biológico. Como por ejemplo la “edad” de las estructuras celulares, tal como lo apuntaron Stewart et al. (2005). Este grupo de investigadores observó que después de la división simétrica, las células hijas heredaban el extremo celular de la célula madre o polo y se formaba un nuevo polo. Después de varias divisiones, las células con los polos “viejos” iniciales crecían más despacio que aquellas células recientemente formadas con nuevos componentes. Otra explicación podría ser algún tipo de quorum sensing (QS), es decir, comunicación intercelular dentro de una población. Mecanismo controlado por una expresión génica en función de la densidad celular, que puede darse entre la misma especie (intraespecies), entre diferentes especies (interespecies) y entre bacterias y organismos superiores (inter-kingdom) (15).

Al respecto, el método matemático que permite una aproximación probabilística de la variabilidad biológica de la fase de latencia es la distribución gamma (16) aceptada por muchos y competentes autores como la que mejor se ajusta a la realidad de las fases de latencia (10 y 15). Esta distribución se caracteriza por dos parámetros forma y la varianza.

Las Figuras 6 y 7 muestran las distribuciones gamma obtenidas a partir de las dos alternativas (1C y/o P) mostradas en la Tabla 4, la observación de cualquier de ellas permite entender que las fases de latencia de las bacterias no estresadas son bastante afiladas en los tres tratamientos, y a medida que se van haciendo más largas y las distribuciones más anchas conforme el estrés se hace más intenso (en todos los casos). La distribución gamma de las fases de latencia asumiendo la alternativa de 1célula/celda con crecimiento muestran que las bacterias del lote control (0D) a tratamientos acidificantes, calor e irradiación no presentan diferencias significativas, similares resultados se observaron a 2D, 3D y 4D. Igual comportamiento muestran las distribuciones gamma de las fases de latencia asumiendo la distribución Poisson/celda con crecimiento. Aunque no se ven diferencias remarcables a primera vista, desde un punto de vista académico y de precisión, la distribución de Poisson/pocillo que asume que las muestras tienen un número diferente de células es la más recomendable porque muestran tiempos de detección más cortos comparado con las distribuciones gamma con las muestras que tienen una célula/pocillo.

