

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



**TESIS DOCTORAL**

**Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a diferentes tratamientos conservantes de alimentos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan Salvador Aguirre García

Director

Gonzalo D. García de Fernando Minguillón

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los  
Alimentos**



**VARIABILIDAD DE LA INACTIVACIÓN MICROBIANA Y DE LA  
FASE DE LATENCIA DE LOS MICROORGANISMOS  
SUPERVIVIENTES A DIFERENTES TRATAMIENTOS  
CONSERVANTES DE ALIMENTOS**

**Memoria que presenta Juan S. Aguirre García para optar al grado de  
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid**

**Director**

**Dr. Gonzalo D. García de Fernando Minguillón**

**Madrid, 2012**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



**VARIABILIDAD DE LA INACTIVACIÓN MICROBIANA Y DE LA  
FASE DE LATENCIA DE LOS MICROORGANISMOS  
SUPERVIVIENTES A DIFERENTES TRATAMIENTOS  
CONSERVANTES DE ALIMENTOS**

**TESIS DOCTORAL**

Memoria que, para optar al grado de Doctor, con mención honorífica “*Doctorado Europeo*”, presenta el Ingeniero de Alimentos (PUCV-Chile), homologado a Licenciado en Ciencia y Tecnología de Alimentos (UCM-España) Don Juan S. Aguirre García.

**Madrid, 2012**





Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de  
los Alimentos  
Facultad de Veterinaria

---

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid  
Teléfono: 91 394 3744. Fax: 91 394 37 43

**GONZALO DOROTEO GARCÍA DE FERNANDO MINGUILLÓN**, catedrático de  
Tecnología de los Alimentos de este Departamento,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a diferentes tratamientos conservantes de alimentos**”, presentada por Don **JUAN S. AGUIRRE GARCÍA** para optar al grado de Doctor, con mención honorífica “*Doctorado Europeo*”, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección del que suscribe, y autoriza su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal que se nombre a tal fin,

y para que conste a todos los efectos oportunos, firma el presente escrito en Madrid, a cinco de Noviembre de 2012.

Fdo. Gonzalo D. García de Fernando Minguillón



## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado, aconsejado, acompañado y querido a lo largo de estos grandiosos años, lo que les ha convertido en acreedores de mi eterna gratitud y afecto.

A la Universidad Complutense de Madrid por financiar mi amor a la ciencia.

A M<sup>a</sup> Dolores Selgas, directora del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos durante el periodo de realización de este trabajo de investigación, por acogerme en el Departamento y por la amabilidad mostrada a lo largo de los años y las charlas del café en “*el paseo marítimo*” de nuestra Facultad.

Al añorado Lorenzo de la Hoz, cuyo recuerdo permanece imborrable en quienes tuvimos la dicha de conocerle. El me inició en la ardua tarea de la docencia práctica.

A mi Director de tesis, Don Gonzalo García de Fernando Minguillón, por haberme dado la oportunidad de trabajar juntos, por su guía científica a lo largo de este trabajo, por confiar en mí, por su apoyo e inagotable paciencia ante mis constantes interrupciones, preguntas y más preguntas, por las muchas conversaciones, los momentos jazz y los de “tensión científica”, por toda la ayuda brindada a lo largo de todos estos años, tanto dentro como fuera de la Universidad. Más que mi Director y “mecenas de la ciencia”, ha sido la persona más agradable con la que me he podido topar en mi camino del saber durante mi doctorado, un preciado y querido amigo, gracias Gonza.

A Conchita, por su valiosa ayuda durante mis primeros años en el laboratorio y por mostrarme siempre su completa disposición para responderme cualquier duda, y por su cariño, amistad y constante apoyo en momentos difíciles de mi vida.

A M<sup>a</sup> Rosa, por soportar mis constantes cambios de experimentos y caos organizativo en el laboratorio, por estar siempre solícita a echarme una mano con las miles de placas y muestras que he utilizado a lo largo de esta Tesis.

A quienes han estado bajo mi supervisión en el laboratorio, Almira, Andrea, Martina, Nicem, Mauricio, Karina, Rodrigo y Fernando, gracias por su paciencia.

Por supuesto, quiero darle las gracias a todos mis compañeros de laboratorio que me han ayudado alguna vez en el trabajo o simplemente animándome, apoyándome o haciéndome más amena la tarea o simplemente por dedicar una sonrisa y un buenos días;

Serena, Raquel, Carlos Santos, Lola Romero de Ávila, Rosa, Irenes Galán y García, las nuevas (Karen y Ana), Mónica, Susa, Carmencita y Belén, María Martínez y Elvirus por los buenos momentos, a Xavito, gracias por compartir esos adorables y eternos jamones a finales de cada Julio, las vacaciones se anhelaban con más ganas. No me gustaría dejar de nombrar a nadie, como a los becarios del piso de “arriba”, pero creo que esta lista se haría interminable, simplemente agradecer a todos quienes he tenido la dicha de conocer.

A Manuela, Eva, y Carmen Gámez por el gran viaje al “congreso-resort” de Kusadasi; quizás no lo supiesen, pero pasaba por un mal momento; vuestras risas, compañía y momentos culturales, hicieron que la sonrisa volviese rápidamente. Un recuerdo que siempre mantendré conmigo.

Al resto de profesores y compañeros de Tecno, Billy, Marisa, Isabel Cambero Leo y Carmen San José, porque tan importante como “trabajar bien” es “trabajar a gusto” y no podría haber encontrado un ambiente de trabajo mejor en ningún otro sitio. En especial agradecer a Ana e Isabel por nuestras comidas y amenas conversaciones en el rectorado junto a Manuela y Gonzalo.

Tampoco puedo olvidarme de Aurora, por su apoyo, preocupación y cariño durante todos estos años, de Alberto y Aby por la ayuda con los ordenadores, de Carmen Muñoz, del Servicio de Acceso al Documento de la Biblioteca de esta Facultad, por encontrar artículos antiquísimos, de Mari Jose, por su constante ayuda en los trámites de secretaría, de Armando Chapín, por sus aportaciones técnicas en el inglés, de Santiago y Rosi, por tener siempre una sonrisa y un buenos días nada más entrar al departamento, y por supuesto de Andrés, por su estricta y disciplinada ayuda.

A Carmen Pin y resto de compañeros en el Institute of Food Research (IFR, UK) por acogerme y transmitirme sus conocimientos y dedicarme el escaso tiempo libre que tenían para integrarme en Norwich.

To all the member members of the Laboratory of Food Microbiology and Hygiene, Dpt. of Food Science and Technology (Faculty of Agriculture) of Aristotle University of Thessaloniki (Greece), for make me feel as if I was at home, and specially to Dr. Kostas Koutsoumanis for his hospitality, advices and brilliant supervision, and to Zaphi and Pantelis, specially to Maraki, Alexia and Mirsini(nini), for their support, friendship and lovely company.

A modo personal agradecer a mis amigos y familia española e internacional, Brice, Guada y Elena que han sido unos verdaderos hermanos todo este tiempo, Sonia y Marito, Mauro, Cote y Martina por el constante apoyo, Peter por nuestras horas de ocio, que sin ellas perderíamos el contacto con la vida real, Simonky y Danita por la compañía desde siempre, Ana y sus padres, Antonio y Paloma, quienes siempre me han tratado como un miembro más de su familia, a Saray G.S., quien me ayudó y alentó a retomar mis estudios, a Paola B.M., por mantenerme conectado a Chile y seguir creyendo en nuestra amistad a pesar de la distancia y a veces mis largos silencios. A mí querida amiga Dra. Beatriz Cancino, quien me ha seguido apoyando y acompañando hasta el día de hoy.

Στη Μαρία που με ευλόγησε με την κόρη μου, που φροντίζει τον άγγελο μας οντας μια αψογη μητερα και καλη μου φιλη.

To Dennis, Elena Toukmenidou, Panagiotis, Dimitris, Crazy Thanos, Meike for giving me great and lovely moments y al resto de mis amigos “*around the World*” que no es necesario nombrar pero que ellos saben quienes son.

A Vesna, por hacerme sentir “*especial-espacial*”, por soportar al “*crazy researcher*” por todo el cariño, amor y apoyo que me ha entregado en el último periodo de esta tesis.

A mis abuelitos, Tata Peruco, Yeya y Gonzalo, de quienes no tuve la ocasión de despedirme personalmente, pero se que estarían orgullosos.

Y finalmente, y en especial, agradecer a mi amada familia, Jorge y Malu, mis pilares, a mis hermanos, Gonzalo, Javier y Emanuel, y Abuelita Catalina, y a la luz que me protege y guía mis pasos, por estar siempre a mi lado y confiar ciegamente en mí, apoyándome a la distancia para que siguiese adelante y no decayese en los momentos más difíciles, sin su soporte no sería quien he llegado a ser hoy.

“*GRACIAS a todos por tenerles y hacer de mi un hombre afortunado*”



***A Chloe***

*Στη Χλόη, το μικρό μου θησαυρό, που ήρθε απρόσμενα στη ζωή μου, δίνοντάς της νεο νόημα.*



***“If we begin with certainties, we shall end in doubts; but if we begin in doubts, and are patient in them, we shall end in certainties”.*** Sir Francis Bacon (1561-1626)

***“Understanding altruistic behaviours, those actions that increase another individual’s fitness at a cost to your own, is one of the greatest challenges to evolutionary biologists, as natural selection appears to favour selfish and uncooperative individuals”.*** Hamilton, 1963.

***“Variety and variability are the spice of life”.*** Kot, 2001.



## INDICE

Índice	I
Resumen	V
Summary	XI
Acrónimos	XIX
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
1. Revisión bibliográfica	3
1.1. Historia de la Microbiología Predictiva	3
1.2. Modelos matemáticos	5
1.3. Clasificación de los modelos microbiológicos predictivos	5
1.3.1. Clasificación de modelos según su fundamento matemático	
Modelos empíricos y mecanicistas	6
1.3.2. Clasificación de modelos según su finalidad.	
Modelos cinéticos y probabilísticos	7
1.3.3. Clasificación de modelos según Whiting y Buchanan (1993)	
Modelos primarios, secundarios y terciarios	8
1.4. Etapas en la creación de un modelo matemático	12
1.4.1. Definición del problema y diseño experimental	12
1.4.2. Acumulación y análisis de los datos experimentales	13
1.4.3. Formalización del modelo, ajuste de los datos experimentales	14
1.4.4. Validación del modelo generado	15
1.4.5. Elección de cepa	16
1.4.6. Métodos de obtención de datos	17
1.4.6.1. Método de recuento de células viables	17
1.4.6.2. Método de medida de la impedancia	18
1.4.6.3. Método de citometría de flujo	18
1.4.6.4. Método de turbidimetría	20
1.4.6.5. Método de microscopía	23
1.4.6.6. Otros métodos	26

1.5. Métodos para validar modelos predictivos	26
1.5.1. Evaluación gráfica	29
1.5.2. Análisis matemático	30
1.5.2.1. Coeficiente de determinación ( $R^2$ )	30
1.5.2.2. Raíz del error cuadrático medio (“Root Mean Square Error” $RMSE$ )	31
1.5.2.3. Error Standard de Predicción (“Standard error of prediction” $SEP$ )	31
1.5.2.4. Factor de sesgo (“Bias factor” $B_f$ ) y factor de exactitud (Accuracy factor” $A_f$ )	32
1.6. Aplicación de los modelos microbiológicos predictivos	35
1.6.1. Relación de la microbiología predictiva con el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control y la evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos	36
1.7. Inactivación microbiana	41
1.7.1. Calor	42
1.7.2. Irradiación o ionización de alimentos	47
1.8. Crecimiento microbiano	52
1.8.1. Influencia de los factores ambientales en el crecimiento Microbiano	58
1.8.1.1. Temperatura	59
1.8.1.2. Actividad de agua ( $a_w$ )	60
1.8.1.3. pH	61
1.8.1.4. Otros factores ambientales	62
1.9. Variabilidad e incertidumbre	65
<b>II. Justificación</b>	<b>71</b>
<b>III. Resumen del protocolo de trabajo</b>	<b>77</b>
3.1. Microorganismos	79
3.2. Estudio de la variabilidad de la inactivación microbiana	79
3.3. Estudio de la variabilidad de la fase de latencia de microorganismos individualizados que han sobrevivido a operaciones de conservación	80
3.4. Estudio del efecto del tamaño del inóculo (de 1 a unos centenares de ufc) en la variabilidad de la fase de latencia de poblaciones	81

3.5. Estudio del efecto del estado fisiológico de los microorganismos en la variabilidad de su inactivación mediante tratamientos térmicos	82
3.6. Análisis de datos	82
<b>IV. Resultados</b>	<b>85</b>
Artículo 1. <i>Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food</i>	89
Artículo 2. <i>Analysis of variability in the lag phase of individuals and micropopulations that have survived mild heat treatment</i>	97
Artículo 3. <i>Variability of heat inactivation of Listeria innocua at different stages of growth</i>	129
Artículo 4. <i>Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms</i>	141
Artículo 5. <i>A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of Bacillus cereus inactivation and lag phase duration of surviving cells</i>	155
Artículo 6. <i>The Poisson Distribution Is Applied to Improve the Estimation of Individual Cell and Micropopulation Lag Phases</i>	167
Artículo 7. <i>Modeling the Listeria innocua micropopulation lag phase and its variability</i>	185
<b>V. Discusión General</b>	<b>217</b>
5.1. Análisis de la variabilidad de la inactivación	220
5.2. Efecto del estado fisiológico en la variabilidad de la inactivación	231
5.3. Análisis de la variabilidad en la fase de latencia	232
<b>VI. Conclusiones</b>	<b>253</b>
<b>VI. Conclusions</b>	<b>257</b>
<b>VII. Bibliografía</b>	<b>261</b>



**RESUMEN**

---



## RESUMEN

A la industria alimentaria se le están exigiendo productos seguros, nutritivos, apetecibles y, últimamente, de uso cómodo y rápido. Aunar todos esos calificativos en un solo alimento es, muchas veces, ardua tarea. Valgan un par de ejemplos. Un tratamiento conservante intenso, que ofrezca buenas perspectivas sanitarias, suele conllevar una pérdida de valor nutritivo y unas características sensoriales poco atractivas. El manejo de los alimentos para transformarlos en productos listos para el consumo implica la asunción de ciertos riesgos microbiológicos, mayores siempre que los asumidos en los productos exentos de manipulación. ¿Cómo responder ante el incremento de riesgos y peligros que se ciernen sobre los “nuevos alimentos”? Una de las respuestas que ha ganado correligionarios, justificadamente, es la microbiología predictiva. Se trata de una herramienta de gran utilidad, a disposición de cualquier entidad interesada en los alimentos, capaz de predecir mediante modelos matemáticos el comportamiento microbiano bajo ciertas condiciones. La mayoría de los modelos generados hasta el momento predicen valores estáticos. Por ejemplo, considérese un valor  $D$  de 1 minuto. Si el producto contiene  $10^3$  microorganismos por gramo, un envase de 1 Kg que haya pasado por un tratamiento  $6D$ , contendrá 1 célula. Hasta aquí la predicción de un modelo clásico. Ahora pensemos en una producción industrial, de miles de envases de 1 Kg por hora. ¿Quién puede creerse que en todos ellos habrá 1 microorganismo superviviente? ¿No es más creíble que en unos no quedará ningún viable, en muchos habrá 1, en otros 2, 3 y quizás en los menos 5 u 8? Estos modelos estáticos, que han demostrado su eficacia durante décadas a base de tratamientos sobredimensionados para salvaguardar la calidad microbiológica de los alimentos, predicen una media, sin considerar la variabilidad, la dispersión de datos. Por otra parte, los modelos de crecimiento microbiano desarrollados sin tener en cuenta la variabilidad microbiana predicen con suficiente precisión la tasa de crecimiento pero han fracasado en la predicción de la fase de latencia. Es obvio que esta fase del crecimiento microbiano es un factor crítico a la hora de estimar la vida útil de muchos productos y si quiere ajustarse a la realidad la fecha de consumo preferente, sin asumir pérdidas económicas al acortarla, ni asumiendo riesgos derivados de la incertidumbre, hay que mejorar los modelos que la predicen.

A partir de estos antecedentes se propuso como objetivo general de esta Tesis Doctoral el estudio, desde un punto de vista matemático, de la variabilidad de la

inactivación microbiana y de la fase de latencia de los supervivientes, con la finalidad de entender mejor la eficacia de los procesos de conservación de los productos alimenticios y contribuir con datos que, quizás, permitan mejorar la precisión de los modelos matemáticos predictivos del crecimiento microbiano.

Se ha trabajado con cinco microorganismos relevantes en la microbiología de los alimentos: *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria innocua*. Se realizó un estudio previo de los parámetros cinéticos de inactivación mediante un tratamiento convencional (calor) y uno relativamente emergente (ionización con electrones acelerados) en sistemas modelos y alimentos.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo se estudió la variabilidad del número de supervivientes aplicando diferentes tratamientos para lograr distintos grados de reducción decimal (desde 0 hasta 4-5 ciclos) utilizando un gran número de muestras, al menos 75.

Por otra parte, para el estudio de la variabilidad de la fase de latencia de los supervivientes a los tratamientos conservantes antes mencionados, los viables se diluyeron hasta obtener alícuotas que debían contener una sola célula. Tales muestras se incubaron a diferentes temperaturas de refrigeración y de abuso térmico para finalmente estimar su fase de latencia.

Los resultados obtenidos se exponen en siete artículos publicados o en vías de publicación:

- Aguirre, J.S., Pin C., Rodríguez, M.R, García de Fernando G.D. (2009). Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. **Appl. Environ. Microbiol**, **75**, (22): 6992-6997.
- Aguirre, J.S., Monís, A., García de Fernando, G.D. (2013). Analysis of variability in the lag phase of individuals and micropopulations that have survived mild heat treatment. **Int. J. Food Microbiol.** (enviado).
- Herrera, M., Aguirre, J., Rodríguez M.R., Aguado, F., García de Fernando, G.D. *Listeria innocua* inactivation through heat treatments at different growth stages. **Brazilian Journal of Microbiology** (enviado).

- Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R, García de Fernando, G.D. (2011). Effects of electron beam irradiation on variability of the number of survivors and on duration of lag phase of four food-borne organisms. **Int. J. Food Microbiol** **149**: 236-246.
- Aguirre, J., Ordóñez, J.A., García de Fernando, G.D. (2012). A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of *Bacillus cereus* inactivation and lag phase duration of surviving cells. **Int. J. Food Microbiol.** **153**: 444–452. doi. 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.012.
- Aguirre, J., Bravo, M.C., Ordóñez, J.A., García de Fernando, G.D. (2012). The Poisson distribution is applied to improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. **Advances in Microbiology**, 2: 146-161.
- Aguirre, J., Gonzalez, A., Özçelik, N., Rodríguez, M.R., García de Fernando, G.D. (2012). Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. **Int. J. Food Microbiol.** (2ª revisión).

Se ha comprobado que la inactivación microbiana, tanto mediante electrones acelerados como tratamientos térmicos, está sujeta a cierta variabilidad, que, afortunadamente, puede cuantificarse. Cuanto más intensos son los tratamientos conservantes, menor es el número de microorganismos que permanecen viables, pero más variable es su número. Este hecho adquiere toda su relevancia si se considera un patógeno y un proceso que persigue su total inactivación. Debe considerarse la variabilidad inherente al proceso conservante para aplicar un tratamiento suficiente que minimice el riesgo microbiológico hasta donde el tecnólogo quiera y no hasta que el azar pueda determinar caprichosamente. Además y por supuesto, dicha conclusión debe considerarse en cualquier análisis de peligros y puntos críticos de control y aplicarse en la evaluación cuantitativa de riesgos microbianos. Pasar por alto la variabilidad de la inactivación es una negligencia.

Como era de esperar, los tratamientos conservantes afectan a la fase de latencia y la hacen más variable. Cuanto más intenso es el tratamiento aplicado, más prolongada e inconstante es la fase de latencia. No obstante debe tenerse en cuenta que en este periodo de adaptación celular previo a la multiplicación son muchos los factores que influyen, desde el tamaño del inóculo hasta la temperatura pasando por cualquier factor que pueda comprometer o afectar al estado fisiológico de los microorganismos. Se comprende,

entonces, la necesidad de disponer de un buen modelo que la prediga, considerando siempre su variabilidad, sobre todo cuando la carga inicial es escasa, del orden de unidades o hasta centenas de viables, y en unas condiciones alejadas de las óptimas de crecimiento (ambos condicionantes son típicos de muchos alimentos), ya que, entonces, la fase de latencia -y su variabilidad- puede ser el factor más importante para determinar la vida útil del alimento. Tal modelo se ha desarrollado en el contexto de esta Tesis y permite la obtención de distribuciones de frecuencia de fases de latencia.

Al autor de esta Tesis no le caben dudas. Un buen modelado del comportamiento microbiano, tanto de la inactivación como del crecimiento, debe contemplar la variabilidad inherente a los organismos vivos. La inclusión de la variable “variabilidad” en tales modelos mejorará sus predicciones y su aplicación redundará en unas mayores garantías sanitarias de los alimentos.

Esta Tesis ha podido desarrollarse gracias a subvenciones de diferentes organismos, todos ellos en régimen competitivo:

- Variabilidad de la destrucción microbiana y de la capacidad de adaptación –fase de latencia- y de formación de biofilms de los microorganismos. Posible aplicación de los modelos a la industria alimentaria. AGL2005-01239. Subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia.
- Tecnologías emergentes y procesado mínimo: aplicación a la seguridad química y microbiológica de alimentos listos para el consumo (RTE). S-0505/AGR-0314. Subvencionado por la Dirección General de Universidades e Investigación de la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid.
- Variabilidad de la inactivación microbiana y de la capacidad de adaptación –fase de latencia- de los microorganismos y su posible aplicación al *APPCC*. Acción 4 del subproyecto PROCARTE del Proyecto CARNISENUSA CSD2007-0016. Subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia. Proyectos Consolider Ingenio 2010.
- Nuevos factores que pueden afectar a la variabilidad de la supervivencia microbiana y a la fase de latencia de bacterias supervivientes a procesos de conservación de alimentos. AGL2010-16598. Subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

## **SUMMARY**

---



## SUMMARY

The food industry is being called upon to provide safe, nutritious and delicious products that are also fast and easy to prepare. Combining all of these qualities into a single food product is often an arduous task. For example, intensive preservation techniques may ensure sanitary quality, but they often reduce the nutritional value of food and give it sensory characteristics that are less than ideal. Manufacturing food products that are ready-to-eat involves taking on some microbiological risk, since contamination is always more likely in processed food than in unprocessed food. What can be done about the increased risk inevitably associated with "new foods"?

One answer gaining adherents, and justifiably so, is predictive microbiology. This highly useful tool, available to any individual or organization interested in food, relies on mathematical models to predict microbial behavior under defined circumstances. Most models developed so far predict static values. For example, consider a  $D$  value of 1 min. If the product contains  $10^3$  microorganisms per gram, a 1-kg package that received a  $6D$ -treatment will contain 1 cell. This is according to the prediction of a classical model. Now let us consider industrial-scale production, in which thousands of 1-kg packages are produced per hour. Who would believe that each of them contains only 1 surviving microorganism? Is it not more likely that some packages will contain no survivors, others will contain 2 or 3, and a few others 5 or 8? Classical, static models, which have proven effective over decades in "overkill" treatments designed to safeguard the microbiological safety of foods, predict only the mean number of survivors; they do not take into account the variability or dispersion in the data.

Another significant fault of classical models of microbial growth is that while they predict the growth rate with sufficient precision, they fail to predict the length of the lag phase. This phase of microbial growth is clearly essential for estimating the shelf-life of many products. Thus these static models must be improved in order to provide realistic "best if used by" dates on packaging, which if too conservative lead to economic losses but if too liberal lead to uncertainty about microbiological risk.

As a step towards generating improved models to predict microbial growth, this doctoral thesis aimed to apply mathematical tools to the study of the variability of microbial inactivation and of the latent phase of surviving microorganisms. This study

sought to improve our understanding of the efficiency of food preservation techniques and to generate data that may help improve the precision of predictive models of microbial growth.

This study dealt with five bacteria important in food microbiology: *Bacillus cereus*, *Salmonella* Enteritidis, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua*. The optimal conditions for working with these organisms were first established by determining the kinetic parameters of inactivation in model systems and in foods subjected to conventional heat treatment or to the “emerging” technique of irradiation with accelerated electrons (E-beam irradiation).

In the first part of the project, the optimized working conditions were used to study the variability in the number of survivors after inactivation treatments of different intensity, which were designed to achieve different degrees of decimal reduction from 0 to 4-5 cycles. To ensure that the full extent of variability could be measured, each experiment was carried out using at least 75 samples.

The second part of the project examined the variability in the lag phase duration of cells that survived the conventional and E-beam treatments described above. Cultures of survivors were diluted down to single cells, which were then incubated at refrigeration and thermal abuse in order to estimate the lag phase.

The results obtained from both parts of this project have been described in the following seven research articles that have been published or are under review:

- Aguirre, J.S., Pin C., Rodríguez, M.R, García de Fernando G.D. (2009). Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. **Appl. Environ. Microbiol.** **75**, (22): 6992-6997.
- Aguirre, J.S., Monís, A., García de Fernando, G.D. Analysis of variability in the lag phase of individuals and micropopulations that have survived mild heat treatment. **Int. J. Food Microbiol.** (*submitted*)
- Herrera, M., Aguirre, J., Rodríguez M.R., Aguado, F., García de Fernando, G.D. *Listeria innocua* inactivation through heat treatments at different growth stages. **Brazilian J. Microbiol.** (*submitted*)

- Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R, García de Fernando, G.D. (2011). Effects of electron beam irradiation on variability of the number of survivors and on duration of lag phase of four food-borne organisms. **Int. J. Food Microbiol.** **149**: 236-246.
- Aguirre, J., Ordóñez, J.A., García de Fernando, G.D. (2012). A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of *Bacillus cereus* inactivation and lag phase duration of surviving cells. **Int. J. Food Microbiol.** **153**: 444–452. doi. 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.012.
- Aguirre, J., Bravo, M.C., Ordóñez, J.A., García de Fernando, G.D. (2012). The Poisson distribution is applied to improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. **Adv. Microbiol.** **2**: 146-161.
- Aguirre, J., Gonzalez, A., Özçelik, N., Rodríguez, M.R., García de Fernando, G.D. (2012). Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. **Int. J. Food Microbiol.** (under revision based on reviewer comments)

Results from the first part of this project indicate that microbial inactivation, whether achieved through heat treatment or E-beam irradiation, shows a certain variability that, fortunately, can be quantified. The more intense the preservation treatment, the smaller is the number of surviving microorganisms, but the greater is the variability in this number. This insight is critical when designing processes to inactivate pathogens completely: it means that the variability inherent in a preservation treatment should be taken into account, so that the treatment can reduce microbiological risk to the desired level, rather than to the level dictated by chance. This insight should inform any analysis of risks and critical control points, and it should be applied to any quantitative assessment of microbial risk. To ignore the variability in microbial inactivation is a dangerous oversight.

Results from the second part of this project indicate that microbial inactivation techniques affect the lag phase: the more intense the preservation technique, the longer and more variable the lag phase is. The lag phase is the period before multiplication when cells are adapting to the environment; thus, numerous factors can affect lag phase duration and variability, including inoculum size, temperature, and any other factor that might affect the physiological state of the microorganism. Under certain conditions, lag phase duration and variability can become the primary determinants of food shelf-life.

This happens when the inoculum is quite small, on the order of units, tens or few hundreds of viable cells, and when growth conditions are far from optimal. Since both situations are typical of many foods, the work in this doctoral Thesis may prove particularly useful for predictive microbiology in the food industry. Indeed, as part of this work, a model was developed that provides frequency distributions of lag phase durations.

The author of this Thesis is convinced that models of both microbial growth and inactivation should take into account the variability inherent in living things. Incorporating a variable called “variability” in such models will improve their predictions and lead to greater microbial safety in foods.

This Thesis was made possible by financial support from several organizations in the form of competitive grants:

- Variabilidad de la destrucción microbiana y de la capacidad de adaptación –fase de latencia- y de formación de biofilms de los microorganismos. Posible aplicación de los modelos a la industria alimentaria. AGL2005-01239, subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia.

Variability of microbial destruction, adaptive capability (lag phase), and biofilm formation. Possible application of models to the food industry. AGL2005-01239, subsidized by the Ministerio de Educación y Ciencia.

- Tecnologías emergentes y procesado mínimo: aplicación a la seguridad química y microbiológica de alimentos listos para el consumo (RTE). S-0505/AGR-0314, subvencionado por la Dirección General de Universidades e Investigación de la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid.

Emerging technologies and minimal processing: application to chemical and microbiological safety of ready-to-eat (RTE) foods. S-0505/AGR-0314, subsidized by the Dirección General de Universidades e Investigación de la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid.

- Variabilidad de la inactivación microbiana y de la capacidad de adaptación -fase de latencia- de los microorganismos y su posible aplicación al *APPCC*. CARNISENUSA CSD2007-0016. PROCARTE, Acción 4, subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia.

Variability of microbial inactivation and adaptive capability (lag phase) and its possible application to HACCP. CARNISENUSA CSD2007-0016. PROCARTE, Action 4, subsidized by the Ministerio de Educación y Ciencia.

- Nuevos factores que pueden afectar a la variabilidad de la supervivencia microbiana y a la fase de latencia de bacterias supervivientes a procesos de conservación de alimentos. AGL2010-16598, subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

New factors that can affect variability of microbial survival and of the lag phase of bacteria that survive food preservation processes. AGL2010-16598, subsidized by the Ministerio de Ciencia e Innovación.



## **ACRÓNIMOS**

---



## ACRÓNIMOS

- AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
- Af: Factor exactitud
- ALOP: Nivel Adecuado de Protección (Appropriate Level of Protection)
- APPCC Análisis de peligros y Puntos Críticos de Control
- $a_w$ : Actividad de agua
- Bf: Factor sesgo
- CECT Colección Española de Cultivos Tipo
- CV: Coeficiente de variación
- DIFRES: Danish Institute for Fisheries Research
- $D_f$  : Porcentaje de discrepancia (%)
- DO: Densidad Óptica
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- FDA: Food and Drug Administration
- FMM: Food Micro Model
- FSP: Food Spoilage Predictor
- FSO: Objetivo de Seguridad Alimentaria (Food Safety Objective)
- FSC: Forward Scatter
- g: Tiempo de generación (h) o de duplicación de una población
- GP: Growth Predictor
- HSPs: Heat shock protein
- ICMSF: International Commission of Microbiological Specifications in Foods
- IDT: Impedance detection time
- IFR Institute of Food research
- ISO: International Organization for Standardization
- kGy: Kilo-Gray
- MAP: Atmósferas modificadas
- MAFF: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food
- MeV: Mega electron Volts (Unidad de energía)
- $Mg^{++}$ : Magnesio
- MSE: Error cuadrático medio
- N: Número de células (CFU/g ó ml)
- N0: Inóculo Inicial (CFU/g ó ml)

- N<sub>max</sub>: Densidad máxima de Población (log CFU/g ó ml)
- NaCl: Cloruro sódico
- OIEA: Organismo Internacional de Energía Atómica
- OMC: Organización Mundial del Comercio
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- p: Valor p, valor de probabilidad que oscila entre 0 y 1.
- PMP: Pathogen Modelling Program
- QMRA: Quantitative microbial risk assessment
- QS: quorum sensing
- R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación
- RMSE: Raíz del error cuadrático medio
- RTE: Alimentos listos para el consumo (Ready-To-Eat)
- RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction
- SASP: Proteínas de pequeño tamaño molecular solubles en medio ácido
- SCF: Comité Científico Alimentario.
- Sd: Desviación estándar
- SE.: Error Standard
- SEP: Error Standard de Predicción
- SERA: Salmonella Enteritidis Risk Assessment
- SSSP: Seafood Spoilage and Safety Predictor
- SSC. Side Scatter
- T: Temperatura (°C)
- t: Tiempo (h)
- t<sub>a</sub>: Tiempo de adaptación (h)
- T<sub>d</sub>: Tiempo de detección (h)
- t<sub>m</sub>: tiempo de multiplicación
- TSA: Agar soja tripticasa
- TSB: Caldo soja tripticasa
- USDA-ARS: United States Department of Agriculture & Agriculture Research Service
- α : Nivel de significancia
- λ: Fase de latencia (h)
- μ: Tasa específica de crecimiento (h<sup>-1</sup>)
- μ<sub>max</sub>: Tasa específica máxima de crecimiento (h<sup>-1</sup>)

## **I. INTRODUCCIÓN**

---



# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Revisión bibliográfica

### 1.1. Historia de la Microbiología Predictiva

La seguridad microbiológica de un alimento se establece determinando la presencia o ausencia de patógenos. Este sistema funciona, ha demostrado su eficacia durante décadas, pero es costoso, lento y requiere personal cualificado. Además, este sistema analítico y el conocimiento derivado de él, no es “acumulativo”; es decir, es necesario seguir analizando lote tras lote para garantizar que cada uno de ellos cumple con los requisitos establecidos.

Una alternativa razonable es predecir, en base a un modelo, las respuestas de los microorganismos, tanto patógenos como alterantes, a cualquier factor que pueda afectar su supervivencia y crecimiento en un alimento. Esta alternativa, el modelado y la predicción del comportamiento microbiano permite que el conocimiento generado para sea acumulativo; es decir, lo experimentado por un grupo de investigación o una industria le sirve a cualquier otro. ¿De qué manera?, desarrollando los medios para interpolar las respuestas microbianas. A todo esto se le ha denominado microbiología predictiva [1].

Los primeros pasos de la microbiología predictiva los dieron Esty y Meyer (1922), quienes describieron la inactivación térmica de esporas de *Clostridium botulinum* tipo A utilizando un modelo logarítmico lineal [2], el cual sigue utilizándose actualmente para calcular la cantidad de calor necesario en el procesamiento de alimentos enlatados de baja acidez. Este modelo sencillo dice que, a una temperatura dada, el grado de inactivación de una bacteria es constante en el tiempo, es decir, el porcentaje de población celular que se inactiva en una unidad de tiempo siempre es el mismo. Ball (1923) estudió el tiempo de tratamiento térmico para productos enlatados [3]. Scott (1936) dio un paso más adelante, investigando como influía el agua disponible (hoy conocida como actividad de agua,  $a_w$ ) en el grado de inactivación celular [4]. Este mismo autor estudió el efecto de la temperatura sobre el grado específico de inactivación microbiana [5], señalando que éste disminuía linealmente en función de la temperatura, concepto hoy conocido como valor  $z$ .

Sin embargo, no fue hasta la década de los 80 cuando esta disciplina experimentó un gran impulso, debido al aumento de brotes de toxiinfecciones alimentarias, o mejor, al incremento del número de diagnósticos de tales brotes, junto con el desarrollo tecnológico

de ordenadores, cada día más potentes, y de paquetes estadísticos, cada día más completos, que simplificaron casi hasta “la nada” los tediosos y engorrosos cálculos necesarios para el desarrollo de un modelo predictivo.

Una de las primeras definiciones de Microbiología predictiva la propuso McMeekin y col. (1993), describiéndola como una “*Ciencia cuantitativa que permite evaluar objetivamente la respuesta microbiana a las condiciones del procesado, la distribución y el almacenamiento y sus efectos en la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos*” [6]. En el año 2003 Mckellar y Lu definieron la microbiología predictiva como la “*descripción de la respuesta microbiana en los alimento mediante modelos matemáticos*” [7]. Finalmente en el año 2005, Fratamico y col. la definieron como la ciencia que parte de la premisa de que el comportamiento microbiano (crecimiento, supervivencia e inactivación), puede cuantificarse y expresarse con ecuaciones matemáticas, que permiten predecir tal comportamiento en unas determinadas condiciones ambientales [8]. Ese mismo año se publica el Reglamento (CE) 2073/2005 sobre los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en el que se reconoce, en su anexo II, el uso de los modelos microbiológicos predictivos como una herramienta útil para la gestión de la seguridad alimentaria [9]. En este contexto, en el año 2011, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha publicado las pautas para la aplicación de lo dispuesto en el anexo II del reglamento antes mencionado [10].

Los fundamentos de la microbiología predictiva son:

- La reproducibilidad del comportamiento microbiano en los alimentos (crecimiento, supervivencia e inactivación). Este es uno de los principios esenciales del método científico y se refiere a la capacidad que tenga una prueba o experimento de ser reproducido o replicado, proporcionando unos resultados dentro de lo esperable.
- Un número limitado de factores ambientales o intrínsecos al alimento determinan las respuestas cinéticas de los microorganismos. La temperatura,  $a_w$ , pH, conservantes, etc., influirán en el comportamiento microbiano y determinan una respuesta concreta.
- Los modelos matemáticos que describen cuantitativamente el efecto combinado de los factores ambientales en el comportamiento microbiano pueden utilizarse para predecir el crecimiento o la inactivación de los microorganismos. Tal información puede ser crucial para la seguridad alimentaria y la estimación de la vida útil de los alimentos [11].

## **1.2. Modelos matemáticos**

*Modelo. Esquema teórico, generalmente en forma matemática, de un sistema o de una realidad compleja, como la evolución económica de un país, que se elabora para facilitar su comprensión y el estudio de su comportamiento [12].*

Un modelo es una representación matemática simplificada de una realidad compleja, que persigue, en primer lugar, reproducir el comportamiento histórico del sistema y, en segundo, poder simular el comportamiento que el sistema tendrá frente a diversas hipótesis que puedan establecerse (cambios de los parámetros que lo condicionan).

Modelar es la acción de construir un modelo, de encorsetar la realidad. Implica la relación entre dos figuras (no necesariamente encarnadas por personas únicas sino por equipos): el modelador (encargado de la especificación y desarrollo del modelo) y el experto en la realidad a modelar (conocedor del problema real). La mayoría de las veces, el desarrollo de un modelo puede involucrar a un equipo multidisciplinar compuesto por matemáticos, estadísticos, ingenieros, economistas, psicólogos, etc., que aportan diferentes perspectivas y conocimiento en la representación de la realidad. Afortunadamente, los modelos microbianos no suelen necesitar de tan complejos equipos. Un modelo debe equilibrar la necesidad de contemplar todos los detalles con la factibilidad de encontrar técnicas de solución adecuadas. Un modelo es, es definitiva, una herramienta de ayuda a la toma de decisiones. Por esta razón, sus resultados deben ser inteligibles y útiles [13].

## **1.3. Clasificación de los modelos microbiológicos predictivos**

No existe un criterio único de clasificación de los modelos predictivos [14]. Pueden clasificarse según su fundamento matemático, según su finalidad o según la clasificación propuesta por Whiting y Buchanan en 1993 en modelos primarios, secundarios y terciarios [15], siendo esta última la más aceptada por la comunidad científica [16].

### **1.3.1. Clasificación de modelos según su fundamento matemático. Modelos empíricos y mecanicistas**

Según su fundamento matemático, los modelos predictivos pueden clasificarse en empíricos y mecanicistas.

Los modelos empíricos se ajustan a una función matemática a partir de los datos obtenidos experimentalmente, basados en la experiencia y la observación de los hechos. Éstos son de interés en situaciones prácticas y simplemente describen los datos de crecimiento bajo condiciones experimentales en forma de una conveniente relación matemática [17]. Se pueden mencionar, a modo de ejemplo, las funciones de Gompertz, modelos de raíz cuadrada y sus modificaciones, ecuaciones polinómicas, redes neuronales artificiales [18], así como las modificaciones empíricas de la ecuación de Arrhenius utilizadas por Davey y col. (1989, 1991 y 1994) para describir la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y la fase de latencia ( $\lambda$ ) en función de la temperatura,  $a_w$  y pH [19-21].

Los modelos mecanicistas parten de una base teórica biológica, considera hechos y obliga al modelo a adaptarse a la realidad biológica mediante una determinada hipótesis. Por tanto, estos modelos predicen con mayor exactitud los hechos reales [22], aunque no se ajusten con tanta exactitud como los empíricos a los datos utilizados para la generación del modelo. Ya indicaron Baranyi y Roberts (1994) que los modelos mecanicistas se ajustan más a la realidad [23] y la predicen mejor. La mayoría de investigadores están de acuerdo en que los modelos mecanicistas son inherentemente mejores que los modelos empíricos, por las razones citadas arriba [24-26]. Sin embargo, y paradójicamente, no son muchos los ejemplos encontrados en la bibliografía. Se puede mencionar el modelo de Johnson y Lewin (1946) que describe el crecimiento de bacterias a altas temperaturas, el modelo de Hultin (1955) que describe la velocidad de catálisis enzimática a baja temperatura, Sharpe y DeMichile (1977) quienes describieron el crecimiento microbiano en función de la temperatura, los modelos de McMeekin y col. (1993) y los de Ross (1993 y 1999) que predicen la tasa de crecimiento microbiano en función de la temperatura [27].

### **1.3.2. Clasificación de modelos según su finalidad. Modelos cinéticos y probabilísticos**

Según su finalidad, los modelos predictivos pueden clasificarse en modelos cinéticos y modelos probabilísticos. La elección de un enfoque u otro y su aplicación específica está ampliamente determinada por el tipo de microorganismo que se estudia y el número de variables con las que se trabaja [14].

Los modelos cinéticos son aquellos que a cada punto de un conjunto de variables independientes le corresponde un valor de la variable dependiente. Son especialmente útiles en los sistemas que evolucionan con el tiempo, como son los sistemas dinámicos [28]. En ellos podemos conocer, una vez que se han adjudicado valores a los distintos parámetros que aparecen en el modelo, el estado del sistema en cualquier momento. No obstante, estos modelos son laboriosos de construir puesto que requieren muchos datos de recuento microbiano [29-31]. Aún así, los modelos cinéticos se han empleado para modelar los efectos de variables intrínsecas y extrínsecas, particularmente la temperatura, en el crecimiento microbiano [32], desde luego con mayor frecuencia que los probabilísticos.

Los modelos probabilísticos se refieren a procesos estocásticos y dan un resultado que contempla la variabilidad de un sistema y de sus componentes. La misma entrada puede proporcionar diferentes resultados. La base que se establece para la modelización probabilística es la relación existente entre el crecimiento de las células microbianas y las propiedades fisicoquímicas del ambiente [33]. La probabilidad de crecimiento microbiano puede ayudar al productor de alimentos a la hora de tomar decisiones acerca de la formulación, procesado, envasado y almacenamiento de un producto [34].

Buchanan (1993) determinó, con estos modelos, la probabilidad de que *Cl. Botulinum* sobreviviera en carne de vaca enlatada en determinadas condiciones [35], sin embargo, en casos así, la probabilidad varía con el tiempo y, por tanto, estos modelos probabilísticos suelen ser más bien una combinación entre un modelo cinético y uno probabilístico *in strictu senso*.

Ratkowsky y Ross (1995) formularon la hipótesis de que debería usarse un modelo cinético para generar un modelo probabilístico que describiese el límite de crecimiento/no crecimiento. Para ello, propusieron un modelo logístico de regresión para determinar la probabilidad de crecimiento en diversas condiciones, incluyendo pH, temperatura y

concentración de sal y de nitrito sódico. La unión de aproximaciones cinéticas y probabilísticas puede verse como una integración de la microbiología predictiva de modelos cinéticos y probabilísticos, y una unificación de la microbiología predictiva y de la teoría de obstáculos [36]. Sin embargo, las razones para una aparente unión entre los modelos cinéticos y de probabilidad no están aún claras [37].

### **1.3.3. Clasificación de modelos según Whiting y Buchanan (1993). Modelos primarios, secundarios y terciarios**

Como se ha nombrado anteriormente, Whiting y Buchanan (1993) propusieron una terminología que expresase el significado de la descripción y desarrollo de la microbiología predictiva, proponiendo clasificar los modelos en primarios, secundarios y terciarios [15].

Los modelos primarios describen la evolución del número de viables en función del tiempo (crecimiento, supervivencia e inactivación) en un ambiente determinado. En otras palabras, estiman los parámetros cinéticos de los microorganismos.

Cuantitativamente pueden incluir unidad formadora de colonia (ufc), biomasa, medidas de absorbancia, además de concentración de substratos o de metabolitos producidos [16].

Muchos de los modelos primarios desarrollados hasta ahora son modelos deterministas de población. En estos modelos, la evolución del número total de células de una población se describe a través de un sencillo conjunto de parámetros (fase de latencia, velocidad de crecimiento específica y máxima densidad poblacional) [38]. Como ejemplos de modelos primarios pueden destacarse el modelo de Baranyi y Roberts (1994), que permite cuantificar la cinética de crecimiento microbiano y obtener, por ejemplo, la tasa máxima específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) [23]; el modelo modificado de la ecuación de Gompertz para el mismo fin [39], el modelo de número de masa (“masa-number”) de Hills y Wright (1994), en el cual se relaciona el crecimiento de la biomasa con el aumento del número de células viables [40], el modelo de poblaciones heterogéneas de Mckellar (1997), en el cual se asume que el inóculo está distribuido en dos compartimentos, es decir, células en crecimiento y células que no están en crecimiento [41], el modelo trifásico de Buchanan y col., (1997), en el que se describe la clásica curva de crecimiento en tres fases (latencia, exponencial y estacionaria) [42], el

modelo discreto-continuo de McKellar y Knight (2000), una expansión del modelo de McKellar (1997), en el que se permite la transición del compartimento en el que no hay crecimiento hacia el de células en crecimiento, y el modelo continuo – discreto –continuo de McKellar (2001), que es una ampliación del anterior al añadirle una etapa previa de adaptación continua [38].

Los modelos secundarios caracterizan los parámetros que pueden aparecer en los modelos primarios en función de las condiciones del entorno (temperatura, pH,  $a_w$ , concentración de conservantes, etc.). Permiten considerar cómo dos o más factores interactúan sobre el crecimiento microbiano.

Dentro de esta categoría pueden mencionarse ejemplos tales como el modelo de Ratkowsky y col. [43], que relaciona la raíz cuadrada de la tasa máxima específica de crecimiento en función de la temperatura, modelos de adaptación de la ecuación de Arrhenius [20, 44], modelos con un enfoque polinomial [30, 45], modelos de superficie de respuesta [46, 47], modelos probabilísticos [48] o modelos obtenidos con redes neuronales artificiales [49].

Los modelos terciarios se obtienen por integración de los primarios y secundarios implementados mediante una herramienta informática (software) a nivel de usuario. La potencia de los actuales ordenadores han hecho que estas herramientas sean cada vez más asequibles, ahorrando a los usuarios los tediosos cálculos matemáticos y el tiempo en ellos invertidos [27]. Actualmente hay disponibles varios paquetes informáticos de modelado microbiano, que varían en complejidad, desde una sencilla ecuación en una hoja de cálculo, a sistemas expertos o programas de simulación de estimación de riesgos. Los principales modelos terciarios se muestran en la Tabla 1. En general, los usuarios de estos programas no necesitan dominar las técnicas del modelado, y como consecuencia, hacen de la microbiología predictiva una herramienta simple y a la vez poderosa para muchas áreas de investigación y, claro está, para la industria alimentaria en general [15, 50-52].

