

MODELIZACIÓN PREDICTIVA DE DESARROLLO BACTERIANO EN LOS ALIMENTOS.

Rosa María García Gimeno¹, Gonzálo Zurera Cosano¹.

Introducción

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 interviene podría ser cuantificado, por lo que se podría establecer si ese 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 sólo unos pocos, entre los que destacan pH, a_w y temperatura (Pooni y Mead., 1984). Esta es la base de la subdisciplina que se está desarrollando dentro de la microbiología de alimentos, la microbiología predictiva (Buchanan, 1991). La microbiología predictiva se basa en la premisa de que las respuestas de las poblaciones de microorganismos a los factores ambientales son reproducibles y de este modo es posible, desde observaciones realizadas, predecir las respuestas de esos microorganismos en otras condiciones similares (Ross y col., 2000b).

Todos los modelos son simplificaciones que representan los complejos procesos bioquímicos que controlan el crecimiento microbiano. Deben ser simplificados hasta un número razonable de parámetros de entrada. Estos parámetros necesitan ser fácilmente medidos (por ejemplo, la temperatura y el pH) o conocidos para un alimento (por ejemplo, la concentración de sal añadida). Un parámetro de entrada, como la concentración de glucosa o de un péptido, necesitaría un análisis del alimento previo al uso del modelo. Por lo tanto, el modelo debe ser a la vez suficientemente complejo para aportar una predicción útil, pero lo bastante simple como para poder ser utilizable. Este equilibrio entre simplicidad y complejidad significa que no existe un modelo óptimo para todas las situaciones. Los modelos multiparamétricos, de rangos amplios, basados en cultivos en caldo, tienen aplicaciones más extensas que los diseñados para una única variable, como la tempera-

¹ Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Campus Rabanales. Universidad de Córdoba.

tura, o aquellos basados en único alimento, pero son, a su vez, probablemente menos exactos que los modelos más específicos (Whiting y Buchanan, 2001).

Pero la microbiología predictiva no se restringe a un ámbito teórico sino que tiene como finalidad la aplicación en la industria. 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. El desarrollo de los modelos predictivos permitirá a los productores predecir la vida media y seguridad de sus productos en una determinada etapa y hacer que los científicos puedan usar condiciones inhibitorias y preventivas (Bratchell y cols., 1990). El modelo matemático aporta conocimientos y técnicas para las decisiones día a día en el control de la cadena de producción como complemento del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) (Cole, 1991).

Un gran inconveniente que tiene el sistema de modelización 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. En Australia estimaron que se ahorra un 20% de costes con la prevención de la alteración de los alimentos (McMeekin y Olley, 1993).

Precedentes históricos y situación actual

La modelización en Microbiología de los alimentos comenzó alrededor de 1920 con el desarrollo de métodos para el cálculo de los tiempos de destrucción térmica. Estos modelos revolucionaron la industria conservera (Goldblith y col., 1961). La posibilidad de predecir el comportamiento microbiano en los alimentos no es novedosa y existen referencias del uso de la microbiología predictiva en la literatura de la década de los años 30. Scott en 1937 informó sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento de los microorganismos en el músculo de buey. En este trabajo se demuestra claramente la potencialidad de reunir datos cinéticos en función de las respuestas de crecimiento microbiano para predecir la vida media y seguridad de los alimentos.

Los primeros trabajos de modelización de datos en microbiología se hicieron en fermentaciones industriales, donde se desarrolló una serie de ecuaciones como la que introdujo Monod en 1949, para describir el impacto de las variables en el rendimiento.

Desde hace tiempo se tiene interés en conocer en qué medida diferentes factores afectan el crecimiento bacteriano o la producción de toxinas (Farber, 1986). Este interés ha llevado a la necesidad de buscar técnicas de modelización de datos para explicarlas.

En la década de los 80 un marcado incremento en la incidencia de brotes en enfermedades alimentarias condujo a un creciente conocimiento público de los requisitos para un suministro sano y seguro de los alimentos. Durante el mismo período muchos microbiólogos de los alimentos comenzaron a aceptar que los métodos microbiológicos tradicionales, para determinar la calidad y seguridad alimentaria, estaban limitados por el tiempo necesario para obtener resultados, y que los métodos indirectos dependientes de cambios químicos, físicos o fisicoquímicos no proporcionaban una respuesta hasta que no había un gran número de células. Muchos de los métodos rápidos propuestos requieren altos niveles de células antes de una respuesta evidente, mientras que otros dependen del uso de equipos muy sofisticados y caros.

