

Variabilidad microbiana y vida útil de los alimentos II. Cálculo de la fase de latencia de microorganismos individualizados

GARCÍA DE FERNANDO, GONZALO¹, VELASCO, RAQUEL¹ Y AGUIRRE, JUAN²

¹Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria (UCM).

²Departamento de Agroindustria y Enología. Universidad de Chile, Chile.

✉ mingui@ucm.es

En un artículo precedente (García de Fernando y col., 2024) se analizó cómo afecta la variabilidad de la inactivación microbiana a la vida útil de los alimentos y cómo puede aprovecharse dicha variabilidad para determinar su duración con cierta exactitud, en función del riesgo microbiológico que el fabricante considere oportuno asumir. Pero ya se anunciaba en dicho artículo que esa forma de actuar es imprudente porque considera constante la fase de latencia de los microorganismos. La fase de latencia puede ser crucial en la conservación de un alimento. ¿Por qué la vida útil de un alimento congelado o de uno deshidratado puede ser de muchos meses? Porque la fase de latencia de los microorganismos es casi infinita, ya que las condiciones del medio impiden la multiplicación. No obstante, es obvio que la composición de muchísimos alimentos y las condiciones en que se envasan y almacenan permiten el desarrollo de los microorganismos presentes. Estos microorganismos se caracterizarán por una determinada fase de latencia, considerada como el tiempo necesario para que se recuperen y/o adapten al medio para que se multipliquen por primera vez, y una tasa específica de crecimiento (tiempo necesario para cada duplicación de la población). Ambos factores deben tenerse en cuenta a la hora de establecer la vida útil de un alimento para que su carga microbiana no supere el límite que el fabricante considere o que el alimento aconseje.

Antes de ponernos a calcular la fase de latencia deben entenderse algunas características de este periodo. La fase de latencia viene determinada por un conjunto de factores; entre los más relevantes caben citarse las condiciones ambientales en que se encuentra la población (pH, temperatura, a_w , etc.) y la "historia" de dicha

población, es decir, en qué condiciones ha estado (tratamientos conservantes, pH, temperatura de incubación previa, etc.) (Baranyi, 2002). Otro factor a considerar es el número inicial de microorganismos; está demostrado que inóculos escasos se caracterizan por fases de latencia más prolongadas, mientras que concentraciones iniciales mayores, la acortan (Augustin y col., 2000; Robinson y col., 2001; Pin y Baranyi, 2006). ¿Por qué los inóculos más pequeños se caracterizan por fases de latencia más prolongadas? Sin duda hay un efecto "numérico-genético" basado en la probabilidad de encontrar en la población una o más células, con la disposición genética que permita una duplicación temprana y, claro está, condicionan la fase de latencia de la totalidad de la población, ya que las células "rápidas" empujarán al grupo a aumentar su número. Cuantas más células componen una población, más probable es que exista una célula muy rápida en iniciar el crecimiento y provocar una fase de latencia de la población corta (Pin y Baranyi, 2008). Así, la fase de latencia de poblaciones puede considerarse bastante constante, siempre que las condiciones, tanto las propias de la población (estado fisiológico) como de su entorno (temperatura, pH, medio circundante, etc.) sean las mismas (Augustin y col., 2000). Pero, tratándose de células individualizadas, la constancia es puro azar. Es decir, es muy improbable que la fase de latencia de una bacteria sea la misma que la de otra, aunque sean de la misma cepa y hayan sido tratadas de igual manera. Un microorganismo que ha sobrevivido a un estrés, sea cual sea, puede estar más o menos dañado y precisará de un tiempo variable (fase de latencia) para repararse y poder duplicarse (Mackey y Kerridge, 1988). Es de esperar que, a más daños, más tiempo (más larga la fase de latencia) (Aguirre y col., 2013).