**Tabla 1.** Principales modelos terciarios utilizados en microbiología predictiva

Nombre	Creador	Aplicación	Ref.
Combase	Institute of Food research (IFR, UK)	Modelos predictivos de crecimiento e inactivación, generados a partir de datos de facilitados por cientos de investigadores	[53]
-Pathogen Modelling Program (PMP). - <i>Salmonella</i> Enteritidis Risk Assessment (SERA)	United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service (USDA-ARS, USA)	-Software de libre acceso, describe, el crecimiento, supervivencia e inactivación, además de la producción de toxinas bajo condiciones establecidas por el usuario.  - El programa SERA incorpora una red de evaluación de riesgos microbiológicos	[50, 54]  [16]
Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP)	Danish Institute for Fisheries Research (DIFRES) y la Universidad Técnica de Dinamarca	Este programa predice la vida útil de productos de la pesca con respecto a un determinado microorganismo, considerando la temperatura de almacenamiento, ya sea ésta fija o fluctuante.	[55]
-Food Spoilage Predictor (FSP). -Refrigeration Index Calculator	Universidad de Tasmania	Estos modelos cuantifican el efecto de la temperatura en diversos alimentos (carne, pescado y productos lácteos) y predice el crecimiento de microorganismos alterantes. Además es capaz de relacionar la vida útil de un producto con su historial de temperaturas de almacenamiento.	[56]
Food Micro Model (FMM)	Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF, UK)	Este programa predice la evolución de microorganismos patógenos implicados en enfermedades alimentarias, así como la de microorganismos causantes del deterioro de los alimentos.	[57]
MicroHibro 2.0 Beta	Grupo AGR-170 (HIBRO) Universidad de Córdoba (Córdoba, España)	Herramienta on-line de evaluación del riesgo microbiano en vegetales y productos cárnicos.	[58]

Si bien se ha comprobado que las herramientas informáticas antes descritas permiten tener una idea bastante acertada del comportamiento microbiano [59, 60], sus predicciones no deben utilizarse a la ligera, antes bien con pies de plomo, y considerarlas una aproximación con cierto grado de incertidumbre.

Cuan alejadas estén las predicciones de un modelo de la realidad se debe a una serie de limitaciones, ya sean de carácter estadístico o biológico. Una limitación estadística trascendente de la mayoría de los actuales modelos primarios y secundarios es la estimación de la variación alrededor del valor calculado. En condiciones extremas para el crecimiento, la variabilidad entre réplicas se magnifica. Para soslayarla, suelen transformarse las variables para homogeneizar la varianza y alcanzar un mejor el ajuste

de los modelos. Logaritmos y la raíces cuadradas están con frecuencia más próximamente distribuidos que los mismos valores sin transformar [61].

Son, sin embargo, las limitaciones biológicas las más difíciles de controlar/predecir o inclusive incluir de forma satisfactoria dentro de un modelo; por ejemplo, la presencia de factores de inhibición adicionales en un alimento, que no se incluyan en el modelo, requiere tomar precauciones a la hora de la interpretación de las predicciones. Así mismo, la posible competencia que pudiera darse entre ciertos microorganismos presentes en los alimentos, raramente se incluye como una variable a la hora de confeccionar un modelo predictivo. Algunos autores [62-65] han demostrado la importancia de incluir en los modelos la interacción de mezclas de cepas de microorganismos durante el crecimiento. Sin embargo, Malakar y col. [304] quitaron importancia a las interacciones microbianas, ya que constataron que solo juegan un papel relevante cuando el tamaño de la población microbiana es alto (en el caso de las bacterias ácido-lácticas  $10^8$  ufc/ml).

Por otro lado se ha demostrado que la supervivencia y crecimiento de los microorganismos en los alimentos no depende tan solo de la composición química de estos últimos y de las condiciones de almacenamiento, sino también de su estructura [66]. En alimentos de composición homogénea o en líquidos, este factor es claramente despreciable [67]. Sin embargo, en alimentos sólidos o de composición heterogénea, la evolución microbiana está determinada por su posición en el interior del alimento. Los efectos de la estructura de los alimentos en los modelos predictivos incluyen la distribución mecánica del agua [68], la redistribución química de los ácidos orgánicos y otros conservantes [69], y factores físicos como la movilidad de los microorganismos [70].

Dens y Van Impe [71] simularon el comportamiento espacio-temporal de dos cepas de *Lactobacillus plantarum* y *E. coli* en un sistema con un coeficiente de difusión muy bajo, que sería el caso de un alimento sólido. Demostraron que ambas cepas pueden coexistir en el alimento, lo cual no es habitual que suceda en alimentos líquidos. Así, los modelos predictivos generados en caldo de cultivo, tienden a sobreestimar el crecimiento microbiano que realmente puede darse en alimentos sólidos, ya que en medios líquidos, la difusión de los microorganismos es mayor.

El comportamiento que tengan los microorganismos en las distintas matrices depende también del tipo de cepa utilizada, ya que se han observado diferencias en los parámetros cinéticos, inclusive en cepas de un mismo microorganismo [72].

#### **1.4. Etapas en la creación de un modelo matemático**

*"The conclusion is not that simple is best, but that simple is not stupid, and provides valuable information. Complex, on the other hand, is not always by definition more correct, but also does have its merits"* [73]. Permítasenos interpretar estas conclusiones del profesor Zwitering. Lo simple no tiene por qué ser lo mejor, pero lo simple no tiene por qué ser una simpleza y de algo -un modelo- simple puede obtenerse mucha información. Lo complejo no es siempre sinónimo de más correcto, pero es meritorio".

En teoría, para la construcción de un buen modelo se necesitaría conocer detalladamente todas y cada una de los factores que pueden influir en el sistema y todas y cada una de las interacciones existentes entre ellos. El modelo se aproximará tanto más a la realidad cuanto más detallado y preciso sea dicho conocimiento. Sin embargo, en muchos casos, para que un modelo resulte manejable, es necesario renunciar a algunos elementos que componen el sistema y/o a algunas de las interrelaciones que entre ellos puedan establecerse

La construcción o creación de modelos matemáticos sigue una serie de fases bien determinadas:

##### **1.4.1. Definición del problema y diseño experimental**

Esta etapa consiste en identificar un problema o situación más o menos compleja que necesita ser simulada, optimizada o controlada y, por tanto, requerirá de un modelo matemático predictivo. El desarrollo de tal modelo es un proceso iterativo, en donde la pregunta o preguntas que el modelo deberá responder deben precisarse con anterioridad. Siempre habrá que tener en cuenta lo establecido por Annino y Russel [74], quienes afirmaron que "modelar no es el objetivo, modelar es el mecanismo para alcanzar el objetivo".

Una vez definido "el problema" se diseña el experimento, cuyo fin último es la resolución de dicho problema. Devlieghere y col. [75] plantearon una serie de cuestiones

para planificar un adecuado diseño experimental ¿Cuál es el objetivo que se persigue y cuáles son los factores que podrían influir en dicho objetivo? ¿Cuáles son los niveles en la práctica que deben usarse de esos factores? ¿Cuáles son las características del o los microorganismos a utilizar? ¿Cuáles y cuántas son las condiciones ambientales y sus interacciones (pH, temperatura, composición del medio, etc.) que pueden influir de una forma relevante en el comportamiento del microorganismo o microorganismos? ¿Cuáles son las variables dependientes e independientes y cuál será el tipo de modelo a utilizar? ¿Cuál y cómo será(n) el(los) método(s) utilizado(s) para la recogida de datos?

#### **1.4.2. Acumulación y análisis de los datos experimentales**

Una buena acumulación de datos considera los costes del método empleado y un número óptimo de replicas. Respecto a esto último, no se ha establecido con claridad el número adecuado de muestras necesarias para que los datos experimentales generen un modelo “estadísticamente robusto”. El adjetivo robusto se utiliza en los modelos predictivos para designar aquellos modelos construidos con una base estadística sólida, basada en una gran cantidad de evidencias. Desde un punto de vista puramente estadístico es necesario tener siempre más observaciones que parámetros, pero ¿cuántos datos se requieren para obtener un buen ajuste? La respuesta dependerá de muchos factores; por ejemplo, de lo que se persiga modelar, el tipo de modelo a utilizar o el conocimiento previo que exista de las variables involucradas y su variación, etc. La respuesta más acertada es, en cualquier caso, cuantos más, mejor, “*as much as possible*”, ya que a mayor cantidad de datos, se identificará mejor el comportamiento de las variables [76], pero, claro, sin olvidar el coste y la inversión de tiempo que esto pueda implicar.

Existen tablas sobre el número de datos requeridos pero suelen estar simplificadas en exceso [76]. Sin embargo, en bibliografía pueden encontrarse algunos ejemplos que pueden usarse como guía la hora de establecer un número adecuado de réplicas. Así se ha observado que durante todo el periodo de crecimiento/inactivación de un microorganismo, casi siempre se necesitan alrededor de cien curvas para que el modelo sea significativo [14]. Gibson y col. [17] concluyeron que, como mínimo, se necesitan entre 10 y 15 puntos por curva de crecimiento/inactivación, estableciendo un óptimo de 20. Un número menor de 10 puntos por curva hace que el ajuste no sea lo suficientemente representativo, aumentando la incertidumbre de los datos. Poschet y Van Impe [77]

establecieron que tal incertidumbre aumenta cuando se recogen pocos puntos, pero por encima de un cierto número, la incertidumbre se mantiene estable. Baty y Delignette-Muller [78] compararon el ajuste de varios modelos, unos generados con solamente unos pocos datos por punto y otros con muchos, concluyendo que la imprecisión en los parámetros estimados estaba concluyentemente relacionada con la cantidad de datos.

Otro factor que afectará a la robustez del modelo, es la disposición de los puntos recogidos dentro del diseño experimental, siendo ésta crucial para que la estimación de las variables dependientes a estimar sea óptima. Por ejemplo, en algunos casos los valores recogidos deben estar espaciados en un mismo rango (por ejemplo, pHs de 7.0, 6.5, 6.0, 5.5 y 5.0) mientras que en otros es mejor que los datos se concentren en unos determinados valores (pHs de 7.0, 6.0, 5.5, 5.2, 5.0). En este último caso se concentran donde se espera que la variable dependiente (por ejemplo, la tasa máxima de crecimiento) cambie de forma significativa [79].

#### **1.4.3. Formalización del modelo, ajuste de los datos experimentales**

Los datos obtenidos se seleccionan y ajustan a un modelo primario, que describe como se comporta el microorganismo en estudio a lo largo del tiempo de análisis. Posteriormente, los parámetros obtenidos del modelo se relacionan con los factores considerados mediante un modelo secundario a través de una descripción matemática del efecto de los factores medioambientales en los parámetros cinéticos. Cabe destacar que, a mayor número de parámetros incluidos en un modelo, mayor número de datos habrá que ajustar. Generalmente, los modelos simples, los “*parsimonious models*” de los angloparlantes, predicen el comportamiento con mayor precisión [80, 81]. Un modelo simple necesita solo un par de parámetros de entrada (por ejemplo: número de microorganismos supervivientes a un tratamiento conservante en función del tiempo) y se basa en asunciones generales, mientras que un modelo complejo requiere el ajuste de muchos parámetros y solo podrá aplicarse en ciertos escenarios bajo condiciones definidas (como es el caso de los modelos de condiciones límite de crecimiento que consideran la interacción de dos o más condiciones como pueden ser el porcentaje de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), de nitrógeno (N<sub>2</sub>) u otro gas, pH, temperatura, porcentaje de cloruro sódico, etc.). Si existe poca información sobre las condiciones ambientales y el

comportamiento del microorganismo en estudio, la incertidumbre aumenta y, en estos casos, únicamente un modelo simple será capaz de ofrecer información valiosa.

#### **1.4.4. Validación del modelo generado**

La microbiología predictiva pretende proporcionar una estimación cuantitativa del comportamiento microbiano en los alimentos usando modelos matemáticos. Las predicciones del modelo deben compararse con hechos observados para comprobar si el modelo predice dentro de ciertos intervalos. Si los resultados no se ajustan a la realidad en esos rangos, frecuentemente se vuelve a la fase 1 para refinar la precisión del modelo.

Hay que considerar que los datos volcados por modelos muy simples suelen ajustarse peor a una realidad concreta, dando una considerable desviación entre los datos reales y los valores predichos. Por su parte, los modelos más complejos ofrecerán predicciones más precisas, pero dichas predicciones solo serán válidas para una o unas pocas simulaciones, cuyas condiciones han de ser muy similares a las del desarrollo del modelo. Modelos muy complejos podrían incluso llegar a arrojar más de una solución [82].

Para determinar si un modelo describe el comportamiento real de los microorganismos, éste debe validarse en alimentos para evaluar su capacidad predictiva [60]. El proceso de validación establece una comparación entre las variables dependientes estimadas por el modelo y los observados en los alimentos para un mismo microorganismo [30, 83]. La validación de un modelo debe hacerse sobre un alimento, pero en muchos casos, debido al coste que implica dicha validación, también se realiza en sustratos artificiales o con datos procedentes de la literatura científica [75]. Más adelante se explican en detalle alguno de los métodos de validación de modelos.

Una vez demostrado que las predicciones son similares a las observaciones en los alimentos, el modelo podrá aplicarse prácticamente. Una de las aplicaciones de los modelos es la creación de una herramienta informática (modelo terciario), en la que se integran los parámetros cinéticos estimados en el modelo primario y el comportamiento microbiano frente a los factores medioambientales considerados, recogidos en el modelo secundario, dando origen a los modelos terciarios descritos anteriormente.

Si del análisis de los datos experimentales se deduce que la precisión del modelo es insuficiente, puede ser necesario cambiar el modelo matemático empleado. En este caso

es probable que se necesiten más experimentos, más datos o incluso introducir más variables en el sistema, volviendo a la etapa 1 de la creación de un modelo. La precisión del modelo también puede mejorarse mediante alguna reparametrización [84].

Para generar un buen modelo predictivo es esencial trabajar con datos de elevada precisión obtenidos con un buen diseño experimental [82]. Para reducir la incertidumbre y mejorar la exactitud, sin que esto signifique un incremento de los costes, debe tenerse en cuenta en qué momentos han de tomarse las muestras y realizar los análisis correspondientes, en función del objetivo que se persiga. Por ejemplo, Ernstberger (2008), apuntó que los datos que pueden obtenerse en cada una de las fases de la curva de crecimiento de un microorganismo no dan información del resto de las fases; así, las determinaciones tomadas en la fase de latencia no sirven para calcular la tasa máxima de crecimiento [85].

Lo dicho hasta ahora es válido para la generación de un modelo de cualquier naturaleza. Pero, cuando se trata de un modelo microbiológico, han de considerarse, además, las características de la cepa y el método para generar los datos, los cuales se describen a continuación.

#### **1.4.5. Elección de cepa**

Respecto a la cepa microbiana, puede elegirse una sola cepa o una mezcla de ellas. Este dilema suele resolverse en función de lo que se busque en el modelo. ¿El modelo va a usarse para predecir el comportamiento de una especie patógena en particular, o es un modelo de una microbiota alterante de un determinado producto alimenticio?

Trabajar con una cepa que haya sido previamente utilizada en varios estudios proporciona el beneficio de los conocimientos acumulados previamente sobre dicha cepa. En cambio, trabajar con una cepa aislada del alimento en el que vaya a aplicarse el modelo, puede significar una mejora notable en la posterior validación del modelo.

Existe la posibilidad de trabajar con una mezcla o “cocktail” de cepas. Esto siempre es más representativo de la situación real de los alimentos, además, no necesariamente la misma cepa va a tener respuestas coherentemente homogéneas en un determinado intervalo condiciones. Sin embargo, la utilización de varias cepas simultáneamente dificulta la labor cuando en la generación de los modelos y sobre todo a la hora de

interpretar resultados, siendo recomendable trabajar con cepas individuales, sobre todo en el caso de las cinéticas de inactivación [86].

#### **1.4.6. Métodos de obtención de datos**

El número y la calidad de las observaciones hechas (datos) determinará la exactitud de los parámetros estimados [87, 88]. El número de datos y el o los método(s) utilizados para su recolección, definidos en la etapa de diseño experimental, deberán generar datos que proporcionen una información cuantitativa del comportamiento microbiano en estudio. La elección del método dependerá de qué quiera estudiarse, el material del cual se disponga, el tiempo que quiera invertirse y los costes involucrados. Algunos métodos se describen a continuación.

##### **1.4.6.1. Método de recuento de células viables**

El método estándar utilizado para cuantificar una población bacteriana, verificar su crecimiento o calcular el número de supervivientes a un determinado tratamiento microbicida es el recuento total de células viables en placa. Este método implica normalmente la dilución decimal de las muestras en un medio líquido y la posterior siembra de las diluciones pertinentes en un medio de cultivo con agar, bien general bien específico, ya en superficie ya en profundidad. Teóricamente, cada microorganismo viable generará una colonia, tras la correspondiente incubación, por lo que se asume que cada una de ellas proviene de un único microorganismo, denominado ufc [89], aunque esto no sea siempre cierto, dadas las estructuras en cadenas, racimos, pares, tétradas, etc. que pueden adoptar muchos microorganismos. Además, los microorganismos móviles, en su desplazamiento, pueden generar grandes colonias que abarcan varias ufc. Por otra parte, si el número de viables es elevado, es muy probable que los microorganismos estén cerca unos de otros y al multiplicarse, compartan colonia y ésta provendrá en realidad de dos o más ufc. De ahí la obviedad de que este método requiera de unos límites de conteo, sobre todo en lo que se refiere al límite máximo. En este sentido, la *Food and Drug Administration* (FDA) estipula como límites 25 y 250 colonias [90], mientras que Anderson y Calderón lo establecieron entre 30 y 300 colonias [89]. La razón de ser del límite mínimo radica en que un recuento muy bajo de una muestra muy diluida puede

conllevar un considerable error, por lo que siempre que se tengan recuentos de una dilución menor dentro del intervalo recomendado, éste o estos serán más certeros.

Este método requiere tiempo, más o menos prolongado dependiendo de las características de los microorganismos y de las condiciones de incubación, sobre todo de la temperatura, pero siempre más de 24 horas para la obtención de datos.

#### **1.4.6.2. Método de medida de la impedancia**

A diferencia del recuento de células viables, esta técnica es un método de cuantificación rápida y en tiempo real que consiste en medir el metabolismo microbiológico en mediante el movimiento de iones entre dos electrodos (conductancia), o el almacenamiento de carga en el electrodo del interfaz del medio (capacitancia). Cuando un microorganismo está activo y se multiplica, la conductividad del medio de crecimiento aumenta proporcionalmente al número de bacterias debido a la producción de moléculas orgánicas con carga [91]. Esta producción de moléculas cargadas se debe a, por ejemplo, la hidrólisis de proteínas en aminoácidos, de carbohidratos en lactato, y de lípidos en acetato; todos estos metabolitos incrementan la conductividad del medio [92].

La señal que debe medirse (impedancia, conductividad o capacitancia) depende del instrumento y del microorganismo y su metabolismo. Por ejemplo, para determinar el crecimiento de microorganismos, los tiempos de generación pueden calcularse basándose en el tiempo invertido en alcanzar unas unidades de impedancia concretas o a partir del tiempo requerido para duplicar la conductancia [91]. Finalmente, la cantidad de microorganismos se expresa en función del tiempo que tarda el cultivo en alcanzar unos valores de impedancia correspondientes a  $10^6$  -  $10^7$  células/ml (IDT: Impepedance detection time).

La conductancia se ha utilizado para el modelado del crecimiento de *Yersinia enterocolitica* [93] y la impedancia y la conductancia fueron utilizadas para el de *Salmonella* Enteritidis [86, 94, 95].

#### **1.4.6.3. Método de citometría de flujo**

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células)

alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula [96]. Estos parámetros pueden estar relacionados con características intrínsecas de la célula (tamaño y complejidad de su núcleo y citoplasma) o relacionados con características antigénicas de cada célula (conjunto de estructuras propias de la célula con funciones varias y que actúan como antígeno. Estas estructuras pueden estar localizadas en la membrana, intracitoplásmicos y nucleares).

Las señales producidas por la interacción de las células con el haz de luz son de dos tipos, señales de dispersión y señales de fluorescencia. La señal de dispersión resulta de la interacción de la luz con una partícula que produce un cambio de dirección (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. Las características morfológicas que determinan la dispersión de la luz son fundamentalmente el tamaño celular, la membrana, el núcleo y el material granular del interior de la célula, llamado complejidad. En los Citómetros de Flujo se miden dos fracciones de dispersión:

-La luz dispersada en ángulo cónico pequeño que casi coincide con la dirección de la luz incidente, llamada FSC (Forward Scatter). Es una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión.

-La luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (Side Scatter). Es proporcional a la complejidad de la estructura interna de la partícula.

Por otro lado, las señales de fluorescencia, están relacionadas con la capacidad de las moléculas (fluorocromos) en absorber la luz a una determinada longitud de onda (energía) y emitir a una longitud superior (menor energía). El espectro de absorción o excitación es el rango sobre el que un fluorocromo absorbe luz, y el espectro de emisión es el rango sobre el que un fluorocromo emite luz. Cuando un fluorocromo interacciona con la luz de excitación procedente del láser emite energía radiante. Debido a que parte de la energía se utiliza para la absorción, la luz emitida es de menor energía que la luz de excitación, es decir la longitud de onda emitida es mayor. La diferencia entre la longitud de onda de absorción y emisión se denomina Stokes shift. Los citómetros de flujo permiten detectar señales de fluorescencia procedentes de complejos

Antígeno/Anticuerpo marcados con un fluorocromo y situados en una célula, siendo la cantidad de señal de fluorescencia emitida igual a la proporción de la cantidad de componentes fluorescentes de la partícula [97].

Con esta técnica puede obtenerse más información que con las dos anteriores, como sería el caso del estado fisiológico de las células analizadas [86]; además, es capaz de cuantificar un número de células muy grande en un corto tiempo y puede diferenciar entre células y proporcionar un espectro de la posible heterogeneidad de la población microbiana y, de este modo, detectar subpoblaciones [98].

El uso de la citometría de flujo en microbiología predictiva está limitado por el coste de los equipos; sin embargo, existen referencias de su uso, destacando el trabajo de Sorensen y Jacobsen [99], quienes usaron citometría de flujo para enumerar las células viables de *Debaryomyces hansenii* en diferentes condiciones ambientales, lo que permitió modelar la fase de latencia y la máxima velocidad de crecimiento en función de la temperatura, pH y concentración de cloruro sódico.

#### **1.4.6.4. Método de turbidimetría**

La turbidimetría es un método indirecto para estudiar el crecimiento bacteriano mediante la cuantificación de la densidad óptica (DO) o absorbancia que genera un cultivo, ya que el crecimiento bacteriano genera turbidez [37]. Esta técnica se basa en el hecho de que las células bacterianas son capaces de absorber y dispersar un haz de luz incidente dependiendo de su concentración, tamaño y forma. Esta proporcionalidad es la base del uso de la turbidimetría como un método rápido, no destructivo y relativamente económico para monitorizar el crecimiento de cultivos microbianos [100, 101]. Los resultados de esta técnica han ganado en precisión gracias a los relativamente nuevos equipos turbidimétricos automatizados existentes en el mercado, como es el ampliamente utilizado *Bioscreen C* (Labsystem, Finlandia) [102], que permite realizar muchas medidas de DO de un cultivo en función del tiempo.

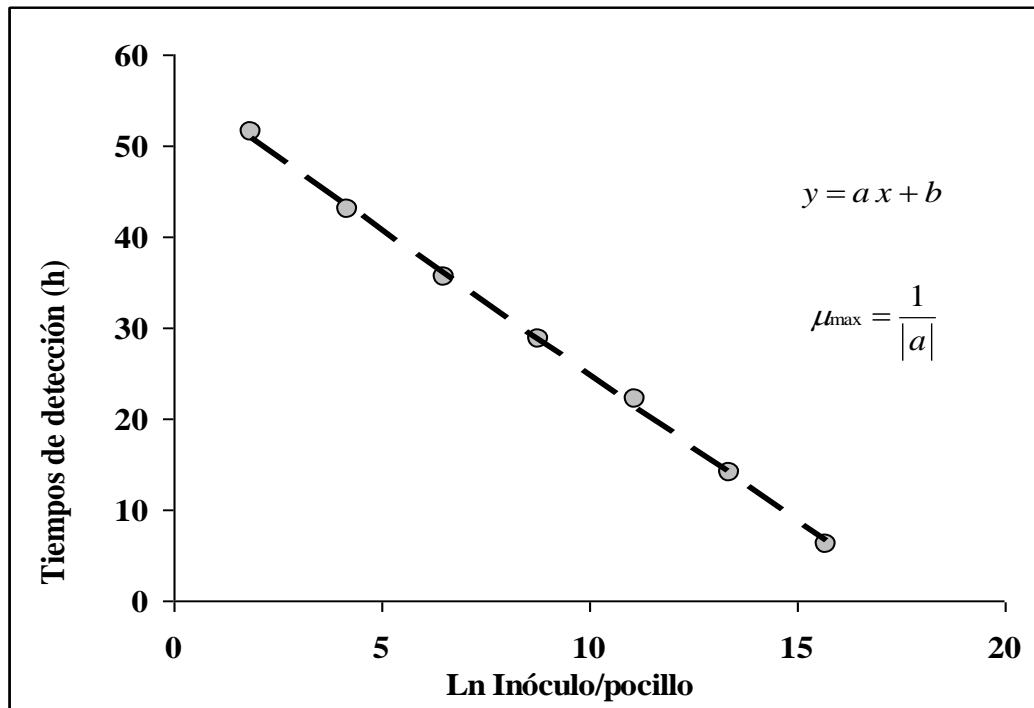
Algunos fundamentos de este método fueron descritos por McMeekin y col. [91]. Estos autores enfatizaron las limitaciones de este método, siendo la más importante el hecho de que su umbral de detección corresponde a una concentración microbiana en el intervalo de  $10^6 - 10^7$  células/ml [103], recuentos demasiado elevados y que hacen a esta técnica poco útil en muchas circunstancias. En apariencia, con esta técnica solo podría

modelarse con precisión la última fase del crecimiento de un microorganismo [38]. No obstante, es posible cuantificar los parámetros de crecimiento cuando el cultivo está por debajo del umbral de detección, siempre que se sepa la concentración del inóculo y se haya obtenido previamente una ecuación de calibración. Por ejemplo, Bréand y col. (1997) estimaron la fase de latencia determinando la intersección entre la línea recta, prolongación de la concentración del inóculo, y la extrapolación de la recta de pendiente igual a la velocidad de crecimiento, basada en las mediciones de DO detectables [104]. De todas formas, la precisión de esta medida está en entredicho, puesto que la asunción de que la velocidad de crecimiento es constante incluso cuando la concentración microbiana es de  $10^7$  células/ml es, cuando menos, aventurada, por lo que cuanto menor sea el inóculo, mayor será el error en la determinación de la fase de latencia, dando medidas de tiempo más cortas que las reales.

Varios autores han descrito métodos de calibración [105, 106]. McClure y col. [102] utilizaron una sencilla ecuación cuadrática para relacionar la densidad óptica con recuentos viables. Dalgaard y col. [105] emplearon dos métodos equivalentes de calibración: En uno, las células en fase estacionaria se diluían hasta una DO apropiada, y en el otro se tomaban medidas de DO y de recuentos viables durante el crecimiento. En algunos trabajos se ajusta directamente la ecuación de Gompertz a datos turbidimétricos, aunque no se disponga de datos por debajo del mínimo de DO detectable (aprox.  $10^7$  ufc/ml), por lo que evidentemente, deberían cuestionarse las estimaciones del tiempo de latencia y de la velocidad de crecimiento [107, 108].

Otros autores [109, 110] han propuesto el uso del tiempo de detección observado, es decir, el tiempo necesario para que una población celular alcance un nivel de turbidez detectable, como una alternativa fiable y factible para determinar la curva de crecimiento de un microorganismo. El tiempo de detección se define como el tiempo necesario para alcanzar una determinada absorbancia cuantificable y fiable; es decir, el tiempo necesario para que un determinado inóculo alcance una tasa microbiana que genere la suficiente turbidez para que el equipo de medida “pueda verla”. El método consiste, a grandes rasgos, en disponer de una serie de muestras con un inóculo conocido y sus diluciones seriadas. Obviamente, cuanto menor sea el inóculo, más tiempo tardarán las muestras que lo contengan en alcanzar la absorbancia del nivel de detección y, viceversa, a mayor concentración del inóculo, menos tiempo. Con los datos del logaritmo natural de la concentración microbiana y el tiempo requerido por cada una de tales concentraciones en

alcanzar el nivel de detección ( $T_d$ ) se construye una gráfica y el inverso absoluto de la pendiente ( $a$ ) de la recta de regresión coincide con la tasa máxima específica de crecimiento del microorganismo en las condiciones del experimento. La Figura 1 es un ejemplo que servirá para aclarar esta técnica.



**Figura 1.** Representación del cálculo de la tasa máxima específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) utilizando los tiempos de detección obtenidos por el equipo Bioscreen.

Wu y col. (2000) compararon el método del *Bioscreen C* de McKellar y Knight (2000) con el de la observación microscópica directa para determinar los tiempos de latencia de células aisladas. La diferencia entre el tiempo de latencia obtenido a partir de datos microscópicos o a partir de los tiempos de detección (Bioscreen) es que el primero se determina cuando la célula se divide, y en el segundo caso, la fase de latencia se calcula restando al tiempo que tarda una célula en llegar a una tasa microbiana capaz de generar una determinada turbidez (nivel de detección), el tiempo que habrá invertido la célula en llegar a esa tasa [111].

François y col. [112] calcularon la fase de latencia de células individuales utilizando el *Bioscreen*; para ello midieron las absorbancias en la parte superior de la curva de crecimiento clásica y extrapolaron la pendiente de dicha recta hasta el punto de corte con la prolongación paralela al eje de abscisas de la concentración del inóculo (1 célula), de

forma similar a lo diseñado por Bréand y col. [38] para calcular el tiempo de latencia de una población y, por tanto, deben tomarse con precaución por los mismos motivos expuestos más arriba. François y col. [113] habían desarrollado previamente un protocolo consistente en diluir las muestras hasta obtener una única célula en los 300 µl de medio que caben en cada pocillo del equipo. Con este sistema, los autores pretenden que el 80% de los pocillos del *Bioscreen* contengan una sola célula.

Rattanasomboon y col. [114], al observar que los valores obtenidos de los pesos de las células se correlacionaban bien con las mediciones turbidimétricas, sugirieron que la turbidimetría sería un buen indicador de las fluctuaciones en la masa de células durante el crecimiento. Estos mismos autores compararon datos obtenidos mediante citometría de flujo, turbidimetría, recuentos en placa y recuentos directos por microscopia del crecimiento de *Brocothrix thermosphacta* y concluyeron que la turbidimetría sobreestimaba la densidad celular porque las células cambian morfológicamente durante el crecimiento, mientras que la citometría de flujo rendía recuentos más exactos que la técnica de recuento en placa [114].

Finalmente cabe destacar que el equipo *Bioscreen C* posee como fundamental ventaja que todas sus funciones se controlan por medio de un software. De este modo pueden ajustarse diferentes parámetros, como la longitud de onda del filtro (405-600 nm), temperatura de incubación (1 - 60° C), frecuencia e intensidad de agitación, intervalo de tiempo entre dos medidas y duración global del experimento. El *Bioscreen C* ofrece, además, la posibilidad de generar una gran cantidad de réplicas, garantizando idénticas condiciones de trabajo, ya que procesa hasta 200 muestras simultáneamente, a la misma temperatura de incubación. De todas maneras, cada una de las muestras puede contener un medio diferente. Todo esto, evidentemente, permite obtener datos contrastados para la microbiología predictiva. En la actualidad, hay unos 800 equipos en laboratorios de microbiología alrededor del mundo [115].

#### **1.4.6.5. Método de microscopía**

La observación microscópica directa cada vez se está utilizando más como una alternativa excelente para la medida de la fase de latencia de células individualizadas y para la medida del tiempo de duplicación. Este auge se debe al desarrollo de software que permite captar imágenes cada cierto tiempo y un buen análisis de tales imágenes. Con

este método se establece con absoluta precisión el tiempo necesario para que una célula se divida, siempre en unas condiciones experimentales determinadas por las circunstancias del microscopio, mientras que con otras técnicas, la fase de latencia o el tiempo hasta la primera duplicación son estimaciones más o menos precisas [86, 111].

La microscopía permite observar la multiplicación y también medir con bastante precisión el tamaño de microcolonias en matrices sólidas, que guardan mucha similitud con muchos sistemas alimentarios. No obstante, también es posible observar el crecimiento en sistemas líquidos [86]. Otra ventaja es que pueden distinguirse las células muertas o inactivas de las activas y viables por su capacidad de duplicarse. Así, la microscopía directa permite ver a las células sometidas a una situación estresante, como pueda ser cualquier proceso de conservación de alimentos, y obtener información sobre su comportamiento, fase de latencia, capacidad de multiplicación y la posible variabilidad del tiempo de duplicación en las primeras etapas de la curva de crecimiento [111].

A pesar de que existe escasa información de la aplicación de este método se deben a Hansen en 1888, quien observó directamente en un microscopio el crecimiento de células individuales de levaduras hasta formar una pequeña colonia sobre una gota de gelatina. Sin embargo no fue hasta 1922 cuando el bacteriólogo, dr. Orskov, logró perfeccionar la técnica y observar células individuales de bacterias [116]. Posteriormente Kelly y Rahn (1932), sugirieron poner una pequeña lámina de agar en un microscopio para observar la tasa de crecimiento de células individuales y observaron una pequeña disminución en los tiempos de división con el número de generaciones [117]. Powell (1956) sugirió el uso de una cámara de flujo, en la que una membrana de celofán separaba las células del medio en movimiento, permitiéndole así cambiar las condiciones del medio y cuantificar los cambios en el crecimiento de las células [118].

En las últimas décadas esta técnica ha mejorado notoriamente gracias a la creación de microscopios más potentes y software de captura de imágenes que facilitan el procesado y la automatización de los datos [119, 120].

James y col. [121] utilizaron esta técnica con un software de análisis de imágenes para estudiar el crecimiento de *Acinetobacter* sp. en superficie con diferentes concentraciones de nutrientes, observando que cuanto más escasos eran, la capacidad de expansión de las poblaciones y su habilidad para adherirse decrecían. Wu y col. (2000) compararon el método turbidimétrico con el método de microscopía para la

determinación de la duración de la fase de lactancia en células individuales de *Listeria monocytogenes*, concluyendo que las fases de latencia estimadas por turbidimetría eran ligeramente mayores que las estimadas con el microscopio. Esta afirmación debe tomarse con mucha precaución, ya que Baranyi y col. (1993) y Dalgaard y col. (1994) habían concluido previamente que los métodos indirectos, como el método turbidimétrico, para la generación de curvas de crecimiento podrían proporcionar tiempos de generación diferentes de los determinados por recuento de viables o métodos directos. Estas diferencias pueden verse acentuadas por la disponibilidad de oxígeno y otros factores [111] que se escapan al control del investigador.

Se ha estudiado el flujo de células para analizar las características de los biofilms y microcolonias [122], pero mucho menos frecuentes han sido los intentos de utilizar este método para células individuales [118-120], porque el medio líquido donde las células están inmersas no es capaz de separar las “células hijas”, por lo que la unidad celular en estudio se convierte más o menos deprisa en una superpoblación, dificultando mucho la medida de la tasa de crecimiento. Elfwing y col. [123] desarrollaron un método consistente en un sistema de flujo acoplado a una cámara digital unida a un microscopio para cuantificar la división celular de un elevado número de células individuales. El sistema tenía la peculiaridad de mantener un flujo de medio nutritivo con una fuerza suficiente para separar las células hijas de la “madre”, previamente fijada en una matriz sólida. De esta manera, puede determinarse el tiempo que se invierte en un número más o menos grande de duplicaciones consecutivas. De esta manera puede estudiarse con mucha precisión la tasa de crecimiento de células individualizadas en vez del de poblaciones. Es obvio que la variabilidad de la  $\mu$  de una célula aislada, en divisiones sucesivas, no tiene nada que ver con la de una población, en la que los tiempos de duplicación de unas células compensarán los de otras, y como consecuencia, la variabilidad, si se llegase a apreciar, sería casi despreciable. En esta misma línea han trabajado Niven y col. [124, 125]. Finalmente Koutsoumanis y su equipo han desarrollado un método que les ha permitido visualizar el comportamiento de células individuales adheridas a una finísima lámina de agar con una elevada precisión, debido a la incorporación de un software analizador de imagen de última tecnología a un microscopio, que permite fotografiar células individuales y autorregular el enfoque de éste, obteniendo hasta 300 imágenes de una célula o grupo de células (microcolonia en formación) a diferentes niveles del “eje z” (altura de enfoque), generando finalmente una única imagen a intervalos regulares que se

incorpora a un video, en el que puede observarse cómo crece la célula, cuándo se divide y cómo va formando una colonia. Este método permite observar células aisladas y microcolonias en formación en tiempo real, cuantificar el tamaño celular y el tiempo de división y determinar la cinética de formación de colonias generadas a partir de una única célula [126].

#### **1.4.6.6. Otros métodos**

En este manuscrito no se pretende entrar en detalles de todos los métodos que permiten determinar el crecimiento microbiano, si no ahondar en aquellos que se han utilizado a lo largo de esta investigación, como han sido el método de recuentos de viables y el turbidimétrico. Aunque también se detalla el método de microscopia, ya que el doctorando ha trabajado con él. Este apartado de “otros métodos” se deja como una ventana abierta a otras posibles técnicas que podrían ser una herramienta más para obtener información del comportamiento microbiano, tales como, la centrifugación por densidad, actividad beta-galactosidásica de células aisladas, hibridación fluorescente *in situ*, RT-PCR *in situ*, *fluorescent protein reporters*, *bioluminescent reporters*, inmunofluorescencia, microelectroforesis y microscopía de fluorescencia, entre otros [127].

Cabe destacar, dentro de las alternativas para obtener información del comportamiento celular, los métodos desarrollados por los equipos de Wakamoto y Siegal-Gaskins. Wakamoto y col. [128] utilizaron una técnica fotolitográfica para diseñar unos micro-pocillos a los cuales se podían transferir células individualizadas de un pocillo a otro gracias a unas pinzas ópticas, cuantificando de este modo la división celular de la misma célula de forma consecutiva, de forma similar a la de Elfwing y col. [123], aunque solo podía estudiarse un número limitado de células en cada experimento. Por su parte, Siegal-Gaskins y Crosson [129] han diseñado un método parecida a los anteriores, denominado “cámara de cultivo en microflujo”.

### **1.5. Métodos para validar modelos predictivos**

Una vez obtenidos los datos del comportamiento microbiano con cualquiera de los métodos antes descritos (recuento en placa, microscopia, turbidimetría, etc.), se aplica un modelo primario, adecuado al comportamiento de dichos datos, de tal forma que se

expresen la evolución de las células en función del tiempo. Así se obtienen los parámetros cinéticos de los microorganismos para cada combinación de factores ambientales analizados. Más tarde es posible aplicar un modelo secundario para predecir cómo varían dichos parámetros en función de los cambios en uno o más factores ambientales. Finalmente, para comprobar la exactitud del modelo obtenido, se procederá a su validación para demostrar que el modelo predice con cierta certeza la realidad, puede aplicarse en la práctica de forma segura y, dentro de lo posible, puede integrarse en una herramienta informática como un modelo terciario.

Hay que considerar que la mayoría de los modelos predictivos se han desarrollado en medios de cultivo [130], por ende no existen garantías de que los valores predichos por un modelo coincidirán con los observados en un sistema alimenticio específico. Está comprobado que al complicarse más el sistema al que se aplica un modelo predictivo, aumenta el error de las predicciones [131].

Antes de la aplicación de un modelo predictivo en una situación práctica debe demostrarse que ese modelo predice con una mínima exactitud el comportamiento de los microorganismos en los alimentos durante su procesado, almacenamiento y distribución. En otras palabras, el usuario debe validar el modelo para cada alimento en cuestión [132]. La validación de un modelo matemático es una de las etapas más cruciales y al mismo tiempo más complicada dentro del ciclo completo de la modelización predictiva [133, 134].

La validez de un modelo desarrollado en el laboratorio y su aplicabilidad en alimentos debe cuestionarse, ya que estos son mucho más complejos en cuanto a composición, estructura macro y microscópica y procesos por lo que hayan podido pasar, además, de los posibles efectos sinérgicos o no entre estos factores y, quizás, algunos otros. Por un lado se ha demostrado que los alimentos reales pueden ser mejores sustratos para el crecimiento microbiano que los medios utilizados en un sistema modelo [135, 136] y, por otro, la carga inicial de un alimento y el estado fisiológico de los microorganismos que la forman pueden ser muy diferentes a los de los utilizados para la generación del modelo. Así, un producto sometido a pasterización, con un pH algo ácido y una determinada concentración salina es posible que contenga un número de microorganismos viables pequeño, supervivientes al procesado y necesiten una fase de latencia prolongada para reparar sus daños y adaptarse a las condiciones imperantes en el producto, mientras que, en el mismo alimento, una contaminación post-proceso, con

microorganismos en “plenitud de facultades”, se caracterizarán por un estado fisiológico muy diferente y unas capacidades distintas [136].

Ya se ha dicho que la microbiología predictiva se basa en que las respuestas de las poblaciones de microorganismos a los factores ambientales son reproducibles, y que la caracterización de las respuestas de crecimiento y/o inactivación, permite, a partir de observaciones anteriores, predecir las respuestas de dichos microorganismos en otras condiciones ambientales similares [137] y que es necesario validar tales predicciones, pudiendo ser ésta de dos tipos:

- Validación interna, que consiste en la comparación de los valores predichos por el modelo con los utilizados para generarlo o con otros obtenidos en idénticas condiciones. Esta comparación permite determinar si el modelo describe los datos experimentales con suficiente precisión.

- Validación externa, que consiste en comparar los valores predichos por el modelo con datos obtenidos de forma independiente en productos diferentes, ya sea con datos recogidos en la bibliografía o con datos obtenidos *ex profeso* para la validación [132]. En esta validación se incluyen la validación matemática y de producto. La validación matemática cuantifica la seguridad matemática de un modelo comparando sus predicciones con nuevos datos experimentales. Estos datos nuevos, no usados para la generación del modelo, se habrán obtenido en condiciones experimentales similares, con el mismo sustrato, pero con diferente tamaño de inóculo, temperatura, etc. Únicamente cuando la etapa previa de validación matemática demuestra la certidumbre del modelo será posible iniciar la validación de producto [133]. Ésta consiste en comparar las predicciones del modelo con observaciones en condiciones reales en un alimento. Con esta última validación se determina si las predicciones son lo suficientemente seguras y ciertas para poder aplicarse de forma rutinaria.

Para determinar qué predicciones proporcionan una buena descripción del crecimiento microbiano en los alimentos, los modelos deben validarse y evaluar su habilidad predictiva. Cuando un modelo se construye y valida adecuadamente, permite, por ejemplo, predecir el efecto del cambio de las condiciones de tratamiento sobre la evolución microbiana [16]. Un buen modelo debe ser generalista y no demasiado específico, a no ser que se requiera solo para una predicción muy específica. Esto

significa que un modelo debería funcionar bien cuando se confronte con nuevos datos, siempre dentro de la región de interpolación del diseño experimental original.

Si bien se puede pensar que el objetivo principal de un modelo es replicar los datos experimentales con la mayor exactitud posible, sin embargo viene a ser más importante que el modelo logre imitar la respuesta microbiana [138], debido a esto, el proceso de validación debe mirarse con cautela, considerando muchas veces los conocimientos empíricos sobre el comportamiento microbiano, no olvidando que es normal observar un “cierto” alejamiento entre lo observado y lo predicho, sobre todo cuando se trabaja con un alimento de composición mucho más compleja que el medio de cultivo utilizado para su generación. Por tanto es el usuario quien establece el rango de aplicabilidad del modelo, su límite de fiabilidad y sobre todo donde o cuándo el modelo comienza a dar predicciones poco seguras o peligrosas, como por ejemplo subestimar la tasa de crecimiento, lo que implicaría predecir que la población tarda más tiempo en llegar a una tasa de contaminación peligrosa, o sobrestimar el valor de la fase de latencia, es decir, predecir que las células empezarían a crecer más tarde de lo que en realidad sucede.

En microbiología predictiva se han usado diversos métodos con el fin de comparar la bondad de ajuste de una serie de modelos a los datos utilizados para su elaboración, así como métodos para determinar la aceptabilidad de la predicción del modelo en relación al error inherente a los datos [139]. A continuación se detallan algunos de estos indicadores.

### **1.5.1. Evaluación gráfica**

Al representar los valores predichos respecto a los observados en una gráfica se ven de forma simple y rápida las predicciones que podrían ser poco acertadas, inseguras o peligrosas. A este análisis visual, puede añadirse el análisis de los errores residuales, que da una idea de las diferencias entre los valores reales u observados y los predichos [61]. Más recomendable resulta la representación de la transformación logarítmica de los parámetros cinéticos porque el error de distribución será homogéneo, al quedar los puntos más equitativamente dispersos, aunque tiene el inconveniente de que las desviaciones y tendencias de los datos pueden pasar desapercibidas [60].

Witzjes y col. [140] representaron gráficamente valores de tiempo de generación para *L. monocytogenes*, procedentes de la bibliografía, frente a las correspondientes

predicciones de un modelo predictivo elaborado en medio de cultivo. Así mismo, Nerbrink y col., [141] compararon gráficamente los valores observados de la tasa máxima específica de crecimiento de *L. monocytogenes* con los publicados anteriormente en las mismas condiciones experimentales. En ambos ejemplos, en las representaciones gráficas se podían observar fácilmente aquellas predicciones que podrían ser inseguras en la práctica y la bondad de ajuste del modelo utilizado.

### 1.5.2. Análisis matemático

Si bien una mera evaluación gráfica es útil, es necesario un análisis matemático más profundo para valorar la fiabilidad o bondad de ajuste de un modelo. A continuación se detallan algunos indicadores matemáticos.

#### 1.5.2.1. Coeficiente de determinación ( $R^2$ )

Una vez ajustada una ecuación a la nube de observaciones es importante disponer de una medida que mida la bondad del ajuste realizado y que permita decidir si el ajuste es suficiente o se deben buscar modelos alternativos.

Una de estas medidas es el coeficiente de determinación, éste da una idea del ajuste total conseguido, midiendo la fracción de la variación, alrededor de la media, que es explicada por el modelo, es decir mide la proporción de la variabilidad total de la variable dependiente respecto a su media que es explicada por el modelo de regresión. El valor más cercano a 1 significa una mejor predicción obtenida por ese modelo [142].

$$R^2 = \left( \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}} \right)^2 \quad (1)$$

Son muchos los artículos en donde se ha utilizado este coeficiente, por mencionar un ejemplo, Perez y col. (2007) ajustaron dos modelos (log-linear y Weibull) para describir la transferencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* durante el troceado de productos cárnicos ahumados utilizando el  $R^2$  como bondad de ajuste [143].