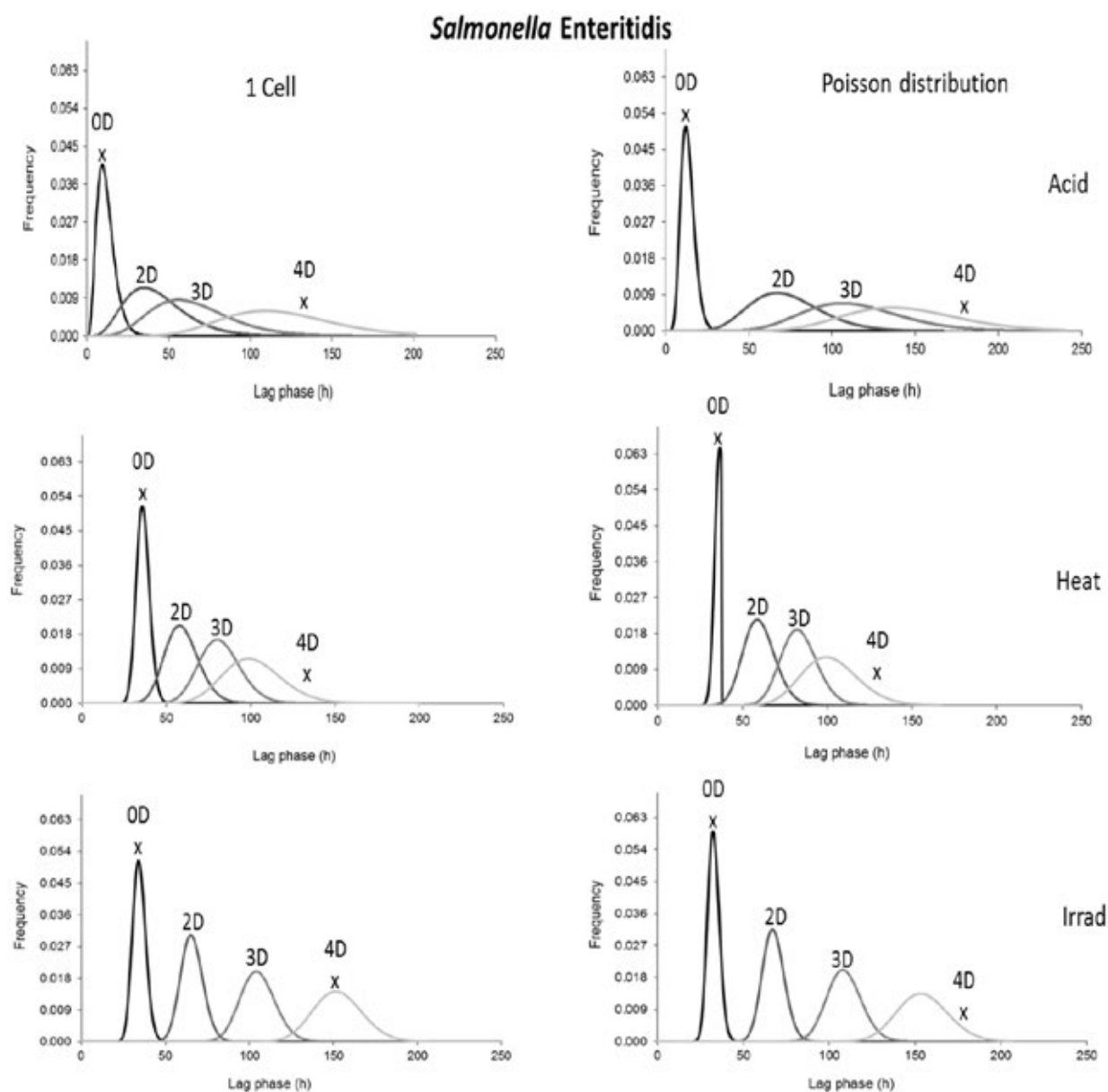
Figura N° 6. Distribución de la fase de latencia en células viables de *Listeria innocua* en caldo tripticaseína soja



Fuente: Elaboración propia. 2019.

La Figura 6 muestra la distribución de la fase de latencia en células viables de *Listeria innocua* en caldo tripticaseína soja (TSB) asumiendo un inóculo de 1 célula/pocillo o asumiendo la distribución de Poisson del número de células/pocillo en muestras con crecimiento. Las bacterias se sometieron a diferentes tratamientos acidificantes, calor e irradiación para lograr el número indicado de reducciones logarítmicas, luego se dejaron crecer a 20 °C (en el caso de tratamiento con ácido) o a 16 °C (en el caso de tratamientos de calor e irradiación). Las variaciones de las distribuciones etiquetadas con una "x" son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) según la prueba de permutación.

Figura N° 7. Distribución de la fase de latencia en células viables de *Salmonella Enteritidis* en caldo tripticaseína soja



Fuente: Elaboración propia. 2019.

La Figura 7 muestra la distribución de la fase de latencia en células viables de *Salmonella Enteritidis* en caldo tripticaseína soja (TSB) asumiendo un inóculo de 1 célula/pocillo o asumiendo la distribución de Poisson del número de células/pocillo en muestras con crecimiento. Las bacterias se sometieron a diferentes tratamientos acidificantes, calor e irradiación para lograr el número indicado de reducciones logarítmicas, luego se dejaron crecer a 20 °C (en el caso de tratamiento con ácido) o a 16 °C (en el caso de tratamientos de calor e irradiación). Las variaciones de las distribuciones etiquetadas con una "x" son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) según la prueba de permutación.