Una alternativa para la tecnología en desarrollo es la microbiología predictiva. Los modelos predictivos son construidos midiendo la respuesta de los microorganismos frente a los principales factores que los controlan, como por ejemplo la temperatura, pH, atmósfera gaseosa, conservantes químicos o a_w , por separado o en conjunto. Posteriormente los modelos pueden ser aplicados para predecir la magnitud del crecimiento o muerte de los microorganismos, bajo condiciones no experimentadas.

Se ha despertado un interés internacional por la microbiología predictiva particularmente en Estados Unidos y Reino Unido, también en Australia y los países del este de Europa. Los gobiernos, los institutos de investigación y la industria están trabajando, independientemente o en colaboración, en programas para generar las bases de datos necesarias para el desarrollo de los modelos predictivos, y también en sistemas que consigan que la información esté accesible rápidamente para una amplio rango de usuarios.

El retorno reciente de la modelización predictiva es impulsado por la proliferación de alimentos refrigerados y de vida útil limitada, el desarrollo de sistemas combinados de conservación y la aparición del ordenador personal. Las herramientas microbiológicas, matemáticas y estadísticas ya existían antes de la expansión actual. Sin embargo, sin la capacidad de difundir complicadas ecuaciones y resolverlas rápida y repetidamente en el propio ordenador, los grandes esfuerzos en investigación necesarios para crear modelos microbianos no habrían dado fruto (Buchanan, 1993a).

Tipos de modelos predictivos

La clasificación de los modelos predictivos aún no tiene un único esquema con un completo apoyo por parte de la comunidad científica (McDonald y Sun, 1999). Sin embargo, el esquema propuesto por Whiting y Buchanan (1993) de modelos primarios, secundarios y terciarios es un avance para aumentar esa claridad que es necesaria. Además los modelos predictivos se pueden clasificar según su finalidad en modelos cinéticos o probabilísticos y según su base matemática en empíricos o mecanísticos. La disponibilidad de muchos y diferentes modelos, puede hacer que la selección del mejor modelo para un uso particular sea complicada. En situaciones determinadas se puede trabajar mejor con un modelo que con otro para algunos datos particulares.

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).

Los **modelos probabilísticos**, se utiliza más con microorganismos cuya sola presencia constituye un riesgo (por ejemplo las esporas del *Clostridium*) y 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** estiman la respuesta de crecimiento específica, con respecto a diferentes variables ambientales como la temperatura, el pH o la a_w (Van Boekel, 1996). Otras variables como la concentración gaseosa, el potencial de oxidación-reducción, humedad relativa, contenido de nutrientes y propiedades antimicrobianas también pueden incluirse en los modelos cinéticos. Existen buenas revisiones de la modelización cinética (Skinner y Larkin, 1994; Baranyi y Roberts, 1994, 1995; Kovarova-Kovar y Egli, 1998; Betts y Earnshaw, 1998). Los modelos cinéticos son útiles y pueden utilizarse para predecir cambios en el número de microorganismos con respecto al tiempo, incluso cuando una variable que puede afectar al crecimiento esté cambiando. No obstante, estos modelos son laboriosos de construir puesto que requieren muchos datos de recuento microbiano (Gibson y col., 1988; McClure y col., 1994a; Baranyi y col., 1995).

Los modelos cinéticos han sido empleados con mayor frecuencia que los probabilísticos, para modelar los efectos de variables intrínsecas y extrínsecas, particularmente la temperatura, en el crecimiento microbiano (McMeekin y col., 1997).

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 sólo unos pocos influyen fuertemente sobre el crecimiento microbiano; y por lo tanto muchos serían los factores pero realmente son solo unos pocos los que influyen sobre el crecimiento éstos son la temperatura, el pH y la actividad agua_w.

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 y Olley, 1993).