Esto forma parte de lo que se ha dado en llamar "historia del microorganismo", es decir, sus antecedentes (Baranyi, 2002). El conjunto de condiciones por el que han pasado determina la fase de latencia de los individuos. La fase de latencia de una bacteria cuando pasa de estar en su temperatura óptima de crecimiento (establecida en el confort) a una temperatura de refrigeración será más prolongada que a la inversa, cuando se encuentra en unas condiciones más disgenéticas (viviendo en el estrés) y accede a unas más favorables (Aguirre y col., 2013). Cuando hay muy pocas bacterias viables, las fases de latencia tienden a ser más largas y más variables (Baranyi y Pin, 1999; Pin y Baranyi, 2006; Baranyi y col., 2009) porque en algunos casos habrá células rápidas en iniciar la multiplicación y en otros casos, no. En cambio, cuando las poblaciones son relativamente numerosas, de un par de cientos por mililitro, al menos en condiciones de laboratorio, las fases dejan de depender prácticamente del tamaño del inóculo (Augustin y col., 2000) porque hay una elevadísima probabilidad de que siempre haya células rápidas, prestas a multiplicarse.

En muchos alimentos puede haber un número reducido de microorganismos o, con una carga microbiana más o menos numerosa, un escaso número del microorganismo relevante; un caso obvio es el de *Listeria monocytogenes*. De sobra es conocida la ubicuidad de esta bacteria en la cadena alimentaria y que causa listeriosis, tanto en animales como en el ser humano, una grave enfermedad, mortal con cierta frecuencia (Takeuchi-Storm y col., 2023). Se encuentra en agua, suelo, heces y un largo etcétera (Rogga *et al.*, 2005). Se aísla de muchos alimentos, entre ellos, leche (Greenwood y col., 1991), los listos para el consumo, como quesos (Greenwood y

col., 1991; Cordano, 2001; Abrahão y col., 2008), helados (Cordano, 2001) y jamón cocido y loncheado (Martins y Germano, 2011). Así mismo, esta bacteria se ha aislado de techos, desagües, manillas y otras superficies (dos Santos y col., 2024). Estas referencias son solo un mínimo ejemplo de la abundante literatura que puede encontrarse a este respecto.

Su ubicuidad y patogenicidad, unidas a su carácter psicrotrofo (puede multiplicarse a 3 °C) (Santos y col., 2019), y su capacidad de supervivencia y crecimiento en ambientes estresantes, hacen de este microorganismo uno de los más peligrosos para la industria alimentaria. La legislación establece el criterio microbiológico de no detección en 25 gramos en los alimentos listos para el consumo destinados a lactantes y a usos médicos especiales, así como a los destinados a un público general que pueden favorecer su desarrollo y no pueda demostrarse que no se superarán las 100 ufc/g a lo largo de la vida útil del alimento; en aquellos alimentos listos para el consumo que no favorezcan el crecimiento de *L. monocytogenes* o en los que se pueda garantizar que no alcanzará las 100 ufc/g a lo largo de la vida útil, el límite establecido es 100 ufc/g (UE, 2005). Es incuestionable que, en este último caso, considerando el límite de aceptación y que el microorganismo puede crecer, la carga inicial ha de ser una o muy pocas células por gramo y la fase de latencia de cada una de las

células que conforman la minipoblación es muy relevante para estimar la vida útil del alimento. En definitiva, es fundamental conocer o estimar ρ , a ser posible, predecir, la fase de latencia de cada una de las células que pueden estar contaminando un alimento.