Considerando que las fases de latencia presentaban un mejor ajuste con la distribución gamma para comparar dichas distribuciones se recurrió a la prueba de permutación. Este test compara, desde un punto de vista estadístico, múltiples muestras “no normales” como por ejemplo fases de latencia. Además este test agrega la corrección de Holm-Bonferroni (17), necesaria para las comparaciones múltiples. En la práctica este test recalcula los valores-p y considera que es significativo siempre que sea menor que un determinado valor alpha, al que convencionalmente se le asigna el valor de  $\alpha = 0,05$ .

Continuando con la explicación, indicar que se compararon las fases de latencia de *L. Innocua*, *S. Enteritidis* calculado con la distribución de Poisson (P) y calculados con la premisa de una célula (1C) tras recibir 0, 2, 3 y 4 reducciones logarítmicas a tratamientos acidificantes, calor e irradiación. De estas observaciones puede decirse que para la premisa 1C no hay diferencias significativas en los lotes control (0D) a tratamientos acidificantes, calor e irradiación al igual que tampoco hay diferencias significativas a 2, 3 y 4D. Igual conclusión se extrae con la premisa P. Sin embargo si a este test agregamos la corrección de Holm-Bonferroni indican que los diferentes grados de inactivación son significativamente diferentes a 0 y 4D (valor  $p < 0.05$ ). En cambio a 2D y 3D no hay diferencias significativas tal como se observa en las Figuras 6 y 7 marcadas con una x. Esa pequeña diferencia resalta la importancia del cálculo de la fase de latencia cuando de micro-poblaciones se trata. Si la industria la utiliza conocería la probabilidad de supervivencia de sus contaminantes al proceso conservante que aplique (acidificante, calor, irradiación o de otra naturaleza), la fase de latencia de los posibles microorganismos que puedan haber sobrevivido y su tasa de crecimiento máximo, podría fijar la fecha de caducidad o de consumo preferente de acuerdo con el riesgo que quiera asumir (conociendo siempre la naturaleza del alimento).

## Conclusiones

Cuanto más intenso es un tratamiento conservante, menor es el número de supervivientes, pero aumenta la variabilidad de tal número. Tal variabilidad es mayor en alimentos que en sistemas modelos. Asimismo, cuanto más intensos son los tratamientos conservantes, más larga y variable es la fase de latencia de los microorganismos supervivientes, dicha variabilidad aumenta cuando el sustrato donde crece el microorganismo es más complejo y cuando la temperatura de crecimiento se aleja de la óptima. El tratamiento cuya fase de latencia es la más variable es la acidificación, en cambio la irradiación es una excelente alternativa a los tratamientos térmicos porque, tanto para la inactivación como para la fase de latencia arroja resultados más homogéneos y menos variables.

Así también, cuanto menor es el tamaño de la población microbiana, más larga y variable es la fase de latencia de la población por dos motivos: 1) es más probable que haya una célula con fase de latencia corta que reduce la de la población y; 2) debe existir un mecanismo de cooperación intercelular que acorta la fase de latencia de las poblaciones, incluso cuando el número de células que la integran



es de solo unas pocas decenas. Indicar la importancia de la aplicación de modelos predictivos que contemplen la variabilidad de la inactivación y de la fase de latencia que es y será de suma utilidad para la estimación de la probabilidad de que una población microbiana desarrolle. Quizás sea en los alimentos listos para el consumo y en los mínimamente procesados donde puedan sacarse más provecho de la aplicación de tales modelos.

### Agradecimientos

Agradecimientos especiales al Ph.D. Gonzalo García de Fernando catedrático de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, mi tutor mientras realizaba el doctorado en Ciencias Veterinarias por darme una oportunidad para hacer investigación y guiarme en los laboratorios del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Asimismo, agradecimiento al Ph.D. Juan Salvador Aguirre por su colaboración y por transmitirme sus conocimientos en microbiología predictiva