Varios modelos intentan predecir el crecimiento bacteriano con respecto a la temperatura. Los más conocidos son los siguientes:

- Modelo Arrhenius no lineal (Broughall y cols., 1983)
- Funciones sigmoidales (McMeekin y Olley, 1993; Zwietering, y cols., 1990)
- Modelo Raíz Cuadrada (Ratkowsky y cols., 1983)
- Modelo de formas polinómicas (Gibson y Roberts, 1986a y b)
- Modelo6. Modelo de Hinselwood (Zwietering, y cols., 1990)
- Modelo Arrhenius lineal (Davey, 1991)
- Modelo Schoofield y cols. (Schoofield y cols., 1981)
- Modelo Nuevo (Duh, y Schaffner, 1993):
- Modelo hiperbólico (Davey, 1991)
- Modelo dinámico de Van Impe (Van Impe; y cols., 1992)
- Modelo dinámico de Baranyi (Baranyi y cols., 1993a, b y c)
- Función que relaciona la asíntota superior con la temperatura (Zwietering y cols., 1991)
- Redes neuronales artificiales (Garcia-Gimeno y cols., 2002)

Los **modelos probabilísticos** estuvieron originariamente relacionados con predecir la posibilidad de que ciertos microorganismos formadores de esporas crecieran y produjeran toxinas (como *Clostridium botulinum*) para un periodo de tiempo determinado. Más recientemente, este tipo de modelos han sido extendidos para definir los límites de crecimiento de microorganismos en ambientes específicos, donde un único factor no es limitante pero en conjunto con otros sí previenen o inhiben el crecimiento microbiano.

La base que se establece para el modelización probabilístico es la relación existente entre el crecimiento de las células microbianas y las propiedades fisicoquímicas del ambiente (Ross y McMeekin, 1995). La probabilidad de crecimiento microbiano puede ayudar al productor de alimentos a la hora de tomar decisiones a cerca de la formulación, procesamiento, envasado y almacenamiento de un producto (Roberts, 1997).

Los modelos probabilísticos son apropiados en aquellos casos donde el conocimiento de la producción de toxinas en un alimento es un dato de interés, y sin embargo la velocidad de crecimiento proporciona escasa información (Gibson y Hocking, 1997). Tal es el caso del estudio llevado a cabo por Buchanan (1993a) en el que determina la probabilidad de que *Cl. botulinum* sobreviva en carne de vaca enlatada. Sin embargo, el principal problema que surge con este tipo de modelos es que la probabilidad cambia con respecto al tiempo, por lo tanto los modelos probabilísticos son de hecho una combinación de ambos modelos cinéticos y probabilísticos.

Ratkowsky y Ross (1995) formularon la hipótesis de que debería ser usado un modelo cinético para generar un modelo probabilístico que describa el área de crecimiento/no crecimiento. Fue propuesto un modelo logístico de regresión para determinar la probabilidad de crecimiento a varias condiciones, incluyendo pH, temperatura, sal y nitrito sódico. La unión de aproximaciones cinéticas y probabilísticas puede ser vista como una integración a la microbiología predictiva de modelos cinéticos y probabilísticos, y una unificación de la microbiología predictiva y la teoría de obstáculos (Ratkowsky y Ross, 1995). Sin embargo, las razones para una aparente unión entre los modelos cinéticos y de probabilidad no están aún claras (Presser y col., 1998).

Los productos alimenticios deberían ser formulados teniendo los mínimos requerimientos para su conservación, mientras que satisfagan las preferencias de los consumidores (Presser y col., 1998). Houtsma y col., (1996) describieron el efecto combinado de la temperatura, pH y lactato sódico en el crecimiento de *Listeria innocua* en salchichón tipo bologna, en el área que tuvo en cuenta el crecimiento por encima de la concentración mínima de inhibición de lactato sódico. De esta manera, fue posible discriminar entre crecimiento y no crecimiento, y estimar el tiempo en el cual podría sucederse el crecimiento bajo unas condiciones específicas (Houtsma y col., 1993, 1994).

Uno de los factores limitantes de estos modelos es el determinar cuál es el error probabilístico real que se debería aceptar, sobre todo en casos en los que produzcan intoxicaciones fatales. Otra dificultad es establecer cuál es el nivel de esporos iniciales en un producto y como se traduce al establecer una vida media segura a un producto. Estos

problemas se están resolviendo integrando los dos modelos probabilísticos y de cinética. Los modelos predictivos también se pueden clasificar según el origen de su base matemática en modelos empíricos y mecanísticos. Los **modelos empíricos**, como la función de Gompertz, son de interés en situaciones prácticas y simplemente describen los datos de crecimiento bajo condiciones experimentales en forma de una conveniente relación matemática (Gibson y col., 1987). Otros ejemplos de este tipo de modelos son las redes neuronales artificiales, modelos de raíz cuadrada y sus modificaciones, así como las ecuaciones polinómicas (Geeraerd y col., 1998). Estas últimas son fáciles de usar y no requieren el conocimiento particular de un proceso.