### 1.5.2.2. Raíz del error cuadrático medio (“Root Mean Square Error” *RMSE*)

Este estadístico es una de las maneras de cuantificar el error cuadrático de las diferencias entre un valor predicho por un modelo y un valor real u observado. Se calcula como la raíz cuadrada del sumatorio de las diferencias cuadradas de los valores predichos ( $X_i$ ) y los valores observados ( $X_0$ ) (diferencia residual) dividido por el número total de datos ( $n$ ). Es una medida de la variabilidad residual, no explicada por los cambios de los factores ambientales como concentración de cloruro sódico, pH o temperatura. Esta variabilidad residual puede deberse a varios motivos, incluyendo la variabilidad natural y ciertos errores sistemáticos. Evidentemente, un valor bajo de *RMSE* implica que el modelo predice con una razonable certeza [142]. No obstante, el *RMSE* puede ser grande y el modelo predecir con exactitud, ya que depende mucho del orden de magnitud de los valores predichos y observados. Así, con el mismo porcentaje de error (misma “exactitud”), si el valor predicho es del orden de  $10^6$  o es del orden de  $10^1$ , el *RMSE* en el primer caso es mucho mayor, porque la variabilidad residual va a ser mayor ( $X_i - X_0$ ) que en el segundo cuando, en realidad, del modelo predice con la misma precisión [75].

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_0)^2}{n}} \quad (2)$$

### 1.5.2.3. Error Standard de Predicción (“Standard error of prediction” *SEP*)

Esté índice es similar al *RMSE* pero en términos relativos, es decir, que su valor no depende de la magnitud de los datos observados [144] y se define como:

$$SEP = \frac{100}{\overline{X_0}} \sqrt{\frac{\sum (X_0 - X_i)^2}{n}} \quad (3)$$

Donde  $\overline{X_0}$  es el promedio de los valores observados, el resto de los parámetros están definidos en *RMSE*.

*SEP* se utiliza menos que el indicador anterior aunque algunos autores prefieren su uso al ser adimensional [144]; es el caso de Hervas y col. [144], quienes evaluaron el poder de las redes neuronales computacionales para la predicción del crecimiento microbiano, observando un error estándar de predicción del 5 %.

#### 1.5.2.4. Factor de sesgo (“Bias factor” $B_f$ ) y factor de exactitud (Accuracy factor” $A_f$ )

Ross (1996) desarrolló dos índices para evaluar la bondad de ajuste de los modelos predictivos de forma sencilla. Estos índices, denominados factor de sesgo y factor de exactitud proporcionan una buena estimación de la fiabilidad de los modelos [145] y se definen como:

$$B_f = 10^{(\sum \log(X_{pred}/X_{obs}))/n} \quad (4)$$

$$A_f = 10^{(\sum |\log(X_{pred}/X_{obs})|)/n} \quad (5)$$

El objetivo de estos índices es estimar la bondad de ajuste de un modelo cuando se compara con observaciones que no se han utilizado para generarlo, pensando sobre todo en comparar las predicciones con datos obtenidos en alimentos. Estas comparaciones permiten evaluar la utilidad del modelo en la toma de decisiones en materia de seguridad alimentaria [130]. Desde el desarrollo de estos índices, su aplicación ha sido muy amplia en estudios de validación [146-149].

Es importante recalcar que los usuarios de los modelos deben conocer su intervalo de aplicabilidad y los límites de su fiabilidad. Al considerar la bondad de ajuste de un modelo, hay que tener en cuenta si las predicciones que realiza son seguras o peligrosas, es decir, si sobreestiman o subestiman el crecimiento microbiano respectivamente. Aunque es preferible establecer un cierto margen de seguridad, conviene que los modelos se aproximen lo más posible a la realidad. Un  $B_f > 1$  indica un modelo seguro para el caso de la tasa de crecimiento, porque el valor observado es inferior al estimado, lo que indica que el microorganismo crece más despacio en el alimento que en lo predicho, lo que da un margen de seguridad. En cambio un  $B_f < 1$  para la fase de latencia indica que la predicción es segura porque la fase de latencia observada es mayor que la predicha por el modelo [145], es decir, la población tardará más tiempo del predicho en iniciar su multiplicación en el alimento. Cuanto mayor sea el valor del  $A_f$ , menos exacta es la predicción. Un valor de  $A_f$  de 1,7 indica que las predicciones, en promedio, difieren un 70% de las observaciones. Cuando ambos índices toman el valor de la unidad significa que existe concordancia perfecta entre los valores de los parámetros de crecimiento predichos y observados. Una buena concordancia entre los valores predichos, por

ejemplo, de la tasa de crecimiento de un microorganismo y los observados en un alimento indica que el alimento por sí mismo juega un mínimo papel en la respuesta microbiana.

Idealmente, los modelos predictivos deberían tener un valor de  $B_f = A_f = 1$ , pero típicamente el valor de  $A_f$  aumentará en 0,10 a 0,15 por cada variable del modelo, siendo, por ejemplo, aceptable un modelo que predice el efecto de la temperatura, pH y la  $a_w$  sobre la tasa de crecimiento con valores de  $A_f = 1,3 - 1,5$ . No así para los valores que pueda tomar  $B_f$ , ya que definir un rango de éste, será relativo a la aplicación específica del modelo [146].

Cuando las predicciones difieren de los valores observados, las diferencias pueden deberse a infinidad de factores. Es posible que haya parámetros decisivos que no se han incluido en el modelo como antimicrobianos naturales del alimento, un determinado conservante añadido, el sistema de envasado, la estructura del alimento, etc. Si la respuesta observada difiere sustancialmente de la predicción es importante determinar la razón de esta diferencia y, quizás, sea necesario, incluir más variables independientes en el modelo para que su precisión mejore.

Baranyi y col. (1999) introdujeron una modificación en los índices  $B_f$  y  $A_f$  descritos anteriormente, basándose en la diferencia del promedio de los valores cuadráticos [150]. Dichos investigadores propusieron las siguientes ecuaciones para comparar un modelo  $f$  respecto de un modelo  $g$ :

$$B_{f,g} = \exp \left[ \frac{\int_R (\ln f(x_1 \dots x_n) - \ln g(x_1 \dots x_n)) dx_1 \dots dx_n}{V(R)} \right] \quad (6)$$

$$A_{f,g} = \exp \left( \sqrt{\frac{\int_R (\ln f(x_1 \dots x_n) - \ln g(x_1 \dots x_n))^2 dx_1 \dots dx_n}{V(R)}} \right) \quad (7)$$

donde  $f(x_1 \dots x_n)$  son los valores predichos, por ejemplo, de la tasa máxima de crecimiento de la función  $f$  compuesta por  $n$  factores ambientales  $x$ ;  $g(x_1 \dots x_n)$  son los valores predichos de la tasa máxima de crecimiento de la función  $g$  compuesta por  $n$  factores ambientales  $x$  y  $V(R)$  es el volumen de la región  $\int_R 1 dx_1 \dots dx_n$ , es decir, si  $R$  está compuesto por el intervalo de temperatura  $(T_1 - T_2)$  entonces  $V(R) = T_2 - T_1$ .

Las ecuaciones (6) y (7), se utilizan para comparar dos modelos, definidos como caso continuo, pero en casos discretos, donde  $n$  observaciones  $g^{(1)}, g^{(2)}, \dots, g^{(n)}$  son hechas aleatoriamente en el entorno de la región  $R$ , entonces  $B_f$  y  $A_f$  estarán definidos por:

$$B_f = \exp \left( \frac{\sum_{k=1}^m (\ln f(x^{(k)}) - \ln g^{(k)})}{n} \right) \quad (8)$$

$$A_f = \exp \left( \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (\ln f(x^{(k)}) - \ln g^{(k)})^2}{n}} \right) \quad (9)$$

Los mismos autores definieron además “porcentaje de discrepancia (%  $D_f$ )” y “porcentaje de sesgo (%  $B_f$ )”:

$$\% D_f = (A_f - 1) * 100 \quad (10)$$

$$\% B_f = \text{sgn}(\ln B_f) * (\exp |\ln B_f| - 1) * 100 \quad (11)$$

donde  $\text{sgn}$  indica el signo de  $(\ln B_f)$ , cuya función es indicar si el sesgo global es positivo o negativo. Si el %  $B_f$  es positivo, entonces, en promedio, las predicciones arrojan un valor mayor que las observaciones, en el caso por ejemplo de modelarse la tasa de crecimiento, el modelo predecirá un crecimiento más rápido que las observaciones, y el modelo se considera seguro.

El porcentaje de discrepancia no puede ser negativo, como mucho puede llegar a un valor nulo, si y solo si las predicciones son idénticas a las observaciones, y entonces el %  $B_f$  es cero también. No obstante, un %  $B_f$  muy pequeño, incluso de cero, puede darse aun que la precisión sea pobre, con un %  $D_f$  grande [150].

Por ultimo, McClure y col. (1993) introdujeron otra medida de la exactitud de las ecuaciones predictivas. Estos autores compararon sus modelos y la realidad mediante el sumatorio de los cuadrados de las diferencias entre los logaritmos naturales de los valores observados ( $g_{\text{obs}}$ ) y los predichos ( $g_{\text{pred}}$ ), siendo

$$\sum (\ln(g_{\text{obs}}) - \ln(g_{\text{pred}}))^2 \quad (12)$$

El modelo será más preciso cuanto más pequeño sea este valor [46].

## 1.6. Aplicación de los modelos microbiológicos predictivos

Una manera rápida y eficaz para obtener información sobre el posible comportamiento que tendrá un microorganismo bajo ciertas condiciones ambientales es aplicando un modelo predictivo. Es importante, sin embargo, tener en cuenta el hecho de que los modelos predictivos no sustituyen en ningún caso el análisis microbiológico rutinario que se lleva a cabo en una industria alimentaria [14].

En los alimentos pueden actuar factores no contemplados en el modelo e influir de forma significativa en el comportamiento de un determinado microorganismo. El uso del modelo en estas situaciones no es apropiado ya que puede dar lugar a predicciones inexactas. No obstante, si el modelo se ha validado, es de suponer que aporte información rápida y útil que permita una toma de decisiones en muchas situaciones más o menos comprometidas. Así pues, los modelos predictivos son herramientas complementarias a considerar en la toma de decisiones en una industria alimentaria, que, aunque no siempre indican el camino correcto a seguir, suelen ser una guía bastante fiable. Valero [75] resumió en la siguiente tabla muchas de las aplicaciones de los modelos predictivos.

**Tabla 2.** Posibles aplicaciones de la microbiología predictiva

<b>Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Análisis preliminar de peligros</li><li>➤ Identificación y establecimientos de puntos críticos de control</li><li>➤ Acciones correctoras</li><li>➤ Evaluación de la interacción entre variables</li></ul>
<b>Evaluación de Riesgos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Estimación de los posibles cambios en los niveles de un determinado microorganismo en la cadena alimentaria</li><li>➤ Evaluación de la exposición hacia un microorganismo patógeno</li></ul>
<b>Estudios de Vida útil</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Predicción del crecimiento de posibles microorganismos patógenos y alterantes en alimentos</li></ul>
<b>Investigación y desarrollo de un producto</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Evaluación del efecto de la alteración microbiológica de un producto</li><li>➤ Efecto del procesado sobre un determinado producto</li><li>➤ Evaluación del efecto de circunstancias externas al control de la producción alimentaria</li></ul>
<b>Medidas de higiene e integración de temperatura</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Evaluación de las consecuencias de la temperatura de la cadena de frío sobre la alteración microbiológica de un producto</li></ul>
<b>Educación</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Educación de personal científico y no científico</li></ul>
<b>Diseño de experimentos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Número de muestras a preparar</li><li>➤ Definición de los intervalos entre cada factor a analizar</li></ul>

### **1.6.1. Relación de la microbiología predictiva con el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control y la evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos**

Las exigencias de las autoridades sanitarias en las sociedades occidentales son muy rigurosas en su afán de conseguir la máxima seguridad microbiológica de los alimentos para salvaguardar la salud de los consumidores. Con este fin se han introducido dos conceptos. Uno es el “Objetivo de Seguridad Alimentaria” (en adelante FSO, del inglés “Food Safety Objective”) y el otro es el nivel adecuado de protección del consumidor, en adelante “ALOP” del inglés “Appropriate Level of Protection”, que, en realidad es la pretensión que el FSO persigue. El ALOP viene a significar el nivel tolerable de riesgo que pueda asumirse [151].

El FSO se define como *“la máxima frecuencia y/o concentración de un peligro en un alimento en el momento de su consumo que proporciona o contribuye al nivel de protección adecuado”* [151]. De esta forma, el FSO convierte al ALOP en un parámetro que puede controlarse por los industriales y monitorizarse por las agencias gubernamentales. El establecimiento de un FSO específico de un determinado alimento y la consecución del mismo mediante un tratamiento definido depende de diversos factores, como la dosis infectiva del microorganismo, los microorganismos más representativos o de mayor importancia sanitaria en el producto, de la fase de latencia y del tiempo de generación de dichos microorganismos, en el caso de que las condiciones imperantes permitan su crecimiento, del nivel inicial habitual por unidad de producto, del criterio microbiológico que se haya fijado, de las condiciones normales en que se almacena y distribuye hasta su venta y de las prácticas culinarias y de consumo más implantadas [152].

Para traducir un nivel de seguridad (expresado como FSO) en acciones prácticas, se utiliza el APPCC. Los conceptos del APPCC se basan en la identificación y control de peligros y en la identificación y evaluación de las etapas clave de la cadena de producción alimentaria, lo que, teóricamente, es un acierto y apunta a tener éxitos evidentes, pero, a menudo, los APPCCs se aplican de forma subjetiva o tienden a simplificarse, quizás en exceso, debido a la complejidad de todos los factores implicados en la producción y posterior consumo de un alimento.

Los FSOs son muy útiles para comparar metas, en materia de seguridad, de diferentes países o empresas, y pueden servir para determinar la equivalencia de medidas

de control para la protección de la salud que parecen diferentes, pero que en realidad pueden ser equiparables.

Pero, ¿cuál es el nivel adecuado o tolerable de protección al consumidor? Idealmente, lo deseable sería eliminar por completo un peligro del alimento durante las etapas de producción primaria, transformación, distribución, e incluso preparación doméstica previa al consumo. Pero nos topamos con el escollo de que el riesgo cero no existe. Por tanto ha de definirse y asumirse un riesgo tolerable, teniendo en cuenta consideraciones de salud pública, normativas, de tipo económico, la aceptación del consumidor, etc.

La microbiología predictiva es una valiosa herramienta para la formulación de planes de APPCC [153-155]. Los modelos predictivos tienen un papel preponderante en la evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos (QMRA, del inglés Quantitative microbial risk assessment), ya que pueden estimar, para unas determinadas condiciones, la cantidad de microorganismos que pueden encontrarse en un producto y, en consecuencia, el riesgo asociado al consumo de tal producto. Por ejemplo, un modelo nos dice cuándo puede alcanzarse la dosis infectiva de un determinado patógeno, cuya carga inicial es una concreta, en un alimento almacenado en unas condiciones específicas.

El riesgo microbiológico es la probabilidad de que un peligro microbiológico esté presente en el alimento. Se estima mediante el análisis de datos, cuantos más mejor, y el uso de información científica [75]. Las toxiinfecciones alimentarias surgen como consecuencia del consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos y/o toxinas microbianas por individuos con status sanitario determinado. Así, el riesgo de padecer una toxiinfección alimentaria resulta de una combinación de la probabilidad de exposición al patógeno, la probabilidad de que se desarrolle la enfermedad y de su gravedad [75].

Tanto el APPCC como el QMRA pretenden que al consumidor le lleguen alimentos seguros, basándose, para conseguirlo, en conocer la magnitud de los peligros que puedan entrañar tales productos. La evaluación de riesgos es parte del proceso para decidir lo que es “seguro” para nosotros, pero, para evaluar el riesgo debe analizarse el grado de exposición de los humanos a los patógenos que pueden contaminar más o menos esporádicamente un alimento. Los modelos predictivos se están utilizando en la evaluación de la exposición humana a los patógenos como sustitutos de los

convencionales recuentos microbianos o la puesta de manifiesto de la presencia de un determinado patógeno en un producto [155]. Por otra parte, es obvio que una buena evaluación de un riesgo necesita conocer el número de microorganismos en un alimento en el momento de su consumo. Esta información raramente está disponible, pero los modelos predictivos pueden predecirla. Para prever el número de microorganismos presentes tras un tiempo determinado (por ejemplo, en el momento del consumo) a partir de niveles concretos en un momento previo de la historia del producto (por ejemplo, tras todo el procesado), es necesario conocer a la perfección las respuestas de los microorganismos a y en las condiciones del alimento y del entorno (temperatura, nutrientes, agentes químicos, conservantes, otros microorganismos).

Varios autores [156-160] han discutido el nexo entre la microbiología predictiva y la evaluación del riesgo cuantitativo en la seguridad alimentaria, por lo que actualmente son numerosas las publicaciones científicas que sustentan la utilidad de la microbiología predictiva como una herramienta para la evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Algunas publicaciones científicas relacionadas con el análisis de riesgos y la microbiología predictiva

<b>Autores</b>	<b>Título</b>	<b>Referencia</b>
Nauta M., y col., 2007	<i>A risk assessment model for Campylobacter in broiler meat.</i>	[161]
Delignette-Muller, M.L. y Cornu, M., 2008.	<i>Quantitative risk assessment for Escherichia coli O157:H7 in frozen ground beef patties consumed by young children in French households.</i>	[162]
Zwietering, M., 2009.	<i>Quantitative risk assessment: is more complex always better? Simple is not stupid and complex is not always more correct.</i>	[73]
Ross, T., y col., 2009.	<i>Quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat meats in Australia.</i>	[163]
Mataragas, M., y col., 2010	<i>Quantitative microbiological risk assessment as a tool to obtain useful information for risk managers--specific application to Listeria monocytogenes and ready-to-eat meat products</i>	[164]
Augustin, J.C., 2011.	<i>Challenges in risk assessment and predictive microbiology of foodborne spore-forming bacteria</i>	[165]
Malakar, P.K., y col., 2011.	<i>Quantitative risk assessment for hazards that arise from non-proteolytic Clostridium botulinum in minimally processed chilled dairy-based foods.</i>	[166]
Perez-Rodriguez, F., y Zwietering, M., 2012.	<i>Application of the Central Limit Theorem in microbial risk assessment: High number of servings reduces the Coefficient of Variation of food-borne burden-of-illness.</i>	[167]

El QMRA propone un marco para una evaluación sistemática y objetiva de toda la información disponible acerca de un determinado peligro. Su ventaja más destacable quizá estriba en que facilita el establecimiento de criterios microbiológicos en alimentos destinados al comercio internacional y determina unas pautas a seguir por la política de cada país [168]. Un *QMRA* estructurado puede utilizarse para detectar lagunas o desconocimiento de fuentes de información, caracterizar los factores de riesgo más importantes en la cadena producción-consumo, identificar estrategias encaminadas a la reducción del riesgo, y por último, establecer unas guías sobre las prioridades a tener en cuenta en los programas de salud pública y seguridad alimentaria [75].

El QMRA constituye una herramienta especialmente útil cuando los objetivos de seguridad alimentaria se encaminan hacia nuevos contaminantes en productos conocidos, o a contaminantes conocidos en nuevos productos [169]. Asimismo es un relevante componente durante el desarrollo de un producto, la optimización del proceso higienizante, y en la implantación de cualquier plan de APPCC.

El QMRA forma parte del primero de uno de los tres 3 pilares descritos por la Comisión del Código Alimentario y que conforman el Análisis del Riesgo Microbiológico [170]:

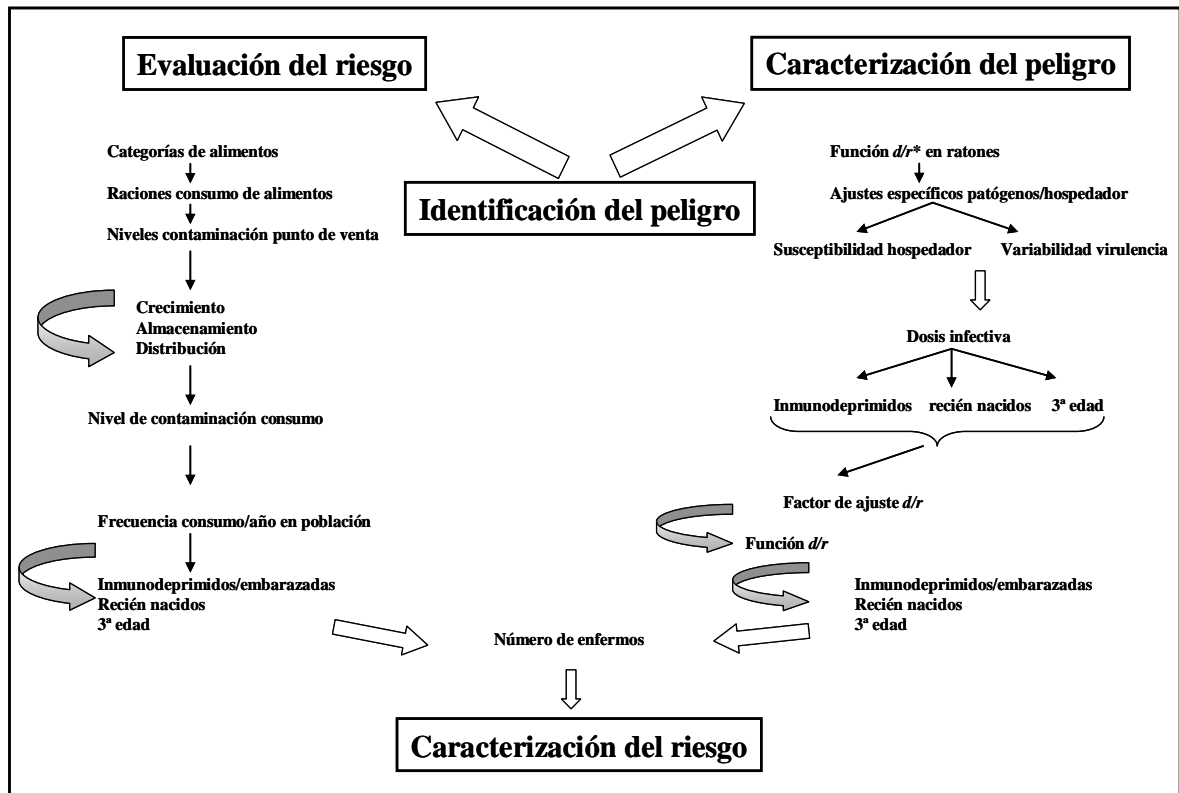
- A. Evaluación del Riesgo: es un proceso iterativo de carácter científico que consiste en el desarrollo de cuatro etapas: Identificación del Peligro, Caracterización del Peligro, Evaluación de la Exposición y Caracterización del Riesgo.
- B. Gestión del Riesgo: es el proceso de selección de alternativas en función de los resultados obtenidos en la evaluación de riesgo, y en su caso, de implantación de medidas o acciones correctoras.
- C. Comunicación del Riesgo: es el proceso interactivo de intercambio de información y opiniones concernientes a la gestión del riesgo entre diferentes asesores de riesgo, gestores, consumidores y otros partidos interesados.

Un Análisis de Riesgo Microbiológico formal puede tardar varios años en llevarse a cabo. Para evitar las dificultades que requiere la realización de un Análisis de Riesgo Microbiológico para cada empresa y tipo de producto, la Organización Mundial del Comercio (OMC) acepta el uso de criterios internacionales establecidos. Cada uno de esos criterios está basado en procesos previos de Análisis de Riesgo Microbiológico, en

los cuales, los organismos internacionales y los gobiernos de cada país actúan como gestores del riesgo. El esfuerzo de los diferentes países en poner en común sus propias medidas higiénico-sanitarias en los alimentos facilitará una rápida armonización global. Los requisitos que deben seguir dichas medidas se resumen en lo siguiente [171]:

- Las medidas higiénico-sanitarias en los alimentos deberán basarse en evidencias científicas.
- La aplicación de las medidas higiénico-sanitarias buscar la coherencia y nunca ser discriminatoria.
- A la hora de elaborar las medidas, debe mantenerse una completa transparencia.
- Las medidas higiénico-sanitarias se aplicarán creando la menor distorsión posible en el comercio.
- Debe aplicarse el concepto de regionalización entre las distintas áreas.
- Debe aceptarse la equivalencia y fiabilidad de las medidas higiénico-sanitarias.

El marco de trabajo del QMRA se divide en cuatro componentes; el primero de ellos define el peligro microbiológico asociado a los alimentos, mientras que los tres restantes utilizan los datos disponibles o ciertas presunciones científicas para desarrollar modelos matemáticos que estimen la frecuencia de consumo de alimentos contaminados, número de bacterias presentes o probabilidad de contraer la enfermedad cada uno de los diferentes grupos de riesgo. En la Figura 2 se muestra la relación existente entre todas las fases de un QMRA y pretende resumir lo que hasta aquí se ha descrito.



**Figura 2.** Relación entre las diferentes etapas que conforman un QMRA.

\*  $d/r$  = dosis-respuesta.

Figura reproducida de Valero [75].

### 1.7. Inactivación microbiana

Aunque es extremadamente difícil fijar con exactitud cuándo el hombre se percibió de la presencia y el papel de los microorganismos en los alimentos, las evidencias de las que se disponen indican que este hecho se produjo mucho antes de que naciera la microbiología. Existen evidencias arqueológicas de que hace unos 8.000 años surgieron los primeros métodos conscientes de conservación de alimentos (salazones y conservación en aceite). Los romanos, 1.000 a.C., ya conservaban gambas y otros alimentos perecederos en nieve. Sin embargo no fue hasta finales del siglo dieciocho cuando empieza a hablarse de conservación de alimentos [172].

Hoy en día, existen muchos métodos para inactivar microorganismos en los alimentos. A continuación se detallan la inactivación por calor e irradiación por electrones acelerados, ambos utilizados en esta tesis.

### 1.7.1. Calor

La temperatura es uno de los principales agentes que afectan a la viabilidad y al crecimiento microbiano. De acuerdo al intervalo de temperatura en el que crecen los diferentes microorganismos, se clasifican en termófilos, mesófilos, psicrotrofos y psicrófilos [152].

Los microorganismos presentan una temperatura óptima de crecimiento, por debajo de la cual éste se ralentiza hasta llegar a una determinada temperatura en la que se detiene por completo. En el caso de los microorganismos esporulados pueden permanecer años sin presentar un metabolismo detectable hasta encontrar las condiciones adecuadas para germinar y transformarse en células vegetativas. Por el contrario, temperaturas superiores a las máximas de crecimiento del microorganismo, producen inevitablemente su muerte o les provocan lesiones subletales, debido a la desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidativos irreversibles. Las células supervivientes a tratamientos térmicos podrán permanecer viables, pero no podrán multiplicarse hasta que la lesión o lesiones sufridas no se reparen y se encuentren en un entorno que permita su duplicación (viables cultivables), o, quizás, no logren recuperarse (viables no cultivables) [152].

Por otro lado, el tipo de calor utilizado como agente microbicida afecta de manera diferente a los componentes celulares de los microorganismos. La desnaturalización de las proteínas cuando se someten a vapor saturado (calor húmedo) es más rápida que si se hace en con aire caliente (calor seco). Siendo por lo tanto el calor húmedo quien posee mayor poder microbicida.

Se ha sugerido que la desnaturalización de las proteínas es el mecanismo de la muerte por calor o está estrechamente asociado con este fenómeno. No se saben a ciencia cierta los mecanismos de cómo favorece el agua la desnaturalización de las proteínas por el calor, pero se ha apuntado que el calentamiento provoca la formación de grupos sulfhidrilo libres lo que conlleva un aumento de la capacidad de retención de agua de las proteínas. La presencia de agua favorece la rotura térmica de los enlaces peptídicos, un proceso que requiere más energía en ausencia de agua [172].

De un modo general se puede decir que, los microorganismos termófilos son más termorresistentes que los mesófilos, siendo los psicrófilos y psicrotrofos los más

termolábiles. Las bacterias Gran positivas son más resistentes que las Gran negativas, así mismo, las bacterias esporuladas mucho más que las formas vegetativas [152].

Las altas temperaturas a las que se exponen las células no afectan a un blanco específico o a la célula como un todo, sino que pueden producirse lesiones en cada uno de los constituyentes celulares, estructuras, moléculas y reacciones que tienen lugar en la célula [173]. Las células, por tanto, contienen diferentes posibles sitios para la acción del calor y se acepta que la termorresistencia basal de los microorganismos se debe a la estabilidad intrínseca de las macromoléculas, los ribosomas, los ácidos nucleicos, las enzimas y las proteínas celulares, entre otras moléculas o estructuras. La actividad biológica del ácido ribonucleico (ARN) es 30 veces más sensible al calor que la del ácido desoxirribonucleico (ADN) [174]. La modificación de las moléculas de ARN se asocia con las primeras fases del daño celular por acción del calor. El calentamiento daña las membranas produciéndose una depleción de iones magnesio en las células [175]. La presencia de magnesio estabiliza los ribosomas, por lo que la depleción de estos iones los escinde en las subunidades 30S y 50S, ambas más termolábiles que la partícula completa 70S. Esta hipótesis viene respaldada por los trabajos de Anderson y col. (1991) y de Mackey y col. (1991), quienes establecieron que la desnaturalización de la subunidad 30S comenzaba a temperaturas comprendidas entre 50 y 80°C [176, 177]. Por otra parte, la presencia de altas concentraciones de sal en el medio de calentamiento aumenta la termorresistencia aparente de los microorganismos debido, al parecer, a un aumento en la temperatura de desnaturalización de la subunidad 30S [178].

En cuanto a las proteínas, su coagulación no parece que sea la principal causa de la muerte celular. El agua que se encuentra en íntimo contacto con las mismas es un factor que contribuye de forma decisiva en el grado de termorresistencia de la célula [179]. Además bajo la acción del calor, los microorganismos acumulan compuestos orgánicos de bajo peso molecular llamados osmolitos (aminoácidos y sus derivados), responsables de la estabilidad térmica de las proteínas [180].

Cabe destacar que existe una gran diferencia entre la termorresistencia entre las formas vegetativas y esporuladas de algunos microorganismos. Éstas últimas son mucho más resistentes en parte debido al número y estructura de sus envueltas externas (córtez, exosporio), concentración de minerales y agua del cloroplasto (más deshidratadas en las más termorresistentes) y la retracción del mismo, la temperatura de esporulación (a mayor temperatura de esporulación, mayor termorresistencia), temperatura óptima de

crecimiento (los termófilos más termorresistentes que los mesófilos y éstos, más que los psicrotrofos). Se ha observado que ciertas sustancias presentes en las esporas, proteínas ácido solubles (SASP) de pequeño tamaño molecular, contribuyen en la termorresistencia de éstas, previniendo la eliminación del DNA [172].

Estas características de las formas esporuladas explican las razones de la aparición a menudo de los “hombros” en el inicio de las curvas de supervivencia. Algunos autores interpretan estos “hombros” como el resultado de dos reacciones consecutivas de primer orden, rotura del exosporio e inactivación de la célula desprotegida [181], aunque también dependerá del estado fisiológico en el cual éstas se encuentren. Al estar éstas inactivadas, en estado latente o silente, sin poder germinar, el tratamiento térmico, en sus primeras fases, producirá dos fenómenos opuestos: la activación de las formas silentes y posterior inactivación [182]. También se ha encontrado explicación a este fenómeno en la reparación del daño térmico [183].

Por último, dentro de los mecanismos de termorresistencia de los microorganismos, cabe destacar, que éstos no solo presentan mecanismos que les permite resistir y reparar los efectos del calor, sino que además pueden adaptarse a temperaturas subletales, por encima de la máxima de crecimiento, adquiriendo cierto grado de protección frente a un posterior tratamiento térmico más intenso. Existe una relación entre la síntesis de proteínas de estrés térmico y el desarrollo de termotolerancia. Estas proteínas, y otras relacionadas, están presentes en la célula a temperaturas normales, realizando funciones vitales. Se ha observado que el aumento de la temperatura lleva a una producción acelerada de estas proteínas en un corto intervalo de tiempo [184-187].

Los tratamientos térmicos ocasionan un progresivo descenso del número de viables de una población microbiana, debido a la muerte de un determinado número de microorganismos. Cada cepa microbiana presenta una resistencia característica frente a la acción del calor, esta termorresistencia se ve reflejada en los parámetros cinéticos (valores  $D$  y  $z$ ) ampliamente difundidos en referencias bibliográficas [172].

Para establecer las condiciones adecuadas para un tratamiento de inactivación térmica se asume, de forma general, que todos los microorganismos pertenecientes a una misma población mueren de forma progresiva (logarítmica), siguiendo una cinética de primer orden, que se representa gráficamente mediante el logaritmo en base 10 del número de supervivientes frente al tiempo de tratamiento, del inverso absoluto del valor

de la pendiente de la recta de regresión se calcula el tiempo de reducción decimal (valor  $D$ ), que es el tiempo necesario, a una temperatura dada, para que se inactive el 90% de los microorganismos o presentes, lo que es lo mismo, atravesar un ciclo logarítmico o un orden de magnitud.

El valor  $D$ , para cada microorganismo, es específico de la temperatura de tratamiento y del medio, por lo que es necesario disponer de una fórmula que relacione los valores  $D$  a distintas temperaturas. Esto se consigue representando el logaritmo decimal de los valores  $D$  en función de la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) de tratamiento, obteniéndose la gráfica de termodestrucción de la que deriva el valor  $z$ . Este parámetro se define como la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) que es necesario aumentar o disminuir para que el valor  $D$  disminuya o aumente, respectivamente, 10 veces [152].

Los parámetros cinéticos ( $D$  y  $z$ ) de un microorganismo se ven afectados por una serie de factores. Aunque la termorresistencia en buena parte está genéticamente codificada, la influencia de los factores ambientales no es desdeñable y puede ser incluso mayor que la debida al genotipo [188]; entre estos están:

- Características del medio de calentamiento y de recuperación: En términos generales, la presencia de grasas, carbohidratos, proteínas y otras sustancias provoca un aumento de la termorresistencia de los microorganismos, porque, se supone, se modifica la humedad celular (o agua disponible), así mismo el pH del medio definirán el grado de resistencia de los microorganismos. Por ejemplo, a una  $a_w$  de 1,0 y pH 6,5, el valor  $D_{95}$  es de 2,39 minutos para las esporas de *Bacillus cereus*, mientras que al disminuir la  $a_w$  a 0,86, el valor  $D_{95}$  aumenta hasta 13,84 minutos [172].

Otros compuestos, como las sales, ejercen un efecto variable, dependiendo del tipo de sal, su concentración y su interacción con otros compuestos. Se ha sugerido que las sales disminuyen la actividad de agua y, por tanto, aumentan la termorresistencia por un mecanismo similar al de la deshidratación, mientras que otras sales pueden aumentar la actividad de agua (ej.,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ) y, en consecuencia, aumentar la sensibilidad frente al calor. Por ejemplo, se ha observado que al suplementar el medio de crecimiento con sales de  $\text{CaCl}_2$  aumenta la termorresistencia de las esporas de *Bacillus megaterium* mientras que la adición de L-glutamato disminuye su termorresistencia [172].

La presencia de azúcares en los medios de suspensión ocasiona un aumento de la termorresistencia de los microorganismos contenidos en los mismos. El efecto se debe, al menos en parte, al descenso de la actividad de agua causada por la concentración de los azúcares [172]. Así mismo, se sabe que la presencia de ciertas sustancias inhibitoras, antibióticos termoestables (SO<sub>2</sub>) por ejemplo, provoca una disminución de la termorresistencia [172].

Como se ha mencionado anteriormente, el pH del medio juega un papel importante en la termorresistencia, por lo general, la desnaturalización de las proteínas se ve afectada por el pH del medio de calentamiento, es así como los microorganismos son más termorresistentes al pH óptimo de su crecimiento que es, generalmente, en torno a 7,0. A medida que el pH se desvía (en sentido ascendente o descendente) del óptimo se produce un consistente aumento en la sensibilidad al calor [172, 189].

- Características de los microorganismos: Cuanto mayor es el número de microorganismos, más elevado es el grado de termorresistencia. Se ha sugerido que el mecanismo de protección de una gran población microbiana frente al calor se debe a la formación de sustancias protectoras excretadas por las células [172], sin embargo, esto es algo que no ha sido demostrado.

Así mismo, las células bacterianas tienden a ser más termorresistentes en la fase estacionaria del crecimiento (células “viejas”) y menos durante la fase logarítmica. Se ha informado también que la termorresistencia es más elevada al principio de la latencia y decrece al mínimo a medida que las células pasan a la fase logarítmica. Las esporas bacterianas viejas son más termorresistentes que las jóvenes. El incremento de la termorresistencia de las células microbianas menos activas es indudable pero su mecanismo es complejo y escasamente conocido [172].

Las condiciones por las que han pasado las células (“historia del inóculo”) también influyen en su termorresistencia. Ésta suele ser mayor a medida que aumenta la temperatura de crecimiento y es así, sobre todo, en el caso de las bacterias esporuladas. Aunque el mecanismo íntimo de este efecto no está claro, parece coherente que la selección natural favorezca el crecimiento de las cepas termorresistentes a altas temperaturas. Se ha observado, por ejemplo, que cuando *S. Senftenberg* crece a 44°C es aproximadamente tres veces más termorresistente que

cuando se cultiva a 35°C [172]. Mañas y col. (2003) observaron que al aumentar la temperatura de crecimiento de *S. Typhimurium* de 10 a 37°C, el tiempo de reducción decimal a 58°C aumentaba desde 0,092 a 0,33 minutos [190]. Así mismo se ha observado que la termorresistencia de los microorganismos disminuye como resultado de un almacenamiento a bajas temperaturas previo al tratamiento térmico [152].

### **1.7.2. Irradiación o ionización de alimentos**

La emergencia de nuevas tecnologías se debe a muchos factores. Desde los indudables avances científicos y tecnológicos que las fundamentan hasta el fracaso de las tecnologías más convencionales para resolver ciertos problemas higiénicos como pueda ser la inactivación de microorganismos en huevos enteros. Dentro de este amplio abanico de posibilidades, uno de los más influyentes ha sido la presión social en su demanda de alimentos cada vez más seguros, más nutritivos, más sabrosos y más parecidos a los naturales, sin olvidarnos de los cambios en los hábitos culinarios (consumo de carnes/ pescados crudos, etc.), nuestras nuevas tendencias de consumo (de comidas rápidas, productos precocinados, listos para el consumo, etc.) [191].

En este contexto, la irradiación de alimentos ha sido uno de los tratamientos más estudiados y evaluados precisamente por la controversia que le acompaña. Los resultados obtenidos en múltiples investigaciones, realizadas en distintas condiciones y países, indican que el consumo de alimentos irradiados carece de efectos nocivos siempre que este tratamiento se realice dentro de ciertos límites y en condiciones controladas. Si los niveles de energía de la fuente radiactiva son elevados podría presentarse un fenómeno de radiactividad inducida por el cual ciertos componentes del alimento se convertirían en radiactivos. Por ello el Comité Mixto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), expertos en irradiación en alimentos, basándose en estimaciones teóricas y estudios experimentales, acordó en 1980 autorizar como fuentes de radiación, para el tratamiento de alimentos, aquellas cuyos niveles de energía se encuentren muy por debajo de los que pueden inducir radiactividad, garantizando así que los alimentos tratados serán, en este aspecto, seguros [192].

La siguiente tabla recoge las fuentes de irradiación recomendadas y las características de las mismas.

**Tabla 4.** Fuentes de irradiación recomendadas para el tratamiento de alimentos por el Comité de Expertos de la FAO/OIEA/OMS y por la Comisión del Codex Alimentarius

Fuente	Energía (MeV)
Rayos gamma de radionúclidos	
-cesio 137	1,25
-cobalto 60	0,66
Rayos X generados en aceleradores de electrones	≤ 5
Electrones generados en aceleradores (rayos beta)	≤ 10

eV =  $1,6 \times 10^{-19}$  Julios

En el contexto de esta Tesis se ha trabajado con radiaciones ionizantes  $\beta$ , en la empresa Ionisos Ibérica (Tarancón, Cuenca) que posee un rhodotron (acelerador de electrones).

Las radiaciones ionizantes surgieron como una alternativa a la aplicación de agentes químicos cuando éstos son inadecuados para la desinfección de determinados alimentos o para evitar el efecto deletéreo de agentes físicos, como el calor, que pueden deteriorar las propiedades funcionales de los alimentos. Específicamente la ionización por electrones acelerados presentan ventajas tales como [193]:

- Se genera mediante energía eléctrica.
- Es un proceso rápido (instantáneo), fiable y repetitivo.
- Sin fuentes ni residuos radioactivos.
- Sin necesidad de recargas o gestiones del combustible.
- Consumo relativamente bajo.
- Flexibilidad y precisión en la aplicación de la dosis.
- No produce un aumento significativo de temperatura durante su aplicación.
- Inactiva un gran número de microorganismos, insectos, y parásitos.
- No deja residuos. Medioambientalmente amigable.
- No afecta significativamente a las características físicas del alimento.
- Seguridad intrínseca: es una máquina que se conecta y se apaga a voluntad.

Pese a todas estas ventajas, sigue existiendo una gran polémica sobre la irradiación de alimentos, tanto en el ámbito científico como en el social, con un manifiesto rechazo por parte de los consumidores. Sin embargo, su uso se ha implantado en varios países, EEUU entre ellos. En la comunidad europea, la irradiación de alimentos está regulada por las Directivas 1999/2/CE, que establece las leyes de manufactura, comercio e importación de alimentos e ingredientes de alimentos tratados con ionización entre los estados miembros [194], y la 1999/3/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999, que establece una lista de alimentos que pueden ser tratados con radiaciones ionizantes y los países en los que están permitidos [195]. El español Real Decreto 348/2001, de 4 de abril, regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes, y limita su utilización a hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales, con una aplicación máxima de 10 kGy [196]. A través del Diario Oficial de la UE 2012/C 20/6, algunos países como Holanda y Portugal, han ampliado la utilización de las radiaciones ionizantes a otros productos, siendo, por ejemplo, permitida en setas, cebollas, patatas, carnes de corral y ovoproductos [197]. De todas maneras, la irradiación de alimentos es todavía insignificante en la UE. El último informe de la Comisión Europea (COM 2012) sobre alimentos irradiados reveló que en el año 2010 se irradiaron 9263,4 toneladas de alimentos en la Unión Europea [198].

Finalmente, la Organización Internacional de Normalización (ISO), ha publicado una norma de calidad y gestión continua de calidad (ISO 14470:2011), en la que se detallan los requerimientos para el desarrollo, validación y rutina de control de los procesos de ionización para el tratamiento de alimentos [199].

El fundamento científico de las aplicaciones industriales de los aceleradores de electrones radica en la interacción de los electrones acelerados con la materia. Esta aceleración hace que los electrones adquieran una energía cinética tal que al chocar contra una superficie provoca una serie de reacciones, excitando y arrancando algunos electrones (ionización) propios de los átomos del alimento. El átomo ionizado o excitado pierde su estabilidad por la ausencia de electrones que ocupaban sus orbitales, se torna muy reactivo químicamente y trata de reaccionar rápidamente con los átomos circundantes [193], lo que se conoce como efecto primario. Como consecuencia de la excitación molecular aparecen nuevos iones y radicales libres, que dan lugar a recombinaciones y dimerizaciones de las que resultan sustancias ajenas a la composición inicial del producto,

lo que constituye el efecto secundario de la irradiación. Este último efecto se prolonga en el alimento, con formación y desaparición de compuestos, hasta el establecimiento de productos estables. Al conjunto de estos fenómenos se les denomina radiolisis, cuya intensidad depende de la composición del alimento tratado, de las condiciones de procesado y de la dosis de irradiación absorbida, siendo ésta la cantidad de energía absorbida por unidad de masa, expresada en gray (1 Gray = 1Julio/kg) [192].

Cabe destacar el papel del contenido acuoso de los alimentos, al ser irradiados, se originan diversos radicales libres, con carácter oxidante o reductor, con elevada capacidad de reacción. Aunque algunos de estos radicales se pierden al formarse de nuevo moléculas de agua, la mayoría de ellos intervienen de forma decisiva en la radiolisis. Su efecto es aún mayor en presencia de oxígeno (O<sub>2</sub>), al formarse peróxido y superperóxidos de gran actividad. En conjunto, la presencia de estos radicales va a condicionar las reacciones de oxidación y de reducción, provocando un desequilibrio en los procesos de óxido-reducción enzimática y, en consecuencia, la desestabilización metabólica.

La sensibilidad de una molécula a la irradiación es directamente proporcional a su masa molecular. Esto explica que la irradiación a dosis bajas sea válida para prolongar la vida útil de los alimentos. Tratamientos de esta naturaleza pueden causar la destrucción de agentes vivos presentes en los alimentos (insectos y parásitos fundamentalmente y algunos microorganismos) o ralentizar los procesos fisiológicos de algunos vegetales (maduración, crecimiento de brotes y raíces), sin apenas modificar las características organolépticas y el valor nutritivo derivado de su composición en proteínas, lípidos y carbohidratos.

En el caso de los microorganismos, se produce una degradación química del ADN y del ARN durante la ionización debido a la ruptura de enlaces químicos por la formación de iones y radicales libres, lo que desestabiliza a estas moléculas, alterándose la síntesis proteica. Por otra parte, también pueden afectarse las membranas celulares por los mismos motivos y como resultado global, los microorganismos mueren o, al menos, sufren daños que podrán repararse o no, dependiendo de muchos factores, tanto intrínsecos como extrínsecos al microorganismo [200].

El grado de radioresistencia de los microorganismos suele representarse por el valor  $D_{10}$ , o dosis de irradiación necesaria, en kGy, para reducir en un 90% el número de viables [201], y se calcula de forma similar al valor  $D$  térmico descrito anteriormente. De

forma genérica, se puede decir que las bacterias esporuladas son mucho más radorresistentes que las formas vegetativas. Dentro de éstas últimas, las bacterias Gran positivas son más radorresistentes que las bacterias Gran negativas. La radioresistencia de los microorganismos, es un patrón perfectamente conocido por la termobacteriología, de todas maneras, debe considerarse que el grado de sensibilidad de los microorganismos presentes en los alimentos dependerá además del tipo de microorganismo de otros factores, como su estado fisiológico, la dosis recibida, temperatura, O<sub>2</sub>, pH, a<sub>w</sub>, composición del alimento, etc. [172].

El desarrollo de los modelos de inactivación térmica fue una de las primeras aplicaciones de la microbiología predictiva. Sin embargo, su área de aplicación se ha abierto a otras tecnologías, incluyendo las no térmicas como los pulsos de luz, altas presiones, irradiación, etc., y al uso de conservantes de origen químico [75].

El concepto de valor *D* es bien conocido y constituye uno de los parámetros cinéticos más representativos para estudiar la inactivación microbiana. Este valor *D* se predice con suma facilidad siempre que los tratamientos de inactivación sean lineales; es decir, la reducción de unidades logarítmicas de microorganismos viables en función del tiempo es lineal y puede ajustarse a una ecuación de dos incógnitas (logaritmo de viables y tiempo) de primer grado. Sin embargo, su interpretación es más dificultosa en curvas o tratamientos de inactivación no lineales, como por ejemplo la inactivación química [75]. Por ello se han descrito varios modelos de inactivación que intentan representar procesos de inactivación no lineales. El software GINaFit [202], disponible gratuitamente en Internet: <<http://www.kuleuven.ac.be/cit/biotec>>, constituye una herramienta muy útil a la hora de elaborar tales modelos.