Experimentalmente puede calcularse la fase de latencia de células individualizadas y, claro, también de poblaciones. El equipo más utilizado para determinarla en medio líquido y transparente (medios de cultivo) es el Bioscreen, que puede calcular 200 curvas de crecimiento simultáneamente en sus 200 pocillos. Se trata en realidad de un turbidímetro que mantiene la temperatura constante y toma medidas de turbidez cada cierto tiempo. Para calcular la fase de latencia de células individualizadas hay que diluir el inóculo en su medio de cultivo líquido y transparente hasta poder sembrar en cada pocillo del equipo una única célula. Un hecho que se comprueba *a posteriori*, cuando no se aprecia el crecimiento en todos los pocillos. La función de probabilidad de Poisson [$f(k, \rho)$] permite predecir qué porcentaje de muestras (pocillos) contendrán k (1, 2, 3, etc.) células viables cuando la media de células por muestra es ρ . En la ecuación, e es la base de los logaritmos naturales (Aguirre y col., 2012).

$$f(k, \rho) = (e^{-\rho} * \rho^k) / k!$$

Para calcular ρ , la media del número de células por pocillo, se recurre a la siguiente

ecuación, que asume que se sigue una distribución de Poisson

$$\rho = - \ln(P)$$

siendo P , la probabilidad (de 0 a 1) de que no haya crecimiento en una muestra.

En la tabla 1 se muestran algunos datos al respecto que ayudan a entender la utilidad de la distribución de Poisson. Por ejemplo, si se ha observado crecimiento en la mitad de los pocillos (50 %), habrá un 35 % de muestras con una célula, 12 % con 2, 3 % con 3 y un 1 % con 4 y, claro está, 50 % sin viables.

Para calcular la fase de latencia en el Bioscreen se recurre a la siguiente ecuación:

$$Lag = Td - [Ln(N_d) - Ln(N_0)] / \mu_{max}$$

donde Lag es la fase de latencia, T_d , el tiempo de detección, es decir, el tiempo transcurrido hasta que se alcanza una determinada absorbancia fijada de forma arbitraria (con frecuencia 0,2) en el equipo, N_d la carga microbiana que genera dicha absorbancia, N_0 , la carga inicial y μ_{max} la tasa específica máxima de crecimiento. Entonces, para estimar la fase de latencia se han tenido que calcular con anterioridad, N_d y μ_{max} . N_d se calcula mediante una recta de calibración, haciendo recuentos de diferentes absorbancias en el entorno de 0,18 - 0,21 medidas en el propio equipo Bioscreen. La μ_{max} se calcula también en dicho equipo, inoculando cargas micro-

TABLA 1
PORCENTAJE DE MUESTRAS CON UN DETERMINADO NÚMERO CÉLULAS VIABLES,
PREDICHAS POR LA DISTRIBUCIÓN DE POISSON.

		% de muestras con número inicial de células						
% muestras con crecimiento	Media Cél/muestra	1	2	3	4	5	6	7
90	2,303	23	27	20	12	5	2	1
80	1,609	32	26	14	6	2	0	0
70	1,204	36	22	9	3	1	0	0
60	0,916	37	17	5	1	0	0	0
50	0,693	35	12	3	1	0	0	0
40	0,511	31	8	1	0	0	0	0
30	0,357	25	5	1	0	0	0	0
20	0,223	18	2	0	0	0	0	0
10	0,105	9	1	0	0	0	0	0

bianas conocidas en el intervalo $10^0 - 10^5$ ufc/pocillo. Cada una de las diluciones se inocula en unos 10 pocillos. Seguidamente se calcula el T_d de cada una y se genera una recta de regresión relacionando los logaritmos del número de viables por pocillo con la media de los T_d para cada inóculo. La inversa del valor absoluto de la pendiente de la ecuación de dicha recta es μ_{max} . Se muestra un ejemplo en la figura 1, en la que el inverso del valor absoluto de la pendiente es $\mu_{max} = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