Comprender los mecanismos fundamentales que gobiernan el metabolismo celular, con producción de datos, permitirá la construcción de los **modelos mecanísticos**. Este tipo de modelos representarán los mecanismos más exactamente y generarán predicciones a partir de hipótesis (Bazin y Prosser, 1992). Por lo tanto, podría ser posible la interpretación de la respuesta modelada en términos de conocer los fenómenos y procesos (Krist y col., 1998). Baranyi y Roberts (1994) indicaron que los modelos derivados mecanísticamente serían más fáciles de desarrollar y además la cantidad y calidad de información de los sistemas analizados incrementaría. No obstante, no se han desarrollado modelos mecanísticos completos que incorporen todas las variables intrínsecas y extrínsecas que afectan al crecimiento microbiano (Labuza y Fu, 1993).

La mayoría de investigadores están de acuerdo en que los modelos mecanísticos son inherentemente superiores a los modelos empíricos, por las razones citadas arriba (Van Impe y col., 1992). Actualmente los modelos disponibles son empíricos o semi-mecanísticos. Sería aconsejable que los modelos que se desarrollasen en el futuro reflejen el conocimiento que se tiene sobre la dinámica microbiana y se construyan para obtener datos de calidad.

La denominación de los modelos predictivos en modelos primarios, secundarios y terciarios tuvo su origen en la demanda de Davey (1992) quien solicitó la creación de una terminología que expresase el significado de la descripción y desarrollo del modelo predictivo. En respuesta a esta demanda, y para evitar las confusiones existentes, Whiting y Buchanan (1993) propusieron un nuevo sistema de clasificación para la microbiología predictiva, de acuerdo con criterios específicos, bajo tres niveles: modelos primarios, secundarios y terciarios.

Los **modelos primarios** los constituyen las expresiones matemáticas que describen el cambio del número de bacterias con el tiempo, bajo unas condiciones particulares del entorno y cultivo. La respuesta se puede medir directamente por recuento total, formación de toxina, nivel de substrato o productos del metabolismo, o bien indirectamente, por

medida de densidad óptica o impedancia. Se puede generar información acerca de los parámetros de crecimiento microbianos, como el tiempo de generación, duración de la fase de adaptación, velocidad o tasa de crecimiento exponencial y densidad máxima de población (Whiting y Buchanan, 1993). Otros ejemplos de modelos primarios serían, el que describe los recuentos decrecientes con el tiempo durante el procesamiento térmico, tal como el ampliamente usado «tiempo de reducción decimal», o valor D, y el que describe la producción de una toxina microbiana u otro producto metabólico a lo largo del tiempo

Los **modelos secundarios** están compuestos por ecuaciones que describen cómo varían los parámetros de crecimiento de los modelos primarios (tasa de crecimiento, duración fase de adaptación, etc.) con cambios en uno o más factores ambientales (temperatura, pH, aw, atmósfera gaseosa, etc.). Ejemplos de estas ecuaciones son las basadas en las fórmulas de Arrhenius o en la de la raíz cuadrada (Skinner y col., 1994), particularmente si la temperatura es el principal factor de control del crecimiento, aunque dichos modelos ya han sido ampliados para incluir el pH y la aw. Cuando se incluyen otros factores, tales como la concentración de ácidos orgánicos o nitritos, se pueden emplear ecuaciones de regresión polinomiales, las cuales son muy flexibles, con términos cuadráticos, cúbicos e interacciones, pero tienen una menor interpretación mecanística si los comparamos con las anteriores.

Los **modelos terciarios** son aplicaciones de uno o más modelos primarios y secundarios, incorporados a software informáticos a nivel de usuario, cuyo uso facilita la aplicación de dichas ecuaciones matemáticas. Actualmente hay disponibles comercialmente varios paquetes informáticos de modelización microbiana, los cuales varían en complejidad, desde una sencilla ecuación en una hoja de cálculo, a sistemas expertos o programas de simulación de estimación del riesgo. En general, los usuarios de estos programas no necesitan estar preparados en las técnicas de modelización predictivo, y como consecuencia, hacen de la microbiología predictiva una herramienta fácilmente accesible y poderosa para todas las áreas de la investigación e industria de alimentos (Buchanan 1993).