La mayor parte de los modelos de inactivación desarrollados hasta presente son de tipo primario, es decir, se limitan a describir la curva de inactivación. Son pocos los modelos secundarios generados hasta el momento. Uno de ellos, el de Buchanan y col. (1997), propone una ecuación polinomial que predice la inactivación no-térmica de *L. monocytogenes* en función de la temperatura, pH, concentración de sal, nitrito sódico y concentración de ácido láctico [203].

## 1.8. Crecimiento microbiano

En microbiología, la palabra “crecimiento” se define como el incremento del número de células o de masa celular por unidad de tiempo de una población microbiana [204].

El crecimiento se traduce en un aumento del número de células al multiplicarse bien por gemación, bien por fisión binaria. En este caso, las células individuales en primer lugar se agrandan y después se dividen formándose dos células hijas de un tamaño aproximadamente igual [205].

La microbiología predictiva está relacionada con la compleja dinámica del comportamiento de la población microbiana, tal como fue observado por Monod (1949): *“El crecimiento de los cultivos bacterianos, a pesar de la inmensa complejidad del fenómeno, generalmente obedece a leyes relativamente sencillas, las cuales hacen posible definir ciertas características cuantitativas del ciclo del crecimiento, esencialmente las tres constantes del crecimiento: crecimiento total, tasa del crecimiento exponencial y crecimiento latente. Estas definiciones no son puramente arbitrarias y corresponden a elementos fisiológicamente distintos del ciclo de crecimiento”* [155].

La curva típica de crecimiento de un microorganismo (Figura 3) es de tipo sigmoidea [38] y se caracteriza por tres fases más la fase de descenso o muerte microbiana (no representada en la figura). La representación gráfica del logaritmo natural del número de bacterias en función del tiempo permite verlas nítidamente. Al principio no se observa cambio alguno en el número de microorganismos, después comienza el crecimiento exponencial y, finalmente, su número permanece en valores constantes. Son las fases de latencia, exponencial y estacionaria, respectivamente. Cabe mencionar que durante la fase estacionaria se produce un agotamiento de los nutrientes disponibles y una acumulación de productos tóxicos del metabolismo microbiano, ambos producen una disminución de la velocidad del crecimiento hasta que finalmente las células mueren de forma exponencial descendente lineal [205]. A lo largo de esta Tesis doctoral se hablará solo de las fases de latencia y crecimiento exponencial.

Los parámetros que caracterizan estas curvas y el crecimiento microbiano son:

- Inóculo inicial ( $X_0$ ), que se corresponde con la concentración inicial del inóculo, expresado en ufc/ml o g.

- Concentración microbiana final o máxima ( $X_{max}$ ), que representa la densidad máxima que puede alcanzar una población bajo unas determinadas condiciones.

- Tiempo de adaptación o fase de latencia ( $\lambda$ ), que es el tiempo que tarda una población microbiana, o una célula, en iniciar la multiplicación.

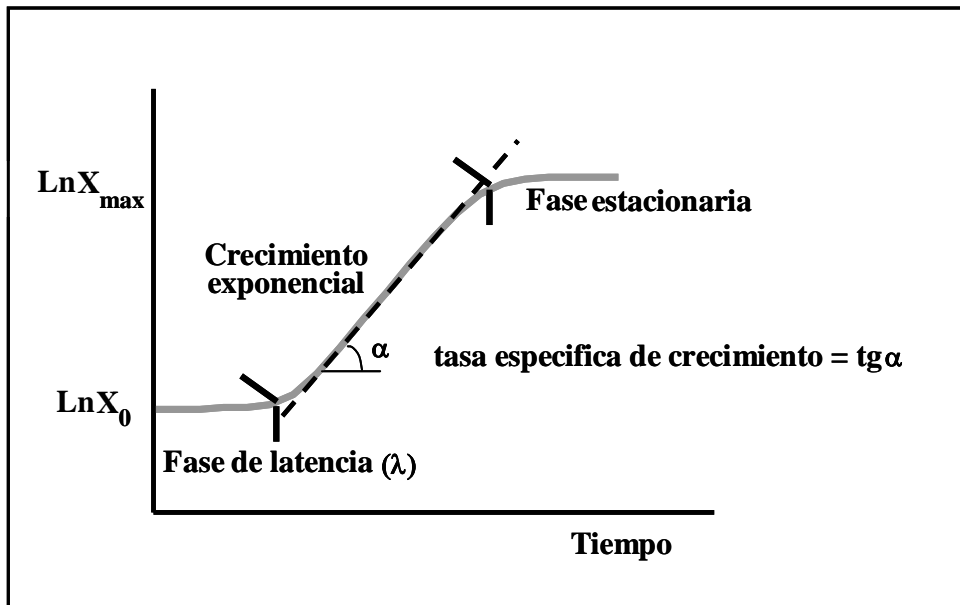
- Tasa de crecimiento ( $\mu$ ), que es velocidad de crecimiento microbiano por unidad de tiempo, se suele representar por unidades de concentración/tiempo, su valor es la tangente del ángulo formado por el eje de las  $x$  y la recta imaginaria que coincide con la porción “recta” de la curva de crecimiento. En realidad, esto es una aproximación a la realidad. Acaba de decirse que el crecimiento microbiano sigue una “curva” sigmoidea, por lo que en *sensu stricto*, en realidad, la  $\mu$  va variando en cada momento y, si las técnicas de recuento fueran lo suficientemente precisas, podría comprobarse experimentalmente la evolución de tal tasa. Tras la fase de latencia, la tasa iría aumentando poco a poco y cada vez más, hasta llegar a un máximo, que coincide con el punto de inflexión de la curva. Después, la  $\mu$  iría disminuyendo paulatinamente hasta llegar a la fase estacionaria, en la que, prácticamente, se hace cero. Cuando la  $\mu$  se hace máxima, se denomina “tasa máxima específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ )”, la cual se calcula en logaritmo neperiano. Este es el valor que maneja el modelo primario de Baranyi y Roberts [23]. No confundir con “la tasa máxima de crecimiento” que es calculada en logaritmo decimal.

Matemáticamente,  $\mu$  puede calcularse con facilidad:

$$\mu = (\ln X - \ln X_0) / (TX - \lambda) \quad (13)$$

donde  $X$  es la concentración microbiana en un momento determinado del crecimiento exponencial y  $TX$  el tiempo transcurrido desde la inoculación hasta el momento del recuento cuyo resultado es  $X$ . De la ecuación anterior puede despejarse  $\lambda$  y calcularse, siempre que previamente se conozca  $\mu$ , ya que este parámetro suele considerarse constante, siempre que las condiciones de crecimiento sean las mismas. Por consiguiente, se asume que  $\mu$  depende de las características genéticas del microorganismo y de las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio) [204]. Por consiguiente, se ha asumido durante mucho tiempo que las condiciones por las que pasaba un

microorganismo no afectaban a la  $\mu$ . No obstante se ha observado que la  $\mu$  de bacterias que se mantienen viables tras tratamientos con electrones acelerados era menor que la de bacterias sin tratar [206]. Además, la deceleración en la velocidad de crecimiento era proporcional a la intensidad de irradiación aplicada [207].



**Figura 3.** Curva típica de crecimiento microbiano.

Se asume que la fase de latencia es el tiempo que tarda una población microbiana, o una célula, en iniciar la multiplicación. En realidad se considera que la fase de latencia es un tiempo de adaptación a las condiciones imperantes para que pueda producirse el desarrollo [54]. Por tanto, durante la fase de latencia las células se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas, iniciando la replicación de su material genético, y, en el caso de las esporas, diferenciándose en células vegetativas [208].

Debido a que el crecimiento de patógenos en los productos alimenticios no es aceptable, de encontrarse alguno en un alimento, un mal menor sería que su fase de latencia fuera infinita, es decir, las condiciones impiden el crecimiento, pero si éstas no representan tal barrera al desarrollo microbiano, al menos será muy conveniente conocer la fase de latencia con exactitud [32], y la velocidad de crecimiento del patógeno para predecir, siempre que se sepa su carga inicial, cuando puede alcanzarse la dosis infectiva.

La línea divisoria entre el crecimiento y el no crecimiento representa un límite en el cual la tasa de crecimiento es cero y la fase de latencia infinita. Probablemente, y más que cualquier otro factor, la determinación precisa de la fase de latencia ha creado problemas a los microbiólogos predictivos. Incluso ha sido ignorada en muchas aplicaciones prácticas de modelos predictivos, por ejemplo en la evaluación de la higiene de las operaciones del procesado de la carne [209]. La dificultad radica principalmente en que las células que contaminan un alimento pueden encontrarse en estados fisiológicos diferentes, por lo que el tiempo que tardan en alcanzar el nivel de capacidad fisiológica de división puede ser muy diferente y difícil de predecir. Hay diversos estados de latencia. La fase de latencia de las células que no tienen daños suele asimilarse a una fase de latencia fisiológica, que será siempre más corta que la latencia de aquéllas que los han sufrido. Lógicamente, cuanto más daños, más reparaciones son necesarias y la fase de latencia se alargará proporcionalmente a tales daños. También deben considerarse las células viables, no cultivables, que por el motivo que sea, no han podido llegar a repararse o no pueden multiplicarse en las condiciones en que se encuentren, pero, si éstas mejoran, podrían hacerlo. Por otra parte pueden surgir complicaciones de modelado cuando las fluctuaciones en las condiciones ambientales sean de la suficiente magnitud y rapidez como para inducir a una población que ya ha superado su fase de latencia para empezar otra vez uno de los estados latentes citados anteriormente [210].

El hecho de que la fase de latencia sea el tiempo que el microorganismo tarda en iniciar la multiplicación implica que puede subdividirse en dos subfases [42]:

$$\lambda = t_a + t_m \quad (14)$$

donde  $t_a$  es el tiempo de adaptación y  $t_m$  el tiempo de multiplicación. El  $t_a$  sería el tiempo que tarda la célula en estar en disposición de multiplicarse, en estar capacitada para dividirse, mientras que  $t_m$  sería el tiempo que tarda la célula en multiplicarse. Este último valor viene a coincidir, más o menos, con el tiempo que tarda el microorganismo en dividirse durante fase exponencial, o tiempo de duplicación, aunque no de una forma exacta, ya que está demostrado que el tiempo de duplicación de una célula no es constante [123], sino estocástico. Así, una célula madre tras pasar su  $t_a$ , se divide en dos hijas en un tiempo X, cada una de las hijas se dividirán en tiempos Y y Z, las hijas de éstas en otros tiempos diferentes. No hay una constancia en el tiempo de división de cada célula [211]. No obstante, para poder estudiar la curva de crecimiento de un microorganismo y poder

cuantificar su velocidad de crecimiento, se introdujo el término tiempo de generación ( $g$ ), que es el tiempo que tarda una población en duplicarse. Este valor, en realidad, es la media de todos los tiempos de duplicación de las células de una población y se considera constante cuando las condiciones ambientales, de nutrientes, etc. son constantes. Ya se ha dicho más arriba que la curva de crecimiento de una bacteria sigue un comportamiento sigmoideo, sin un tramo recto propiamente dicho, pero para poder simplificar los cálculos y facilitar la cuantificación de la velocidad de multiplicación, se asume que existe una relación lineal entre el logaritmo del número de células (o cualquier otra propiedad cuantificable de la población) y el tiempo. Es decir, reproduciendo las condiciones ambientales en que se encuentra una población puede obtenerse la misma tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el mismo tiempo de generación ( $g$ ), ya que estos dos parámetros están relacionados. Sea una población de  $N$  ufc en el tiempo  $T$ . En el momento ( $T_2$ ) en que dicha población ha duplicado su número, habrán  $2N$  ufc, y de acuerdo con la ecuación (13):

$$\mu = (\ln 2N - \ln N) / (T_2 - T) \quad (15)$$

$T_2 - T$  es el tiempo que ha tardado la población en duplicar su número, es decir, el tiempo de generación ( $g$ ). Simplificando, la expresión anterior queda:

$$\mu = (\ln 2) / g \quad (16)$$

y de aquí, puede despejarse  $g$ :

$$g = 0'693 / \mu \quad (17)$$

Por tanto, conociendo  $\mu$ , y por ende, el tiempo de multiplicación ( $t_m$ ) podría calcularse el tiempo de adaptación ( $t_a$ ) aunque, recuérdese, que este  $t_a$  no es de cada célula que forma la población, sino un valor medio de todos los  $t_a$  de las células que forman la población. Pero más importante, quizás, que su cálculo, es entender que, en realidad, la fase de latencia depende fundamentalmente de este  $t_a$  porque el  $t_m$  se considera constante para unas determinadas condiciones ambientales y un microorganismo en concreto y se sabe que, en cambio, la fase de latencia no es en absoluto constante [212-214], por lo que es obvio que las diferencias observadas en la fase de latencia de una población van a ser función, sobre todo, del  $t_a$ . Así, cualquiera que esté interesado en la fase de latencia y qué factores influyen en ella, están interesados, en realidad, en los factores que afectan a  $t_a$ , que, desde luego, son muy variados.

La duración de la fase de latencia se ve afectada, entre otros factores, por la identidad y el fenotipo de la bacteria [215], el tamaño del inóculo [23, 216-219], la historia fisiológica de la población [91], por los cambios en el medio físico-químico, tales como la temperatura [220], el pH y  $a_w$  [221], el historial térmico [222], y la disponibilidad de nutrientes [215]. Algunos se han estudiado ampliamente, como los cambios en las condiciones ambientales [223-226]. Por ejemplo, una bacteria que ha crecido en refrigeración se adapta enseguida a su temperatura de crecimiento óptima, mientras que el mismo salto térmico a la inversa conlleva una fase de latencia mucho más prolongada porque la tasa metabólica celular a la temperatura favorable para el desarrollo es, obviamente, mucho mayor. Todo sucede más deprisa en esas condiciones. La fase de latencia será tanto más larga cuanto más diferentes sean las condiciones en que se desarrolló la bacteria y las que se encuentra al inocularla. Augustin y col. [227], estudiando el crecimiento de *L. monocytogenes* concluyeron que su fase de latencia se prolonga cuando el inóculo ha sido estresado severamente por escasez de nutrientes y el tamaño del inóculo es muy pequeño.

Otro factor muy importante es la posible reparación de daños que tengan que llevar a cabo las bacterias para capacitarse para la multiplicación [228, 229]. Cuanto más dañadas estén las células (por ejemplo, células supervivientes a un tratamiento conservante) más tiempo tardarán en prepararse para el desarrollo. Por tanto, cuanto más disgenésicas sean las condiciones previas: acidificación, deshidratación, inanición, tratamientos térmicos, etc., más dañadas estarán las estructuras celulares y más actividad bioquímica será necesaria para capacitarse para la división [228] (si esto fuera posible). Este último factor puede incluirse dentro de uno más genérico, que sería el estado del inóculo o estado fisiológico [23]. En él influyen todos los sucesos acaecidos a los microorganismos y las condiciones por las que ha pasado hasta que contamina un medio o se le siembra en él.

Whiting y Bagi [230] estudiaron la duración de la fase de latencia de células de *L. monocytogenes* crecidas en diferentes estados fisiológicos y transferidas a diferentes temperaturas: las células que crecían exponencialmente tuvieron fases de latencia más cortas; las células que estaban en la fase estacionaria y las células inoculadas en un medio más pobre en nutrientes tuvieron fases de latencia largas; las células refrigeradas tuvieron fases de latencia ligeramente largas y las células desecadas exhibieron las fases de latencia más largas.

Existen otros factores no tan bien conocidos y, casi seguro, otros aún por descubrir que, todos juntos, controlan la fase de latencia. Dentro de los inciertos, puede citarse el *quorum sensing*, la posibilidad de que exista una comunicación intercelular mediada por una sustancia de tipo autocrino que, liberada por una o varias células, sirva de señal desencadenante de la multiplicación [231, 232].

### **1.8.1. Influencia de los factores ambientales en el crecimiento microbiano**

Los alimentos son ecosistemas complejos. Los ecosistemas están constituidos por el medio ambiente y los organismos que viven en él. El ambiente de un alimento está constituido por factores intrínsecos inherentes al alimento (por ejemplo, pH, actividad de agua y nutrientes) y factores extrínsecos a él (por ejemplo, la temperatura, la composición del aire o gas que lo rodea, o la presencia de otras bacterias) [208].

El crecimiento bacteriano está influido notablemente por la naturaleza química y física de su ambiente. El conocimiento de estas influencias ambientales permite controlar el crecimiento microbiano y estudiar la distribución ecológica de los microorganismos [205].

Numerosos factores afectan el crecimiento de los microorganismos en los alimentos, y, a menudo, sus interacciones tienen un efecto significativo sinérgico o antagónico sobre el crecimiento. Estos efectos interactivos pueden ser muy importantes en los sistemas alimentarios, en los cuales el crecimiento bacteriano puede verse favorecido o inhibido por los múltiples ingredientes que los componen, condiciones de almacenamiento, etc. [233].

De entre los varios factores ambientales que pueden tener influencia sobre el crecimiento bacteriano podemos destacar los siguientes: la temperatura, el pH, los solutos y la actividad de agua, la concentración de O<sub>2</sub> y tratamientos conservantes. En muchos sistemas alimentarios, la temperatura, la actividad de agua y el pH son los factores ambientales claves que controlan el crecimiento bacteriano. Las respuestas de las bacterias a estos factores son altamente reproducibles, permitiendo que tales respuestas puedan cuantificarse en forma de modelos matemáticos [91, 234], que predicen el comportamiento microbiano.

### 1.8.1.1. Temperatura

El control de la temperatura se encuentra entre los factores más críticos precisos para el logro de un suministro de alimentos que reúna las propiedades sanitarias y organolépticas correctas. Probablemente sea la temperatura el más importante de los factores ambientales que afectan a la viabilidad y desarrollo microbianos [235]. El factor que más influye en el efecto de la temperatura en el crecimiento es la sensibilidad de las reacciones catalizadas por enzimas. En condiciones de temperaturas bajas, un aumento eleva la velocidad de crecimiento, porque la velocidad de una reacción catalizada por enzimas, como cualquier reacción química, casi se duplica por cada incremento de 10 °C. Como la velocidad de cada reacción aumenta, el metabolismo en general es más activo a temperaturas altas, hasta alcanzar la temperatura óptima de crecimiento, es decir, en la que el microorganismo crece más rápidamente. A partir de ese punto, el incremento de la temperatura provoca una disminución de la tasa de crecimiento y si se sigue incrementando la temperatura, se alcanzarán unas que impiden el crecimiento, provocando la inactivación de los microorganismos y su muerte [208].

Todos los microorganismos tienen una temperatura mínima por debajo de la cual no se produce un crecimiento prolongado, así como una temperatura óptima en la cual el crecimiento es el más rápido, y una temperatura máxima, por encima de la cual el crecimiento no es posible. Estas tres temperaturas son a menudo llamadas temperaturas cardinales, y son, generalmente, características de cada organismo, a pesar de que no son completamente fijas, ya que pueden cambiar ligeramente por efecto de otros factores ambientales, particularmente la composición del medio de crecimiento [204].

Durante el crecimiento en ambientes fríos son importantes muchas capacidades metabólicas. La adaptación “homeoviscosa” permite a las células mantener la fluidez de sus membranas a bajas temperaturas. Se ha comprobado que conforme la temperatura disminuye, la célula sintetiza cantidades crecientes de ácidos grasos mono y di-insaturados [236, 237].

La temperatura de crecimiento también puede influir sobre la sensibilidad de la célula al calor. Las células de *L. monocytogenes* precultivadas a 48 °C poseen una mayor resistencia térmica que aquellas que han sido precultivadas a temperaturas menores [208].

### 1.8.1.2. Actividad de agua ( $a_w$ )

La  $a_w$  de un alimento o solución se define como la relación entre la presión de vapor del agua del alimento ( $P_{sol}$ ) y la del agua pura ( $P_{agua}$ ) a la misma temperatura. La  $a_w$  es un parámetro ligado a la humedad del alimento, que permite determinar su capacidad de conservación, de propagación microbiana, etc. La  $a_w$  de un alimento se puede reducir aumentando la concentración de solutos en la fase acuosa de los alimentos mediante la extracción del agua o mediante la adición de nuevos solutos. Este parámetro, junto con la temperatura, el pH y el  $O_2$ , es el factor que más influye en la estabilidad de los productos alimenticios. La  $a_w$  de una solución o un sólido puede establecerse aislando la muestra en una cámara y midiendo la humedad relativa después de que el sistema haya alcanzado el equilibrio [205].

La mayoría de los microorganismos, incluyendo las bacterias patógenas, crecen más rápidamente a niveles de  $a_w$  de 0,995 – 0,980. La  $a_w$  de la mayoría de los medios de cultivo utilizados en el laboratorio es de 0,999 – 0,990. A valores de  $a_w$  inferiores a éstos, la velocidad de crecimiento y la población estacionaria o la masa celular final disminuyen, y la fase de latencia aumenta. A una  $a_w$  suficientemente baja, un valor difícil de establecer con precisión, la fase de latencia se hace infinita, es decir, el crecimiento cesa [235].

Los microorganismos tienen que realizar un esfuerzo adicional para crecer en un hábitat con un valor de  $a_w$  bajo porque deben mantener una elevada concentración interna de solutos para retener agua. Este tipo de microorganismos se denominan osmotolerantes. Pueden crecer en un amplio intervalo de  $a_w$  o de concentraciones osmóticas. Los microorganismos halófilos se han adaptado tan bien a las condiciones salinas que necesitan niveles elevados de cloruro sódico para crecer. En concreto se aíslan bacterias del género *Halobacterium* en el Mar Muerto. Estas bacterias han modificado sustancialmente la estructura de sus proteínas y membranas, acumulando en el interior grandes cantidades de potasio y otros solutos para mantener hipertónico su citoplasma [205].

A muchos alimentos se les proporciona estabilidad, desde el punto de vista microbiológico, eliminando agua (deshidratación) o mediante la adición de solutos hasta alcanzar un valor bajo de  $a_w$ . La sal y el azúcar son los solutos que habitualmente se añaden a los alimentos para reducir la  $a_w$  [235].

La osmorregulación se ha estudiado considerablemente en las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. La adaptación de estas bacterias a concentraciones altas de solutos extracelulares generalmente se acompaña de la acumulación intracelular de iones de potasio y compuestos orgánicos como aminoácidos, compuestos amonio cuaternarios e hidratos de carbono (trehalosa) [238].

Por último cabe destacar que muchos hongos son osmotolerantes y, por ello, son los principales microorganismos implicados en la alteración de alimentos salados y deshidratados [205].

### 1.8.1.3. pH

El pH es una medida de la actividad de los iones de hidrógeno de una solución que se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno (expresada en moles). Es decir,  $\text{pH} = 2$  indica que la concentración de hidrogeniones es 0,01 M. Así, el vinagre (con un pH aproximado de 2) y el amoníaco doméstico (con un pH aproximado de 11) tienen una diferencia de concentración de iones de hidrógeno aproximada a un billón de veces.

Cada especie tiene un intervalo definido de pH que le permite crecer y un pH óptimo de crecimiento. Aunque los microorganismos crecen a menudo en medios en un amplio intervalo de pHs, su tolerancia tiene un límite. Variaciones intensas en el pH pueden dañar a los microorganismos alterando su membrana plasmática o inhibiendo la actividad de las enzimas y proteínas transportadoras. Los cambios en el pH externo pueden modificar también la ionización de las moléculas de nutrientes, disminuyendo, por ello, su disponibilidad para el organismo [205].

La mayoría de los ambientes naturales tienen valores de pH entre 5 y 9, y son más comunes los microorganismos con un pH óptimo situado dentro de estos valores.

Pocas especies pueden crecer en medios con valores de pH inferiores a 2 (acidófilos) o superiores a 10 (alcalinófilos). Los hongos son un grupo que tienden a ser más acidotolerante que las bacterias. Entre las bacterias acidófilas están las especies del género *Thiobacillus*. Muy pocos microorganismos son alcalinófilos. Estas bacterias normalmente se encuentran en hábitats altamente básicos como lagos con carbonatos o suelos altamente carbonatados. Entre estos microorganismos están incluidas algunas especies del género *Bacillus*. Salvo esas excepciones y algunas otras, la mayoría de los

microorganismos tienen un pH óptimo de crecimiento situado entre 6 y 8. Son considerados neutrófilos [204].

Los procesos de elaboración de alimentos que conllevan la liberación de ácidos orgánicos como, por ejemplo, la fermentación, se utilizan asiduamente como mecanismos de prevención del crecimiento microbiano y para garantizar la seguridad alimentaria. Es bien sabido que hay especies y cepas más resistentes a la acidez y más sensibles. Es evidente la importancia de comprender las respuestas de los microorganismos al pH, y así determinar lo más correctamente posible los riesgos que puedan entrañar diferentes alimentos y la serie de condiciones del medio necesarias para reducir o controlar su crecimiento [239].

A menudo los microorganismos tienen que adaptarse a cambios ambientales de pH para poder sobrevivir. En las bacterias, los sistemas de transporte de sodio y de potasio posiblemente corrigen pequeñas variaciones de pH. Si el pH se vuelve demasiado ácido, se ponen en marcha otros mecanismos. Cuando el pH baja hasta valores de 5,5 a 6,0, se ha observado en algunos microorganismos, como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, la síntesis de un grupo de proteínas nuevas como parte de la denominada repuesta de tolerancia al medio ácido. La ATPasa translocadora de proteínas contribuye a esta respuesta protectora, produciendo más ATP o bombeando protones fuera de la célula. Si el pH externo disminuye a valores de 4,5 o inferiores, se sintetizan proteínas de respuesta al shock ácido. Probablemente, estas sustancias eviten la desnaturalización de las proteínas y faciliten de nuevo el plegamiento de las desnaturalizadas [205].

#### **1.8.1.4. Otros factores ambientales**

Además de la temperatura, el pH y la  $a_w$ , existen otros factores ambientales que influyen en el crecimiento microbiano. La concentración de ciertos gases en el entorno del microorganismo es de gran relevancia. Los microorganismos se clasifican en aerobios, los que necesitan  $O_2$  para su crecimiento, y anaerobios, los que crecen en ausencia de él. Estos últimos pueden ser anaerobios facultativos, cuando no necesitan el  $O_2$  para crecer, pero lo hacen mejor en su presencia, anaerobios aerotolerantes, los que pueden crecer bien tanto en presencia como en ausencia de  $O_2$ , anaerobios estrictos u obligados, los que no toleran en absoluto el  $O_2$ , y microaerófilos, los que precisan para su crecimiento niveles de  $O_2$  del orden del 2 al 10 % [205].

Debe tenerse presente que los microorganismos patógenos pueden desarrollarse en productos envasados a vacío y en atmósferas modificadas (MAP) conteniendo cualquier tipo de combinación de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>, a temperaturas de refrigeración, aunque pueden precisar un tiempo prolongado para que se aprecie su crecimiento y alcancen niveles peligrosos [240].

Sin embargo, las MAPs constituyen una buena alternativa para la prolongación de la vida media del alimento, manteniendo sus cualidades y apariencia originales, y disminuyendo la velocidad de crecimiento de los microorganismos que pudieren alterar el alimento [75].

La proporción que tenga cada gas en un producto depende de las características de cada alimento, por ejemplo, las carnes rojas necesitan una elevada concentración de O<sub>2</sub> para que la mioglobina esté oxigenada y el producto tenga un atractivo tono rojo brillante. En cambio, una concentración elevada de ese mismo gas podría provocar el enranciamiento de un pescado graso [240].

Considerando las diferentes atmósferas recomendables en cada caso y la considerable cantidad de variables que afectan al desarrollo microbiano, la única forma racional de investigar el efecto del envasado en atmósferas modificadas en los microorganismos patógenos es mediante creación de modelos que tengan en cuenta las variables de mayor relevancia en la multiplicación y supervivencia de la microbiota [240].

Se han desarrollado muchos modelos matemáticos para predecir el crecimiento de microorganismos en función a los factores ambientales, algunos de las publicaciones científicas se muestran en orden cronológico en la Tabla 5.

Quiero destacar el software Dmfit 2.1, desarrollado por József Baranyi y su equipo del Institute of Food Research (Norwich Research Park, Norwich NR4 7UA, UK) porque es el que se ha sido utilizado en esta tesis para ajustar algunas de las curvas de crecimiento. Puede disponerse de él gratuitamente en Internet: <<http://www.ifr.ac.uk/safety/dmfit/>>. Este software integra las funciones descritas por Baranyi y Roberts [23], está adaptado a Microsoft Excel y calcula los parámetros del mejor ajuste de la curva de crecimiento, junto con otros índices estadísticos.

**Tabla 5.** Ejemplos de publicaciones científicas referentes a investigaciones de modelos predictivos del comportamiento microbiano en función de algunos factores ambientales

<b>Autores</b>	<b>Título</b>	<b>Referencia</b>
Zwietering, M., y col., 1991.	<i>Modeling of bacterial growth as a function of temperature.</i>	[241]
Wijtzes, T., y col., 1993.	<i>Modelling bacterial growth of Listeria monocytogenes as a function of water activity, pH and temperature.</i>	[140]
Sutherland, J.P. y Bayliss, A.J., 1994.	<i>Predictive modelling of growth of Yersinia enterocolitica: the effects of temperature, pH and sodium chloride.</i>	[83]
Zaika, L., y col., 1994.	<i>Model for the combined effects of temperature, initial pH, sodium chloride and sodium nitrite concentrations on anaerobic growth of Shigella flexneri</i>	[242]
Ratkowsky, D.A. y Ross, T., 1995.	<i>Modelling the bacterial growth/ no growth interface.</i>	[36]
Presser, K.A., y col., 1997	<i>Modelling the growth rate of Escherichia coli as a function of pH and lactic acid concentration</i>	[239]
Fernandez, P.S., y col., 1997	<i>Predictive model of the effect of CO<sub>2</sub>, pH, temperature and NaCl on the growth of Listeria monocytogenes.</i>	[243]
Buchanan, R.L., y col., 1997.	<i>Response surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the aerobic and anaerobic growth of Staphylococcus aureus 196E</i>	[50]
Le Marc, Y., y col., 2002	<i>Modelling the growth kinetics of Listeria monocytogenes as a function of temperature, pH and organic acid concentration.</i>	[244]
Ross, T., y col., 2003.	<i>Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of Escherichia coli.</i>	[56]
Koutsoumanis, K., y col., 2004.	<i>Modeling the boundaries of growth of Salmonella Typhimurium in broth as a function of temperature, water activity, and pH</i>	[245]
Pin, C., y col., 2004.	<i>Analysis and validation of a predictive model for growth and death of Aeromonas hydrophila under modified atmospheres at refrigeration temperatures.</i>	[246]
Francois, K., y col., 2005.	<i>Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of Listeria monocytogenes.</i>	[247]
Zuliani, V., y col., 2007.	<i>Modelling the behaviour of Listeria monocytogenes in ground pork as a function of pH, water activity, nature and concentration of organic acid salts</i>	[248]
Emborg, J. y Dalgaard, P., 2008.	<i>Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by Morganella psychrotolerans</i>	[249]
Valero, A., y col., 2009.	<i>Modelling the growth boundaries of Staphylococcus aureus: Effect of temperature, pH and water activity</i>	[250]
Guevara, L., y col., 2011.	<i>Comparison of probabilistic and deterministic predictions of time to growth of Listeria monocytogenes as affected by pH and temperature in food</i>	[251]
Antolinos, V., y col., 2012.	<i>Modelling the effects of temperature and osmotic shifts on the growth kinetics of Bacillus weihenstephanensis in broth and food products</i>	[252]

## 1.9. Variabilidad e incertidumbre

Los procesos microbiológicos son más variables de lo que muchos científicos se atreven a considerar. Hace décadas que se demostró que los tiempos de generación de células individuales en una población en crecimiento varían en un amplio rango [117]. Más recientemente se ha observado que las células tratadas previamente pueden cambiar drásticamente la forma de la curva de supervivencia, por ejemplo para *L. monocytogenes* [253]. Incluso pequeñas diferencias en la matriz donde se encuentran los microorganismos pueden provocar cambios cruciales en la curva de supervivencia, ejemplo *Mycobacterium tuberculosis* muere en 15-20 min a 60°C en leche, pero sobrevive a las mismas condiciones en nata [254, 255].

Las células individuales difieren en sus cinéticas, pero cuando se habla de poblaciones, se suele trabajar con las cinéticas medias de todos los individuos que las forman. No existe una curva verdadera de crecimiento o supervivencia por parámetros ajustados, existe un conjunto de datos con parámetros variables que siguen una distribución de probabilidad. Los modelos predictivos que no incluyen la variabilidad en el sistema modelado únicamente proporcionan puntos estimados, como la media, y no son capaces de reproducir el rango completo de las posibles cinéticas [256].

La variabilidad es un componente dependiente del sistema y no puede modificarse a menos que se cambie el sistema en si mismo [256], sin embargo puede cuantificarse y así tener un cierto control del sistema [75]. Por ejemplo, el crecimiento microbiano en un alimento está condicionado por la variabilidad natural de la cepa y la propia del alimento. Si ambas “variables” pueden controlarse exhaustivamente, la variabilidad del desarrollo microbiano quedará más definida, aunque nunca se verá completamente anulada.

La variabilidad lleva asociada una componente de incertidumbre (error en la estimación), que se define como el rango de valores que toma cada factor, que pueden ser potencialmente ciertos, pudiendo ser reducida, por ejemplo, aumentando el número de repeticiones [257]. La incertidumbre suele estar generada por errores experimentales o de ciertos aparatos; en realidad es una medida de la falta de conocimiento (es en sí, un medidor de ignorancia) sobre los parámetros que caracterizan un sistema.

Sir David Cox caracterizó la variabilidad y la incertidumbre como “*La variabilidad es un fenómeno en el mundo físico, que puede medirse, analizarse y explicarse adecuadamente; en contraste, la incertidumbre es un aspecto del conocimiento*” [257].

La variabilidad dentro de una especie microbiana puede deberse a una variabilidad de cepa [258] y/o a la variabilidad celular intrínseca, es decir, como cada célula responde a las condiciones medioambientales [259]. Esta variabilidad intrínseca puede ser un reflejo del estado fisiológico de la célula, el cual es o ha sido afectado por su medio ambiente previo o a las condiciones de estrés sometidas [260]. Es decir, una población microbiana, al igual que cualquier otra población de seres vivos, se compone de individuos más resistentes y de otros más sensibles; esta heterogeneidad puede deberse al genotipo [261], o, en el caso de los clones, a diferencias no genotípicas [262-264].

En el contexto de esta tesis, nos referiremos a variabilidad en términos biológicos, relativos a la variación de la respuesta microbiana de individuos pertenecientes a una población y, supuestamente, clónicos.

El QMRA debe tener en cuenta la variabilidad y la incertidumbre en términos del entorno del alimento y de la respuesta microbiana a ese entorno [265]. Es útil mantener variabilidad e incertidumbre claramente separadas porque, de otro modo, no podrían determinarse. Recuérdese que la incertidumbre está condicionada por el número de datos de los que se dispone; si se tienen más, la incertidumbre suele reducirse, mientras que la variabilidad no disminuirá. Ambos conceptos, variabilidad e incertidumbre, pueden representarse con distribuciones de probabilidad que proporcionan una estructura matemática por propagación durante los cálculos [266] y de esta manera pueden incluirse en los modelos matemáticos predictivos del desarrollo microbiano. Existen dos maneras distintas de incluir la variabilidad y la incertidumbre en los modelos predictivos. En una, la más lógica desde nuestro punto de vista, los parámetros de un modelo determinista pueden remplazarse por distribuciones de probabilidad. Esta aproximación de imponer estructuras probabilistas en los parámetros del modelo, por ejemplo en modelos de las tasas de crecimiento o muerte, conduce a la creación de modelos probabilísticos. La otra alternativa es estocástica, es decir, aleatoria. La diferencia entre las dos es que la probabilística asocia una determinada probabilidad a cada dato, mientras que la estocástica solo predice el dato en sí mismo [256]. Por ejemplo, la fase de latencia de un microorganismo en unas determinadas condiciones fluctúa entre 1 y 5 horas. El modelo estocástico no va más allá de esa predicción. En cambio, el probabilístico asocia una frecuencia a cada posible fase de latencia entre 1 y 5 horas.

Sin embargo, esta variabilidad biológica ha pasado desapercibida para la microbiología predictiva hasta unos años, cuando comenzó a analizarse con detenimiento

el comportamiento de células individualizadas [113, 123, 150, 211, 267-271]. Hoy en día se sabe que no todos los microorganismos, aunque sean de la misma especie, cepa o incluso precedan de la misma célula “madre”, se comportan de igual manera. Unas células son más resistentes que otras, algunas comienzan a multiplicarse antes y otras son más lentas [211]. La heterogeneidad de las células individuales o esporas de una población es la explicación más aceptada cuando se observan colas u hombros en las curvas de inactivación [272, 273] o se aprecia un inesperado incremento en la variabilidad del número de supervivientes a un tratamiento térmico [273-275]. Esta heterogeneidad que hace que unas células sean más resistentes que otras durante, por ejemplo, la aplicación de calor como método de conservación, puede deberse a que las células, en respuesta al cambio de temperatura, sintetizan las llamadas *heat shock proteins* (HSPs), cuya función consiste en estabilizar las estructuras celulares frente a los cambios bruscos de temperatura en el medio o ayudar a la proteólisis o al re-desdoblamiento (*refolding*) de proteínas anormales, desnaturalizadas durante el calentamiento [276]. Cabe destacar la influencia del pH del medio donde se produce el calentamiento en la respuesta y adaptación celular porque la formación de las HSPs, depende del pH [277]. Por otro lado, se ha demostrado que el calor favorece la interacción de componentes de bajo peso molecular y cationes divalentes del medio con componentes de la superficie de las células, resultando en una estabilización de la membrana exterior que conlleva un incremento de la tolerancia frente al calor [278].

La posible heterogeneidad de los parámetros de crecimiento de una población proveniente de una sola célula (una población supuestamente clónica) puede deberse a la diferencia de “edad” de las estructuras celulares, como apuntaron Stewart y col., 2005. Este grupo de investigadores observó que después de la división simétrica, las células hijas heredaban un “polo” o extremo celular de la célula madre 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 [279].

Otra explicación podría ser algún tipo de “*quorum sensing*” (QS), es decir, comunicación intercelular dentro de una población. Se entiende por QS un mecanismo microbiano de comunicación que controla la expresión génica en función de la densidad celular, que puede darse entre la misma especie (*intraspecies*), entre diferentes especies (*interspecies*) y entre bacterias y organismos superiores (*inter-kingdom*) [280]. El proceso de QS se basa en la liberación de una molécula señal extracelular, de bajo peso molecular,

cuya concentración se relaciona con la densidad poblacional del organismo que la produce. La molécula señal llega a las células vecinas y se “censa”, lo que permite que la población comience una acción concertada, una vez que se ha alcanzado una concentración crítica de la señal. De este modo, la población, como un todo, es capaz de modificar su comportamiento como una unidad única [281]. Actualmente se sabe que el QS regula procesos fisiológicos como la bioluminiscencia, la maduración de biofilms, pigmentación, producción de algunos metabolitos secundarios, inducción del proceso de esporulación, producción de exopolisacáridos, producción de factores de virulencia por microorganismos patógenos, motilidad, transferencia de plásmidos conjugativos e inducción de la competencia en bacterias [282]. También hay alguna referencia del posible papel del QS en el inicio de la multiplicación bacteriana. A este respecto, Kaprelyants y Kell [231] propusieron que para poder crecer, los organismos procariotas deben comunicarse entre ellos a través de una señal molecular. Y Mukamolova y col. [283] afirmaron que el comportamiento social de las células es importante para muchos procesos celulares asociados con la multiplicación, diferenciación y supervivencia a los cambios ambientales y muerte. De todas maneras, es difícil asumir un proceso QS cuando se trata de solo unas pocas células, aunque no hay pruebas concluyentes que lo desmientan ni tampoco que lo demuestren. Sin duda es un interesante y prometedor campo de trabajo.

Una respuesta variable del microorganismo suele ser más notoria cuando las condiciones de crecimiento distan mucho de las óptimas o cuando se ha sometido a la población a operaciones que conllevan destrucción o estrés, como las utilizadas en cualquier proceso de conservación de alimentos. Así, por ejemplo, se ha observado un incremento en la variabilidad de la fase de latencia de células individuales tras someterlas a estrés y/o incubarlas en condiciones alejadas de las óptimas [211, 270, 284-286]. Así mismo, se ha observado que los tiempos para la primera división son más largos y más variables entre células individuales de *Escherichia coli* que habían pasado un tiempo prolongado en fase estacionaria antes de la incubación [211].

Una interesante hipótesis relativa a la variabilidad de la fase de latencia de las células radica en la cantidad de trabajo que la célula tiene que hacer para restablecer el estado fisiológico que le permita multiplicarse, así mismo como la velocidad a que dicho trabajo puede llevarse a cabo [214]. Se asume que cada célula tendrá que llevar a cabo un trabajo para alcanzar un estado que la capacite para poder iniciar el crecimiento. Cada

célula puede necesitar una serie de reparaciones de sus estructuras dañadas, activar algún gen, sintetizar enzimas o cualquier otro mecanismo imprescindible para que la multiplicación comience. En suma, cada célula puede necesitar una cantidad de trabajo diferente y, además, cabe la posibilidad de que la velocidad a la que se desarrollen esos trabajos sea también variable de unas células a otras o incluso de unos momentos a otros. Esta hipótesis tiene algún respaldo científico; se ha observado que las células de *Bacillus licheniformis* que tienen un alto pH intracelular empiezan a crecer antes en un medio ácido que aquellas que poseen un pH más ácido. En este caso, y de acuerdo con la hipótesis que acaba de enunciarse, el trabajo necesario para empezar la división celular consistiría en neutralizar el pH [287].

No todos los microorganismos de la misma especie y de la misma población, tanto patógenos como alterantes, responden de igual manera ante situaciones idénticas en los alimentos [288]. Es decir, la variabilidad de las capacidades fisiológicas de los microorganismos hace que no todos actúen homogéneamente en bloque, ante las mismas condiciones. Razón por la cual, la variabilidad de las respuestas microbianas debe influir y considerarse en la predicción de la cinética de los microorganismos. La profundización en el conocimiento de las capacidades fisiológicas microbianas y de su variabilidad puede ayudar a la industria alimentaria en su empeño por ofrecer productos más seguros y de mayor calidad microbiológica, ya que permitirán mejorar los modelos de crecimiento microbiano.



## **II. JUSTIFICACIÓN**

---



## II. JUSTIFICACIÓN

Vivimos en un mundo en el que los avances tecnológicos y científicos nos llevan a cambios sin precedentes, no siendo los microorganismos y sus interacciones con nuestros alimentos y nuestra salud ajenos a ellos. El pequeño tamaño de los microorganismos, su velocidad de crecimiento, plasticidad fenotípica y promiscuidad genética hacen que tengan una gran capacidad de adaptación y, por tanto, pueden beneficiarse de tales cambios [155]. Esta reflexión quizá ayude a comprender por qué aparecen microorganismos patógenos emergentes y reemergentes en los alimentos con cierta periodicidad [289].

Tradicionalmente, la gestión de la calidad y la seguridad alimentaria se ha basado en el control del producto final. Una vez fabricado el alimento, se muestrea, se analiza y se responde a la pregunta: ¿es seguro el producto, o no lo es? Como consecuencia de una mayor incidencia en las últimas décadas de emergencias sanitarias por contaminación de alimentos, tanto química como biológica, ha surgido la necesidad de replantearse la pregunta anterior al tiempo futuro: ¿será seguro el producto, o no lo será? Este replanteamiento implica una predicción, prever si el producto será o no seguro bajo ciertas condiciones y tras un cierto periodo de tiempo. Para responder a dicha pregunta se han desarrollado nuevas herramientas, siendo una de las más importantes, la microbiología predictiva. Los modelos se utilizan para predecir el desarrollo de microorganismos en alimentos y en otros productos mediante funciones matemáticas.

No hay ninguna estrategia que asegure la ausencia total de microorganismos en los alimentos procesados [290], sin embargo se dispone de muchas herramientas para controlarlos. Es esencial pronosticar el crecimiento, la persistencia o la muerte de microorganismos, tanto patógenos como alterantes. En el procesado de los alimentos han de considerarse la seguridad alimentaria y las propiedades sanitarias, nutritivas, y organolépticas de los alimentos. Todas son cruciales y más o menos críticas dependiendo del producto que se trate y suelen estar enfrentadas. Una calidad organoléptica óptima puede conllevar unos riesgos microbiológicos inaceptables o viceversa. Los modelos microbiológicos predictivos pueden y deben optimizar el procesado y permitir alcanzar el compromiso ideal entre calidad nutritiva, sensorial y sanitaria [256].

Las primeras corrientes del modelado microbiano seguían un procedimiento determinístico de la respuesta microbiana, es decir, asignaban valores rígidos, sin considerar posibles fluctuaciones ni hechos biológicos irrefutables. En los últimos años, muchos autores han confirmado la importancia de incluir dentro del modelado, los parámetros de variabilidad e incertidumbre [110, 269, 288, 291-294], lo que se logra a través de modelos en los cuales la respuesta microbiana es considerada como una distribución de valores. Considerar la respuesta microbiana heterogénea o, lo que es lo mismo, variable, permite proporcionar escenarios más realistas, sobre todo de cara a la elaboración de estrategias preventivas en el aseguramiento de la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico.

En esta tesis se plantea como objetivo global el estudio, desde un punto de vista matemático, de la variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los supervivientes a tratamientos conservantes, con el objetivo último de entender mejor la eficacia de los procesos de conservación de los productos alimenticios y contribuir con datos que, quizás, permitan mejorar la precisión de los modelos matemáticos predictivos del crecimiento microbiano, especialmente en lo que respecta a la fase de latencia.

Deben considerarse, por otro lado, los cambios sociales, a veces verdaderas convulsiones, que han disparado la demanda de alimentos cada vez más seguros, más nutritivos, más sabrosos y más parecidos a los naturales, sin olvidarnos de los cambios en los hábitos culinarios (consumo de carnes/ pescados crudos, etc.), las nuevas tendencias de consumo (de comidas rápidas, productos precocinados, listos para el consumo, etc.) [191], que han llevado a una revolución en el área de la producción y elaboración de estos alimentos. En este contexto, las tecnologías emergentes no térmicas, entre ellas la irradiación, están en disposición de satisfacer muchas, en algunos casos todas, de esas demandas.

La irradiación de alimentos ha sido uno de los tratamientos más estudiados y evaluados precisamente por la controversia que le acompaña. Los resultados obtenidos en múltiples investigaciones, realizadas en distintas condiciones y países, indican que la irradiación puede utilizarse para la higienización de los alimentos y que el consumo de alimentos irradiados carece de efectos nocivos, siempre que este tratamiento se realice dentro de ciertos límites y en condiciones controladas. Sin embargo, no se ha estudiado como afecta este proceso en la variabilidad del comportamiento microbiano.