En el caso de alimentos, una vez aplicado un tratamiento que debería permitir sobrevivir a una única célula por muestra, estas se incuban a la temperatura del estudio y, cada cierto tiempo, se enumeran los microorganismos viables en una o dos muestras y cuando en alguna de ellas se sobrepasaba 10^4 ufc/muestra, se recuentan todas (en torno a 100) al día siguiente. La fase de latencia se calcula mediante la siguiente ecuación (D'Arrigo y col., 2006):

$$Lag = T_{cont} - [(Ln(X_{cont}) - Ln(X_0))/\mu_{max}]$$

donde T_{cont} es el tiempo transcurrido desde el tratamiento hasta el momento del recuento, X_{cont} es el número de bacterias en T_{cont} , X_0 es el inóculo inicial y μ_{max} es la tasa máxima específica de crecimiento, que debería haberse calculado previamente mediante curvas de crecimiento. En este caso también es válida la distribución de Poisson para estimar cuántas muestras contienen 1 célula viable, cuántas 2, 3, etc. en función del número de muestras en las que no se ha apreciado crecimiento. Cuando hay una única célula, se cumple:

$$Lag = Td - [Ln(N_0) / \mu_{max}] \quad \text{y} \quad Lag = T_{cont} - \frac{[Ln(X_{cont})/\mu_{max}]$$

Pero cuando hay dos ó más células, la fase de latencia será, teóricamente, algo más corta porque será más probable que alguna de las células que forman esa micropoblación sea una de las rápidas y, por tanto, para minimizar errores, se asigna la fase latencia más corta de las medidas al inóculo más alto, la segunda más corta al siguiente inóculo más elevado y así sucesivamente hasta que todas las fases de latencia restantes deben pertenecer a células individualizadas (Aguirre y col., 2012); estos son los datos que deben utilizarse.

Con estas premisas, ya se puede calcular la fase de latencia de células individualizadas, unos datos que pueden ser cruciales para poder determinar con exactitud y seguridad la vida útil de los alimentos. Es

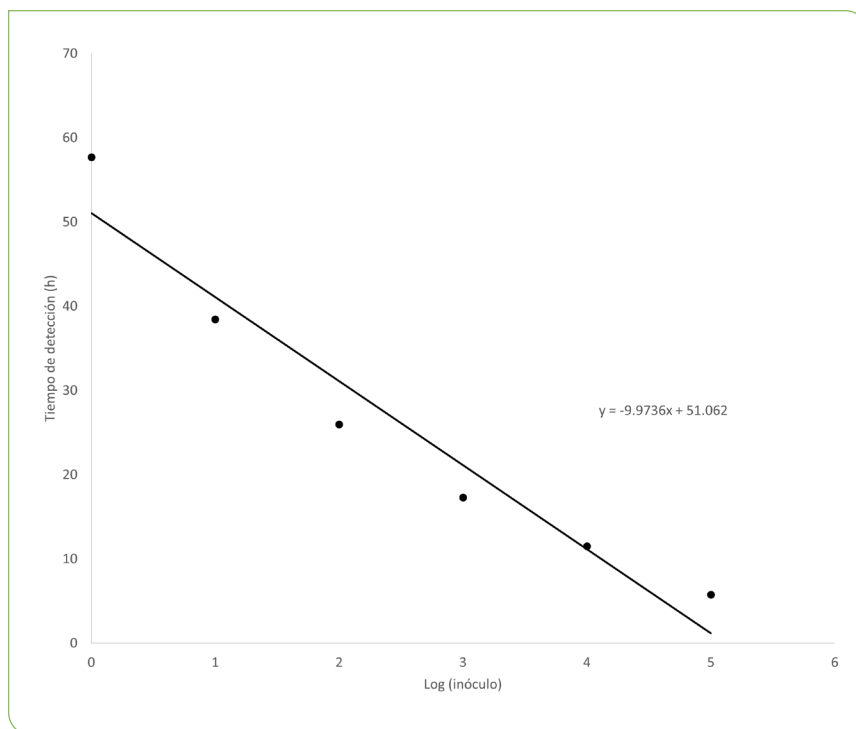


Figura 1. Efecto del tamaño del inóculo en el tiempo de detección.