En Estados Unidos, el ARS-USDA (Eastern Regional Research Center, Microbial Food Safety Reseach Unit) ha desarrollado el *Pathogen Modeling Program* (PMP). Este software utiliza modelos con múltiples variables, basados en el uso de la función de Gompertz, en combinación con análisis de respuesta en superficie. Fue desarrollado usando gran cantidad de datos experimentales del comportamiento de microorganismos patógenos en medios líquidos (Buchanan, 1991; 1993). La versión 6.0 de este software, editada en el 2001, contiene un modelo de inactivación térmica para *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, y modelos de crecimiento a temperaturas de refrigeración para *Cl. perfringens* y *Cl. botulinum*, como novedad.

Otro software lanzado al mercado ha sido el *Food Spoilage Predictor* (FSP), desarrollado por un grupo de científicos de la Universidad de Tasmania, en Australia (Neumeyer y col., 1997a). Este programa informático es capaz de cuantificar los efectos de la temperatura en diversos alimentos (carne, pescado y lácteos) y predecir el crecimiento de especies de *Pseudomonas* alterantes. Además es capaz de relacionar la vida media de un producto a su historial de temperaturas de almacenamiento. Sin embargo, el FSP requiere que el usuario tenga algunas nociones sobre informática, lo cual puede oponerse a la flexibilidad del mismo.

Otro software es el *Seafood Spoilage Predictor* (SSP), el cual predice e ilustra el efecto de las temperaturas y/o de los niveles de CO₂ sobre el crecimiento bacteriano alterante de productos de la pesca, como son *Shewanella putrefaciens* y *Photobacterium phosphoreum*, y sobre la vida comercial de dichos productos (Dalgaard y col., 2002).

Con la utilización de estos programas informáticos, para la estimación del crecimiento microbiano, no se puede garantizar que los valores predictivos se igualen a los observados en cualquier sistema alimenticio específico. Los investigadores han señalado las insuficiencias existentes en las fuentes actuales de información y han manifestado la necesidad de crear nuevas investigaciones para el desarrollo de softwares de modelos predictivos. Sin embargo, las investigaciones han demostrado que las predicciones obtenidas con varios programas informáticos concuerdan razonablemente bien con los resultados de la literatura o de experimentos.

Estrategia de modelización

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:

Diseño

Elección de los parámetros y confección de un plan de combinación de estos parámetros. 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.

Se sabe que existen combinaciones de factores (bajos valores de temperatura y pH, por ejemplo) donde las condiciones son extremas y no habrá crecimiento, y por otro lado combinaciones óptimas de factores donde el crecimiento será rapidísimo (37°C y pH= 7, por ejemplo para muchos microorganismos). Justamente en estos puntos habrá que prestar especial atención durante el planteamiento del experimento.

El diseño experimental variará según los objetivos planteados, siendo muy diferente la modelización de la producción de una toxina o la duración del tiempo de adaptación de un microorganismo patógeno en un alimento.

Acumulación de Datos

La aproximación al modelización se ha desarrollado usando curvas de crecimiento. Es importante que se realice suficiente cantidad de recuentos para describir toda la curva, sobre todo en durante cuatro momentos clave: la transición de la fase de adaptación a la fase exponencial, la pendiente de la fase exponencial, la transición de la fase exponencial y la fase estacionaria.

Ajuste de la Curva

Si se representa el logaritmo del recuento bacteriano frente al tiempo, se obtiene una curva sigmoideal (Figura 1). 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, fase estacionaria, para luego pasar a ser negativa en la fase de declive o muerte.

Si consideramos la ecuación de Gompertz como un ejemplo sencillo de ajuste de curvas:

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

donde:

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

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

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

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

B= Tasa relativa de crecimiento a M {log(cfu/ml)/hr}

Este ajuste a la curva debe posibilitar la definición de los parámetros necesarios para el modelo (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 modelización. Expresiones de la respuesta de crecimiento (tiempo de generación, tiempo de adaptación, ...) son calculadas a partir de los parámetros de Gompertz de la siguiente forma:

Tasa exponencial de crecimiento: $EGR = B \cdot C / e^{\{\log(ufc/ml)/h\}}$

Tiempo de generación: $GT = (\text{LOG } 2) \cdot e / B \cdot C \{h\}$

Modelización

En esta etapa la relación existente entre los parámetros de crecimiento calculados (tasa específica de crecimiento, por ejemplo) y las variables consideradas (la temperatura, por ejemplo) es traducida en una expresión matemática, como por ejemplo la ecuación de Ratkowsky y cols. (1983). Diversos estudiosos en este campo de los modelos predictivos están realizando grandes esfuerzos en la búsqueda ecuaciones con mayor componente mecanístico, o sea, que sean expresiones del metabolismo microbiano y no simplemente el mejor ajuste matemático de unos datos. Para cualquier sistema se asume que existe una representación matemática o física precisa de todos los fenómenos que ocurren en el sistema. En muchas situaciones sin embargo, a priori no se conoce cual es el modelo y es lo primero que el investigador debe establecer (Iyengar, 1984).

Validación

Este modelo aun pareciendo bueno necesita su validación, comparando las respuestas de crecimiento reales (tiempos de generación, tasa de crecimiento, densidad máxima, etc.) que han sido publicados en la literatura científica o bien resultados de nuevos experimentos, con los valores predictivos generados por el modelo. En algunos casos la coincidencia es excelente, otras veces la literatura no tiene muchos ejemplos. Zwietering y cols. (1994) han realizado un estudio reciente sobre la validación de los modelos y transformaciones que se realizan a los datos.

Predicción

Sólo después 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 productos, puede tenerse la garantía de que el modelo puede ser usado en predicciones (FLAIR, 1993).

Aplicaciones

Los modelos predictivos de crecimiento microbiano son herramientas útiles para que los microbiólogos obtengan estimaciones iniciales del comportamiento microbiano. Sin embargo, es fundamental que el usuario entienda y respete las limitaciones de un modelo dado. Algunos alimentos tendrán valores ambientales fuera de aquellos empleados para construir el modelo. Los alimentos pueden contener factores adicionales no incluidos en el modelo, con influencia significativa sobre el comportamiento de un microorganismo patógeno. El uso del modelo en estas situaciones es inapropiado y dará lugar a predicciones probablemente inexactas. No obstante, una vez validados, los modelos pueden aportar información rápidamente para tomar decisiones en muchas situaciones.

Entre las posibles aplicaciones de la microbiología predictiva se puede mencionar el establecimiento de la vida media comercial de los productos alimenticios, el estudio de posibles riesgos de crecimiento de microorganismos patógenos en productos nuevos y en la formación de personal puede ayudar a explicar el comportamiento microbiano durante un proceso y la importancia de los puntos de control. Otro aporte significativo lo hacen los modelos predictivos en el APPCC y en la evaluación del riesgo dentro del análisis de riesgo.

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

Los modelos predictivos se ha desarrollado basándose en experimentos utilizando medios de cultivos o directamente productos alimenticios. Se han realizado modelos a partir de productos como carnes y productos cárnicos (POONI, et al. 1984;Pooni y Mead,

1984), leche (Bin y cols., 1991), vegetales (Guerzoni y cols., 1992), pescado (Charm y cols., 1972) y salsas (Zanoni y cols., 1993).

Los microorganismos sobre los que se han realizado modelos predictivos son muchos, entre ellos los más estudiados fueron; *Clostridium botulinum* (Baker y Genigeorgis, 1990); *Listeria monocytogenes* (Buchanan y Philips, 1990); *Staphylococcus* (Buchanan, y cols. 1993); *Salmonella* (Gibson y cols., 1988); *Aeromonas hydrophila* (Palumbo y cols., 1992); *E. coli* (McClure y Roberts, 1987); *Yersinia enterocolítica* (Little y cols., 1994); *Bacillus cereus* (Raevuori y Genigeorgis, 1975); *Pseudomonas* (Membré y Burlot, 1994); *psicrófilos* (Stannard y cols, 1985), *bacterias acidolácticas* (Nicolai y cols., 1993); *Clostridium perfringens* (Yip y Genigeorgis, 1981) y levaduras (Gardini y cols., 1990)

Agradecimiento: Los autores quieren agradecer la financiación por parte del CICYT con el Proyecto ALI2001-2435, de INIA del proyecto CAL 01-032.1, y del Grupo de Investigación PAI AGR-170

Referencias bibliográficas

- Bratchell N.,Gibson A.M.,Truman M.,Kelly T. M., y Roberts T.A. (1989) Predicting microbial growth: The consequences of quantity of data. International J. Food Microbiol., 8, 47-58
- 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.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiol., 23, 277-294.
- Baranyi, J. y Roberts, T. (1995). Mathematics of predictive food microbiology. Int. J. Food Microbiol., 26, 199-218.
- 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. of Mathematics Appl. in Medicine and Biology 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.
- Baranyi, J., Robinson, T. P., Kalotia, A. y Mackey, B. M. (1995). Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. Int. J. Food Microbiol., 27, 61-75.
- Betts,G. y Earnshaw, R. (1998). Predictive microbiology for evaluating food quality and safety. Food Review, 25, 11-13.