Es de esperar que la carga microbiana de un alimento post proceso esté compuesta por unas muy pocas células provenientes del medio externo (contaminación post proceso) o que han sobrevivido al tratamiento conservante. Estos pocos individuos, si las condiciones se lo permiten, podrán multiplicarse y que alcancen un nivel perjudicial depende del número inicial de células, de su fase de latencia y de la tasa de crecimiento. Muchos investigadores han estudiado el efecto del tamaño del inóculo en la fase de latencia, obteniendo resultados contradictorios. Algunos estudios han sugerido que la fase de latencia no se afecta por el tamaño del inóculo [295-297], mientras que otros se ha demostrado lo contrario [218, 219, 227, 260].

Por ello se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. Establecer las cinéticas de inactivación y crecimiento microbiano tras recibir un tratamiento convencional (calor) y otro no tan común, la irradiación con electrones acelerados.
2. Comparar, desde un punto de vista estadístico, el efecto del calor y el efecto de la irradiación sobre la respuesta microbiana (inactivación y latencia de los supervivientes) y su variabilidad.
3. Analizar la variabilidad de la inactivación microbiana
4. Estudiar el efecto del estado fisiológico de los microorganismos en la inactivación y en la variabilidad de la inactivación.
5. Analizar la variabilidad de la fase de latencia de células individualizadas y pequeñas poblaciones.
6. Modelar el efecto de diferentes factores en la fase de latencia de micropoblaciones y en su variabilidad.



### **III. RESUMEN DEL PROTOCOLO DE TRABAJO**

---



### III. RESUMEN DEL PROTOCOLO DE TRABAJO

#### 3.1. Microorganismos

Se ha trabajado con cinco microorganismos:

- *Listeria innocua* por ser un émulo del patógeno *L. monocytogenes*, ubicuo, contaminante frecuente de los alimentos, psicrotrofo y bastante resistente a una infinidad de condiciones.

- *Salmonella* Enteritidis por ser patógeno y uno de los causantes más frecuentes de brotes alimentarios en nuestro país.

- *Bacillus cereus*, por ser esporulado y, por tanto, tener una considerable capacidad de supervivencia a los tratamientos de conservación industrial, ser un contaminante frecuente de productos tratados térmicamente pero no esterilizados y ser capaz de multiplicarse a temperaturas relativamente bajas.

- *Enterococcus faecalis* por ser ubicuo, muy frecuente en los alimentos y de gran resistencia y, en algunos casos, poder multiplicarse a temperaturas relativamente bajas.

- *Pseudomonas fluorescens* por ser uno de las bacterias que con mayor frecuencia altera los productos frescos debido a la velocidad a la que puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración, incluso sin que se produzcan abusos en la temperatura de almacenamiento.

Las cepas se mantienen congeladas. Su revitalización se realizó mediante 2 pases en caldo soja tripticasa (TSB) a temperatura óptima de crecimiento (dependiendo de la especie) durante 24 horas. Este cultivo se incubó en tubos de centrifugación con 20 ml de TSB durante 24 horas a la misma temperatura, se centrifugó a 12.0000 g durante 15 minutos, obteniéndose un sedimento (microorganismos concentrados). Posteriormente, al sedimento se le agregaron 20 ml de suero fisiológico y la mezcla se homogeneizó, obteniéndose un inóculo de  $10^8$  a  $10^9$  ufc/ml. Esta suspensión sirvió de inóculo de partida.

#### 3.2. Estudio de la variabilidad de la inactivación microbiana

La intención era estudiar la variabilidad de la respuesta microbiana a tratamientos conservantes habituales en la industria alimentaria (tratamientos térmicos) y

relativamente novedosos (irradiación). Previamente hubo que confeccionar curvas de inactivación con los microorganismos anteriormente señalados para poder elegir en cada caso, los tratamientos adecuados. Una vez obraron en nuestro poder las curvas de inactivación se aplicaron tratamientos que reducían la carga microbiana en 0, 1, 2, 3 y/o 4 ciclos logarítmicos a un número elevado de muestras (75 al menos para cada tratamiento; esta elevada cantidad de muestras era necesaria para el análisis matemático de los resultados).

### **3.3. Estudio de la variabilidad de la fase de latencia de microorganismos individualizados que han sobrevivido a operaciones de conservación**

La individualización de los microorganismos requirió un proceso de dilución de las células que sobrevivían a la operación en estudio (es decir, diversos tratamientos térmicos y de irradiación) que dependía de la concentración microbiana inicial y del efecto microbida del tratamiento. Una vez establecidos los tratamientos, las células se sometieron a determinadas condiciones tanto en un medio de cultivo como en un alimento, estéril a ser posible, y contaminado experimentalmente con el microorganismo en estudio. Las muestras con, teóricamente, una única célula se incubaron a una temperatura -de refrigeración más o menos estricta, dependiendo del microorganismo- que permitía el desarrollo de la bacteria en estudio. Si el experimento podía desarrollarse en el Bioscreen (equipo que mide a la vez la absorbancia de 200 muestras y mantiene la temperatura) se incubaba hasta que las muestras que contenían microorganismos (es de esperar que solo 1) alcanzaban una absorbancia de 0,2, que coincide con una concentración microbiana de alrededor de  $10^{7-8}$  ufc/ml. De esta manera se conseguía una distribución de tiempos de detección que será función de las fases de latencia ( $\lambda$ ) de las células individualizadas y que, matemáticamente, puede transformarse fácilmente en una distribución de las fases de latencia [260].

$$\lambda = T_d - ((Ln(N_d) - Ln(N_0)) / \mu_{max}) \quad (18)$$

donde,  $T_d$  es el tiempo de detección (tiempo necesario para alcanzar una absorbancia de 0,2),  $Ln(N_d)$  es el logaritmo neperiano del número de células cuando se ha alcanzado una absorbancia de 0,2,  $Ln(N_0)$  es el logaritmo neperiano del número de microorganismos iniciales y  $\mu_{max}$  es la tasa máxima específica de crecimiento.

Si la muestra es turbia o sólida (los alimentos), se sembraba una única célula en ella y se incubaba a una temperatura de refrigeración. Cada cierto tiempo se sembraban 5 muestras control y cuando se observaba crecimiento en alguna de ellas (es decir, al día siguiente) se enumeraban los microorganismos de todas ellas. Dado que cada día se toman 4 ó 5 muestras para detectar crecimiento y que, claro está, éstas ya no pueden reutilizarse porque hemos podido sembrar la única célula que podría existir, cuando se trabaja con este sistema son necesarias más muestras por lote. Suele trabajarse con 150.

De esta manera se obtenía una distribución de las ufc/g ó ml de alimento en un momento concreto de la fase de crecimiento exponencial, que también puede transformarse en la distribución de las fases de latencia [285].

$$\lambda = T_{count} - ((Ln(x_{count}) - Ln(x_{initial})) / \mu_{max}) \quad (19)$$

donde  $T_{count}$  es el tiempo transcurrido entre la inoculación y la siembra de las muestras,  $Ln(x_{count})$  es el logaritmo neperiano del número de microorganismos en el momento  $T_{count}$ ,  $Ln(x_{initial})$  es el logaritmo neperiano del número inicial de microorganismos (inóculo) y  $\mu_{max}$  es la tasa máxima específica de crecimiento.

### **3.4. Estudio del efecto del tamaño del inóculo (de 1 a unos centenares de ufc) en la variabilidad de la fase de latencia de poblaciones**

Esta tarea surge a modo de corolario a la demostrada variabilidad de la duración de la fase de latencia de las células individualizadas y de que en un envase, obviamente, no tiene por qué mantenerse viable una única célula viable. Está demostrado que la duración de la fase de latencia es función, entre otros factores, del número de células que forman la población. Así, 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, pero hace falta la cuantificación de esa variabilidad para poder incorporarla a los modelos que predicen el crecimiento microbiano.

Para llevar a cabo esta tarea se analizó la variabilidad de la fase de latencia de diferentes poblaciones, estando formada la más concentrada por unas 250 ufc/pocillo del Bioscreen y el resto eran diluciones medias de ésta hasta llegar a menos de 1 célula/pocillo -10 diluciones-. En este equipo pueden acoplarse dos placas de 10x10 pocillos (200 muestras). El número de réplicas suficiente para la obtención de

distribuciones se fijó en 40, por lo que, en nuestras condiciones de trabajo, se obtenían resultados de 5 diluciones (inóculos) en cada experiencia.

Se procedió igual que en la determinación de la fase de latencia de células individuales, pero, en este caso, como las muestras contenían un número variable de microorganismos, éste se determinó con recuentos de, al menos, 20 placas por cada dilución.

### **3.5. Estudio del efecto del estado fisiológico de los microorganismos en la variabilidad de su inactivación mediante tratamientos térmicos**

Se pretende estudiar el efecto de dos estados fisiológicos de los microorganismos (células en fase exponencial y células en fase estacionaria) en la inactivación mediante tratamientos térmicos. Para ello se revitalizó *Listeria innocua* en un doble pase en TSB a 37°C durante 24 horas. Se tomó una alícuota y se suspendió en el mismo medio. Se incubó durante diferentes tiempos, 6, 12, 24 y 72 horas, a 37°C, para obtener microorganismos en diferentes estados fisiológicos, fase exponencial y estacionaria. Una vez recolectada una cantidad alícuota de microorganismos, se suspendió en solución salina estéril a temperatura ambiente y se sometió a diversos tratamientos térmicos, a 54°C, cuyo objetivo era reducir la carga microbiana de la muestra en aproximadamente 0, 1 y 3 ciclos logarítmicos. Una vez transcurridos los tiempos que permitían la inactivación programada para cada experiencia, se tomaba una alícuota de 0.1 ml de cada tubo y se depositaba en un eppendorf con 0.9 ml de solución salina estéril fría (mantenida en un baño de agua / hielo), con el objetivo de detener el tratamiento de inactivación.

En todos los casos, los viables se determinaron mediante recuento en placa en TSA a 37°C durante 48 horas.

### **3.6. Análisis de datos**

Las distribuciones de inactivación y de las fases latencia se estudiaron estadísticamente, obteniéndose los parámetros que caracterizan las distintas distribuciones (valores mínimo y máximo, media, desviación estándar y varianza, coeficiente de variación, etc.).

Para la comparación de las distribuciones obtenidas tras diferentes tratamientos se utilizó la prueba de homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett, en el caso de

la distribución del número de supervivientes, y el test de permutación para las distribuciones de la fase de latencia. Todos estos estudios matemáticos se realizaron con las macros VariFit (ajuste de distribuciones), Dmfit 2.1 (curva de crecimiento), amablemente cedidas por sus programadores, el Dr. József Bányi y su equipo del Institute of Food research (UK), el programa Statgraphic Plus 5.0 (Para el test de Bartlett), el software R 2.7.2. (Para el test de permutación) y el software EasyFit 5.5 (estudio del mejor ajuste).



## **IV. RESULTADOS**

---



#### IV. RESULTADOS

En este apartado quedan reflejados los resultados de los experimentos realizados en esta tesis doctoral, bajo el siguiente orden:

- Análisis de la variabilidad del número supervivientes viables después de tratamientos térmicos. Artículo publicado bajo el título “*Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food*” en Applied and Environmental Microbiology (2009) 75 (22) 6992-6997 y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, Carmen Pin, María Rosa Rodríguez, Gonzalo D. García de Fernando
- Análisis de la fase de latencia de células individualizadas y micropoblaciones supervivientes a tratamientos térmicos. Manuscrito enviado con el título “*Analysis of variability in the lag phase of individuals and micropopulations that have survived mild heat treatment*” a International Journal of Food Microbiology y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, Almira Monís, Gonzalo D. García de Fernando.
- Variabilidad de la inactivación por calor de *Listeria innocua* en diferentes fases del crecimiento. Manuscrito enviado con el título “*Variability of heat inactivation of Listeria innocua at different stages of growth*” a Brazilian Journal of Microbiology y cuyos autores son Mauricio Herrera P., **Juan S. Aguirre**, María Rosa Rodríguez V. Fernando Aguado Criado, Abraham Juárez, María del Rosario, Gonzalo D. García de Fernando.
- Efecto de los electrones acelerados sobre la variabilidad del número de supervivientes y duración de la fase de latencia de cuatro microorganismos en alimentos. Artículo publicado bajo el título “*Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms*” en International Journal of Food Microbiology (2011) 149, 236-246 y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, María Rosa Rodríguez, Gonzalo D. García de Fernando.

- Comparación del efecto de la irradiación con electrones acelerados y del tratamiento térmico en la variabilidad de la inactivación de *Bacillus cereus* y la duración de la fase de latencia de las células supervivientes. Artículo publicado bajo el título “*A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of Bacillus cereus inactivation and lag phase duration of surviving cells*” en International Journal of Food Microbiology (2012) 153, 444-452 y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, Juan A. Ordoñez, Gonzalo D. García de Fernando.
  
- Mejora de la estimación de la fase de latencia de células individuales y micropoblaciones mediante la aplicación de la distribución de Poisson. Artículo publicado bajo el nombre “*The Poisson Distribution Is Applied to Improve the Estimation of Individual Cell and Micropopulation Lag Phases*” en Advances in Microbiology (2012) 2, 146-161 y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, Carmen Bravo, Juan A. Ordoñez, Gonzalo D. García de Fernando
  
- Modelado de la fase de latencia y su variabilidad de micropoblaciones de *Listeria innocua*. Manuscrito en fase de segunda revisión bajo el nombre “*Modeling the Listeria innocua micropopulation lag phase and its variability*” en International Journal of Food Microbiology y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, Andrea González, Nicem Özcelik, María Rosa Rodríguez, Gonzalo D. García de Fernando.

## ARTÍCULO N° 1

---

Análisis de la variabilidad del número supervivientes viables después de tratamientos térmicos.

Artículo publicado bajo el título “*Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food*” en Applied and Environmental Microbiology (2009) 75 (22) 6992-6997 y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, Carmen Pin, Maria Rosa Rodriguez, Gonzalo D. García de Fernando

---

*Lunes*



## Analysis of the Variability in the Number of Viable Bacteria after Mild Heat Treatment of Food<sup>∇</sup>

J. S. Aguirre,<sup>1</sup> C. Pin,<sup>2\*</sup> M. R. Rodríguez,<sup>1</sup> and G. D. García de Fernando<sup>1</sup>

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, Madrid 28040, Spain,<sup>1</sup> and Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UA, United Kingdom<sup>2</sup>*

Received 24 February 2009/Accepted 23 September 2009

**Variability in the numbers of bacteria remaining in saline solution and whole milk following mild heat treatment has been studied with *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, and *Pseudomonas fluorescens*. As expected, the most heat-resistant bacterium was *E. faecalis*, while *P. fluorescens* was the least heat resistant, and all bacteria showed greater thermal resistance in whole milk than in saline solution. Despite the differences in the inactivation kinetics of these bacteria in different media, the variability in the final number of bacteria was affected neither by the species nor by the heating substrate, but it did depend on the intensity of the heat treatment. The more severe the heat treatment was, the lower the average number of surviving bacteria but the greater the variability. Our results indicated that the inactivation times for the cells within a population are not identically distributed random variables and that, therefore, the population includes subpopulations of cells with different distributions for the heat resistance parameters. A linear relationship between the variability of the log of the final bacterial concentration and the logarithmic reduction in the size of the bacterial population was found.**

The safety and quality of many foods, such as minimally processed foods and some ready-to-eat products, are affected by a combination of multiple sublethal stresses due to processing and storage conditions (17, 32). The use of mild preservative processes instead of harsher ones affects the microbiological risk. It is therefore important to identify potential hazards and to perform accurate quantitative microbial risk assessments including probabilistic modeling approaches (17).

It is unlikely that food products are contaminated by one unique bacterial strain or species. In fact, even cells from a pure culture derived from one cell are not necessarily identical (25). Nauta (16) differentiated between uncertainty, which is due to the lack of perfect knowledge about a parameter and which is reducible by further measurements, and variability, which reflects the true variability of a population and is therefore irreducible. He showed the importance of both parameters in quantitative microbial risk assessment models. The estimation of variability usually refers to the variation in the responses of the individual cells within the population, which may be homogeneous or heterogeneous. In a homogeneous population, the heat resistance parameters of the individual cells are identically distributed random variables. Heterogeneous populations include subpopulations of cells with different distributions for the heat resistance parameters. The heterogeneity of the individual cells or spores within a population is the most accepted explanation for the tails of inactivation curves (1,

30) and unexpected increases in the variability of the number of survivors after heat treatments (7, 8, 30).

The microbial concentration in a food product at a given time is affected by the initial inoculum, the length of the lag phase, and the maximum specific growth rate. The distributions of these variables are required to estimate the distribution of the log of the bacterial concentration at a given time during exponential growth (2). Typically for these estimates, the growth rate is assumed to be constant during the exponential growth phase in a nonfluctuating environment. Under this assumption, variations in the growth rate are assumed to be caused by lack of control over the environmental conditions. Recently, distributions of the length of the lag phase among the surviving cells after different stresses have been measured (6, 9, 14, 18). Usually, the distribution of the initial number of cells in a food product is assumed to be independent of previous processing and storage conditions. However, this may be not the case following stress conditions such as heat treatments. The distribution of the initial number of bacteria may depend on the severity of the previous stress. The purpose of the present work was to analyze the distributions of the concentrations of surviving cells after different heat treatments. To do this, heat treatments of various intensities were applied to the gram-positive bacteria *Enterococcus faecalis* and *Listeria innocua*, as well as to the gram-negative bacteria *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and *Pseudomonas fluorescens*.

### MATERIALS AND METHODS

**Strains and preparation of inocula.** *P. fluorescens* (CECT 378), *S. enterica* serovar Enteritidis (CECT 4300; ATCC 13076), *L. innocua* (CECT 910; NCTC 11288; ATCC 33090), and *E. faecalis* (LM24) were maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Strains were subcultured twice successively in sterilized tryptic soy broth (Pronadisa, Spain) and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h, with the exception of *P. fluorescens*, which was incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  for 36 h. Cells were harvested by centrifugation at

\* Corresponding author. Mailing address: Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UA, United Kingdom. Phone: 441603255000. Fax: 441603255288. E-mail: carmen.pin@bbsrc.ac.uk.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 2 October 2009.

TABLE 1. *D* and *z* values<sup>a</sup>

Bacterium	Heating medium	Temp (°C)	<i>D</i> value (min)	SE	<i>z</i> value (°C)	SE
<i>E. faecalis</i>	Saline solution	56	22.03	0.28	6.75	0.005
	Saline solution	59	7.81	0.18		
	Saline solution	61	4.00	0.38		
	Whole milk	57	61.73	0.08	6.85	0.037
	Whole milk	59	34.84	0.11		
	Whole milk	61	18.48	0.17		
	Whole milk	64	5.91	0.16		
<i>L. innocua</i>	Saline solution	50	45.66	0.11	5.16	0.055
	Saline solution	54	6.61	0.2		
	Saline solution	57	2.03	0.37		
	Whole milk	50	68.03	0.25	5.72	0.002
	Whole milk	54	13.7	0.11		
	Whole milk	57	4.07	0.13		
<i>P. fluorescens</i>	Saline solution	45	54.9	0.21	4.19	0.011
	Saline solution	47	18.2	0.15		
	Saline solution	49	6.1	0.45		
	Whole milk	48	13	0.14	4.74	0.014
	Whole milk	49	7.98	0.34		
	Whole milk	51	2.89	0.21		
	Whole milk	53	1.16	0.53		
<i>S. Enteritidis</i>	Saline solution	50	14.1	0.14	5.74	0.092
	Saline solution	54	3.71	0.25		
	Saline solution	59	0.39	0.19		
	Whole milk	48	34.6	0.15	6.53	0.027
	Whole milk	56	2.2	0.38		
	Whole milk	60	0.49	0.45		

<sup>a</sup> Calculated from experimental data for *E. faecalis*, *L. innocua*, *P. fluorescens*, and *S. Enteritidis* in saline solution (NaCl, 0.75%) and whole milk.

15,000 × *g* and 4°C in a Sorvall RC5B refrigerated centrifuge. The final pellets were resuspended in sterile saline solution (0.75% NaCl).

**Inactivation experiments.** Prior to the quantification of the variability in heat resistance, inactivation curves were determined by using temperature-controlled water baths (Bunsen S.A.) set at the target temperatures (Table 1). Temperature was monitored using a thermocouple (Testo 720). Duplicate tubes each containing 9.9 ml of sterile saline solution (0.75% NaCl) or sterile whole milk (Asturiana, Asturias, Spain) were immersed in the water baths and allowed to reach the target inactivation temperature before being inoculated with 100 µl of the bacterial suspensions. At each sampling time, aliquots of 100 µl were removed and immediately mixed with 900 µl of cold sterile saline solution in a tube immersed in an ice water bath. Surviving bacteria were counted on tryptic soy agar (Pronadisa, Spain). Plates were incubated at 37°C for 48 h in the cases of *L. innocua*, *E. faecalis*, and *S. Enteritidis* and at 25°C for 72 h in the case of *P. fluorescens*. The *D* value (time at constant temperature for a 1-log reduction of the population) and *z* value (change of temperature necessary to alter the *D* value by 1 log) were estimated from the inactivation curves for each bacterium in saline solution and whole milk. By using the *D* and *z* values, the times required to obtain 1 to 5 logarithmic reductions in the populations of each bacterium in milk and saline solution at the selected temperatures were estimated. Details of the heat treatments are given in Table 2.

To quantify the variability in the number of survivors after each heat treatment, tubes (between 60 and 100 for each treatment) containing 9.9 ml of sterile saline solution (0.75% NaCl) or sterile whole milk were immersed in water baths and inoculated as described above. When the heat treatment was complete, an aliquot of 100 µl from every tube was removed and mixed with 900 µl of cold sterile saline solution as described above. To minimize error due to the high number of samples processed, the order of the tubes was the same for inoculation and for sampling and the time spent for inoculation was kept as close as possible to the time spent for sampling.

One hundred microliters of each cooled sample, which was further diluted if needed, was plated onto tryptic soy agar (Pronadisa, Spain) by using a spiral platter system (Eddy Jet; IUL Instruments, Barcelona, Spain). Plates were read with an image analyzer (Countermath Flash; IUL Instruments, Barcelona,

Spain) after incubation at 37°C for 24 h in the cases of *L. innocua*, *E. faecalis*, and *S. Enteritidis* or at 25°C for 48 h in the case of *P. fluorescens*. Several (10 to 20) samples from every batch were untreated controls.

**Stochastic model for a theoretical population in which the inactivation times for individual cells are independent and identically distributed.** We estimated the distribution of the final numbers of bacteria after heating for a theoretical population in which the inactivation times for individual cells are independent of one another and identically distributed. For the sake of simplicity, we referred to this population as a homogeneous population. The bacterial concentrations were calculated, and the logarithms of the concentrations were estimated, since log units are the most commonly used units in microbiology.

Let the number of surviving bacteria (*X*) at time *t* be modeled as a Poisson process.

$$X(t) = \sum_{i=1}^N Z_i(t) \quad (1)$$

where *N* is the initial number of bacteria and is a random variable distributed according to Poisson distribution with parameter  $\lambda$ . This assumption is derived from the experimental design and agrees with the initial number of bacteria.

Let us define  $Z_i(t)$  as follows:

$$Z_i(t) = \begin{cases} 1 & \text{if } T_i > t \\ 0 & \text{if } T_i \leq t \end{cases} \quad (2)$$

where  $T_i$  represents independent and identically distributed random variables expressing the inactivation times for individual cells of the population. For our purpose, it is not necessary to assume any specific distribution for  $T_i$ .

Therefore, the expected value (E) for the number of surviving bacteria at a given time (*t*) is as follows:

$$E[X(t)] = \lambda E[Z] \quad (3)$$

The variance (V) is as follows:

$$V[X(t)] = \lambda E[Z^2] = \lambda E[Z] \quad (4)$$

As a result, the values of  $X(t)$ , the numbers of surviving bacteria at times *t*, have a Poisson distribution with parameter  $\lambda \cdot P(T_i > t)$ , where  $P(T_i > t)$  is the probability that the inactivation time of the *i*th cell is greater than *t* (10). This is a standard Poisson process in which the variance is equal to the mean. The required transformation to stabilize the variance of *X* is the square root transformation; however, for the reason mentioned above, we used the logarithmic transformation.

As pointed out by Ratkowsky (21), the expected value and variance for the transformation of a random variable can be approximated using the one-term Taylor series expansion, as follows.

$$E[\log_{10} X(t)] = \log_{10} E[X(t)] \quad (5)$$

$$V[\log_{10} X(t)] = \left( \frac{d}{dx} \log_{10} x \Big|_{x=E[X]} \right)^2 \cdot V[X(t)] = \frac{V[X(t)]}{\{\ln(10)E[X(t)]\}^2} \quad (6)$$

Therefore, for a homogenous population, the relationship between the variability and the expected value of the logarithm of the bacterial concentration after heating at a constant temperature for a certain time, *t*, can be estimated as follows:

$$SD[\log_{10} X(t)] = \frac{1}{\ln(10) \sqrt{10^{\text{average}[\log_{10} X(t)]}}} \quad (7)$$

where SD is the standard deviation.

The results obtained for the theoretical homogeneous population were compared with those obtained for the experimentally measured bacterial concentrations after several heat treatments.

**Statistical tests.** The variances in the distributions of the concentrations of surviving bacteria were compared using a Bartlett test (31). Data analysis and statistical tests were carried out using the Microsoft Excel add-in Varifit (2).

## RESULTS

*D* and *z* values were experimentally obtained (Table 1) and used to design the heat treatments in order to obtain several inactivation intensities (Table 2).

TABLE 2. Concentrations of surviving bacteria after several heat treatments in saline solution (NaCl, 0.75%) and whole milk

Bacterium	Heating medium	Temp (°C)	Length of treatment (min)	No. of samples	Mean concn (log <sub>10</sub> CFU/ml) of surviving bacteria	SD	Minimum concn (log <sub>10</sub> CFU/ml)	Maximum concn (log <sub>10</sub> CFU/ml)
<i>E. faecalis</i>	Saline solution	57	0.0	17	6.20	0.08	6.03	6.29
	Saline solution	57	28.0	70	4.13	0.14	4.02	4.90
	Saline solution	57	42.0	66	3.68	0.24	2.91	3.96
	Saline solution	57	56.0	71	2.55	0.29	2.03	3.00
	Whole milk	61	0.0	10	7.17	0.05	7.14	7.23
	Whole milk	61	28.0	74	5.12	0.08	4.98	5.24
	Whole milk	61	42.0	74	4.35	0.21	4.03	4.71
	Whole milk	61	56.0	75	3.81	0.31	3.26	4.09
<i>L. innocua</i>	Saline solution	54	0.0	15	7.90	0.14	7.63	8.21
	Saline solution	54	13.0	99	5.92	0.23	5.27	6.44
	Saline solution	54	19.5	77	4.95	0.32	4.34	5.86
	Saline solution	54	26.0	96	4.06	0.39	3.03	4.88
	Whole milk	54	0.0	10	7.95	0.03	7.91	7.98
	Whole milk	54	28.0	78	5.82	0.13	5.48	6.00
	Whole milk	54	42.0	77	4.77	0.23	3.89	4.99
	Whole milk	54	56.0	75	3.98	0.41	3.39	4.91
<i>P. fluorescens</i>	Saline solution	48	0.0	10	5.69	0.09	5.57	5.84
	Saline solution	48	2.0	71	4.23	0.19	4.03	4.71
	Saline solution	48	4.0	69	3.50	0.29	3.03	3.93
	Saline solution	48	6.0	70	2.42	0.32	2.03	2.97
	Whole milk	48	0.0	16	6.08	0.10	5.96	6.22
	Whole milk	48	3.0	64	5.12	0.08	5.00	5.28
	Whole milk	48	6.0	60	3.72	0.37	3.07	4.37
	Whole milk	48	9.0	59	3.03	0.41	2.21	3.93
<i>S. Enteritidis</i>	Saline solution	53	0.0	10	8.64	0.06	8.56	8.72
	Saline solution	53	5.3	76	5.24	0.11	5.00	5.46
	Saline solution	53	7.0	74	4.33	0.30	3.00	4.99
	Saline solution	53	8.8	74	3.68	0.30	3.08	4.06
	Whole milk	53	0.0	9	7.13	0.07	7.05	7.25
	Whole milk	53	6.6	76	4.48	0.09	4.00	4.56
	Whole milk	53	8.8	74	3.40	0.30	2.84	3.97
	Whole milk	53	12.0	74	2.49	0.31	1.84	2.97

Bacteria were more resistant in whole milk than in saline solution. Gram-positive bacteria showed greater *D* values than gram-negative bacteria. The most heat-resistant species was *E. faecalis*, while *P. fluorescens* was the least heat resistant.

The mean and standard error of the final numbers of bacteria were estimated from results for ca. 60 to 100 samples after treatments at different temperatures and for different times (Table 2). The unheated control always showed the smallest standard deviation. The more severe heat treatments gave lower numbers of survivors but greater variability in the final numbers of bacteria. After similar inactivation treatments in saline solution and milk, all strains showed similar degrees of variability in the final concentrations of viable bacteria (Table 2).

A Bartlett test showed that the variability in the number of bacteria was significantly smaller for the control than for any of the heated samples (Fig. 1). In most of the cases, the variances in the final bacterial concentrations were significantly different for the different heat treatments (Fig. 1). In general, the distributions of the logarithms of the final bacterial concentrations did not show tails and the shapes were nearly symmetric (Fig. 1). In contrast, the distributions of *E. faecalis* concentrations were bimodal for the most severe heat treatments in both milk and buffer, which may be explained by different thermal-resistance patterns for cells aggregated in chains.

Our results indicate that the distribution of the number of survivors depends on the severity of the treatment. This leads to the idea that the inactivation times for the cells within a population are not identically distributed and that applying heat treatments of different severities allows the survival of different subpopulations. To test this idea, we compared our experimental results with the results for a theoretical population in which the inactivation times for individual cells are independent of one another and identically distributed. As described in Materials and Methods, we referred to this population as a homogeneous population.

According to the model for the theoretical homogeneous population, there is no relation between the variability of the log of the final number of bacteria and the intensity of the heat treatment, as long as the log of the final concentration is greater than 1 (Fig. 2). However, we did not observe this result in our experiments; on the contrary, we observed that the variability of the logarithm of the bacterial concentration after the heat treatment was larger than predicted when a homogeneous population was assumed. Moreover, the observed variability increased as the number of survivors decreased (Fig. 2). Therefore, the inactivation times for the cells within the population were not independent and/or not identically distributed. With our experimental design using saline solution or milk, cell independence can be assumed. Thus, we concluded

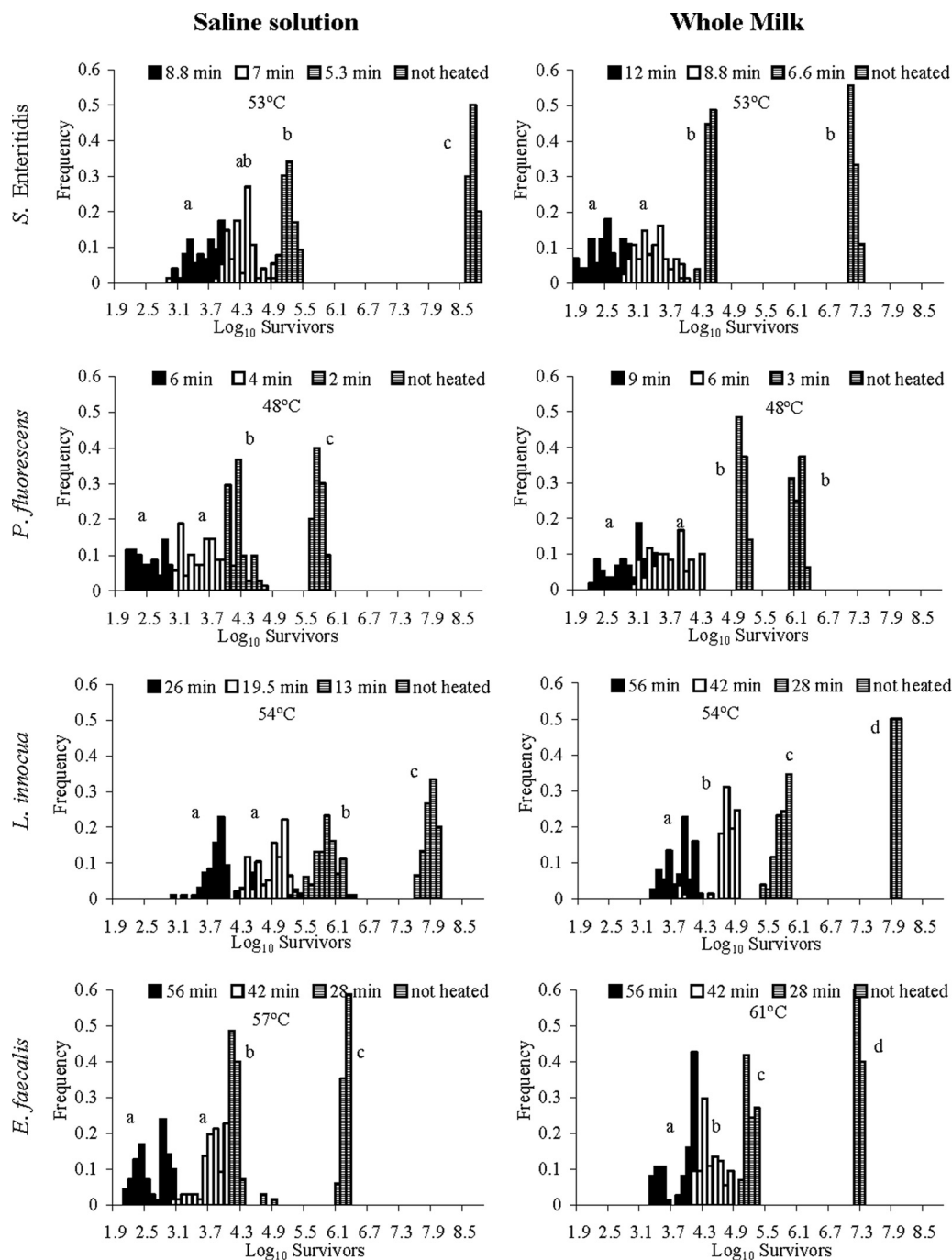


FIG. 1. Distributions of the logarithm values for the surviving bacterial concentrations in saline solution and whole milk after several heat treatments. Variances labeled with the same letter are not significantly different.

that the inactivation times for the cells within the population were not identically distributed.

The variability of the final bacterial concentration was expressed as a function of the reduction of the population independently of the initial population (Fig. 3). Here again, the observed variability was larger than the predictions that assumed a homogeneous population, and it increased with the severity of the treatment. The greater the reduction in the population, the greater was the variability of the final

concentration. An explicit linear relationship between the variability of the final bacterial concentration and the reduction of the logarithm of the population was estimated from the experimental data (Fig. 3). This relationship was as follows:

$$SD[\log_{10}X(t_f)] = 0.060 + 0.074[\log_{10}X(t_0) - \log_{10}X(t_f)] \tag{8}$$

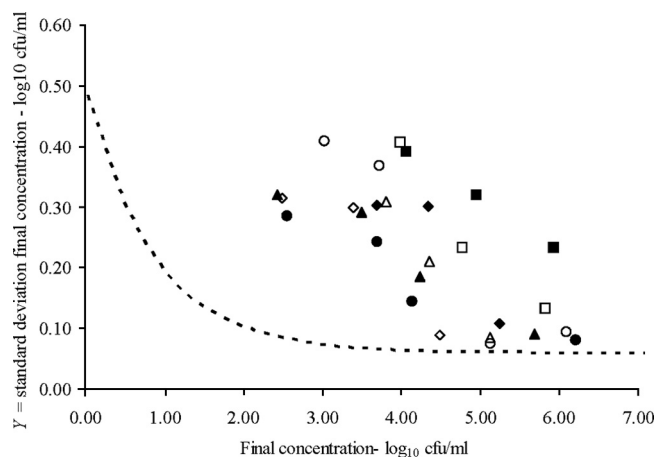


FIG. 2. Relationship between the logarithm of the final bacterial concentration and its standard deviation after several heat treatments. Results are shown for *E. faecalis* (circles), *L. innocua* (squares), *P. fluorescens* (triangles), and *S. Enteritidis* (diamonds) in saline solution (filled symbols) and whole milk (empty symbols). The dashed line shows the relationship expected by assuming that the inactivation times of the cells within a population are identically distributed and independent of one another.

where SD is the standard deviation of the logarithm values for the final concentrations of bacteria [ $\log_{10}X(t_f)$ ],  $t_f$  is the final time point,  $X(t_0)$  denotes the initial bacterial concentration, and  $t_0$  is time zero.

## DISCUSSION

The variability between individual members of a bacterial population can render preservation treatments ineffective, and this variability is not captured in models that assume homogeneous bacterial behavior. Our results showed that the inactivation times for the cells within a population are not identically distributed and that for this reason, as the severity of the heat treatment increases, the variability in inactivation effects increases.

In our work, the microbial inactivation parameters commonly used in food technology,  $D$  and  $z$  values, were comparable to those obtained by other authors under similar conditions (4, 5, 11, 12, 15, 23). Variability in  $D$  values has been analyzed extensively by van Asselt and Zwietering (28), who compared 4,066  $D$  values for pathogens and observed that most factors reported to affect the  $D$  value have an influence that is less than the variability of all published  $D$  values.

Despite the differences in the inactivation kinetics for the different bacteria and heat treatments, the variability in the final number of bacteria was not affected by the species, medium, or heating temperature, but it depended on the severity of the heat treatment (Fig. 1). Assuming that the inactivation times for the cells within the population are independent and identically distributed, the final number of survivors after a heat treatment has a Poisson distribution. As explained by Ratkowsky (21), the required transformation to stabilize the variance in the number of survivors is the square root transformation, so that the variability and expected value of the square root of the number of survivors are independent of each

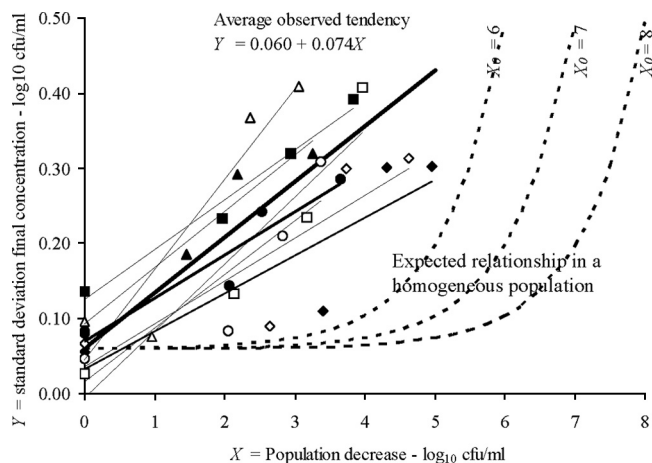


FIG. 3. Relationship between the standard deviation of the log of the final bacterial concentration and the decrease in the log of the bacterial concentration after several heat treatments. The symbols are the same as those used in Fig. 2. The continuous lines show the relationships found in our experiments, while the dashed lines show the expected relationships for the  $\log_{10}$  of the initial bacterial concentrations ( $X_0$ ) used in our experiments when the inactivation times for the cells within a population are assumed to be identically distributed and independent of one another.

other. However, given the widespread use in microbiology of logarithmic transformation for bacterial counts, we approximated the relationship between the variance and the expected value of the logarithm of the number of survivors. The variance of the logarithm of the number of survivors is nearly constant if this value is between 1 and 8. If the log number of survivors is smaller than 1, the variance increases abruptly (Fig. 2). Therefore, the relationship in equation 8 is valid only if the final logarithm of the concentration is greater than 1. If it is smaller, the extrapolation may be highly erroneous since the logarithmic function does not stabilize its variance. Regarding other extrapolations, it is worth noting that in this work all inocula were prepared with bacterial cells grown under optimum conditions; other inoculum preparations may change the heat resistance of the cells and therefore the distribution of the final numbers of bacteria.

According to standard models, which assume a homogeneous population, the variability of the log of the final number of bacteria is not related to the intensity of the treatment, as long as the log of the final concentration is greater than 1 as explained above. However, we observed that the variability of the log of the number of survivors increased as the severity of the treatment increased and concluded that the inactivation times for the cells within the population were not identically distributed. Heterogeneity, regarding growth parameters, of populations derived from a single cell has already been reported and attributed to differences in the age of the cell structures (25). In the previous work, Stewart et al. (25) observed that after symmetric division, daughter cells inherit a pole or cellular extreme from the original cell and form a new pole. After several divisions, cells with old original poles grow more slowly than those cells with newly formed components. Regarding inactivation parameters, it has been reported that the resistance of the surviving bacteria and spores increases during the

inactivation treatment (1, 24), which explains further the heterogeneity of the cells within a population as the result of dynamic survival strategies.

Our finding that the variability of the surviving cells increases with the severity of the heat treatment is consistent with the results of previous studies. A similar increase in variability in *L. monocytogenes* viability was observed as more intense heating treatments were applied after milk pasteurization (20). Tay et al. (27) observed that the variability in the number of survivors among 10 *Listeria* strains (9 *L. monocytogenes* strains and 1 *L. innocua* strain) was greater after a higher-pressure (500-MPa) treatment than after a lower-pressure (400-MPa) one. In addition, other studies of the effects of heat treatments and other stresses on the variability of cell responses have focused on the lag time. Regarding the coefficient of variation of the lag time, some authors have reported that it is not affected by the intensity of the heat treatment (14) while others have found a general increase after heat treatments and other stresses (6, 11). Therefore, the heterogeneity of the surviving population may also be reflected by greater variability in the repair time needed for the survivors to start dividing.

Zwietering (32) discussed the complexity of assessing safety and microbial quality in minimally processed foods; this complexity is due to wide biological variability (e.g., in the raw material and contaminating organisms involved) and uncertainty about which factors influence product safety or quality. The relationship expressed in equation 8 decreases this uncertainty by quantifying the variability of the inactivation times for the cells within a population. Our results show that this relationship applies to both gram-positive and gram-negative bacteria heated in milk or saline solution at temperatures ranging between 48 and 57°C.

The variability is a fundamental property of microbial populations; its quantitative representation has an important role in many practical applications such as risk assessment (3, 29). Stochastic models for the growth of populations have been developed based on the experimentally measured distributions for the lag times of single cells and spores (13, 14, 18, 19, 26). In those models, the distribution of the initial number of cells was assumed to be independent of the heat treatment or previous stress. Based on the findings of the present study, we can now complete those modeling approaches and risk assessments by including the dependence of the variability in survival rates on the stress applied to the population.

#### ACKNOWLEDGMENTS

J.S.A., M.R.R., and G.D.G.D.F. gratefully acknowledge the support of the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (AGL-2005-01239) and Consolider (CSD2007-0016), as well as the Comunidad Autónoma de Madrid (project S-0505/AGR-0314). C.P. acknowledges the support of BBSRC Institute Strategic Program grant 42230A.

#### REFERENCES

1. **Augustin, J. C., V. Carlier, and J. Rozier.** 1998. Mathematical modelling of the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **84**:185–191.
2. **BACANOVA Consortium.** 2005. Final report on the European project QLRT-2000-01145: optimisation of safe food processing methods based on accurate characterisation of bacterial lag time using analysis of variance techniques (BACANOVA). European Commission, Brussels, Belgium.
3. **Barker, G. C., P. K. Malakar, and M. W. Peck.** 2005. Germination and growth from spores: variability and uncertainty in the assessment of food borne hazards. *Int. J. Food Microbiol.* **100**:67–76.
4. **Cabeza, M. C., J. A. Ordóñez, M. I. Cambero, L. de la Hoz, and M. L. García.** 2004. Effect of thermoultrasonication on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in distilled water and intact shell eggs. *J. Food Prot.* **67**:1886–1891.
5. **Chaudhary, R. A., S. L. Tuckey, and L. D. Witter.** 1960. Heat resistance of three strains of psychrotrophic organisms added to skim milk for cottage cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* **43**:1174–1182.
6. **D'Arrigo, M., G. D. García de Fernando, R. Velasco, J. A. Ordóñez, S. M. George, and C. Pin.** 2006. Indirect measurement of the lag time distribution of single cells of *Listeria innocua* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:2533–2538.
7. **Douglas, S. A., M. J. Gray, A. D. Crandall, and K. J. Boor.** 2000. Characterization of chocolate milk spoilage patterns. *J. Food Prot.* **63**:516–521.
8. **Grant, I. R., H. J. Ball, S. D. Neill, and M. T. Rowe.** 1996. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:631–636.
9. **Guillier, L., P. Pardon, and J. C. Augustin.** 2005. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2940–2948.
10. **Kulkarni, V. G.** 1995. Modelling and analysis of stochastic systems. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
11. **Mackey, B. M., A. F. Kelly, J. A. Colvin, P. T. Robbins, and P. J. Fryer.** 2006. Predicting the thermal inactivation of bacteria in a solid matrix: simulation studies on the relative effects on microbial thermal resistance parameters and process conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **107**:295–303.
12. **Mayerhofer, H. J., R. T. Marshall, C. H. White, and M. Lu.** 1973. Characterization of a heat stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P26. *Appl. Microbiol.* **25**:44–48.
13. **Metris, A., S. M. George, and J. Baranyi.** 2006. Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:6674–6679.
14. **Metris, A., S. M. George, B. M. Mackey, and J. Baranyi.** 2008. Modeling the variability of single-cell lag times for *Listeria innocua* populations after sub-lethal and lethal heat treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:6949–6955.
15. **Miller, F. A., T. R. S. Brandao, P. Teixeira, and C. L. M. Silva.** 2006. Recovery of heat-injured *Listeria innocua*. *Int. J. Food Microbiol.* **112**:261–265.
16. **Nauta, M. J.** 2000. Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *Int. J. Food Microbiol.* **57**:9–18.
17. **Peck, M. W.** 2006. *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *J. Appl. Microbiol.* **101**:556–570.
18. **Pin, C., and J. Baranyi.** 2006. Kinetics of single cells: observation and modeling of a stochastic process. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:2163–2169.
19. **Pin, C., and J. Baranyi.** 2008. Single-cell and population lag times as a function of cell age. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:2534–2536.
20. **Piyasena, P., and R. C. McKellar.** 1999. Influence of guar gum on the thermal stability of *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, and  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase during high-temperature short-time pasteurization of bovine milk. *J. Food Prot.* **62**:861–866.
21. **Ratkowsky, D. A.** 1992. Predictive response times in predictive food microbiology. Occasional paper no. 1992/1. Department of Primary Industry, Fisheries and Energy, Hobart, Australia.
22. **Ritz, M., M. J. Nauta, P. F. M. Teunis, F. van Leusden, M. Federighi, and A. H. Havelaar.** 2007. Modelling of *Campylobacter* survival in frozen chicken meat. *J. Appl. Microbiol.* **103**:594–600.
23. **Sanz, B., P. Lopez, M. L. García, P. Hernandez, and J. A. Ordóñez.** 1982. Heat resistance of enterococci. *Milchwissenschaft* **37**:724–726.
24. **Smelt, J. P., A. P. Bos, R. Kort, and S. Brul.** 2008. Modelling the effect of sub-lethal heat treatment of *Bacillus subtilis* spores on germination rate and outgrowth to exponentially growing vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.* **128**:34–40.
25. **Stewart, E. J., R. Madden, G. Paul, and F. Taddei.** 2005. Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol.* **3**:e45.
26. **Stringer, S. C., M. D. Webb, S. M. George, C. Pin, and M. W. Peck.** 2005. Heterogeneity of times required for germination and outgrowth from single spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4998–5003.
27. **Tay, A., T. H. Shellhammer, A. E. Yousef, and G. W. Chism.** 2003. Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. *J. Food Prot.* **66**:2057–2061.
28. **van Asselt, E. D., and M. H. Zwietering.** 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **107**:73–82.
29. **Vose, D.** 2000. Risk analysis: a quantitative guide. John Wiley, Chichester, United Kingdom.
30. **Whitell, E. R.** 1942. The significance of the variation on shape of time-survivor curves. *J. Hyg.* **42**:124–183.
31. **Zar, J. H. (ed.)** 1999. Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.
32. **Zwietering, M. H.** 2002. Quantification of microbial quality and safety in minimally processed foods. *Int. Dairy J.* **12**:263–271.