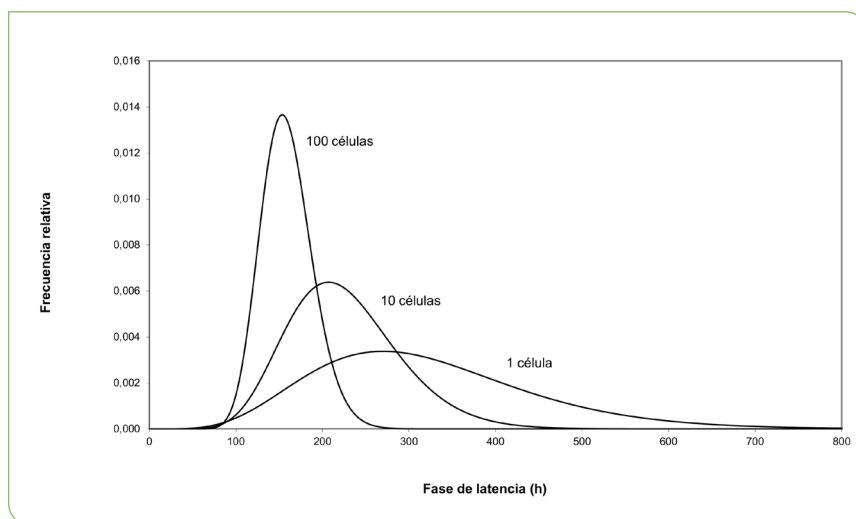


Figura 2. Distribuciones de las fases de latencia predichas de una micropoblación de 10 células/mL de *Listeria innocua* viables tras diferentes tratamientos desde 0 hasta 5D (Aguirre y col., 2013).

obvio que la vida útil de los alimentos ha de ser predicha y la predicción pasa por estimar la fase de latencia de los microorganismos viables en el producto y conocer μ_{max} en las condiciones de almacenamiento. Pero la predicción de la fase de latencia no es trivial dada la ingente cantidad de factores que la condicionan. No obstante,

si se consideran constantes algunos de ellos, sobre todo los que la industria alimentaria debe controlar (composición del alimento, pH, aw, tratamientos conservantes aplicados, temperatura de almacenamiento, etc.), las predicciones son posibles, a pesar de que la fase de latencia es variable como ya se ha indicado más arriba.

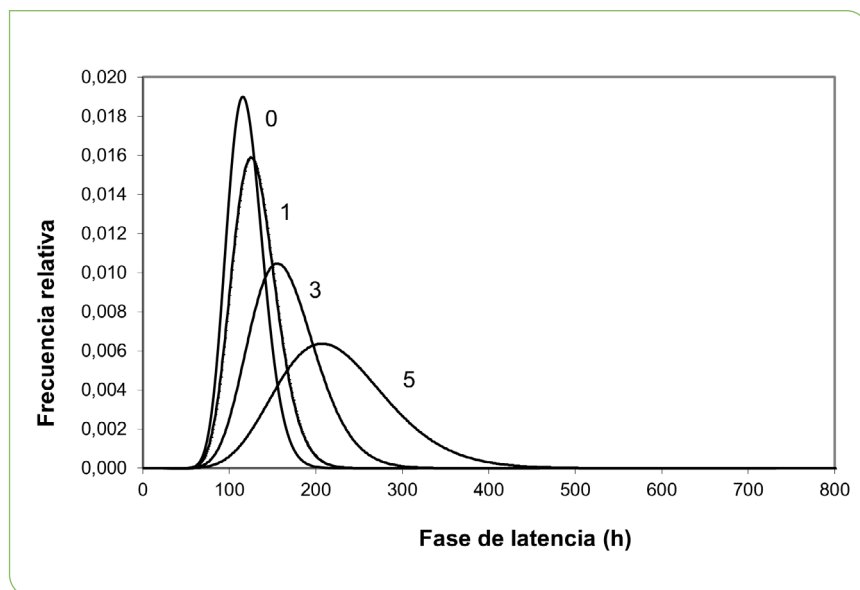


Figura 3. Distribuciones de las fases de latencia predichas de poblaciones/mL de *Listeria innocua* viables tras diferentes tratamientos desde 0 hasta 5D (Aguirre y col., 2013).