- Bin, F., 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.
- 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.
- 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.
- 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*, Am. Chem. Soc., Washington, DC, Cap. 24
- Buchanan, R. (1993) Predictive food microbiology. *Trends Food Sci. Technol.*, 4, 6-11.
- Buchanan, R. y Philips, 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, 370-376.
- Buchanan, R., Bagi LK, Goins RV y Philips, J.. (1993a) Response surface models for the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.*, 10, 303-315
- Buchanan, R., Smith, J., McColgan, C., Marmer, B., Golden, M. y Dell, B. (1993b) 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
- Cole, M. (1991). Predictive modelling—yes it is! *Letters Appl. Microbiol.*, 13, 5, 218-219.
- Charm, S., Learson, R., Ronsivalli, L. y Schwartz, M. (1972). Organoleptic technique predicts refrigeration shelf-life of fish. *Food Technol.*, 26, 65-68.
- Dalgaard, P., Buch, P. y Silberg S. (2002). Seafood Spoilage Predictor—development and distribution of a product specific application software. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 343-349.
- Davey, K. (1991). Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 253-257.
- Davey, K. R. (1992). A terminology for models in predictive microbiology. *Food Microbiol.*, 9, 353-356.
- 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.
- Farber, J. (1986). Predictive Modeling of Food Deterioration and Safety. En: *Foodborne microorganisms and their toxins*. Person M. y Stem W. Ed. Marcel Dekker Inc., 57-90.
- FLAIR (1993). Periodic Progress Report «Predictive Modelling of Microbial Growth and Survival in Foods» IFR.
- García-Gimeno, R. M^a., Hervás-Martínez, C. y de Silóniz, M^a. I. (2002). Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 72, 19-30.
- 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.

- Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Cenens, C. y Van Impe J.F. (1998). Application of artificial neural networks as a non-linear modular modelling technique to describe bacterial growth in chilled food products. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1/2), 49-68.
- Gibson, A. M. y Hocking, A. D. (1997). Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. *Trends Food Sci. Technol.*, 8, 353-358.
- Gibson, A. y Roberts, T. (1986 a) 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. (1986 b) 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. M., Bratchell, N. y Roberts, T. A. (1987). The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurised 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.
- Gill, C. O., Harrison, J. C. L. y Phillips, D. M. (1991a). Use of temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a beef carcass cooling process. *Food Microbiol.*, 8, 83-94.
- Gill, C. O., Jones, S. D. M. y Tong, A. K. W. (1991b). Application of a temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a process for spray chilling beef carcasses. *J. Food Prot.*, 54, 731-736.
- Goldblith SA, Joslyn, MA y Nickerson JT.(1961) . An introduction to the thermal processing of foods, vol.1, p1118. AVI Publishing Co., Wesport, Conn.
- Guerzoni, M., García, R.M^a., 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.
- Houtsma, P. C., De Wit, J. C. y Rombouts, F. M. (1993). Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 20, 247-257.
- Houtsma, P. C., Kant-Muermans, M. L., Rombouts, F. M. y Zwietering, M. H. (1996). Model for the combined effects of temperature, pH and sodium lactate on growth rates of *Listeria innocua* in broth and bologna-type sausages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1616-1622.
- Houtsma, P. C., Kusters, B. J. M., De Wit, J. C., Rombouts, F. M. y Zwietering, M. H. (1994). Modelling growth rates of *Listeria innocua* as a function of lactate concentration. *Int. J. Food Microbiol.*, 24, 113-123.
- ICMSF (1991). El Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos. Su aplicación a las industrias de alimentos. Ed. Acribia, S.A.