## ARTÍCULO N° 2

---

Análisis de la fase de latencia de células individualizadas y micropoblaciones supervivientes a tratamientos térmicos.

Manuscrito enviado con el título “*Analysis of variability in the lag phase of individuals and micropopulations that have survived mild heat treatment*” a International Journal of Food Microbiology y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, Almira Monís, Gonzalo D. García de Fernando.

---

*Martes*



Elsevier Editorial System(tm) for International Journal of Food Microbiology

Manuscript Draft

Manuscript Number: FOOD-D-12-00985

Title: Analysis of variability in the lag phase of individuals and micropopulations that have survived mild heat treatment.

Article Type: Full Length Article

Keywords: Microbial variability, heat shock, micropopulation, Poisson distribution, lag phase

Corresponding Author: Dr Gonzalo Garcia de Fernando.

Corresponding Author's Institution: Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense

First Author: Juan S Aguirre

Order of Authors: Juan S Aguirre; Almira Monis; Gonzalo Garcia de Fernando

Abstract: The effects of heat stress intensity on the duration of the lag phase have been studied in *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Salmonella* Enteritidis. Increasing the intensity of the stress treatment lengthened the lag phase of survivors and increased its variability. In addition, two lag phase distributions were calculated for surviving cells, one assuming that all growth came from single cells and another assuming that growth came from a Poisson distribution of survivors. The two distributions differed significantly in the absence of heat treatment, but not when heat treatment was applied. These findings suggest that the widespread assumption that growth of bacterial populations that have survived heat treatment starts from one cell per sample is appropriate when lag phases are long, but it can lead to significant error when growth conditions are optimal.



## **Analysis of variability in the lag phase of individuals and micropopulations that have survived mild heat treatment**

Juan S. Aguirre, Almira Monís, Gonzalo D. García de Fernando\*

Depto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, Madrid 28040, Spain.

\*Corresponding author. Tel. +34-91 3943744. Fax. +34-91 3943743. Email: [mingui@vet.ucm.es](mailto:mingui@vet.ucm.es) (G.D. Garcia de Fernando)

### **Abstract**

The effects of heat stress intensity on the duration of the lag phase have been studied in *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Salmonella* Enteritidis. Increasing the intensity of the stress treatment lengthened the lag phase of survivors and increased its variability. In addition, two lag phase distributions were calculated for surviving cells, one assuming that all growth came from single cells and another assuming that growth came from a Poisson distribution of survivors. The two distributions differed significantly in the absence of heat treatment, but not when heat treatment was applied. These findings suggest that the widespread assumption that growth of bacterial populations that have survived heat treatment starts from one cell per sample is appropriate when lag phases are long, but it can lead to significant error when growth conditions are optimal.

**Keywords:** Microbial variability, heat shock, micropopulation, Poisson distribution, lag phase

## 1. Introduction

The increasing interest in minimal food preservation processes may help maintain the nutritional value and sensorial properties of foods, but it may relegate microbial safety to a second level. The probability of finding a pathogen or spoiling organism is higher in minimally treated foods than in more aggressively treated ones. Therefore designing preservation methods that reduce the microbiological risk as much as possible without adversely affecting food quality is essential.

Optimizing food preservation methods and determining shelf-life depend on predicting the number of viable organisms that survive the preservation treatment and the length of their lag phase. Recent research suggests that the number and lag phase of surviving cells can be highly variable depending on the preservation treatment and the post-treatment growth conditions, and that taking this variation into account is critical for generating accurate predictions as part of quantitative microbial risk assessment (QMRA) (Metris et al., 2008; Aguirre et al., 2011). Using only the estimated population lag phase fails to account for growth of cells with shorter lag phases, increasing the likelihood that microbial risk will be underestimated (Malakar and Barker, 2009). Thus, single-cell lag phase variability should be taken into account when calculating microbial risk in manufactured foods.

The microbial lag phase reflects the time required for cells to adapt to a new environment and start duplicating. It depends on many factors, including any physical or chemical conditions of the growth environment as well as injuries to cells caused by heating, freezing, drying (Mackey and Kerridge, 1988), irradiation (Aguirre et al., 2011) and other preservation treatments (Robinson et al., 2001). These injuries considerably extend the lag phase and increase its variability (Muñoz et al., 2010). Lag phase is also influenced by the number of cells initiating growth (Augustin et al., 2000; Robinson et al., 2001; Gnanou Besse et al., 2006; Pin and Baranyi, 2006). In general, the smaller this inoculum is, the longer the lag phase, although other factors make smaller or larger contributions to the lag phase, such as the substrate, the intensity and the nature of the preservation treatment, the stages of the cell cycle in the population when the treatment is applied and, perhaps most importantly, the post-treatment storage temperature. Lag phase variability becomes more noticeable when a preservation treatment leaves only a small number of survivors that are then exposed to refrigeration temperatures (Augustin et al., 2000; Pascual et al., 2001), as in the case of some minimally processed foods. Robinson et

al. (2001) observed that, in media containing inhibitory concentrations of NaCl, both the mean lag phase and lag phase variability among replicate inocula increased with smaller inocula. Those authors identified two types of inoculum size effects on population lag phase: a cooperative or inhibitory effect of relatively high cell concentrations, and a statistical effect at low cell concentrations arising from the variability in individual lag times.

Increasing evidence indicates that, even in a homogeneous environment, individual cells show heterogeneity in how they deal with stress. This biological variability may be due to strain variability (Lianou et al., 2006) and/or intrinsic cellular variability in how individual cells respond to environmental conditions (Nauta, 2000). This intrinsic variability may reflect the fact that the physiological state of cells is affected by their previous environment and exposure to stress conditions (Robinson et al., 2001). In addition, a microbial population contains stress-resistant and -sensitive cells; this heterogeneity can be due to genotype (Noma et al., 2006) or to non-genotypic characteristics (Humpheson et al., 1998; Booth, 2002; Den Besten et al., 2006). This biological variability has been studied in the context of the number of viable bacteria after heat inactivation (Aguirre et al., 2009) and irradiation (Aguirre et al., 2011, 2012), as well as in the context of individual cell lag phases after acidification (Rasch et al., 2007), heating (Metris et al., 2008), osmotic stress (Niven et al., 2008) and irradiation (Aguirre et al., 2011, 2012).

Lag phase variability helps to explain why mathematic models of microbial growth usually estimate the specific growth rate accurately but lag time inaccurately. When a population contains thousands or even hundreds of viable cells, the lag phase is quite reproducible for the same pre-inoculation and growth conditions (Pin and Baranyi, 2006). However, the lag phase of populations comprising one or a few cells is inherently variable. Therefore numerous studies have developed and applied techniques to measure the distribution of single-cell lag times (Stephens et al., 1997; Francois et al., 2003a; Metris et al., 2003; Elfving et al., 2004; Guillier et al., 2005; D'Arrigo et al., 2006; Pin and Baranyi, 2006; Niven et al., 2008; Aguirre et al., 2011). These measurements require observing cells directly under the microscope (Elfving et al., 2004; Guillier et al., 2005; D'Arrigo et al., 2006; Pin and Baranyi, 2006; Niven et al., 2008) or isolating single cells (Swinnen et al., 2004), which can be achieved by diluting (Francois et al., 2003a), sorting by flow

cytometry (Smelt et al., 2002) or inactivating all organisms except one (Aguirre et al., 2011, 2012).

To estimate the lag phase of individual cells, growth is commonly assumed to come from one cell when growth is detected in a percentage of the total samples (Metris et al., 2006). Many authors determine the average number of cells per sample through the frequency distribution of the Poisson function and calculate the number of samples that, probably, contain no more than one cell to establish a limit, above which the distribution is not considered because there are too many samples with two or more cells and individual lag phase data would be too inaccurate. This approach is not ideal because it infers the reliability of lag phase distributions from growth of single-cell cultures, which does not accurately reflect reality. When a batch of identical samples is subjected to the same stress and growth is detected in a certain percentage of them after incubation, the Poisson distribution function indicates that a certain number of samples are more likely to contain one, two, three or more viable cells; these numbers depend on the percentage of samples showing growth (Table 1). The data in this table indicate that the lag phase determinations for individual cells will have a certain error if the percentage of having more than one cell is not taken into account. For this reason, the challenge to estimating lag phases more accurately is to model the numbers of samples with one, two, three or more survivors after preservation treatment. The problem is to know what samples within a batch, had one, two or three viable cells.

To address this problem, we assume that the sample with the shortest lag phase contains the highest number of cells, the sample with the second shorter lag contains the second higher number of cells, and so on, according to the predictions of the Poisson function. This assumption is based on the argument that larger inocula require fewer duplications (i.e. less time) to reach a certain number of cells ( $T_d$  or  $T_{count}$  in equation 1, see below). It is also based on the known variability of lag phases of individual cells (Stephens et al., 1997; Stringer et al., 2011; Aguirre et al., 2012), such that larger inocula are more likely to contain a fast-growing cell that initiates growth. Thus, the lag phase of larger inocula will be shorter and more homogeneous because of the fast-growing cell. This supposition is supported by Pin and Baranyi (2006), whose simulations of microbial growth predict that samples with a small initial number of cells will show longer mean lag times than those containing more cells. Taking these observations together allows us to propose that, based on the average number of cells per sample and the Poisson function

(Espejo et al., 2006), the sample with the shortest  $T_d$  or  $T_{count}$  is most likely to contain the highest number of cells, the sample with the second shortest  $T_d$  or  $T_{count}$  is most likely to contain the second highest number of cells, and so on. While this hypothesis remains probabilistic in that it can only describe the *most likely* number of cells in each sample, it would be a powerful tool in QMRA, which requires understanding how lag times of individual cells are distributed over a bacterial population. Such distributions can be used to predict the time required for a few cells, pathogenic or not, to multiply to a concentration sufficient to spoil or poison food (Baranyi et al., 2009).

To assess this hypothesis empirically, the effect of heat shock intensity on the length of the lag phase of surviving organisms was analyzed. Two lag phase distributions were calculated: one assuming that all samples contain one cell and another assuming that the number of cells per sample is given by the Poisson function, with the fastest-growing sample containing the highest number of cells, the second-fastest-growing sample containing the second-highest number of cells, and so on. These distributions were then compared for different conditions.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Bacterial strains and inoculum preparation

*Pseudomonas fluorescens* (CECT 378), *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (CECT 4300; ATCC 13076), *Listeria innocua* (CECT 910; NCTC 11288; ATCC 33090), and *Enterococcus faecalis* (LM24) were kept frozen (-20 °C) in tryptic soy broth (TSB, Pronadisa, Spain) supplemented with 20% glycerol. Strains were subcultured twice in sterile TSB and incubated at 37 °C for 24 h, with the exception of *P. fluorescens*, which was incubated at 25 °C for 36 h. Cell suspensions were then used to inoculate sterile whole milk (Asturiana, Asturias, Spain) and TSB.

### 2.2. Kinetic parameters

Decimal reduction times ( $D$  values) for each microorganism in whole milk were taken from Aguirre et al. (2009).  $D$  values in TSB were calculated following the method described by these authors using the Log Linear Regression add-in for Microsoft Excel (Table 2).

Maximum specific growth rates ( $\mu_{max}$ ) on TSB were estimated from turbidity growth curves at 18 °C for *E. faecalis* and 16 °C for *S. Enteritidis*, *L. innocua* and *P. fluorescens*. Three replicate experiments were done using an automated spectrophotometer (Bioscreen C, Labsystems, Helsinki, Finland), as described by McKellar and Hawke (2006). Serial five-fold dilutions of each 24-h culture were prepared in fresh TSB to obtain dilutions from approximately  $10^7$  to  $10^0$  cfu/ml. Twenty replicate samples (300  $\mu$ l) from each dilution were inoculated into wells of Bioscreen microplates (Labsystems). The plates were loaded into the Bioscreen C operated at the abovementioned temperatures; the equipment was kept in a temperature-controlled room. Optical density (OD) was determined at 15-min intervals using a wide-band filter at 420-580 nm; samples were shaken at medium intensity for 10 s prior to each measurement. Plates were incubated long enough for cultures to reach stationary phase. Dilutions of each initial inoculum were plated by spreading onto tryptic soy agar (TSA, Pronadisa, Spain) and incubated at 25 °C for 48 h for *P. fluorescens* or 37 °C for 24 h for the other organisms. Then colonies were counted with a digital colony counter-S (Mod 4905000, Selecta, Barcelona, Spain).

The time to detection ( $T_d$ ), defined as the time required to reach an OD of 0.20 units (equivalent to a concentration of *ca.*  $10^8$  cfu/ml) was obtained for each well, and a mean value was calculated for each dilution. The coefficient of determination ( $R^2$ ), standard error ( $SE$ ) and slope of the regression of mean  $T_d$  versus the natural logarithm of the inoculum density were obtained for each species using the Data Analysis Add-In of Microsoft Excel. The  $\mu_{max}$  was estimated from the reciprocal of the absolute value of the slope obtained from the regression.

Maximum growth rates in whole milk were estimated at 2 °C and 7 °C for *P. fluorescens* and at 7 °C for all other organisms in a cooled incubator (model FOC225I, Velp Scientifica, Usmate, Italy), according to the method of Aguirre et al. (2012).

In both TSB and milk,  $\mu_{max}$  was assumed to be constant throughout bacterial growth (Table 3).

### 2.3. Lag phase estimation

Lag times of individual cells and micropopulations surviving heat shocks in TSB were estimated from turbidity growth curves generated with the Bioscreen C, as described by several authors (Metris et al., 2003; Guillier et al., 2005; Aguirre et al., 2009). To do

this, tubes containing 9.9 ml of TSB were immersed in a temperature-controlled water bath (model TFB, Bunsen, Madrid, Spain) and allowed to reach the target inactivation temperature (Table 2), which was monitored with a thermocouple (Testo AG 720, Kirchzarten, Germany). Then the tubes were inoculated with 0.1 ml of the microbial suspensions described in section 2.1 to achieve initial loads from  $10^1$  to  $10^5$  cfu/ml. The samples were kept in the bath to achieve population reductions of 0-4 log, respectively. Once the heat shock was completed, the contents of the TSB tubes were mixed with 90 ml of cold TSB in a flask immersed in an ice-water bath; the flask was kept in this bath for 1 min in order to end the heat shock but minimize possible adverse effects of the cold. Aliquots (300  $\mu$ l) of this suspension were transferred to 100 wells of a Bioscreen microplate. The wells of a second microplate were filled with 300  $\mu$ l of a 1:10 dilution of the same suspension to ensure that a majority of wells on at least one of the microplates contained only one cell. The microplates were then incubated under the same conditions at which  $\mu_{max}$  was estimated in TSB (section 2.2).

OD was measured every 30 min for up to 2 weeks on the Bioscreen C using a wide-band filter at 420-580 nm; cultures were shaken for 10 s at medium intensity before each measurement. The following assumptions were made in order to estimate lag times of individual cells or micropopulations: (i) the distribution of detection time ( $T_d$ ) was a convolution of the distributions of lag time and initial cell number; (ii) lag time was defined as the time needed for a cell to generate two daughter cells; (iii) after the first division, cells grew immediately at the maximum growth rate; and (iv) cells continued to grow at the maximum rate even after turbidity became visible.

Lag times of individual cells or micropopulations were estimated according to the following equation (Baranyi and Pin, 1999):

$$lag = T_d - \frac{Ln(Nd) - Ln(N_0)}{\mu_{max}} \quad (1)$$

where  $T_d$  (detection time) is the time required for the OD at 420-580 nm to reach 0.20 units (equivalent to a concentration of *ca.*  $10^8$  cfu/ml),  $Nd$  is the bacterial number (cfu) at  $T_d$ ,  $N_0$  is the initial number of cells (cfu) per well under consideration, and  $\mu_{max}$  ( $h^{-1}$ ) is the maximum specific growth rate determined under the experimental conditions described in section 2.2.

To estimate the lag times of individual cells or micropopulations after heat treatment of milk, approximately 170 test tubes containing 9.9 ml of sterile whole milk were immersed in a water bath set at the target inactivation temperature (Table 2), then inoculated with 0.1 ml of the microorganism suspensions mentioned in section 2.1 to reach concentrations of *ca.*  $10^1$  to  $10^5$  cfu/ml. Tubes were kept in the bath in order to achieve population reductions of 0-4 log, respectively. Once the heat shock was completed, aliquots (100  $\mu$ l) from each tube were mixed with 900  $\mu$ l of sterile cold whole milk in Eppendorf tubes immersed in an ice-water bath; the Eppendorfs were kept in this bath for 1 min in order to end the heat shock but minimize the adverse effects of cold. A second 1:10 dilution was done to ensure that one batch contained, on average, less than one cell per Eppendorf. Finally, Eppendorfs were incubated at 2 °C and 7 °C in the case of *P. fluorescens* and at 7 °C in the case of all other organisms. To minimize error due to the high number of samples processed, the order of tubes was the same for inoculation and for sampling, and the time spent for inoculation was kept as close as possible to the time spent for sampling.

To estimate the lag phase in the Eppendorf milk cultures, growth was checked daily starting from the third day of incubation. Aliquots (100  $\mu$ l) of five randomly selected samples were plated in molten TSA and incubated at 25 °C for  $48 \pm 2$  h (*P. fluorescens*) or at 37 °C for  $36 \pm 2$  h (other organisms). When the cell number in any sample was found to be higher than  $10^3$  cfu, an appropriate dilution of the entire culture was plated onto TSA and incubated at the abovementioned temperatures; sampling times were recorded. Lag time was calculated from plate counts using eq. 1, in which  $T_d$  was substituted with  $T_{count}$ , defined as the time at which the food sample was plated out;  $Ln(N_d)$  was the natural logarithm of the cell number detected at time  $T_{count}$ ; and  $Ln(N_0)$  was the natural logarithm of the initial number of bacteria.

As a control for the average number of cells per well (TSB) or Eppendorf (milk) after heat shock and without heat shock, 300  $\mu$ l of TSB or 1 ml of milk were mixed with molten TSA in plates and incubated at 25 °C for  $48 \pm 2$  h (*P. fluorescens*) or at 37 °C for  $48 \pm 2$  h (other organisms). Approximately 20 plates were counted for each dilution and treatment.

#### 2.4. Estimation of average initial number of cells per sample ( $N_0$ ) according to the Poisson distribution

If all samples are assumed to contain one cell,  $N_0$  in eq. 1 becomes zero. However, since we know the percentage of samples with growth, the distribution of  $N_0$  can be estimated using the Poisson function, which gives the probability of finding one, two, three or more cells per sample (Table 1).

The distribution of the average initial number of cells per sample is estimated according to the Poisson distribution based on the probability of having one cell per well in samples showing growth (Baranyi et al., 2009). In this case,

$$m = - \ln P \quad (2)$$

where  $m$  is the average number of cells per sample and  $P$  is the probability of finding no growth in a sample. In our case, batches showing  $P$  values lower than 0.14 (14% of samples with no growth) or higher than 0.85 were discarded. When  $P$  is lower than 0.14, the average number of cells per sample is higher than 2 and single-cell lag phase estimates may be too inaccurate. When  $P$  is higher than 0.85, the data are insufficient to generate reliable frequency distributions.

Lag phase distributions were estimated for the same batch using two approaches. One approach, the same taken by many authors (Francois et al., 2005; D'Arrigo et al., 2006; Guillier and Augustin, 2006; Metris et al., 2006), assumes that growth is due to one cell in all samples showing growth. The second approach assumes that the sample with the shortest lag phase contains the highest number of cells, the sample with the second shortest lag contains the second highest number of cells, and so on, based on the average number of cells per sample and the Poisson distribution (Espejo et al., 2006).

#### 2.5. Statistical analysis

To find the best fit, a family of distributions was fitted to the experimental data using EasyFit 5.5 software (Mathware Technologies). The *chi*-square test was used to find the goodness of fit.

The probability density function ( $f(x)$ ) of a gamma distribution was estimated using Microsoft Excel and fitted to the data to calculate the lag phase distributions:

$$f(x) = \frac{\lambda e^{-\lambda x} (\lambda x)^{\kappa-1}}{\Gamma(\kappa)} \quad (3)$$

where  $x$  is the lag phase;  $f(x)$ , its relative frequency;  $\lambda$ , the rate;  $\kappa$ , the shape;  $e$ , the base of the natural logarithm; and  $\Gamma(\kappa)$ , the gamma function, calculated using the Microsoft Excel Function tool. The rate and shape, which were used to characterize the gamma distribution, were calculated from the experimental mean and variance ( $Sd$ ) using the equations:

$$\lambda = \frac{mean}{variance} \quad (4)$$

$$k = \lambda * mean \quad (5)$$

The equation 3 can also be used replacing the rate by the scale ( $\theta$ ), defined as

$$\theta = 1/\lambda, \quad (6)$$

Finally, in order to identify differences in the lag phase distributions calculated using the two approaches described above, variances in the distributions were compared using a permutation test, as described by Aguirre et al. (2011).

### 3. Results

#### 3.1. Kinetic parameters ( $D$ and $\mu_{max}$ values)

Experimental  $D$  values are shown in Table 2. Bacteria in whole milk were more heat-resistant than those in TSB. Gram-positive bacteria showed greater  $D$  values than Gram-negative bacteria. The most heat-resistant species was *E. faecalis*, while *P. fluorescens* was the most heat-sensitive.

**Table 1.** Percentage of samples with a given number of cells, as predicted by the Poisson function

% of samples with growth	Average no. of cells/sample	No. of cells per sample							
		0	1	2	3	4	5	6	7
85	1.90	15	28	27	17	8	3	1	0
75	1.40	25	35	24	11	4	1	0	0
65	1.05	35	37	19	7	2	0	0	0
55	0.80	45	36	14	4	1	0	0	0
45	0.60	55	33	10	2	0	0	0	0
35	0.43	65	28	6	1	0	0	0	0
25	0.29	75	22	3	0	0	0	0	0
15	0.16	85	14	1	0	0	0	0	0

**Table 2.**  $D$  values used to predict the inactivation necessary to obtain an average of one viable cell per ml of milk in an Eppendorf or per 300  $\mu$ l of tryptic soy broth in a Bioscreen microplate.  $D$  values in milk were taken from Aguirre et al. (2009)

Bacterium	Growth conditions	$D$ value	$R^2$ (min)	$SE$
<i>Enterococcus faecalis</i>	Milk 61 °C	18.5	0.94	0.009
	TSB 61 °C	6.3	0.93	0.022
<i>Listeria innocua</i>	Milk 54 °C	13.7	0.95	0.010
	TSB 54 °C	7.4	0.97	0.013
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Milk 51 °C	12.3	0.94	0.012
	TSB 51 °C	10.9	0.97	0.017
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Milk 49 °C	8.0	0.93	0.010
	TSB 49 °C	6.7	0.92	0.016

$R^2$ . Coefficient of determination

$SE$ . Standard error of  $D$  value

Comparison of  $\mu_{max}$  values for the different organisms (Table 3) showed that *P. fluorescens* grew fastest both in TSB at 16 °C and in milk at 7 °C, reflecting its psychrotrophic character. The growth rates of the other three species in milk at 7 °C varied as follows: *L. innocua* > *E. faecalis* > *S. Enteritidis*. Growth in TSB at 16 °C was also faster for *L. innocua* than for *S. Enteritidis*.

**Table 3.** Maximum specific growth rate of selected organisms experimentally calculated in milk and tryptic soy broth and used to estimate the lag phases shown in Table 2

Bacterium	Growth conditions	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$R^2$	$SE$
<i>Enterococcus faecalis</i>	Milk, 7 °C	0.045	0.98	0.002
	TSB, 18 °C	0.409	0.99	0.080
<i>Listeria innocua</i>	Milk, 7 °C	0.084	0.96	0.009
	TSB, 16 °C	0.312	0.99	0.051
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Milk, 7 °C	0.031	0.97	0.002
	TSB, 16 °C	0.252	0.99	0.078
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Milk, 2 °C	0.072	0.87	0.016
	Milk, 7 °C	0.166	0.96	0.015
	TSB, 16 °C	0.449	0.99	0.061

$\mu_{max}$ . Maximum specific growth rate

$R^2$ . Coefficient of determination

$SE$ . Standard error of  $\mu_{max}$

### 3.2. Lag phase variability after heat treatment

Table 4 shows lag phases of surviving individual cells or micropopulations after different heat treatments assuming either 1 cell per sample uniformly or a Poisson distribution of cells per sample. The mean, *Sd* and *CV* of lag phases of individual cells or micropopulations were calculated from data obtained with 100-150 milk samples and 100 TSB samples per batch. The mean number of viable cells per sample ranged from 0.46 to 1.43. Lag phases of survivors were shorter and less variable in TSB than in milk after the same microbicidal treatment, primarily because of the difference in incubation temperature. Under all conditions, untreated cells showed the shortest lag time and the smallest *Sd* for lag time. Increasing the intensity of the inactivation treatment lengthened the mean lag phase and increased the *Sd* proportionally (Table 4); as a result, the plot of lag time *CV* versus inactivation degree tended to be parallel to the *x*-axis (data not shown). Various types of distribution, including log-normal, normal, and gamma, were applied to the experimental data (data not shown). The gamma distribution showed the highest goodness of fit, as determined using the chi-squared test, under nearly all conditions. Furthermore, the skewness of the distributions was usually positive, indicating that the tail was longer on the right side than the left side, with most values lying to the left of the mean. This is the typical shape of gamma distributions, characterized by  $\kappa > 1$  (Table 4).

**Table 4.** Lag phase of viable individual cells or micropopulations after different heat shock treatments in milk or tryptic soy broth (TSB).

Bacterium	Growth conditions	Expected no. of log reductions	Total no. of samples	no. of samples with growth	Average no. of cells per sample <sup>a</sup>	Estimated assuming 1 cell per sample				Estimated assuming a Poisson distribution for cell number per sample			
						Mean lag phase (h)	Sd (h)	CV (%)	Skewness	Mean lag phase (h)	Sd (h)	CV (%)	Skewness
<i>Enterococcus faecalis</i>	Milk, 7 °C	0.0	120	75	0.97	128.3	5.3	4.1	0.32	136.0	6.3	4.6	0.16
		2.0	120	75	0.97	206.0	19.3	9.4	1.30	213.7	14.0	6.6	2.36
		3.0	123	70	0.84	308.0	27.8	9.0	1.26	314.4	22.9	7.3	1.84
		4.0	133	72	0.78	390.2	37.5	9.6	0.42	396.2	31.2	7.9	0.91
	TSB, 18 °C	0.0	100	74	1.35	6.0	2.2	37.6	0.43	7.1	1.4	19.4	1.08
		2.0	100	73	1.31	19.7	4.7	24.0	0.29	20.8	3.9	18.1	0.87
		3.0	100	68	1.14	40.5	9.8	24.3	-0.45	41.4	8.9	21.4	-0.36
		4.0	100	70	1.20	63.6	19.0	29.8	1.04	64.7	18.1	28.1	1.15
<i>Listeria innocua</i>	Milk, 7 °C	0.0	115	75	1.05	131.8	7.5	5.7	0.57	136.3	5.2	3.8	1.47
		2.0	120	85	1.24	212.0	23.5	11.1	-1.38	217.2	20.7	9.5	-1.98
		3.0	118	79	1.11	312.1	31.9	10.2	-1.19	316.7	27.1	8.5	-1.22
		4.0	137	96	1.20	384.7	39.0	10.1	-0.45	389.8	34.7	8.9	-0.32
	TSB, 16 °C	0.0	100	54	0.78	24.9	4.7	18.9	0.26	25.8	3.8	14.9	0.70
		2.0	100	54	0.78	52.6	12.6	23.9	0.04	53.4	11.7	21.9	0.12
		3.0	100	67	1.11	70.5	16.5	23.4	0.23	71.7	15.3	21.3	0.30
		4.0	100	65	1.05	123.9	21.3	17.2	0.01	125.1	20.0	16.0	0.06
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Milk, 7 °C	0.0	105	71	1.14	70.9	10.5	14.8	0.24	76.5	6.1	8.0	1.53
		1.0	100	64	1.02	96.3	19.6	20.3	0.55	101.2	15.2	15.0	1.35
		2.0	120	74	0.97	143.4	23.7	16.5	0.58	148.1	19.5	3.1	1.22
		3.0	110	60	0.80	195.7	34.3	17.5	-0.15	199.6	29.7	14.9	0.13
	TSB, 16 °C	0.0	100	68	1.14	43.3	3.9	8.9	0.66	45.8	2.6	5.7	0.36
		1.0	100	72	1.27	58.2	9.7	16.6	1.84	60.9	8.0	13.1	2.61
		2.0	135	93	1.17	76.8	15.7	20.4	1.71	79.5	14.0	17.6	2.19
		3.0	150	99	1.08	131.9	21.8	16.5	0.05	134.4	19.6	14.5	0.21
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Milk, 7 °C	0.0	100	60	0.92	138.7	11.7	8.4	0.16	148.8	7.8	5.3	0.14
		2.0	109	63	0.87	239.0	36.7	15.4	0.34	248.6	27.7	11.2	0.75
		3.0	133	74	0.82	323.9	51.7	16.0	0.40	332.9	42.6	12.8	0.75
		4.0	120	61	0.71	418.3	61.4	14.7	0.00	426.3	52.2	12.2	0.29
	TSB, 16 °C	0.0	100	49	0.67	34.5	3.9	11.3	0.80	35.4	3.1	8.8	1.53
		1.0	100	44	0.58	57.8	10.0	17.3	1.63	58.6	9.4	16.0	1.88
		2.0	100	73	1.31	80.3	12.2	15.1	0.59	82.0	10.6	13.0	0.88
		3.0	100	37	0.46	100.0	17.4	17.4	1.03	100.6	16.7	16.6	1.19

Sd, Standard deviation

CV, Coefficient of variation (%) ( $100 \times Sd / \text{mean}$ )

<sup>a</sup> Calculated from Poisson distribution tables [30]

Parameters characterizing the probability density function of a gamma distribution are shown in Table 5.

**Table 5.** Parameters of the gamma distributions of lag phases fitted to the experimental data according to eq. 3.

Bacterium	Growth conditions	Expected no. of log reductions	Estimated assuming 1 cell per sample		Estimated assuming a Poisson distribution for cell number per sample	
			Shape ( $\kappa$ )	Scale ( $\theta$ )	Shape ( $\kappa$ )	Scale ( $\theta$ )
<i>Enterococcus faecalis</i>	Milk, 7 °C	0.0	595.2	0.22	467.8	0.29
		2.0	114.3	1.80	231.8	0.92
		3.0	123.2	2.50	188.3	1.67
		4.0	108.0	3.61	160.9	2.46
	TSB, 18 °C	0.0	7.1	0.84	26.6	0.27
		2.0	17.3	1.14	28.2	0.74
		3.0	16.9	2.39	21.9	1.89
		4.0	11.2	5.67	12.7	5.09
<i>Listeria innocua</i>	Milk, 7 °C	0.0	308.7	0.43	688.4	0.20
		2.0	81.5	2.60	110.1	1.97
		3.0	95.7	3.26	136.9	2.31
		4.0	97.4	3.95	126.2	3.09
	TSB, 16 °C	0.0	27.9	0.89	45.1	0.57
		2.0	17.4	3.02	20.9	2.55
		3.0	18.3	3.85	22.0	3.27
		4.0	33.9	3.66	38.9	3.21
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Milk, 2 °C	0.0	45.9	1.55	157.2	0.49
		1.0	24.2	3.97	44.2	2.29
		2.0	36.6	3.92	57.9	2.56
		3.0	32.6	6.01	45.1	4.43
	Milk, 7 °C	0.0	125.0	0.35	321.5	0.15
		1.0	36.3	1.60	58.0	1.05
		2.0	23.9	3.21	32.4	2.45
		3.0	36.6	3.60	47.3	2.84
	TSB, 16 °C	0.0	6.4	0.92	20.2	0.34
		1.0	9.2	2.24	10.9	1.95
		2.0	5.7	6.10	6.5	5.48
		3.0	8.3	7.05	9.2	6.44
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Milk, 7 °C	0.0	141.7	0.98	359.5	0.41
		2.0	42.3	5.64	80.4	3.09
		3.0	39.2	8.25	61.1	5.45
		4.0	46.5	9.00	66.8	6.38
	TSB, 16 °C	0.0	78.3	0.44	130.1	0.27
		1.0	33.6	1.72	39.0	1.50
		2.0	43.7	1.84	59.5	1.38
		3.0	33.1	3.02	36.4	2.77

Table 6 shows linear regression equations relating the  $S_d$  of the mean lag phases of individual cells or micropopulations to the log reduction achieved by the heat treatment.

Coefficients of determination of the regression were practically the same for TSB and milk, and for the assumption of one cell per sample or of a Poisson distribution.

**Table 6.** Equations of regression lines relating the standard deviations (*Sd*) of the lag phases of individual cells or micropopulations (*y* for samples assuming an inoculum of 1 cell or *z* for inoculum estimated by a Poisson distribution) with the log reductions applied (*x*). The corresponding coefficients of determination ( $R^2$ ) are shown.

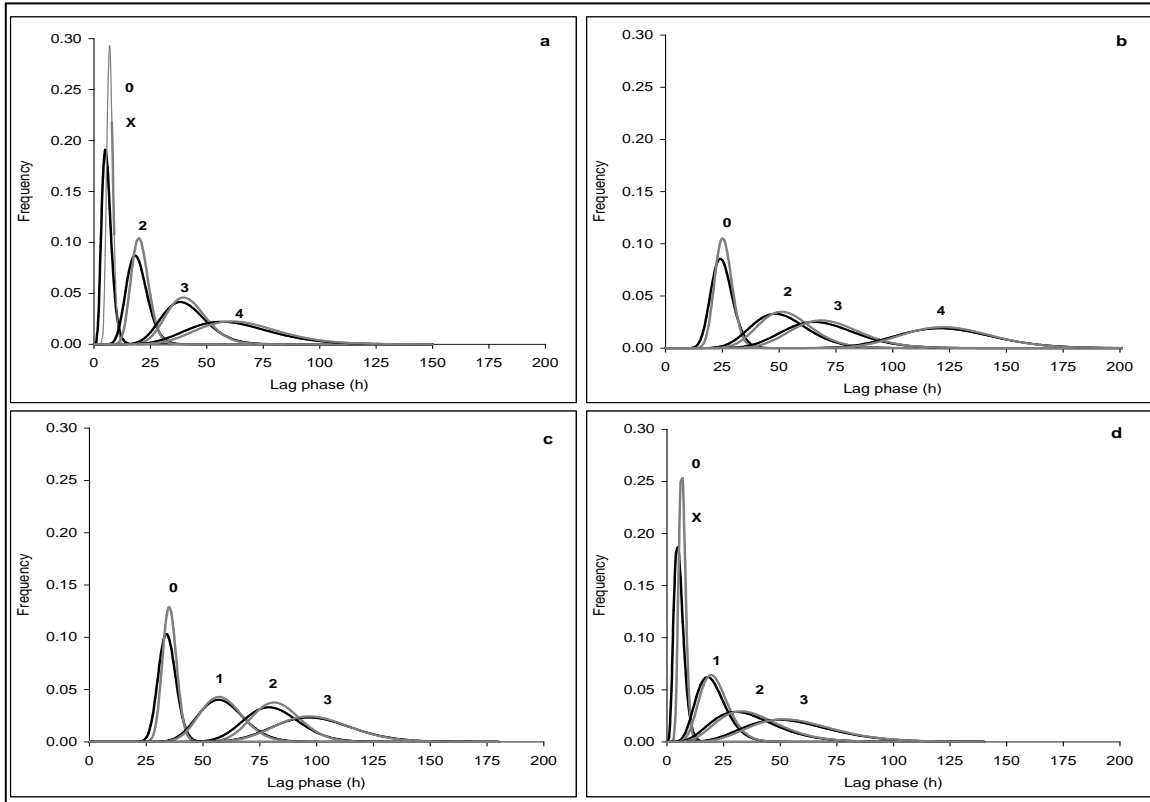
Organism	Medium	Temp. (°C)	Lag phase <i>Sd</i> assuming 1 cell per sample vs. Inactivation		Lag phase <i>Sd</i> assuming a Poisson distribution for cell per sample vs. Inactivation	
			Equation	$R^2$	Equation	$R^2$
<i>Enterococcus faecalis</i>	Milk	7	$y = 7.9842x + 4.490$	0.99	$z = 6.1934x + 4.6841$	0.96
	TSB	18	$y = 3.9309x + 0.1089$	0.85	$z = 3.9229x - 0.7574$	0.84
<i>Listeria innocua</i>	Milk	7	$y = 7.9312x + 7.6205$	0.99	$z = 7.333x + 5.417$	0.99
	TSB	16	$y = 4.0963x + 4.5585$	0.99	$z = 3.9991x + 3.7164$	0.99
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Milk	2	$y = 7.562x + 10.662$	0.98	$z = 7.5133x + 6.3573$	0.98
	Milk	7	$y = 5.982x + 3.7845$	0.99	$z = 5.6846x + 2.4971$	0.99
	TSB	16	$y = 6.1552x + 1.7537$	0.99	$z = 6.1465x + 1.1405$	0.99
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Milk	7	$y = 12.66x + 11.877$	0.99	$z = 11.274x + 7.2175$	0.99
	TSB	16	$y = 4.2588x + 4.4608$	0.97	$z = 4.1977x + 3.6517$	0.95

**Table 7.** Comparison of the two distributions of lag phases of individual cells or micropopulations using the permutation test. The same letter in a column means that the two distributions were not significantly different ( $p > 0.05$ ). Identical results were obtained by assuming 1 cell per sample or a Poisson distribution of the inoculum.

Expected no. of log reductions	TSB				
	<i>E. faecalis</i> 18 °C	<i>L. innocua</i> 16 °C	<i>S. Enteritidis</i> 16 °C	<i>Ps. fluorescens</i> 16 °C	
0	a	a	a	a	
1			b	b	
2	b	b	bc	c	
3	c	b	c	c	
4	d	c			
Expected no. of log reductions	Milk				
	<i>E. faecalis</i> 7 °C	<i>L. innocua</i> 7 °C	<i>S. Enteritidis</i> 7 °C	<i>Ps. fluorescens</i> 2 °C	<i>Ps. fluorescens</i> 7 °C
0	a	a	a	a	a
1				b	b
2	b	b	b	b	b
3	c	c	c	c	c
4	d	c	c		

Figures 1-3 show the estimated gamma distributions of lag phases of individual cells or micropopulations in whole milk or TSB after different heat shocks, assuming either one

cell per sample or a Poisson distribution of the inoculum. These figures were obtained by applying equations 3-5 to the experimental data. Permutation testing revealed significant differences ( $p < 0.05$ ) in lag phase variance between unheated and heated samples in all cases (Table 7). Significant differences were observed between some heat-treated samples, but the differences did not show any clear dependence on species or medium.

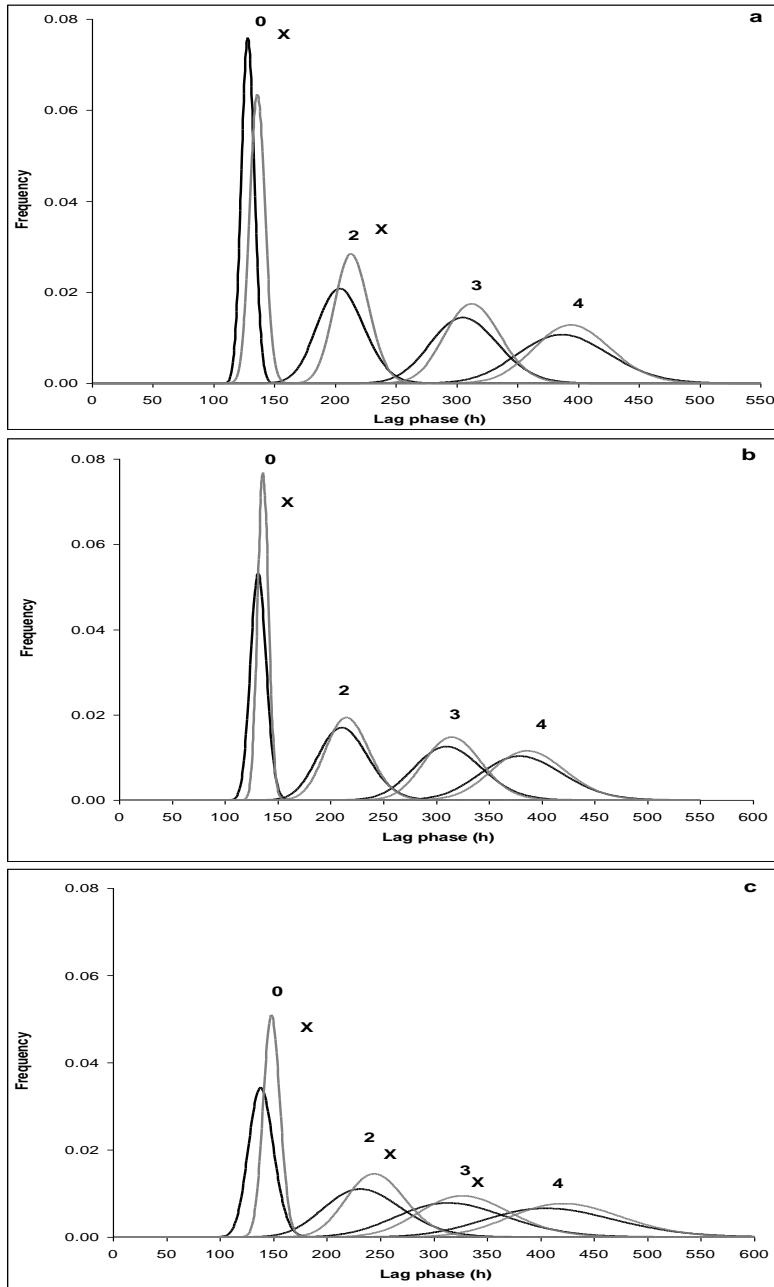


**Figure 1.** Distributions of lag times of viable bacteria in tryptic soy broth (TSB) assuming an inoculum of 1 cell per well with growth (bold line) or assuming a Poisson distribution of cell number per well with growth (grey line). Bacteria were subjected to different heat shock treatments to achieve the indicated number of logarithmic reductions, then allowed to grow at 18 °C in the case of *Enterococcus faecalis* (a) or at 16 °C in the case of *Listeria innocua* (b), *Salmonella* Enteritidis (c) and *Pseudomonas fluorescens* (d). Variances of distributions labelled with an "x" are significantly different ( $p < 0.05$ ) by the permutation test.

### 3.3. Accuracy of inoculum size $N_0$

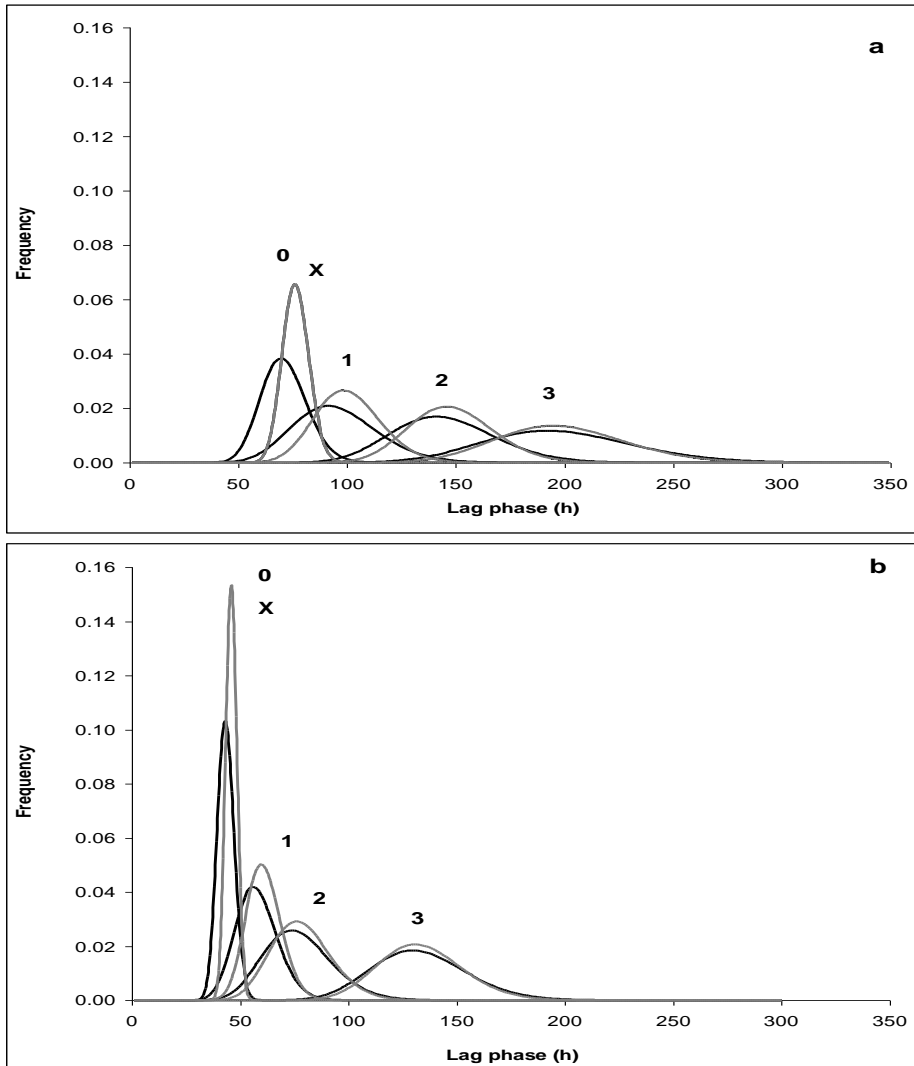
According to the Poisson distribution, when the average number of cells per sample is 1.43 (the maximum value in this study, Table 4), the probability of finding a sample with no viable cells is 0.24, while the probability of finding a sample with one viable cell is 0.34; two cells, 0.24; three cells, 0.12; four cells, 0.04; and five cells, 0.01. When this distribution was applied to these samples following the assumptions outlined in section

2.4, the estimated mean lag phases were 18% longer and had a 34% smaller *Sd* than the lag phases estimated by assuming one cell per sample, reflecting relevant differences in the accuracy of the estimated mean lag phase and its *Sd*. In contrast, when the average number of cells per sample was 0.46 (the minimum in this study, Table 4), the probability of finding a sample with no viable cells was 0.63; one cell, 0.29; two cells, 0.07; and three cells, 0.01. Using this Poisson distribution of inocula gave a mean lag phase that was 0.62% longer and an *Sd* that was 4% smaller than the assumption of one cell per sample.