Aguirre y col. (2013) comprobaron que la fase de latencia de los microorganismos supervivientes era más larga y más variable cuanto más intenso había sido el tratamiento conservante al que habían sobrevivido. Estos autores desarrollaron un modelo que les permitió predecir el comportamiento de células individualizadas de *Listeria innocua*. La figura 2 ilustra una de estas predicciones; muestra las distribuciones de frecuencia de células individualizadas viables de esta especie tras tratamientos térmicos a 59 °C que dan como resultado entre 0 y 5 reducciones decimales (Aguirre y col., 2013). Es obvio el alargamiento de las fases de latencia de las células que habían sobrevivido a tratamientos más drásticos, en este caso desde unas 100 horas, de las células sin tratamiento térmico, hasta más de 200 (ambos valores medios) de las que sobrevivían a un tratamiento 5D. Y que conste que se trata de la fase de latencia de microorganismos individualizados, no de la población, ya que, cuando se trata de poblaciones, si bien las fases de latencia siguen siendo más prolongadas cuanto más intenso haya sido el tratamiento conservante, son menos variables como se muestra en la figura 3 (Aguirre y col., 2013). Diversos autores (Augustin y col., 2000; Robinson y col., 2001; Pin y Baranyi, 2006) han comprobado el efecto del tamaño del inóculo en la duración de la fase de latencia, pero sólo cuando el tamaño del inóculo es pequeño (Augustin

y col., 2000) o cuando crece una pequeña proporción de células a consecuencia de las condiciones estresantes a las que están expuestas (Augustin y col., 2000; Pascual y col., 2001). Cuando la población inicial es relativamente numerosa, a partir de inóculos de unas 200 ufc/ml, se minimiza la variabilidad, y la fase de latencia, siempre que las condiciones previas al y post-tratamiento conservante sean iguales, se asume que es constante.

Cabe preguntarse por qué la fase de latencia de una micropoblación de 10 células es notablemente más corta que la de las células individualizadas y, no digamos, la de 100 células. La respuesta es bastante lógica y radica en la variabilidad inherente de las células. Los daños que hayan padecido las células supervivientes a un tratamiento conservante no van a ser los mismos en todas ellas. Por consiguiente, las reparaciones serán más o menos prolongadas. Por otra parte, con un grado de daño similar, es posible que haya células con una capacidad de reparación mejor y más rápida que otras células. En definitiva, cada célula va a tener una fase de latencia particular, habrá células “rápidas” y células “lentas” en comenzar a multiplicarse, con fases de latencia más cortas y más largas, respectivamente. En una población numerosa (inóculo grande), pongamos por caso de mil células por mL, con prácticamente toda seguridad, habrá células rápidas que

inician pronto su multiplicación y tirarán y condicionarán la fase de latencia de la población entera. Por contra, en una población, de una sola célula, es obvio que esa célula será como será, rápida, lenta o intermedia. En micropoblaciones, de 2, 5, 10, 25, 50 células, cuanto más numerosa sea la población, más probable es que haya una o más células rápidas que condicionan la fase de latencia y se entiende por qué la fase de latencia de poblaciones más numerosas es más constante, mientras que la fase de latencia de poblaciones de una sola célula es muy variable (figura 2). Estas afirmaciones están bien referenciadas por Baranyi y su equipo (Baranyi y Pin, 1999; Pin y Baranyi, 2006; Baranyi y col., 2009), quienes concluyeron que conforme el tamaño del inóculo disminuye, la fase de latencia se incrementa en una proporción dependiente de la distribución de las fases de latencia de las células que la componen y de la tasa específica de crecimiento.