- Iyengar, S. (1984). Computer modeling of complex biological systems. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Kovarova-Kovar, K., y Egli, T. (1998). Growth kinetics of suspended microbial cell: From single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 646-666.
- Labuza, T. P. y Fu, B. (1993). Growth kinetics for shelf-life prediction theory and practice. *J. Ind. Microbiol.*, 12, 309-323.
- Little, C., Adams, M., Anderson 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.
- 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.
- McClure, P. J., Cole, M. B. y Davies, K. W. (1994). An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *Int. J. Food Microbiol.*, 23, 359-375.
- McDonald, K. y Sun, D.W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry. *Internacional Journal of Food Microbiology.* 52, 1-27
- McMeekin, T. y Olley, J. (1993). En: Predictive microbiology. Theory and application. Research Studies Press Ltd.
- McMeekin, T. A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D. S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D. A., Ross, T., Salter, M y Soontranon, S. (1997). Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerg. Infect. Dis.*, 3, 541-549.
- McMeekin, T. A., Ratkowsky, D. A., Olley, J. y Ross, T. 1989. Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the Square Rood model for predicting bacterial growth in foods – A reply to C. Adair et al. *Food Microbiol.*, 6, 304-308.
- Membre, 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.
- Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Ann. Rev. Microbiol.*, Vol III.
- Neumeyer, K., Ross, T. y McMeekin, T. A. (1997). Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage *Pseudomonads*. *Int. J. Food Microbiol.*, 38, 45-54.
- 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 vacuum-packed meat. *Food Microbiol.*, 10, 229-238.
- 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.
- 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.
- Presser, K. A., Ross, T. y Ratkowsky, D. A. (1998). Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1773-1779.

- Raevuori, 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.
- Ratkowsky, D. A. y Ross, T. (1995). Modeling the bacterial no growth interface. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20, 29-33.
- 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.
- Roberts, T. A. (1997). Microbial growth and survival: developments in predictive modelling. *Food Technol.*, 51, 88-90.
- Roberts, T. y Jarvis, B. (1983). Predictive Modelling of Food Safety with Particular Reference to *Clostridium botulinum* in Model Cured Meat Systems. En: «Food Microbiology: Food Microbiology Advances and Prospects» Roberts T. y Skinner. F. Edit Academic Press, 85-95.
- Ross, T. y McMeekin, T.A. (1995). Predictive microbiology and HACCP. En : *Advances in Meat Research: HACCP in Meat, Poultry and Fish Processing* 10, Chapman and Hall, UK, pp. 330-357.
- Ross, T., McMeekin, T.A. y Baranyi, J. (2000). Predictive microbiology and food safety. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. R.K. Robinson, C.A. Batt and P.D. Patel (eds), Academic Press, San Diego, 1699-1710.
- 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.
- Skinner, G.E. y Larkin, J.W. (1994). Mathematical modelling of bacterial growth. *Journal Food Safety*. 14, 175-217
- Stannard, C., Williams, A. y Gibbs, P. (1985). Temperature growth relationships for psychrotrophic food-spoilage bacteria. *Food Microbiol.*, 2, 115-122.
- Van Boekel, M.A. (1996). Statistical aspects of kinetic modelling for food science problems. *J. Food Sci.*, 61, 477-485.
- 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.*, 58, 9, 2901-2909.
- Whiting, R. C. y Buchanan, R. L. (1993). A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiol.*, 10, 175-177.
- Whiting R.C. y Buchanan R.L. (2001) Técnicas avanzadas en microbiología de alimentos. Modelización predictiva. En: «Microbiología de alimentos: fundamentos y fronteras.» Doyle, Beuchat y Montville. (eds) Editorial Acribia, Zaragoza, pp 761-772.
- Yip, B. y Genigeorgis, C. (1981). Interactions of *Clostridium perfringens* and certain curing factors in laboratory media. En: *Proceedings World Congress of Foodborne Infections and Intoxications*, Berlin 1980. Paul Parey Publishers.
- Zaroni, B., Peri, C., Pierucci, S. y Barattini, A. (1993). Predictive modelling of bologna sausage cooking. *Ital. J. Food Sci.*, 4, 311-323.

- Zwietering, M., Cuppers, H., de Wit, J y Van't Riet, K. (1994). 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., Jongenburger, I., Rombouts, F. y Van't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1875-1881.
- Zwietering, M., Koos, J., Hansenack, B., de Wit, J. y Van't Riet, K. (1991). Modeling of Bacterial Growth as a Function of Temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 4, 1094-1101.