**Figure 2.** Distributions of lag times of viable bacteria in whole milk assuming an inoculum of 1 cell per sample with growth (bold line) or assuming a Poisson distribution of cell number per sample with growth (grey line). *Enterococcus faecalis* (a), *Listeria innocua* (b), and *Salmonella Enteritidis* (c) were subjected to different heat shock

treatments to achieve the indicated number of logarithmic reductions, then allowed to grow at 7 °C. Variances of distributions labelled with letter x are significantly different ( $p<0.05$ ) by the permutation test.

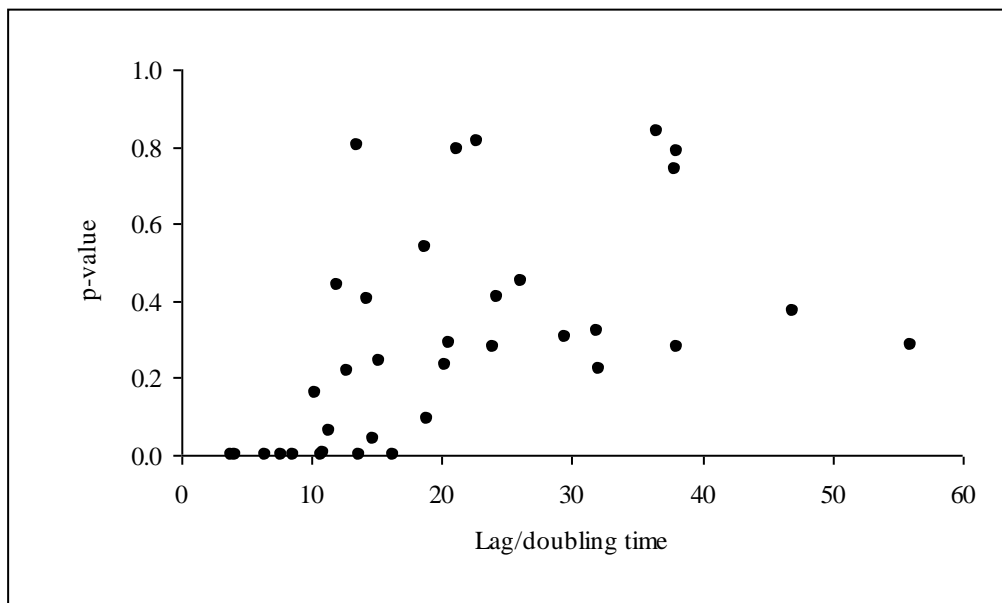


**Figure 3.** Distributions of lag times of viable bacteria in whole milk assuming an inoculum of 1 cell per sample with growth (bold line) or assuming a Poisson distribution of cell number per sample with growth (grey line). *Pseudomonas fluorescens* was subjected to different heat shock treatments to achieve the indicated number of logarithmic reductions, then allowed to grow at 2 °C (a) or 7 °C (b). Variances of distributions labelled with letter x are significantly different ( $p<0.05$ ) by the permutation test.

The lag phase distributions calculated using an assumption of either one cell per sample or a Poisson distribution differed significantly only under certain conditions. At higher growth temperatures (in TSB), the distributions differed for unheated samples of *E. faecalis* at 18 °C (Figure 1A) and *Ps. fluorescens* at 16 °C (Figure 1D). At lower growth temperatures (in milk), the two distributions showed significant differences for *Ps.*

*fluorescens* grown at 2 °C and for *Ps. fluorescens*, *E. faecalis*, *L. innocua* and *S. Enteritidis* grown at 7 °C (Figures 2 and 3).

Figure 4 illustrates, for all of the microorganisms studied, the relationship between the ratio of mean lag phase to doubling time ( $Dt$ ) on one hand, to the  $p$  value of the permutation test comparing the two lag phase distributions estimated by assuming one cell per sample or a Poisson distribution. Lag phases were taken from Table 4 and  $Dt$  values were estimated from the  $\mu_{max}$  values in Table 3. The two distributions showed significantly different variances ( $p < 0.05$ ) whenever the ratio of lag time to  $Dt$  was below 10. A survey of several studies in which the authors estimated lag phases by assuming one cell per sample shows that this ratio is often below 10 (Table 8), raising the possibility that those studies would have obtained significantly different results if the distribution of survivors had been modelled using a Poisson distribution.



**Figure 4.** Effect of the ratio of mean lag phase to doubling time on the  $p$ -value describing the comparison of lag phase distributions estimated by assuming either one cell per sample or a Poisson distribution of cell number per sample. Results are shown for all four bacteria tested. Lag phases were taken from Table 3, and doubling times were estimated from  $\mu_{max}$  values in Table 2.

**Table 8.** Survey of literature showing the ratio of average lag phase assuming 1 cell per sample to doubling time. Grey boxes indicate experiments in which the ratio of mean lag phase to doubling time is below 10. Based on the present study, the lag phases for these experiments are likely to be significantly different if estimated assuming a Poisson distribution of the cell number per sample.

Source	Organism	Growth conditions	Lag phase (h)	Doubling time (Dt), (h)	Lag / Dt
Guillier et al. (2006)	<i>Listeria monocytogenes</i>	TSB, 30°C, pH 7.1	4.2	0.77	5.43
			12.2	0.77	15.83
			2.2	0.77	2.79
			5.7	0.77	7.38
			7.4	0.77	9.62
			16.2	0.77	20.98
			6.1	0.77	7.96
			14.1	0.77	18.35
			2.9	0.77	3.75
			10.7	0.77	13.83
			13.7	0.77	17.79
11.7	0.77	15.13			
D'Arrigo et al. (2006)	<i>Listeria innocua</i>	Paté, 15°C	73.8	3.85	19.17
			61.7	3.85	16.03
			138.8	3.85	36.05
			140.1	3.85	36.39
		Dairy dessert, 4°C	175.2	26.76	6.55
			206.7	26.76	7.73
TSB, 19°C, pH 7.1	238.6	26.76	8.92		
	7.3	1.58	4.60		
			6.8	1.58	4.30
Guillier et al. (2005)	<i>Listeria monocytogenes</i>	TSB, 30°C, pH 7.1	2.0	0.77	2.53
			7.6	0.77	9.83
			11.6	0.77	15.04
			15.1	0.77	19.62
Aguirre et al. (2011)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Cooked ham, 7°C	59.8	16.90	3.54
			109.6	16.90	6.48
			226.9	16.90	13.42
		TSB, 18°C, pH 7.1	6.1	1.69	3.59
			13.3	1.69	7.85
			30.8	1.69	18.20
	<i>Listeria innocua</i>	Cooked ham, 7°C	229.7	10.33	22.24
			285.3	10.33	27.62
			371.5	10.33	35.97
		TSB, 16°C, pH 7.1	24.9	2.22	11.20
			46.4	2.22	20.88
			57.0	2.22	25.60
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cooked ham, 2°C	89.3	14.56	6.13
			114.1	14.56	7.84
			210.8	14.56	14.48
			382.7	14.56	26.29
		Cooked ham, 7°C	48.6	6.83	7.11
			59.9	6.83	8.76
127.6			6.83	18.67	
271.8			6.83	39.78	
TSB, 16°C, pH 7.1		4.3	1.54	2.78	
		35.1	1.54	22.76	
		45.1	1.54	29.19	
		61.2	1.54	39.65	
<i>Salmonella enterica</i> serovar. Enteritidis	Cooked ham, 7°C	265.4	22.87	11.60	
		306.3	22.87	13.39	
		433.2	22.87	18.94	
	TSB, 16°C, pH 7.1	34.5	2.75	12.53	
		89.8	2.75	32.62	
		150.1	2.75	54.54	

#### 4. Discussion

This study set out to determine the variability in the lag phases of individual cells or micropopulations of *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Salmonella* Enteritidis after different heat shocks. As the treatments became more stressful, the variability increased, potentially leading to undesirable safety outcomes in food production processes.

Heat inactivation of bacteria follows first-order kinetics, and our  $D$  values (Table 2) are similar to those previously reported for all four organisms (Chaudhary et al., 1960; Mayerhofer et al., 1973; Sanz et al., 1982; Cabeza et al., 2004; Mackey et al., 2006; Miller et al., 2006). Our maximum specific growth rates (Table 3) are similar to those reported by other researchers (Raykova et al., 2008; Combase, 2011).

Lag estimation (eq. 1) is very sensitive to growth rate. A slight error in the  $\mu_{max}$  estimation may cause considerable error in the lag phase because the term

$$\frac{\text{Ln}(Nd) - \text{Ln}(N_0)}{\mu_{max}}$$

in eq. 1, corresponding to the time that one cell spends in generating more than 20 generations to reach the detection absorbance, is very sensitive to  $\mu_{max}$ . If the doubling time of a cell is  $\text{Ln } 2/\mu_{max}$ , the time to reach 20 generations is  $20 \text{ Ln } 2/\mu_{max}$ . Thus, the error in estimating the  $\mu_{max}$  from the slope of the regression of the exponential phase is multiplied by a factor of 20 when estimating the lag phase using eq. 1. These considerations apply to lag phase estimation not only in TSB but also in milk, although in milk, the number of generations at  $T_{count}$  is usually smaller and so the error in estimated lag is less amplified. Thus good lag estimates depend on accurate  $\mu_{max}$  estimates.

Though the growth kinetics in this study depended on the bacterial species and the intensity of the heat treatment, lag phase variability did not depend either on species or heating temperature. It did, however, depend on the intensity of the heat treatment and the subsequent growth temperature. Thus, more intense heating stress led to longer and more variable lag phases (Table 4). Other factors also affect the length and variability of the lag phase; for example, less favourable growth conditions lengthen the lag, and cultures containing only a few cells show longer and more variable lag times than those containing more cells (Pin and Baranyi, 2006).

Table 5 shows the shapes and scales of the gamma distributions fitted to our experimental data; scale and shape are the two parameters that fundamentally characterize such distributions. A distribution with a shape close to zero is close to an exponential curve, while a shape higher than one indicates that the distribution has a maximum; the larger the shape is, the more the distribution is spread out and displaced to the right. Conversely, the smaller the scale ( $\theta$ , eq. 6) is, the narrower the distribution is. In our study, as the heat treatment intensity increased, the scale also increased, i.e. the distributions became more spread out (Table 5). This indicates that the lag phases of cells that survive very stressful conditions are more variable than those of cells subjected to no or mild stress.

Comparison of the lag phase distributions generated either by assuming one cell per sample or by assuming a Poisson distribution showed that in all but one case, scale was smaller when a Poisson distribution of survivors was assumed. This was expected, given the wide distributions obtained when one cell per sample was assumed. However, the scale was not smaller for a Poisson assumption in the case of untreated *E. faecalis* growing in milk at 7 °C because the *CV* of the distribution assuming a single growing cell was smaller than that of a Poisson distribution of survivors (Table 4).

Substrate also influences lag phase variability. As expected, the variability was greater in the more complex milk substrate than in TSB.

Several other studies of lag phase variability under different circumstances are in agreement with our findings. For instance, sublethal heating of *Lactobacillus plantarum* increased both the mean and standard deviation of the lag time distribution (Smelt et al., 2002). Likewise, the *Sd* of individual *E. coli* O157:H7 lag times increased after treatment with acid or heat or after starvation (Li et al., 2006). *E. coli* cells stressed either by heating at 50 °C or by exposure to high NaCl concentrations showed an increase in the time to first division and in the spread of the lag phase distributions; this spread was proportional to the mean division time (Niven et al., 2008). Mean lag phases and their variability increased in individual *L. innocua* (Kutalik et al., 2005) and *L. monocytogenes* cells as stress levels rose (Francois et al., 2006). On the other hand, not all stresses have the same consequences on mean lag phase and lag standard deviation. Guillier et al. (2005) measured mean lag phases and their variability in *L. monocytogenes* subjected to nine stresses resulting in the same inactivation degree of -1.5 log cfu/ml. The length of the lag phase and its variability depended on the type of stress as follows: HCl < lactic acid ~

NaOH ~ cold < starvation ~ NaCl ~ chlorine < heat ~ benzalkonium chloride (BAC). Nevertheless, for all stresses, the longer the mean lag phase was, the greater was the variability in the lag phase.

*CV* values ( $100 * Sd / \text{mean}$ ) in the present study ranged from 4 to 40%, primarily due to differences in growth temperature (Table 4). At refrigeration temperatures (2-7 °C), *CV* values were smaller than those at 16-18 °C because the lower the temperature was, the longer the lag phase was. Nevertheless, *Sd* was always higher at 2-7 °C than at 16-18 °C. This suggests that the shortening of the lag phase at moderate temperatures disguises the increase in *Sd*. Guillier et al. (2005) observed that using heat stress to reduce a population of *L. monocytogenes* by 1.5 log cycles induced a *CV* in the lag phase at 30 °C of *ca.* 18%, a value lower than that expected based on the data reported here. In support of the idea that growth conditions can affect *CV*, (Metris et al., 2003) found *CV* to range from 5 to 10% as the growth conditions in TSB at 30 °C became less favourable, i.e. when the pH was shifted from 4.5 to 7.0 and the NaCl concentration was increased from 0.5 to 8%. In all the studies cited here, the variability of individual lag times increases as microorganisms are injured or as growth conditions become less favourable.

Studies have provided molecular insights into why individuals of the same strain can vary in their stress resistance and adaptability. In response to heat treatments, cells synthesize heat shock proteins (HSPs), which stabilize cellular structures against the physical action of heat and aid in the proteolysis or refolding of denatured proteins (Hassani et al., 2007). At the same time, heat promotes the interaction of low-molecular-weight components and divalent cations in the medium with components on the cell surface, thereby stabilizing the outer membrane of the cell and increasing its heat tolerance (Manas et al., 2001). This has been described for *Salmonella* Seftenberg cells. Based on these studies, an organism will be more or less thermo-tolerant depending on how many HSPs are synthesized or on how many stabilizing interactions occur between membrane components and cations and other molecules in the medium. These differences determine the extent of heat damage as well as the time to recovery (Montville and Matthews, 2005), both of which affect the lag phase. In addition, the pH of the medium can affect cell adaptability to heat. New protein synthesis is needed for cells to become more heat-resistant, and such synthesis may be inhibited in an acidic environment (Lund et al., 2000).

Different strains can differ in lag phase behavior due to genetic diversity. However, marked heterogeneity occurs even between individual cells within a clonal population

(Guillier et al., 2005), with this heterogeneity appearing as differences in, for example, intracellular pH (Rechinger and Siegumfeldt, 2002) and cell morphology (Rowan and Anderson, 1998).

Physiological factors have also been proposed to affect lag phase variability, though they have been difficult to define (Swinnen et al., 2004). One interesting hypothesis is that the lag phase duration is determined by the amount and speed of the work that the cell must perform in order to restore a physiological state that allows it to multiply (Robinson et al., 1998). This hypothesis is supported by studies with *Bacillus licheniformis*, in which cells with more alkaline intracellular pH started growing before those with a more acidic intracellular environment (Hornbaek et al., 2002). According to the hypothesis, the “work” needed to start bacterial division consisted of neutralizing the intracellular pH. Variability is doubtless a consequence of many other physiological differences between “sisters, brothers or other genetically related cells”, and this deserves deeper investigation.

Stephens et al. (1997) have suggested another factor to explain lag phase variability. Their study of *Salmonella* spp. lag phases after heat treatment led them to attribute the variability to the fact that the cells were in different stages of the cell cycle when they were exposed to heat. They reasoned that large cells at the end of the cell cycle should have a different heat resistance from that of small cells that have just formed, giving rise to different lag phases for the surviving cells. To reduce the contribution of this cell cycle asynchrony to lag phase variability, we incubated the inocula for 24 h under optimal conditions in order for all cells to reach stationary phase.

A key finding in the present study is that lag phase estimates differed significantly depending on whether they were generated by assuming that growth is due to one survivor cell or by assuming that growth comes from a Poisson distribution of survivors. These differences were observed mainly in unheated cells grown at low temperature or in cells subjected to mild heat treatment (Figures 1-3). These differences are likely due to the relationship between the lag phase duration and the values of  $\mu_{max}$  and doubling time ( $Dt$ ) (Figure 4). The smaller the ratio of lag time to  $Dt$  was, the more likely it was that two lag phase distributions differed significantly. In other words, the frequent assumption of considering one survivor cell per sample, although more cells are present in certain percentages of samples, does not generate noticeable error in the estimated lag when the ratio of lag phase to  $Dt$  is high. Our data suggest a "cut-off" value of 10 for this ratio (Figure 4); below this value, the two distributions always differed significantly in the

present study. Analysis of several other studies in which the authors modelled lag phases by assuming one cell per sample (Table 8) indicates that numerous experiments were conducted at ratios below the cut-off value. This suggests that some lag phases reported in the literature would look quite different if they were calculated using the Poisson distribution approach that we describe here.

The greater the number of cells per sample is, the larger the difference between the mean and standard deviation of both lag phase distributions (Table 4). These results confirm the statement by Baranyi et al. (2009) that errors in individual cell lag phases should be larger when the number of cells per sample increases. They also indicate that the mean lag phase was higher, and the *Sd* lower, when a Poisson distribution was assumed than when a single cell was assumed. Furthermore, the percent discrepancy between the mean lag phases was greater for shorter lag phases. This means that the frequent assumption that all growth derives from single survivor cells leads to an appreciable percent discrepancy when lag phases are short, such as when growth conditions are optimal or the cells are untreated. In contrast, when cells are injured or grown under suboptimal conditions, the percent discrepancy may be small or even negligible (Table 4). Nevertheless, if inocula with more than one cell are used to estimate the lag phase of organisms in samples with and without growth, then error will result based on the arguments advanced above, i.e. one cell may have a short lag phase that may even be shorter than that of a micropopulation of two cells with medium or long lag phases, even though that single cell must undergo one more duplication than two cells in order to generate the same number of daughters. In any event, this error should be lower than that due to calculating the lag phase assuming that all samples contain just one cell.

The present study and previous work on the variability in the lag phase of surviving cells (Aguirre et al., 2012), together with previous work on variability in the numbers of survivors (Aguirre et al., 2009, 2011, 2012), indicate that these parameters are as essential to QMRA as are other, better-studied factors, like preservation treatments, storage conditions, and type of food product.

## Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the support of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (projects AGL-2010-16598 and Consolider CSD20072007-0016). We thank Armando Chapin Rodríguez for assistance with manuscript writing.

## References

- Aguirre, J.S., Ordoñez, J.A., Garcia de Fernando, G.D., 2012. A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of *Bacillus cereus* inactivation and lag phase duration of surviving cells. *International Journal of Food Microbiology* 153, 444-452.
- Aguirre, J.S., Pin, C., Rodriguez, M.R., Garcia de Fernando, G.D., 2009. Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6992-6997.
- Aguirre, J.S., Rodriguez, M.R., Garcia de Fernando, G.D., 2011. 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* 149, 236-246.
- Augustin, J.C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V., 2000. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1706-1710.
- Baranyi, J., George, S.M., Kotalik, Z., 2009. Parameter estimation for the distribution of single cell lag times. *Journal of Theoretical Biology* 259, 24-30.
- Baranyi, J., Pin, C., 1999. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 732-736.
- Booth, I.R., 2002. Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology* 78, 19-30.
- Cabeza, M.C., Ordonez, J.A., Cambero, I., de la Hoz, L., Garcia, M.L., 2004. Effect of thermoultrasonication on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in distilled water and intact shell eggs. *J Food Prot* 67, 1886-1891.
- Combase. 2011. <http://www.combase.cc/index.php/en/combase-browser>.
- Chaudhary, R.A., Tuckey, S.L., Witter, L.D., 1960. Heat resistance of three strains of psychrotrophic organisms added to skim milk for cottage cheese manufacture. *Journal of Dairy Science* 43, 1174-1182.
- D'Arrigo, M., Garcia de Fernando, G.D., Velasco de Diego, R., Ordonez, J.A., George, S.M., Pin, C., 2006. Indirect measurement of the lag time distribution of single cells of *Listeria innocua* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2533-2538.
- Den Besten, H.M., Mataragas, M., Moezelaar, R., Abee, T., Zwietering, M.H., 2006. Quantification of the effects of salt stress and physiological state on thermotolerance of *Bacillus cereus* ATCC 10987 and ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5884-5894.
- Elfving, A., LeMarc, Y., Baranyi, J., Ballagi, A., 2004. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 675-678.
- Espejo, I., Fernández, F., López, M.A., Muñoz, M., Rodríguez, A.M., Sánchez, A., Valero, C., 2006. *Estadística descriptiva y probabilidad* (3rd ed.), Cadiz, Spain.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2005. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 100, 41-53.
- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2003a. Modelling the individual cell lag phase. Isolating single cells: protocol development. *Letter of Applied Microbiology* 37, 26-30.
- Francois, K., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., Debevere, J., 2006. Risk assessment of *Listeria monocytogenes*: impact of individual cell variability on the exposure assessment step. *Risk Analysis* 26, 105-114.
- Gnanou Besse, N., Audinet, N., Barre, L., Cauquil, A., Cornu, M., Colin, P., 2006. Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structured media. *International Journal of Food Microbiology* 110, 43-51.
- Guillier, L., Augustin, J.C., 2006. Modelling the individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state and the growth conditions. *International Journal of Food Microbiology* 111, 241-251.
- Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.C., 2005. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2940-2948.

- Hassani, M., Manas, P., Pagan, R., Condon, S., 2007. Effect of a previous heat shock on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pHs. *International Journal of Food Microbiology* 116, 228-238.
- Hornbaek, T., Dynesen, J., Jakobsen, M., 2002. Use of fluorescence ratio imaging microscopy and flow cytometry for estimation of cell vitality for *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters* 215, 261-265.
- Humpheson, L., Adams, M.R., Anderson, W.A., Cole, M.B., 1998. Biphasic thermal inactivation kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 459-464.
- Kutalik, Z., Razaz, M., Elfwing, A., Ballagi, A., Baranyi, J., 2005. Stochastic modelling of individual cell growth using flow chamber microscopy images. *International Journal of Food Microbiology* 105, 177-190.
- Li, Y., Odumeru, J.A., Griffiths, M., McKellar, R.C., 2006. Effect of environmental stresses on the mean and distribution of individual cell lag times of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 110, 278-285.
- Lianou, A., Stopforth, J.D., Yoon, Y., Wiedmann, M., Sofos, J.N., 2006. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *Journal of Food Protection* 69, 2640-2647.
- Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W., 2000. *Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Mackey, B.M., Kelly, A.F., Colvin, J.A., Robbins, P.T., Fryer, P.J., 2006. Predicting the thermal inactivation of bacteria in a solid matrix: simulation studies on the relative effects of microbial thermal resistance parameters and process conditions. *International Journal of Food Microbiology* 107, 295-303.
- Mackey, B.M., Kerridge, A.L., 1988. The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of salmonellae in minced beef. *International Journal of Food Microbiology* 6, 57-65.
- Malakar, P.K., Barker, G.C., 2009. Estimating risk from small inocula by using population growth parameters. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6399-6401.
- Manas, P., Pagan, R., Sala, F.J., Condon, S., 2001. Low molecular weight milk whey components protect *Salmonella senftenberg* 775W against heat by a mechanism involving divalent cations. *Journal of Applied Microbiology* 91, 871-877.
- Mayerhofer, H.J., Marshall, R.T., White, C.H., Lu, M., 1973. Characterization of a heat stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P26. *Applied Microbiology* 25, 44-48.
- McKellar, R.C., Hawke, A., 2006. Assessment of distributions for fitting lag times of individual cells in bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology* 106, 169-175.
- Metris, A., George, S.M., Baranyi, J., 2006. Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6674-6679.
- Metris, A., George, S.M., Mackey, B.M., Baranyi, J., 2008. Modeling the variability of single-cell lag times for *Listeria innocua* populations after sublethal and lethal heat treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6949-6955.
- Metris, A., George, S.M., Peck, M.W., Baranyi, J., 2003. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal of Microbiological Methods* 55, 821-827.
- Miller, F.A., Brandao, T.R., Teixeira, P., Silva, C.L., 2006. Recovery of heat-injured *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology* 112, 261-265.
- Montville, T.J., Matthews, K.R., 2005. Spores and their significance. *Food microbiology: An introduction* Montville and K.R. Matthews (eds). ASM Press, Washington, D.C. E.E.U.U.
- Muñoz, M., Guevara, L., Palop, A., Fernandez, P.S., 2010. Prediction of time to growth of *Listeria monocytogenes* using Monte Carlo simulation or regression analysis, influenced by sublethal heat and recovery conditions. *Food Microbiology* 27, 468-475.
- Nauta, M.J., 2000. Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *International Journal of Food Microbiology* 57, 9-18.
- Niven, G.W., Morton, J.S., Fuks, T., Mackey, B.M., 2008. Influence of environmental stress on distributions of times to first division in *Escherichia coli* populations, as determined by digital-image analysis of individual cells. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3757-3763.
- Noma, S., Kajiyama, D., Igura, N., Shimoda, M., Hayakawa, I., 2006. Mechanisms behind tailing in the pressure inactivation curve of a clinical isolate of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 109, 103-108.
- Pascual, C., Robinson, T.P., Ocio, M.J., Aboaba, O.O., Mackey, B.M., 2001. The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. *Letters in Applied Microbiology* 33, 357-361.
- Pin, C., Baranyi, J., 2006. Kinetics of single cells: observation and modeling of a stochastic process. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2163-2169.

- Raykova, D., Peykov, S., Dimov, S. 2008. Growth kinetics and bacteriocin production by three *Enterococcus* strains under low-temperature stress. *Trakia Journal of Sciences*, 6 (1), 49-53.
- Rasch, M., Metris, A., Baranyi, J., Bjorn Budde, B., 2007. The effect of reuterin on the lag time of single cells of *Listeria innocua* grown on a solid agar surface at different pH and NaCl concentrations. *International Journal of Food Microbiology* 113, 35-40.
- Rechinger, K.B., Siegumfeldt, H., 2002. Rapid assessment of cell viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by measurement of intracellular pH in individual cells using fluorescence ratio imaging microscopy. *International Journal of Food Microbiology* 75, 53-60.
- Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J., Mackey, B.M., 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 70, 163-173.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M., 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 44, 83-92.
- Rowan, N.J., Anderson, J.G., 1998. Effects of above-optimum growth temperature and cell morphology on thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells suspended in bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2065-2071.
- Sanz, B., Lopez, P., Garcia, L.M., Hernandez, P., Ordoñez, J.A., 1982. Heat resistance of enterococci. *Milchwissenschaft* 37, 724-726.
- Smelt, J.P., Otten, G.D., Bos, A.P., 2002. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology* 73, 207-212.
- Stephens, P.J., Joynson, J.A., Davies, K.W., Holbrook, R., Lappin-Scott, H.M., Humphrey, T.J., 1997. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *Journal of Applied Microbiology* 83, 445-455.
- Stringer, S.C., Webb, M.D., Peck, M.W., 2011. Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. *Food Microbiology* 28, 228-235.
- Swinnen, I.A., Bernaerts, K., Dens, E.J., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 137-159.

## ARTÍCULO N° 3

---

Variabilidad de la inactivación por calor de *Listeria innocua* en diferentes fases del crecimiento.

Manuscrito enviado con el título “*Variability of heat inactivation of Listeria innocua at different stages of growth*” a Brazilian Journal of Microbiology y cuyos autores son Mauricio Herrera, **Juan S. Aguirre**, María Rosa Rodríguez, Fernando Aguado, Maria del Rosario Abraham, Gonzalo D. García de Fernando.

---

*Miércoles*



BJM - Brazilian Journal of Microbiology

Manuscript Draft

Manuscript Number: BJM-6560

Title: Variability of heat inactivation of *Listeria innocua* at different stages of growth

Article Type: Full Length Article.

Keywords: inactivation, *Listeria innocua*, variability

Corresponding Author: Gonzalo Garcia de Fernando M.

Corresponding Author's Institution: Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.

First Author: Mauricio Herrera P.

First Author's Institution: Department of Food Engineering, Universidad de Guanajuato, México

Order of Authors: Mauricio Herrera P., Juan S. Aguirre G., M<sup>a</sup> Rosa Rodríguez V., Fernando Aguado C., M<sup>a</sup> del Rosario Abraham J., Gonzalo D. García de Fernando M.

Status: In review

Initiated: 2012-04-22

Abstract: This study analyzes the thermal inactivation of *Listeria innocua* during different phases of growth, since the variability of microbial behavior poses a significant challenge to the prediction and control of bacterial growth in the food industry. This work identifies the growth phase of *L. innocua* as one source of variability in the heat resistance of a homogeneous microbial population. Bacterial batches of 60 replicates were grown to stationary or exponential phase and then heated at 54 °C for 7 min or 21 min. Control batches were not heat-treated. Survivors were counted, and the distributions were statistically analyzed using the program VariFit. *L. innocua* batches were more heat-resistant during stationary phase than during exponential phase. Moreover, the level of inactivation variability was directly proportional to the intensity of the heat treatment. In other words, the more intense the heat treatment was, the fewer organisms survived and the number of survivors in different batches was more variable. However, the variability also depended on growth phase: inactivation variability was



## VARIABILITY OF HEAT INACTIVATION OF *LISTERIA INNOCUA* AT DIFFERENT STAGES OF GROWTH

Mauricio Herrera P.<sup>1</sup>, Juan S. Aguirre G.<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Rosa Rodríguez V.<sup>2</sup>, Fernando Aguado C.<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> del Rosario Abraham J.<sup>1</sup>, Gonzalo D. García de Fernando M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Ingeniería de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato Salamanca, Universidad de Guanajuato, Ex hacienda El Copal, Km. 9, Carr. Irapuato-Silao, Apdo. Postal 311, C.P 36500, Irapuato Guanajuato, México

<sup>2</sup>Depto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, C.P., 28040 Madrid, Spain.

\*Corresponding author: [m.herrerapantoja@ugto.mx](mailto:m.herrerapantoja@ugto.mx)

### ABSTRACT

This study analyzes the thermal inactivation of *Listeria innocua* during different phases of growth, since the variability of microbial behavior poses a significant challenge to the prediction and control of bacterial growth in the food industry. This work identifies the growth phase of *L. innocua* as one source of variability in the heat resistance of a homogeneous microbial population. Bacterial batches of 60 replicates were grown to stationary or exponential phase and then heated at 54 °C for 7 min or 21 min. Control batches were not heat-treated. Survivors were counted, and the distributions were statistically analyzed using the program VariFit. *L. innocua* batches were more heat-resistant during stationary phase than during exponential phase. Moreover, the level of inactivation variability was directly proportional to the intensity of the heat treatment. In other words, the more intense the heat treatment was, the fewer organisms survived and the number of survivors in different batches was more variable. However, the variability also depended on growth phase: inactivation variability was less during stationary phase than during the exponential phase.

**Key words:** inactivation, *Listeria innocua*, variability

## INTRODUCTION

The demand for minimally processed foods is increasing because consumers find their sensory properties and nutritional value to be superior to those of highly processed foods. However, minimally processed foods are preserved using less intensive treatments than conventionally treated products, making them more likely to support microbial growth (1). In fact, the microbiological quality and shelf life of food depends on several factors: microbiological quality of the raw materials, preservation treatments used, and the ability of microbiota that survive the preservation treatment to grow under the storage conditions.

The preservation treatments routinely applied to many food products, including pasteurization, do not guarantee the total destruction of microorganisms. Nevertheless, safety and monitoring measures voluntarily adopted by industry or legislated by government guarantee the safety of processed foods. In fact, much of the progress in developing minimally processed foods has been made possible by the implementation of emerging preservation technologies and their combination with traditional ones, which has minimized the impact of preservation on the organoleptic and nutritious value of foods, while still ensuring their microbiological safety (2).

A food-borne pathogen of particular concern in minimally processed foods is *Listeria monocytogenes*. Although listeriosis can occur in apparently healthy people, certain groups are particularly sensitive: infants, women in gestation, since listeriosis can induce abortion or infect the baby during delivery; the elderly; and the immunocompromised. Fortunately, listeriosis has a low incidence and occurs only when the individual has been infected with a sufficiently high dose of a virulent strain. This ubiquitous bacterium is a Gram-positive, facultative anaerobe, and it can multiply in a wide temperature range from 0 to 42 °C, although it grows optimally between 30 and 37 °C. It is remarkably heat-resistant, only slightly less so than *Mycobacterium tuberculosis* and *Coxiella burnetii*. Despite its ubiquity, its concentration in foods is usually low. Nevertheless, the high mortality of this disease and its presence in contaminated food means that it should be eliminated completely from processed food products, and this is indeed the stipulation of U.S. regulations.

Research to understand microbial behavior often neglects the problem of variability: not all microorganisms behave similarly, even when they are genetically identical. Some cells are more heat-resistant than others; some multiply earlier or later than others (4, 5). This variability poses a challenge to food preservation techniques. Inactivation variability has been demonstrated in various microorganisms, including *L. innocua*, which is a nonpathogenic surrogate of *L. monocytogenes*, following treatment by acidification (6), heat (1) and irradiation with accelerated electrons (2). In fact, even the lag phase of clonal organisms shows variability (1, 2 and 3). To make maintaining food microbiological quality even more challenging, growth variability increases when growing conditions are far from optimal or when the population has been subjected to inactivation or stresses such as occur during food preservation. Thus, members of the same microbial population do not act uniformly under the same conditions or circumstances, and this variability increases during food preservation and storage.

Researchers have yet to understand the full extent of the variability of microbial growth and inactivation. For example, while it is known that microbial resistance to inactivation is higher in the stationary phase than during exponential growth (7), whether the *variability* in microbial resistance also depends on growth phase is unknown. To address this question, the present study analyzed the effect of growth phase (physiological state) of *L. innocua* on the variability of its heat inactivation. These results should provide a useful model to the food industry for improving the microbiological quality of its products, and they may help improve the accuracy of microbial inactivation models. Such improvements may prove especially useful in the production of minimally processed food products.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Microorganism**

*Listeria innocua* (CECT 910, NCTC 11288, ATCC 33090). Culture Media: Tryptic Soy Agar (TSA) for general counting; Palcam agar, which is selective for *Listeria* spp.; tryptic soy broth (TSB) for revitalization and growth; and saline solution (0.75% NaCl) for sample dilution and heat treatments.

### **Strain and inoculum preparation**

*Listeria innocua* was maintained at -20 °C. Bacteria was reactivated by subculturing twice sequentially in TSB at 37 °C for 24 h. Then an aliquot was taken and suspended in the same medium, and incubated at 6, 12, 24 and 72 h at 37 °C to obtain microorganisms in stationary and exponential phases. Aliquots in different growth phases were suspended in sterile saline solution and subjected to different heat treatments.

### **Heat treatment**

Cultures in stationary and exponential phases were inactivated by heating at 54 °C for 0, 7, or 21 min. Heating times were chosen in order to reduce the microbial population by 0, 1 or 3 log units, based on an estimated *D* value of 7 min for *L. innocua* in saline solution at 54 °C (1). The culture not heated at 54 °C was incubated instead at 37 °C for the same time as the heat-treated samples.

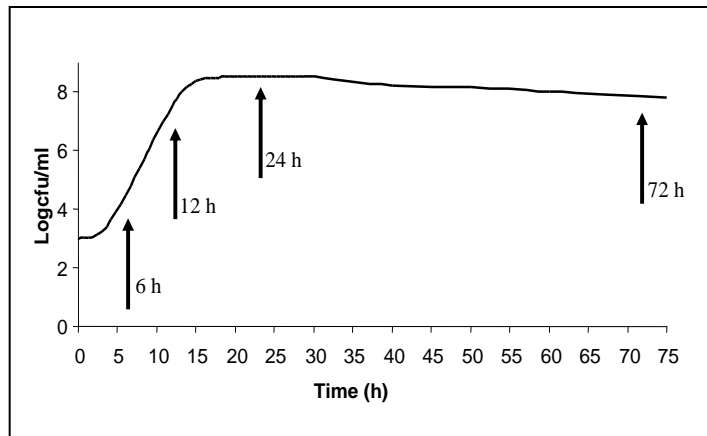
Each heat treatment was applied to a batch of 60 tubes containing 4.5 ml of sterile saline mixed with 0.5 ml of *L. innocua* suspension. When the heat treatment was complete, an aliquot of 0.1 ml was removed from each tube and mixed with 0.9 ml of cold sterile saline solution, and this was placed in an ice-water bath to stop the inactivation treatment. Viable organisms were determined by plate count on TSA after incubation at 37 °C for 48 h.

### **Data analysis**

Data analysis and statistical tests were carried out using the Microsoft Excel add-in “Varifit,” developed by the computational microbiology team at the Institute of Food Research (Norwich, United Kingdom).

## RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the growth curve of *L. innocua* in TSB at 37 °C. The maximum specific growth rate was 0.508 h<sup>-1</sup>, which gives a doubling time of 44 min, a rate consistent with the conditions of temperature and growth substrate. Figure 1 also shows when samples were collected for analysis of microbial thermal resistance. Samples were collected at 6 h, which corresponded to the first part of the exponential phase; 12 h, in the middle of the logarithmic phase (12 h), when cells were multiplying more rapidly; and 24 h, when the exponential phase was finishing and the culture was entering the stationary phase. Another sample was collected at 72 h, in full stationary phase. Culture aliquots collected at each of these times were suspended in saline solution and subjected to heat treatments at 54 °C for 0, 7 or 21 min. These treatments were designed to achieve reductions of 0, 1 and 3 log cycles.



**Figure 1.** Growth curve of *Listeria innocua* at 37 °C in TSB. Arrows indicate when samples were collected for analysis of bacterial thermal resistance.

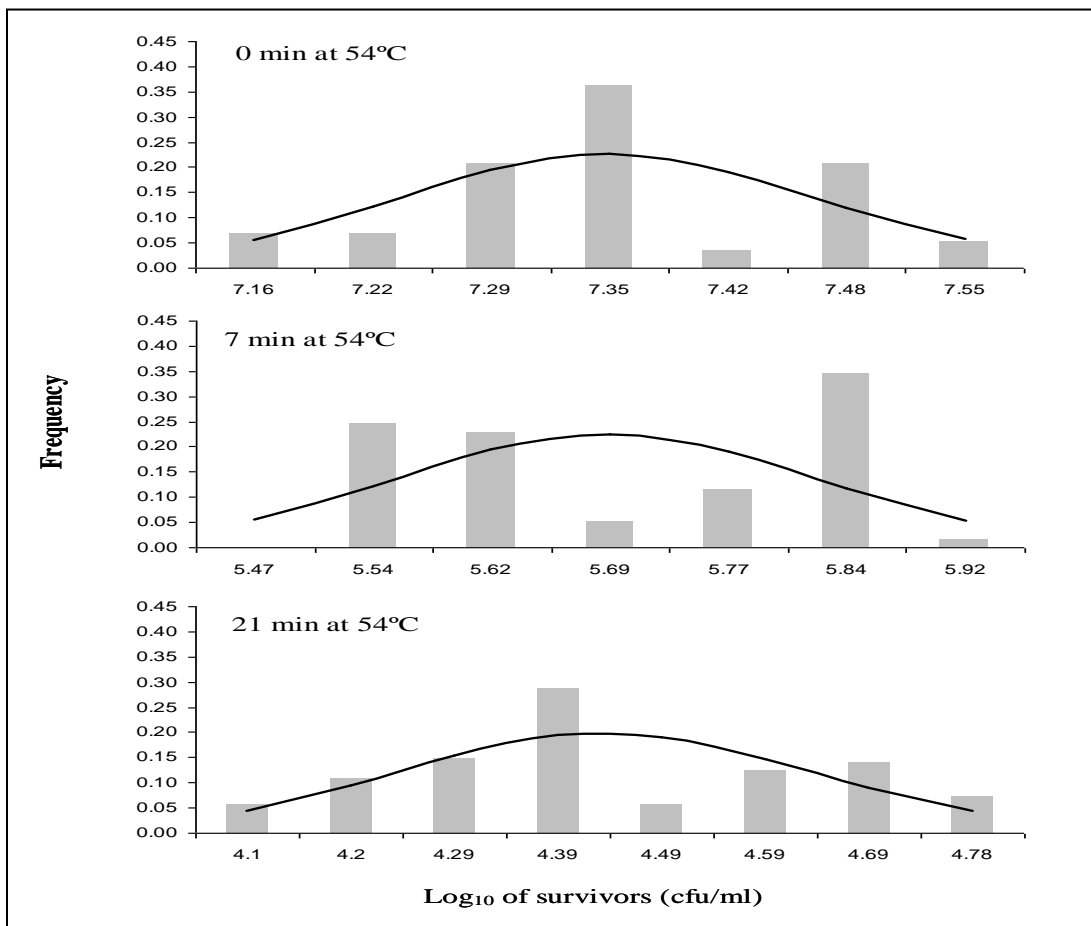
Table 1 shows the *D* values obtained during the different growth phases of *L. innocua*. These results confirm that microorganisms in stationary phase are more heat-resistant than those growing exponentially. This makes sense, because as other authors have suggested, the physiological state during exponential growth is compromised due to the constant multiplication (7); during exponential growth, the population is doubling every 44 min.

**Table 1.** Heat resistance of *L. innocua* at 54°C in saline solution (0.75%).

Growth phase (h)	<i>D</i> value (min.)	Standard error
6	6.17	3.83E-02
12	7.12	2.53E-02
24	7.55	3.65E-02
72	8.40	1.35E-05

Inactivation treatments of three durations (0, 7, and 21 min) were carried out with batches of 60 identical samples each in order to analyze whether the variability of inactivation depends on inactivation intensity. When *L. innocua* was cultured at 37 °C for 24 h and then subjected to the three heat treatments, the frequency distributions of survivor numbers showed roughly normal distributions (Figure 2).

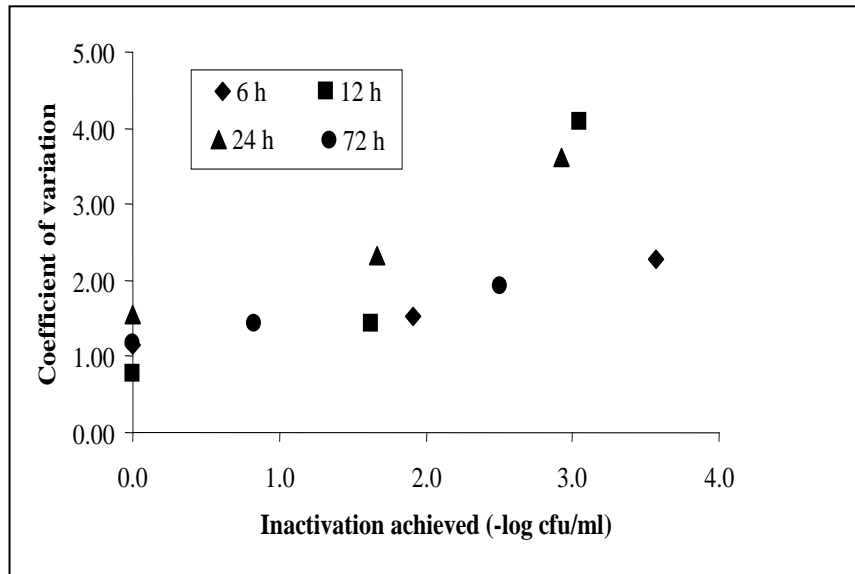
Distributions obtained when cultures were grown at 37 °C for 6, 12 and 72 h and then heat-treated were similar to those in Figure 2 (data not shown). As the heat treatment became more intense, the number of survivors decreased, but the distribution widened. In other words, the more intense the treatment was, the fewer organisms survived and the variability in this number increased. This is illustrated in Figure 3, which shows the coefficient of variation (*CV*) of survivor number as a function of inactivation degree. *CV* is the standard deviation multiplied by 100 and divided by the mean of the distribution. This parameter expresses variability as a percentage of the mean and so provides a better measure of variability than does standard deviation alone.



**Figure 2.** Adjusted frequency distributions of the number of viable organisms after different heat treatments. *L. innocua* was grown for 24 h in TSB at 37 °C, then subjected to heat treatment at 54 °C for the indicated lengths of time. Distributions were generated using VariFit.

The findings in Figure 3 are consistent with results reported by other authors on *L. innocua* and other microorganisms inactivated by acidification (6), heat (1) or irradiation (3).

Inactivation variability was greater when cells were growing at a maximum rate (at 12 h at 37 °C) and when they had reached the end of the exponential phase (24 h), whereas it was lowest when cells were in stationary phase (Figure 3). Heat resistance was maximal in stationary phase (Table 1). It was lower at the beginning of the exponential phase than at other sampling times, though the inactivation variability at the beginning of the exponential phase was similar to that of the stationary phase.



**Figure 3.** Variability in heat inactivation of *L. innocua* at 54 °C when the bacteria were in different physiological states along the growth curve. Samples were taken from a 37 °C culture at different times to capture cells at different stages of growth (exponential phase, 6, 12 and 24 h; stationary phase, 72 h). The samples were mixed with saline solution and subjected to heat treatments of different intensity. The coefficient of variation was calculated by multiplying the standard deviation of the distribution by 100 and dividing by the mean.

For various reasons, this study did not examine microbial behavior during the lag phase. During this phase, bacteria adapt to the new environmental and their physiological state should be the same as during the exponential or stationary phase, depending on when the bacteria were moved into the new environment. Moreover, the number of microorganisms that a sample must contain to yield viable counts after a treatment decreasing the population in 3 log units is very high, inconsistent with a reasonable microbial concentration in lag phase. Therefore, given the difficulty of having a microbial concentration compatible with a lag phase and a treatment decreasing the population in 999 parts out of 1000 and that the physiological state of this phase should be similar to that of microorganisms that can be detected in exponential or stationary phase, we chose not to analyze the variability of the inactivation of bacteria in lag phase.

In conclusion, the present study demonstrates that *L. innocua* cells in exponential phase are less heat-resistant than those in stationary phase. Furthermore, inactivation variability in these cells is greater in the middle of the exponential growth phase than during other phases.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministry of Education and Science of Spain (projects AGL-2010-16598 and CONSOLIDER-CSD20070016). We thank Guanajuato University for financing the stay of Mauricio Herrera at Complutense University of Madrid, Spain.

## REFERENCES

1. Aguirre, J.S.; Pin, C.; Rodríguez, M.R.; García Fernando, G.D. (2009). Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, (22): 6992-6997.
2. Aguirre, J.S.; Rodríguez, M. R.; García Fernando, G.D. (2011a). Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a tratamientos conservantes de los alimentos, En: J.A Ordoñez, J.J. Córdoba, J. Ventanas (eds.). *Productos Cárnicos para el Siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables.* Universidad de Extremadura, Cáceres, p. 215 - 219.
3. Aguirre, J.S.; Rodríguez, M. R.; García Fernando, G.D. (2011b). Effects of electron beam irradiation on variability of the number of survivors and on duration of lag phase of four food-borne organisms. *Int. J. Food Microbiol* 149: 236-246.
4. Guillier, L.; Pardon, P.; Augustin, J.C. (2005). Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2940–2948.
5. Pin, C.; Baranyi, J. (2008). Single-cell and population lag times as a function of cell age. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2534-2536.
6. Rodríguez, M.R.; Aguirre, J.S.; García de Fernando, G.D. (2007). Variabilidad de la inactivación de *Listeria innocua* mediante acidificación. VI Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas, Madrid, Spain.
7. Mackey, B.M. (2000). Injured bacteria. En: Lund BM, Baird-Parker A, Gould GW (eds.). *The microbiological safety and quality of food.* Aspen Pub. Gaithersburg, Maryland, USA, p. 315-341.