Con todo lo expuesto hasta aquí, ya puede uno aventurarse a predecir la vida útil de alimentos, considerando la inactivación lograda, y su variabilidad, durante su procesado (García de Fernando y col., 2024) y la fase de latencia, y su variabilidad, de los microorganismos que puedan crecer en el producto. Convocamos al lector al próximo número de SEM@foro para que compruebe cómo puede estimarse la vida útil con un fundamento probabilístico basado en la inactivación y la fase de latencia de la población superviviente.

Referencias

- **Abrahão, WM, Abrahão, PRDS, Monteiro, CLB, Pontarolo, R** (2008). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, 44, 289–296.
- **Aguirre, J, Bravo, C, Ordóñez, JA, García de Fernando, GD** (2012). The Poisson distribution is applied to improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. *Advances in Microbiology*, 2: 146-161. doi: <https://doi.org/10.4236/aim.2012.22020>

- **Aguirre, J, González A, Özçelik, N, Rodríguez, MR, García de Fernando, GD** (2013). Modelling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. *Int. J. Food Microbiol.*, 164: 60-69.
- **Augustin, JC, Brouillaud-Delattre, A, Rosso, L, Carlier, V** (2000). Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1706-1710.
- **Baranyi J** (2002). Stochastic modelling of bacterial lag phase. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 203-206.
- **Baranyi, J, George, SM, Kutalik, Z** (2009). Parameter estimation for the distribution of single cell lag times. *J. Theoretical Biol.* 259: 24-30.
- **Baranyi, J, Pin, C** (1999). Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:732-736.
- **Cordano, A** (2001). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *Int. J. Food Microbiol.*, 70, 175-178.
- **D'Arrigo, M, García de Fernando, GD, Velasco, R, Ordóñez, JA, George, SM, Pin, C** (2006). Indirect measurement of the lag time distribution of single cells of *Listeria innocua* in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 2533-2538.
- **García de Fernando, GD, Aguirre, J, Velasco, R.** (2024). Variabilidad microbiana y vida útil de los alimentos I. Inactivación microbiana. *SEM@foro*, nº 77, 18-21.
- **Greenwood, MH, Roberts, D; Burden, P** (1991). The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: A national survey in England and Wales. *Int. J. Food Microbiol.*, 12, 197-206.
- **Mackey, BM, Kerridge, AL** (1988). The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of *Salmonellae* in minced beef. *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 57-65.
- **Martins, EA, Germano, PML** (2011). *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of Sao Paulo, Brazil: occurrence, quantification, and serotyping. *Food Control* 22, 297-302. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.026>
- **Pascual, C, Robinson, TP, Ocio, MJ, Aboaba, OO, Mackey, BM.** (2001). The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 33:357-361.
- **Pin, C, Baranyi, J** (2006). Kinetics of single cells: observation and modelling of a stochastic process. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2163-2169.
- **Pin C, Baranyi J** (2008). Single-cell and population lag times as a function of cell age. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2534-2536.
- **Robinson, T, Aboaba, O, Kaloti, A, Ocio, M, Baranyi, J, Mackey, B** (2001). The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 163-173.
- **Rogga, KJ, Samelis, J, Kakouri, A, Katsiari, MC, Savvaidis, IN, Kontominas, MG.** (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C. *Int. Dairy J.*, 15, 59-67.
- **Santos, T dos, Viala, D, Chambon, C, Esbelin, J, Ebraud, M.** (2019). *Listeria monocytogenes* biofilm adaptation to different temperatures seen through shotgun proteomics. *Front. Nutr.* 6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00089>
- **Takeuchi-Storm N, Truelstrup-Hansen L., Nielsen. NL, Andersen, JK** (2023). Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in the danish ready-to-eat food production Environment. *Hygiene*, 3, 18-32. <https://doi.org/10.3390/hygiene3010004>
- **UE** (2005). Reglamento (CE) nº 2073/2005