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MCMEEKIN, T.A., AND ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*. 2002; 78: 133-153. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00231-3)
2. BARBOSA-CÁNOVAS, G., AND BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. Nonthermal Processing of Food. *Scientia Agropecuaria* 2010; 1: 81-93. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2010.01.08>
3. ADAMS, M.R., AND MOSS, M.O. *Food Microbiology Third Edition*. University of Surrey, Guildford, UK. Publishing Royal Society of Chemistry. 2008.
4. MAÑAS, P. Inactivación microbiana para nuevas tecnologías de conservación de los alimentos. *Avances en microbiología de los alimentos*. Editora Elena Gonzáles-Fandos. Logroño: Universidad de la Rioja. 2012. p. 55-60.
5. MACKEY, B.M. En: *The microbial safety and quality of foods*. Vol 1. ed. Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg. 2000. p. 331-341
6. DELIGNETTE-MULLER, M.L., ROSSO, L. Biological variability and exposure assessment. *International Journal of Food Microbiology*. 2000; 58 (3): 203-12. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00274-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00274-9)
7. VAN BOEKEL, M.A. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 2002; 74: 139-159. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00742-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00742-5)
8. KOUTSOUMANIS, K. A study on the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behaviour of microbial populations. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 128 (1): 116-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.013>
9. AGUIRRE, J.S., RODRIGUEZ, M.R., AND GARCÍA DE FERNANDO, G.D. Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009; 75 (22): pp. 6992-6997. <https://doi.org/10.1128/AEM.00452-09>
10. AGUIRRE, J.S., RODRIGUEZ, M.R., AND GARCÍA DE FERNANDO, G.D. Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms. *International Journal of Food Microbiology*. 2011; 149 (3): 236-246. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.003>
11. RODRIGUEZ, MARIA R., AGUIRRE, JUAN S., LIANOU, ALEXANDRA., PARRA-FLORES, JULIO., GARCÍA DE FERNANDO, GONZALO. Analysis of the variability in microbial inactivation by acid treatments. *LWT - Food Science and Technology*. 2016; 66: 369-377. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.056>

12. FRANCOIS, K., DEVLIEGHERE, F., STANDAERT, A.R., GEERAERD, A.H., VAN IMPE., J.F., Y DEBEVERE, J. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. In Predictive Modelling in Food- Conference Proceedings. Kattholieke Universiteit Leuven/BioTec, Belgium: In: Van Impe, J. F.M., Geeraerd, A.H., Leguérine, I. 2003.
13. ROBINSON, T.P., OCIO, M.J., KALOTI, A., MACKEY, B.M. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 1998; 44 (1-2): 83-92. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00120-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00120-2)
14. BUCHANAN, R.L., KLAUITTER, L.A. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes*. Scott A at refrigeration temperatures. International Journal of Food Microbiology. 1991; Feb; 12 (2-3): 235-245. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90074-Y](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90074-Y)
15. AGUIRRE, J.S., MONIS, A., AND GARCÍA DE FERNANDO, G.D. Improvement in the lag phase estimation of individual cells that have survived mild heat treatment. International Journal of Food Science & Technology. 2013; 49 (3): 884-894. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12382>
16. AGUIRRE, J., BRAVO, C., ORDÓÑEZ, J.A., GARCÍA DE FERNANDO, G. The Poisson distribution is applied to improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. Advances in Microbiology. 2012; Vol. 2 No. 2, 146-161. <https://doi.org/10.4236/aim.2012.22020>
17. HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scandinavian Journal of Statistics. 1979; 6: 65-70.
18. PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D.A. Microbiología. 4a Edición. McGraw-Hill. Interamericana. 1999. p. 114 – 136.
19. KOUTSOUMANIS, K.P., SOFOS, J.N. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. Letters in Applied Microbiology. 2004; 38 (4): 321-6. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01491.x>
20. MÉTRIS, A., GEORGE, S., BARANYI, J., PECK, M.W., BARANYI, J. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. Journal Microbiological Methods. 2003; Dec.; 55 (3): 82. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.006>

Derechos de Autor (c) 2019 María Rosa Rodríguez Vargas; Juan Salvador Aguirre García.



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

**Atribución:** Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) - [Texto completo de la licencia](#)