## ARTÍCULO N° 4

---

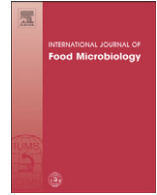
Efecto de los electrones acelerados sobre la variabilidad del número de supervivientes y duración de la fase de latencia de cuatro microorganismos en alimentos.

Artículo publicado bajo el título “*Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms*” en International Journal of Food Microbiology (2011) 149, 236-246 y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, Maria Rosa Rodriguez, Gonzalo D. García de Fernando.

---

*Jueves*





## Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms

Juan S. Aguirre, María R. Rodríguez, Gonzalo D. García de Fernando\*

Depto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, Madrid 28040, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 October 2010

Received in revised form 12 April 2011

Accepted 3 July 2011

Available online 13 July 2011

#### Keywords:

Microbial variability

Inactivation

Lag phase

Electron beam irradiation

Ham

### ABSTRACT

The effect of electron beam irradiation on microbial inactivation and duration of lag time of individual surviving cells of *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Salmonella* Enteritidis has been studied. In addition, the data on variability in microbial inactivation and duration of lag phase for surviving microbes have been fitted by normal and gamma distributions, respectively. The standard deviations of survivor number and lag phase duration of individual cells were higher in irradiated batches than in non-irradiated ones. Furthermore, the more intense the irradiation treatment was, the higher the variability in both survivor number and duration of lag phase of survivors. These findings should be considered in predictive models of microbial inactivation, in risk assessment, and in adjusting preserving and/or storage conditions in the food industry.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The microbicidal effect of irradiation has been well demonstrated at relatively low doses that may (Brewer, 2009) or may not (Boynnton et al., 2006) affect the sensorial quality of foods. Thus, optimising the irradiation dose is critical if mandatory microbial safety levels are to be achieved whilst minimising changes in sensorial properties. Biological variability may be due to strain variability (Lianou et al., 2006) and/or variation in how individual cells in a population respond to environmental conditions. It is critical to take into account variability in microbial inactivation and lag phase length of viable cells because the credibility of a microbial risk assessment is based on its ability to consider the variability and uncertainty of each parameter involved in the estimation of the final risk (Delignette-Muller and Rosso, 2000). The presence of a few atypical cells with short lag phase ("rare" cells) can unexpectedly shorten the population lag time (Baranyi, 2002), which may shorten the food's shelf-life or, if pathogens are present in the food, increase the health risk to consumers. For our purpose, lag is defined as the time needed for a single cell to duplicate. During this period, a cell must repair itself when it has been damaged by any stress, it must adapt to the new environment and it must duplicate. Continuous sigmoid functions such as the empirical Gompertz model or the mechanistic model of Baranyi and Roberts (1994) are used to predict the kinetic parameters of growth rate ( $\mu$ ) and lag phase from microbial growth curves. Such models usually give reliable information on  $\mu$ ; however, results for lag

phase are not accurate enough due to our poor understanding of the physiological events taking place during adaptation of cells to new environments and/or the repair of cell structures damaged in stress conditions (D'Arrigo et al., 2006). Furthermore, microbial behaviour is variable (Aguirre et al., 2009) and this variability can contribute to the inaccuracy of lag predictions in current mathematical growth models. To understand lag phase variability better and use this knowledge to improve models, it is vital to understand how lag times of individual cells are distributed over a bacterial population. Such distributions can be used to predict the time necessary for a few pathogenic cells in a growth-supporting environment to multiply to an unsafe concentration (Baranyi et al., 2009). The distribution of lag times can also be used in quantitative microbial risk assessment studies to estimate the probability that a few contaminating cells multiply to a population level above a tolerance limit (Baranyi et al., 2009).

The variability of microbial growth was first described by Kelly and Rahn (1932) using direct observation of multiplying cells. These authors observed the first four generations of more than 1700 cells and concluded that there was a considerable variation in the rate of fission and this variation was not inheritable, except in the case of one yeast.

Some strain-to-strain variability was observed when treating four strains of *Bacillus cereus* at 500 MPa for 5 min twice at 40 °C in the presence of nisin (Black et al., 2008). Emetic strains of this bacterium are more resistant to heat treatments than diarrhoeal ones (Johnson et al., 1984). Variability has also been observed between members of a single strain. For example, a noticeable variability in inactivation was observed amongst four trials in which simulated apple cider containing *Pediococcus* sp. NRRL B-2354 was subjected to pasteurisation (Piyasena et al., 2003). Variability in the numbers of viable bacteria in saline solution and whole milk following mild heat treatment has also been

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943744; fax: +34 91 3943743.  
E-mail address: [mingui@vet.ucm.es](mailto:mingui@vet.ucm.es) (G.D. García de Fernando).

studied (Aguirre et al., 2009). These authors found that the variability in survivor number was not affected by either the species or heating substrate, but it did depend on the intensity of the heat treatment. The more severe the heat treatment was, the lower the average survivor number, but the greater the variability. A linear relationship was found between the variability of the logarithm of the viable bacteria number after the treatment and the degree of inactivation achieved.

A significant number of studies on the variability in the growth kinetics of individual microbial cells have been published in recent years (Baranyi et al., 2009; Baranyi and Pin, 1999; Koutsoumanis, 2008; Metris et al., 2008; Pin and Baranyi, 2008; Smelt et al., 2002). The majority of these studies focus on the effect of the pre-inoculation and/or the growth environment on the lag phase after sublethal treatments. Lag times vary widely amongst individual cells in a population, and the inherent variability in the lag time of single cells increases with the heat treatment severity (Baranyi, 2002; D'Arrigo et al., 2006; Guillier et al., 2005; Metris et al., 2008; Pin and Baranyi, 2008). Similarly, times to the first division are longer and more widely distributed amongst single cells of *Escherichia coli* that spent more time in the stationary phase prior to inoculation (Pin and Baranyi, 2008). The prolongation and variability of the lag phase after osmotic shock (Guillier et al., 2005) and acidification (Guillier et al., 2005; Li et al., 2006) have also been analysed. In general, all these studies have shown that as the environment becomes more stressful and the growth conditions are less favourable, the single-cell lag time increases and becomes more variable. However, no data are available on the effect of e-beam irradiation either on microbial inactivation variability or on survivor lag phase.

The purpose of the present work was to inactivate bacterial cells by mild irradiation with an electron beam, then analyse the distributions of the concentrations of viable cells and the distributions of the lag phase duration of individual cells.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains and inoculum preparation

*Pseudomonas fluorescens* (CECT 378), *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (CECT 4300; ATCC 13076), *Listeria innocua* (CECT 910; NCTC 11288; ATCC 33090), and *Enterococcus faecalis* (LM24) were kept frozen ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in tryptic soy broth (TSB) (Pronadisa, Spain) supplemented with 20% glycerol. Strains were subcultured twice in sterilised TSB and incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h, with the exception of *P. fluorescens*, which was incubated at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 36 h. Cells were harvested by centrifugation ( $12,000\times g$  for 15 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in a Sorvall RC5B refrigerated centrifuge. Pellets were washed with 10 ml of sterile saline solution (0.75% NaCl), centrifuged again in the same conditions, and eventually the pellets were resuspended in sterile saline solution.

Cell suspensions were then used to inoculate sliced cooked ham (El Pozo Alimentación S.A., Murcia, Spain), tryptic soy agar (TSA, Pronadisa, Spain) and TSB (Pronadisa, Spain).

### 2.2. Radio-resistance parameter ( $D_{10}$ value)

The  $D_{10}$  value, defined as the dose in kGy necessary for a 1-log reduction of the population, was estimated from the inactivation curves on TSA, TSB and cooked ham for each bacterium in triplicate. The dose absorbed was checked by determining the absorbance of cellulose triacetate dosimeters simultaneously irradiated with samples.

To estimate the  $D_{10}$  value in TSA, the inoculum and melted TSA were mixed in plates (10 plates for each dose) to achieve cell concentrations from  $10^2$  to  $10^9$  colony-forming units (cfu) per plate. Once the medium solidified, plates and the corresponding lids were held together with Parafilm (Parafilm M, American National Can, Greenwich, CT, USA) and

transported to the irradiation plant (IONISOS S.A., Tarancón, Spain), where they were placed on stainless steel trays and irradiated with doses ranging from 0 to 3.5 kGy with an e-beam irradiation source operating at 10 MeV. After the treatment, plates were transported to the laboratory and incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h, with the exception of *P. fluorescens*, which was incubated at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 72 h. Colonies were counted with a digital colony counter-S (Mod 4905000, Selecta TM, Barcelona, Spain). In this and all other experiments, samples were transported from the laboratory to the irradiation plant and back under refrigeration.

Ham slices (1 mm thick and approximately 4 cm in diameter) were sterilised by e-beam irradiation (6 kGy) in sealed plastic bags, then experimentally inoculated by immersion in a bacterial suspension to achieve bacterial loads from  $10^2$  to  $10^9$  cfu/slice. The inoculated slices were placed into sterile Stomacher plastic bags (one slice per bag) and heat-sealed. The samples were maintained under refrigeration and transported to the irradiation plant, where they were irradiated with doses ranging from 0 to 3.5 kGy (10 bags per dose). To estimate the number of survivors, 5 ml of sterile saline solution were added to the Stomacher plastic bags containing a ham slice and the contents were homogenised in a Stomacher blender (Seward Laboratory, London, UK) for 60 s. Aliquots from every bag were taken and 500  $\mu\text{l}$  were plated into melted TSA and, once solidified, incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h except *P. fluorescens*, which was incubated at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 72 h. To ensure that the colony number per plate was adequate, a 1:10 dilution was also plated in parallel. Viable bacteria were counted with an image analyser (Countermath Flash; IUL Instruments, Barcelona, Spain).

To estimate the  $D_{10}$  value in TSB, 10 ml of broth were pipetted into sterile plastic bags and inoculated with bacterial suspension to achieve initial loads from  $10^2$  to  $10^9$  cfu/ml. Bags were sealed, and irradiated at doses ranging from 0 to 3.5 kGy (10 bags per dose). Aliquots from every bag were taken and 500  $\mu\text{l}$ , neat and diluted 1:10, were plated and incubated as described for the ham samples.

In accordance with other authors (Bassen et al., 1989; Mendonca et al., 2004; Zhu et al., 2005),  $D_{10}$  values were calculated by using simple linear regression; survival curves were obtained by plotting the decimal logarithm of the number of viable versus the corresponding e-beam doses.  $D_{10}$  values were determined from the slope of the straight portion of the curves.

### 2.3. Specific growth rate ( $\mu$ )

Prior to the quantification of the variability of microbial radio-resistance and variability of the survivor lag time, growth curves were estimated in ham at  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$  for all organisms and at  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  for *P. fluorescens*, and in TSB at  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  for *E. faecalis* and  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  for *S. Enteritidis*, *L. innocua* and *P. fluorescens*. The curves were used to determine the microorganisms' specific growth rates ( $\mu$ ) under the above conditions.

Ham slices sterilised by irradiation (6 kGy) were inoculated with ca.  $10^2$  cfu/slice and incubated at  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$  for all organisms except *P. fluorescens*, which was also incubated at  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Every day, 5 bags were plated on TSA to check cell concentration; this process was repeated over enough days for cultures to reach the stationary phase. The natural logarithm of the number of cells versus their corresponding sampling times during the exponential phase was plotted using the Graphing Assistant Add-In Microsoft Excel and  $\mu$  was estimated from the slope of the linear portion of the curve.

Specific growth rate on TSB was estimated from turbidity growth curves in three replicate experiments using an automated spectrophotometer (Bioscreen C equipment, Labsystems, Helsinki, Finland) as described by McKellar and Hawke (2006). Serial five-fold dilutions of each 24 h culture were prepared in fresh TSB, giving dilutions from approximately  $10^7$  to  $10^0$  cfu  $\text{ml}^{-1}$ . Twenty replicate samples from each dilution were inoculated (350  $\mu\text{l}$  into wells of Bioscreen plates). The plates were loaded into the Bioscreen C operating at an incubation temperature of  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$  for *L. innocua*, *S. Enteritidis* and *P. fluorescens* and

at 18 °C for *E. faecalis* in a cold room. Absorbance measurements were determined using a wide band filter at 420 to 580 nm, at 15 min intervals, after shaking at medium intensity for 10 s. Plates were incubated for 96 h. Dilutions of each sample were plated by spreading onto TSA, incubated at 25 °C for 72 h for *P. fluorescens* or 37 °C for 24 h for the other organisms, and colonies were counted.

From the Bioscreen device, the time to detection ( $T_d$ ), defined as the time required to reach an absorbance of 0.20 was obtained from each well, and a mean value was calculated for each dilution. The coefficient of determination ( $R^2$ ), standard error of the mean (SE) and the slope of the regression of mean  $T_d$  versus the natural logarithm of the inoculum density for each species were obtained using the Data Analysis Add-In of Microsoft Excel.

The specific growth rates ( $\mu$ ) were calculated from the formula:

$$\mu = -1 / \text{slope}. \quad (1)$$

Three replicate experiments were done for each species.

In both ham and TSB, the specific growth rate was assumed to be constant throughout bacterial growth.

#### 2.4. Variability in inactivation

To quantify the variability in the number of survivors after irradiation, approximately 100 TSA plates and 100 ham slices were contaminated with the above mentioned bacterial strains for each irradiation dose. Melted TSA and the inocula were mixed in plates to achieve cell concentrations from  $10^2$  to  $10^9$  cfu/plate for each bacterium; once the medium was solidified, plates and the corresponding lids were held together with Parafilm. Inocula were prepared by diluting a  $10^9$  cfu/ml bacterial suspension. Two batches of plates with two bacterial concentrations were irradiated at different doses: 0 kGy,  $10^2$  and  $10^3$  cfu/plate; 1 kGy,  $10^4$  and  $10^5$  cfu/plate; 2 kGy,  $10^6$  and  $10^7$  cfu/plate; and 3 kGy,  $10^8$  and  $10^9$  cfu/plate. The plates were then incubated at 37 °C for 48 h, with the exception of *P. fluorescens*, which was incubated at 25 °C for 72 h. Colonies were counted with a digital colony counter-S. To homogenise the data, results were multiplied by the corresponding dilution factor and referred to the initial bacterial concentration.

Ham slices (1 mm thick) previously treated with 6 kGy were immersed one by one in a bacterial suspension to achieve initial loads from  $10^2$  to  $10^9$  cfu/slice. The slices were put into sterile Stomacher plastic bags. Two batches of samples with two bacterial concentrations were irradiated at each dose: 0 kGy,  $10^2$  and  $10^3$  cfu/slice; 1 kGy,  $10^4$  and  $10^5$  cfu/slice; 2 kGy,  $10^6$  and  $10^7$  cfu/slice; and 3 kGy,  $10^8$  and  $10^9$  cfu/slice. The viable count in irradiated ham slices was determined using the same procedure as for  $D_{10}$  estimates (see above). Several samples (10–20) from every batch were not irradiated and used as a control for the initial microbial load. To homogenise the data, results were multiplied by the corresponding dilution factor and referred to the initial bacterial concentration.

#### 2.5. Variability in duration of lag phase

Individual cell lag times were estimated from turbidity growth curves generated with the Bioscreen C as described above. To do this, sterile plastic bags containing 200 ml of TSB were experimentally contaminated with bacterial suspensions of the above mentioned strains to achieve initial loads from  $10^2$  to  $10^6$  cfu/ml, depending on the irradiation dose to be applied. Samples were irradiated with doses ranging from 0 to 3.0 kGy. An aliquot (10 ml) from every sterile plastic bag was mixed with 90 ml of sterilised TSB, and 350  $\mu$ l of this suspension were transferred to 100 wells of one Bioscreen microplate (Labsystems, Helsinki, Finland); 100 wells of a second microplate were filled with 350  $\mu$ l of a 1:10 dilution of the same suspension. The average number of cells per well was estimated according to the

Poisson distribution based on the probability of having one cell per well (Baranyi et al., 2009). In this case

$$m = -\text{Ln}P \quad (2)$$

where  $m$  is the average number of cells per well and  $P$  is the probability of finding no growth in a well. Batches showing  $P$  values less than 0.14 (14% of wells with no growth) or higher than 0.85 were discarded because when  $P$  is higher than 0.85, data are insufficient to generate reliable frequency distributions and when  $P$  is lower than 0.14, the average number of cells per sample is higher than 2 and the individual lag estimations may be too inaccurate.

Cultures were grown at 18 °C for *E. faecalis* and 16 °C for the other three organisms. The increase in optical density (OD) was monitored at 420 to 580 nm every 30 min for up to 2 weeks. Cultures were shaken for 10 s at medium intensity before measuring OD. Data were considered only when the average of cells per well was lower than 2 and higher than 0.36, based on the  $P$  cutoffs described above. The following assumptions were made to estimate lag times of single cells: (i) the distribution of detection time ( $T_d$ ) is a convolution of those of the single cell lag time and the initial cell number, (ii) lag time was considered as the time needed for a single cell to divide into two daughter cells; (iii) after the first division, cells were considered to grow immediately at the maximum growth rate; and (iv) when turbidity first became visible, cells continued to grow at the maximum rate.

Individual cell lag times were estimated using the detection time, which was calculated as the time required for the optical density at 420 to 580 nm to reach 0.2 units (this value is equivalent to a concentration of ca.  $10^8$  cfu/ml), based on the following formula (Baranyi and Pin, 1999).

$$\text{Lag} = T_d - \frac{\text{Ln}(Nd) - \text{Ln}(N_0)}{\mu} \quad (3)$$

where  $Nd$  is the bacterial number at  $T_d$  and  $N_0$  the number of cells initiating growth in the well under consideration and  $\mu$  is the specific growth rate of each microorganism determined by growth curves under the experimental conditions described above.

To estimate the lag times of individual cells in ham, two batches were tested. Each one consisted of around 150 slices obtained as described above. Sterilised slices were placed in sterile plastic bags (one slice per bag) and inoculated with a bacterial culture of known concentration to reach final loads of 1 cell per slice (first batch) or 0.1 cells per slice (second batch) after the irradiation treatment (from 0 to 3 kGy). Once irradiated, samples were incubated at 2 °C for *P. fluorescens* and 7 °C for *P. fluorescens* and all other organisms. To check growth, 5 samples per day, after four days of incubation, were homogenised with 5 ml of sterile saline solution and plated on TSA, and plates were incubated at 37 °C for 24 h or at 25 °C for 36 h in the case of *P. fluorescens*. When the bacterial concentration of one slice was higher than  $10^3$  cfu, all the remaining samples were homogenised and plated on TSA using a spiral platter and the sampling times were recorded. Plates were then incubated at 37 °C for 48 h or, in the case of *P. fluorescens*, at 25 °C for 72 h. Colonies were counted with an automatic counter, as described above.

The average number of cells per slice was estimated according to the Poisson distribution as described above. Lag time was calculated from the plate counts applying Eq. 3 substituting  $T_d$  by  $T_{\text{count}}$  (the time at which the food sample was plated out) and  $\text{Ln}(Nd)$  being the natural logarithm of the cell number detected at time  $T_{\text{count}}$ , and  $\text{Ln}(N_0)$  the natural logarithm of the initial number of bacteria (zero in our case).

## 2.6. Statistical analysis

Normal distribution fitting of the numbers of survivors and gamma distribution fitting of lag times of individual survivors were carried out using the Microsoft Excel Add-in Varifit (BACANOVA, 2005), kindly donated by the programmers from the Computational Microbiology Group of the Institute of Food Research (Norwich, United Kingdom). The variances in the distributions of the concentrations of survivors were compared using the Bartlett test (Zar, 1999). The variances in the distributions of lag phases were compared using a permutation test according to Box and Anderson (1955); this is a robust test for non-normally distributed samples using R software (version 2.7.2, 2008). A Holm-Bonferroni  $p$ -value correction was applied to the significance value ( $\mu$ ) amongst variances of distributions for each organism and substrate according to Holm (1979).

## 3. Results

### 3.1. Microbial inactivation ( $D_{10}$ values) by irradiation

Experimentally obtained  $D_{10}$  values are shown in Table 1. All bacteria tested showed a greater radio-resistance in ham than in culture medium. The  $D_{10}$  values in TSA were higher than those in TSB. Gram-positive bacteria showed greater tolerance to irradiation than Gram-negative bacteria. The most and least radio-resistant species were *E. faecalis* and *P. fluorescens*, respectively.

### 3.2. Specific growth rates

Table 2 shows the specific growth rate of the organisms tested. *P. fluorescens* was the fastest growing in ham at 7 °C and in TSB at 16 °C, reflecting the known psychrotrophic character of this species. The ability of the other three bacteria to grow at 7 °C in ham varied as follows: *L. innocua* > *E. faecalis* > *S. Enteritidis*. Growth in TSB at 16 °C was faster for *L. innocua* than for *S. Enteritidis*.

### 3.3. Variability in inactivation

$D_{10}$  values (Table 1) were used to determine the irradiation treatments and the bacterial concentrations of inocula used to experimentally contaminate the food samples, in order to obtain various degrees of inactivation (Table 3). The mean and standard deviation of the viable bacteria were calculated from data obtained with 62–105 samples (Table 3). Non-irradiated controls always showed the smallest standard deviation. The more severe treatments yielded lower numbers of survivors, but greater variability in the final numbers of bacteria and, consequently, more severe treatments yielded larger differences between the maximum and minimum cell

**Table 1**

$D_{10}$  values of selected organisms experimentally calculated and used to predict the inactivation necessary to obtain one viable cell per ham slice or per 350  $\mu$ l of tryptic soy broth (TSB).

Bacterium	Medium	$D_{10}$ values (kGy)	SE <sup>a</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ham	0.56	0.064
	TSA	0.49	0.054
	TSB	0.48	0.054
<i>Listeria innocua</i>	Ham	0.49	0.087
	TSA	0.48	0.060
	TSB	0.46	0.022
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Ham	0.46	0.080
	TSA	0.43	0.047
	TSB	0.42	0.040
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ham	0.41	0.043
	TSA	0.39	0.031
	TSB	0.38	0.024

<sup>a</sup> Standard error of the mean.

**Table 2**

Specific growth rate of selected organisms experimentally calculated in cooked ham and tryptic soy broth (TSB) and used to estimate the lag phases shown in Table 5.

Bacterium	Growth conditions	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	SE
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ham, 7 °C	0.041	0.98	0.002
	TSB, 18 °C	0.409	0.99	0.080
<i>Listeria innocua</i>	Ham, 7 °C	0.067	0.94	0.012
	TSB, 16 °C	0.312	0.99	0.051
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Ham, 7 °C	0.030	0.98	0.002
	TSB, 16 °C	0.252	0.99	0.078
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ham, 2 °C	0.048	0.99	0.001
	Ham, 7 °C	0.101	0.98	0.010
	TSB, 16 °C	0.449	0.99	0.061

$\mu$ , specific growth rate.

SE, standard error of the mean.

R<sup>2</sup>, coefficient of determination.

concentrations per ham slice or TSA plate. Indeed, in the most intense irradiation treatment, the bacterial load differed by more than 2 orders of magnitude. Variability in the number of survivors was greater in ham than in TSA, except in the case of the samples contaminated with *S. Enteritidis* and irradiated with 1 kGy. Table 4 compiles the regression equations and coefficients of determination for describing the effect of the degree of inactivation on the variability in the number of survivors in terms of standard deviation.

Fig. 1 gathers data from all organisms and substrates studied in the inactivation experiments and shows the relationship between the standard deviation of the logarithm of the final bacterial concentration and the decrease in the logarithm of the bacterial concentration after several irradiation doses. An explicit linear relationship between the variability in the final bacterial concentration and the reduction in the logarithm of the population was estimated from the experimental data with a relatively high coefficient of determination ( $R^2 = 0.84$ ).

This linear relationship is described by the following equation:

$$SD[\log_{10}X_f(D_{10})] = 0.034 + 0.068[\log_{10}X_i(D_{10}) - \log_{10}X_f(D_{10})] \quad (5)$$

where  $SD$  is the standard deviation of the logarithm values for the final concentrations of bacteria [ $\log_{10}X_f(D_{10})$ ] after  $D_{10}$  is applied, and  $X_i(D_{10})$  denotes the initial concentration before  $D_{10}$  is applied. This direct proportionality indicates that the variability in the number of survivors depends on the severity of the dose applied.

### 3.4. Variability in lag phases after irradiation treatments

Table 5 shows lag phases of individual surviving cells after different irradiation treatments. The mean and standard error of individual lag phases were calculated from data obtained with 99–149 ham samples and 100 TSB wells per batch. The average number of cells per sample was calculated from the Poisson distribution (Baranyi et al., 2009) and ranged from 0.49 to 1.97 cells/sample. Lags in TSB were shorter than in ham, because of the incubation temperature. Non-irradiated cells always showed the smallest values for both lag time and standard deviation of lag time. As the irradiation dose increased, the lag phase became longer and the standard deviations of lag phases increased. Lag phases were more variable in TSB in terms of coefficient of variation (%CV, 100  $SD$ /mean, see Table 5), although the mean values were shorter than those of individual cells growing in ham. Correlation between individual lag phases and the degree of inactivation achieved by irradiation was very high (Table 6). The same may be said for the correlation between the standard deviation of the lag phase distributions and the degree of inactivation.

Fig. 2 shows the distributions of bacterial inactivation after several irradiation treatments and Fig. 3 shows the distributions of lag phases of viable individual cells to such treatments. The number of viable

**Table 3**  
Concentrations of surviving bacteria after different irradiation treatments in cooked ham and tryptic soy agar (TSA).

Bacterium	Medium	Treatment (kGy)	No. of samples	Mean of survivors (log cfu/sample)	SD	Inactivation achieved (–log cfu/sample)	Min <sup>a</sup>	Max <sup>b</sup>	Coefficient of variation (%) (100 SD/mean)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ham	0	11	8.42 <sup>c</sup>	0.053	0.00	8.30	8.47	0.6
	Ham	1	71	6.66	0.133	1.76	6.31	7.19	2.0
	Ham	2	70	5.02	0.262	3.40	4.37	5.69	5.2
	Ham	3	76	3.34	0.551	5.08	1.81	4.52	16.5
	TSA	0	8	8.28 <sup>d</sup>	0.038	0.00	8.22	8.33	0.5
	TSA	1	71	6.44	0.124	1.84	5.93	6.82	1.9
	TSA	2	72	4.47	0.208	3.81	3.84	5.25	4.7
	TSA	3	80	2.42	0.496	5.86	1.14	3.55	20.5
<i>Listeria innocua</i>	Ham	0	10	8.32	0.065	0.00	8.22	8.41	0.8
	Ham	1	99	6.21	0.221	2.11	5.61	6.61	3.6
	Ham	2	100	4.35	0.282	3.97	3.70	5.16	6.5
	Ham	3	94	2.44	0.579	5.88	1.70	3.48	23.7
	TSA	0	9	8.15	0.040	0.00	8.08	8.19	0.5
	TSA	1	101	6.09	0.137	2.06	5.80	6.38	2.3
	TSA	2	99	4.15	0.165	4.00	3.60	4.48	4.0
	TSA	3	105	2.08	0.450	6.07	1.23	2.67	21.6
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Ham	0	10	8.71	0.076	0.00	8.63	8.89	0.9
	Ham	1	71	6.70	0.240	2.01	6.45	7.33	3.6
	Ham	2	81	4.23	0.330	4.47	3.63	4.95	7.8
	Ham	3	78	2.41	0.427	6.30	1.75	2.98	17.8
	TSA	0	16	9.02	0.081	0.00	8.91	9.14	0.9
	TSA	1	74	6.74	0.200	2.28	6.21	7.13	3.0
	TSA	2	62	4.40	0.366	4.62	3.85	5.09	8.3
	TSA	3	71	2.13	0.635	6.90	1.14	2.95	29.9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ham	0	10	9.22	0.019	0.00	9.19	9.24	0.2
	Ham	1	69	6.73	0.189	2.49	6.44	7.10	2.8
	Ham	2	83	4.51	0.291	4.71	3.82	4.97	6.9
	Ham	3	71	2.12	0.552	7.10	1.79	3.04	26.1
	TSA	0	8	9.59	0.017	0.00	9.56	9.61	0.2
	TSA	1	71	6.89	0.170	2.69	6.60	7.19	2.5
	TSA	2	71	4.79	0.209	4.80	4.37	5.28	4.4
	TSA	3	64	1.98	0.436	7.61	1.23	2.99	22.0

SD: Standard deviation (log cfu/sample).

<sup>a</sup> Minimum concentration in a sample (log cfu/sample).

<sup>b</sup> Maximum concentration in a sample (log cfu/sample).

<sup>c</sup> Surviving bacteria per slice (ca. 32 cm<sup>2</sup>).

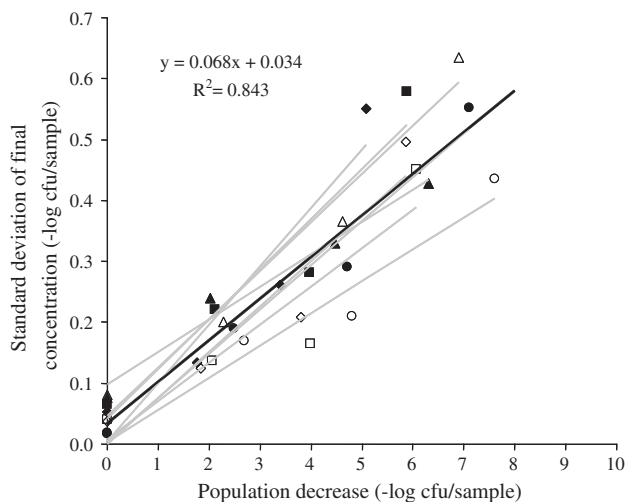
<sup>d</sup> Surviving bacteria per plate (50 cm<sup>2</sup>).

cells (Fig. 2) and individual lag phases (Fig. 3) were significantly different (at a multiple significance level of  $\alpha < 0.05$ ) for all batches analysed within the same species. Furthermore, the Bartlett test showed that in almost all cases, the variances of inactivation were significantly different ( $p < 0.05$ ) for the different irradiation doses (Fig. 2). Similarly, a permutation test showed that in almost all cases, the variances of lag phase were significantly different ( $p < 0.05$ ) for the different irradiation doses (Fig. 3). In general, the distributions of the microbial inactivation and lag phases did not show tails, especially when a low irradiation dose was applied; in these cases, the shape may be considered close to symmetrical. However, at higher irradiation doses, the shape of the distributions lost symmetry and non-typical shapes appeared (Figs. 2 and 3), including a bimodal distribution of *P. fluorescens* grown in TSB (Fig. 3).

**Table 4**

Equations of regression lines relating the standard deviation of the number of viable bacteria ( $y$ ) to the inactivation achieved ( $x$ ). Also shown are the corresponding coefficients of determination ( $R^2$ ).

Organism	Substrate	Equation	$R^2$
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ham	$y = 0.0958x + 0.0043$	0.915
	TSA	$y = 0.075x + 0.0006$	0.909
<i>Listeria innocua</i>	Ham	$y = 0.0821x + 0.0413$	0.922
	TSA	$y = 0.0627x + 0.0082$	0.853
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Ham	$y = 0.0532x + 0.0983$	0.973
	TSA	$y = 0.0794x + 0.0468$	0.966
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ham	$y = 0.0724x + 0.0038$	0.971
	TSA	$y = 0.0525x + 0.0100$	0.957



**Fig. 1.** Relationship between the standard deviation of the logarithm of the final bacterial concentration and the decrease in the logarithm of the bacterial concentration after different irradiation doses. Results are shown for *Enterococcus faecalis* (diamonds), *Listeria innocua* (squares), *Pseudomonas fluorescens* (circles), and *Salmonella* Enteritidis (triangles) in ham (filled symbols) and TSA (empty symbols). The continuous grey lines, for which equations are shown in Table 4, show the relationships found in our experiments. The black line, for which the equation and coefficient of determination are shown, considers all data together.

**Table 5**

Lag phase of viable individual cells after different irradiation treatments in cooked ham and tryptic soy broth (TSB).

Bacterium	Growth conditions	Irradiation (kGy)	Total no. of samples	No. of samples with growth	Average no. cells per sample <sup>a</sup>	Mean lag phase (h)	SD (h)	Min lag phase (h)	Max lag phase (h)	Coefficient of variation (%) (100 Sd/mean)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ham, 7 °C	0.0	106	79	1.39	59.8	7.92	40.1	85.5	13.2
		0.5	109	66	0.94	109.6	9.62	93.5	127.3	8.8
		1.0	114	70	0.94	226.9	19.76	200.0	276.8	8.7
	TSB, 18 °C	2.0	121	68	0.78	458.3	29.58	408.6	508.3	6.5
		0.0	100	79	1.56	6.1	2.16	2.7	10.7	35.5
		0.5	100	85	1.90	13.3	2.67	9.0	18.9	20.1
		1.0	100	76	1.43	30.8	3.53	19.1	38.6	11.4
		2.0	100	86	1.97	69.9	7.00	58.7	90.2	10.0
		2.0	100	71	1.11	229.7	5.35	221.8	254.1	2.3
<i>Listeria innocua</i>	Ham, 7 °C	0.5	123	81	1.08	285.3	6.56	270.7	303.8	2.3
		1.0	119	71	0.92	371.5	10.40	357.5	391.5	2.8
		2.0	109	85	1.51	512.8	18.10	498.2	555.7	3.5
	TSB, 16 °C	0.0	100	54	0.78	24.9	4.72	15.8	34.4	18.9
		0.5	100	39	0.49	46.4	13.72	32.1	78.6	29.5
		1.0	100	80	1.61	57.0	15.51	45.7	113.9	27.2
		2.0	100	59	0.89	130.7	22.19	83.7	188.9	17.0
		3.0	101	65	1.02	533.3	50.24	428.2	637.3	9.4
		2.0	100	72	1.24	48.6	3.47	37.7	52.7	7.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ham, 2 °C	0.0	110	76	1.17	89.3	11.88	62.1	113.4	13.3
		0.5	138	101	1.31	114.1	17.57	91.3	145.6	15.4
		1.0	149	111	1.35	210.8	22.04	158.8	267.9	10.5
	Ham, 7 °C	2.0	116	75	1.05	382.7	30.97	318.9	453.0	8.1
		3.0	101	65	1.02	533.3	50.24	428.2	637.3	9.4
		0.0	101	72	1.24	48.6	3.47	37.7	52.7	7.1
	TSB, 16 °C	0.5	119	83	1.20	59.9	8.12	49.7	77.7	13.6
		1.0	136	101	1.35	127.6	14.99	84.4	167.2	11.8
		2.0	105	67	1.02	271.8	22.06	219.2	296.9	8.1
		3.0	99	65	1.08	407.7	27.16	344.9	458.6	6.7
		0.0	100	86	1.97	4.3	2.27	0.0	9.4	52.8
		0.5	100	46	0.62	35.1	5.13	27.6	54.5	14.6
		1.0	100	76	1.43	45.1	9.31	14.1	95.1	20.7
		1.5	100	68	1.14	61.2	15.15	25.9	94.3	24.8
		2.5	100	53	0.76	96.7	26.47	43.7	136.9	27.4
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Ham, 7 °C	0.0	99	43	0.56	265.4	4.82	259.1	280.1	1.8
		0.5	105	46	0.58	306.3	8.07	292.9	326.2	2.6
		1.0	115	47	0.53	433.2	22.75	402.6	479.7	5.3
	TSB, 16 °C	2.0	135	60	0.58	585.6	36.33	523.9	680.8	6.2
		0.0	100	49	0.67	34.5	3.90	26.4	44.3	11.3
		1.0	100	50	0.69	89.8	6.06	79.9	110.4	6.8
		2.0	100	75	1.39	150.1	8.92	136.6	192.9	5.9
		2.5	100	52	0.73	187.3	13.44	161.3	225.7	7.2

SD: Standard deviation.

<sup>a</sup> Calculated from Poisson distribution tables.

#### 4. Discussion

Variability in the number of viable cells increases as preservation treatments become more intense, even though a small number of organisms remains viable. Thus, variability in the microbial responses to stresses can cause preservation treatments to have unexpected results and become randomly ineffective or, at least, less effective than expected.

The response of bacteria to irradiation treatments fits first-order inactivation kinetics. Comparing  $D_{10}$  values in the present study with those reported by other authors (Cabeza et al., 2007, 2009; Hoz et al.,

2008; Medina et al., 2009; Patterson, 1988; Zhu et al., 2009) shows no noticeable differences. For instance, amongst published *L. innocua*  $D_{10}$  values, the following can be mentioned: 0.53 kGy in “chorizo” and 0.49 kGy in cooked ham (Cabeza et al., 2007); 0.47 kGy in dry-cured ham (Hoz et al., 2008) and 0.44 kGy in smoked salmon (Medina et al., 2009). The strain used by all these authors is the same as that used in the present study (NTC 11288) and our corresponding  $D_{10}$  values were 0.49 in cooked ham and 0.46 in TSB.

Irradiation may become a helpful tool for minimally processed foods, in which the main goal of keeping organoleptic properties may tempt the producers to reduce the intensity of the preserving treatment,

**Table 6**Equations of regression lines relating either the average individual lag phases ( $y$ ) or the standard deviations ( $SD$ ) of the individual lag phases ( $z$ ) with the inactivation ( $x$ ). Also shown are the corresponding coefficients of determination ( $R^2$ ).

Organism	Substrate	Temp. (°C)	Average lag vs. inactivation		SD lag vs. inactivation	
			Equation	$R^2$	Equation	$R^2$
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ham	7	$y = 97.426x + 39.861$	0.990	$z = 5.457x + 6.985$	0.971
	TSB	18	$y = 15.726x + 1.157$	0.975	$z = 1.1815x + 1.669$	0.943
<i>Listeria innocua</i>	Ham	7	$y = 70.94x + 223.67$	0.997	$z = 3.2669x + 4.293$	0.972
	TSB	16	$y = 24.366x + 18.774$	0.954	$z = 3.7364x + 6.984$	0.913
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ham	2	$y = 64.186x + 63.429$	0.989	$z = 5.0398x + 10.632$	0.968
	Ham	7	$y = 52.119x + 18.604$	0.981	$z = 3.274x + 4.827$	0.970
	TSB	16	$y = 13.306x + 9.961$	0.980	$z = 3.760x + 0.782$	0.985
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Ham	7	$y = 76.299x + 251.24$	0.980	$z = 7.605x + 3.406$	0.964
	TSB	16	$y = 25.274x + 32.115$	0.997	$z = 1.478x + 3.209$	0.907

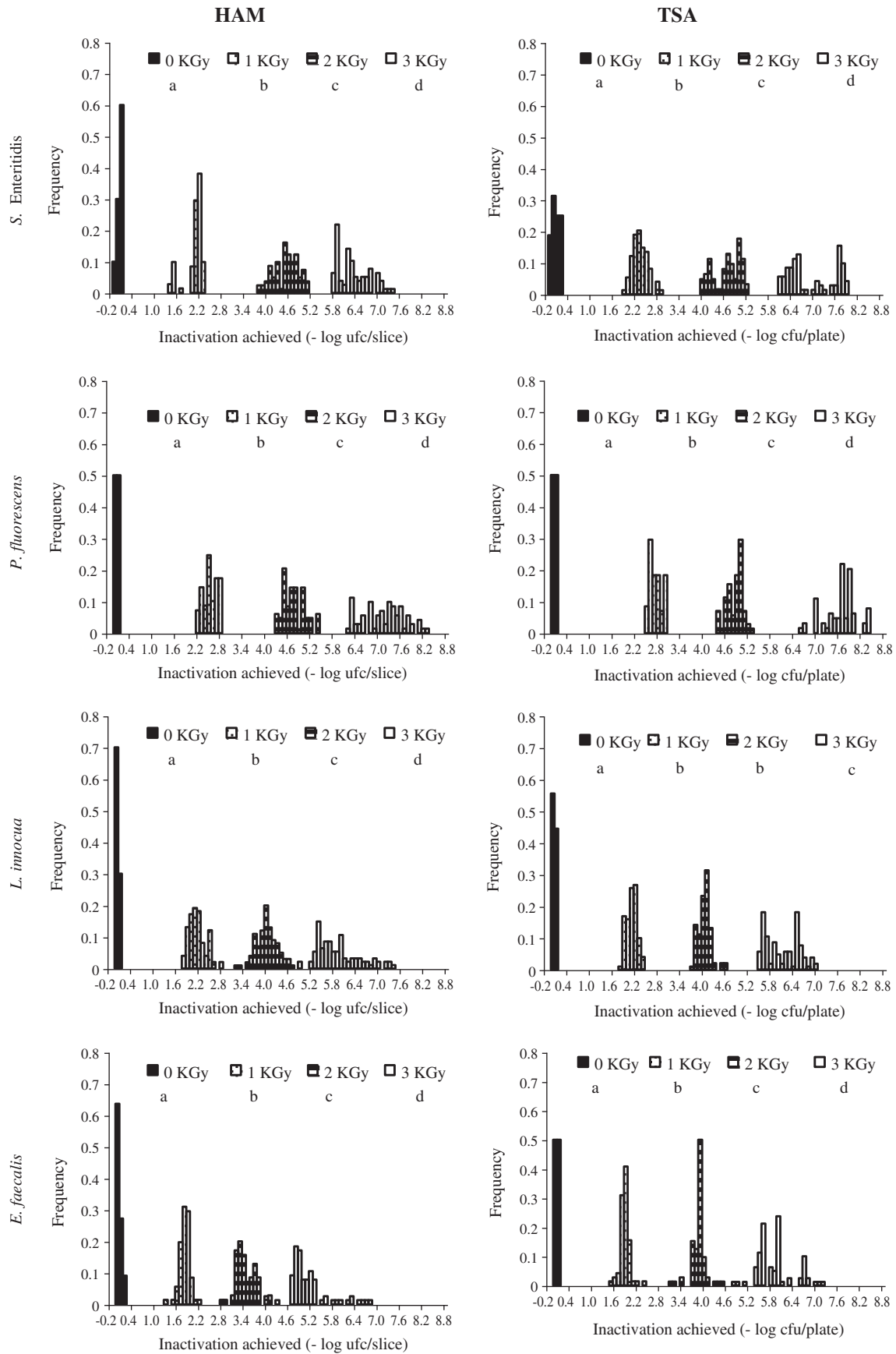
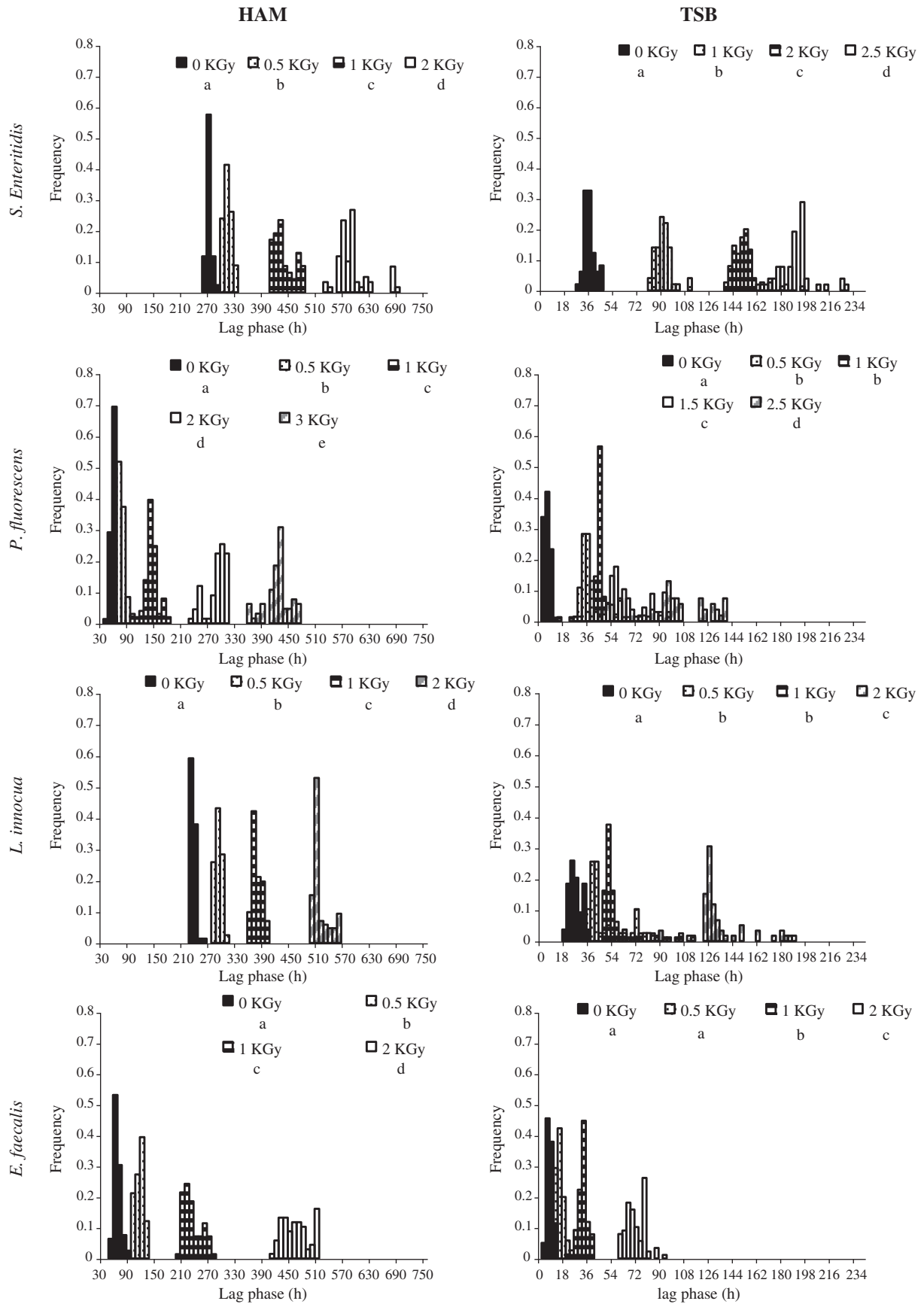


Fig. 2. Distributions of bacterial inactivation in cooked ham and tryptic soy agar (TSA) after different irradiation treatments. Variances of distributions labelled with the same letter are not significantly different by Bartlett test ( $p > 0.05$ ).



**Fig. 3.** Distributions of lag times of viable bacteria in cooked ham at 7 °C and tryptic soy broth (TSB) at 16 °C, or 18 °C in the case of *Enterococcus faecalis*, after different irradiation treatments. Variances of distributions labelled with the same letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ) by the permutation test.

increasing the probabilities of survival of organisms that usually are completely inactivated. It is evident that variability in such cases becomes more important to consider because there is a higher probability of finding an organism than after more intense treatments. For example, assuming the same frequency distribution for an industrial process than that reported here (see Table 3), it would not be unusual to find a difference of two orders of magnitude between the minimum and maximum microbial concentrations. This means the difference between finding one food package with one viable cell of the target organism per  $10^5$ – $10^7$  packs or per  $10^3$ – $10^5$  packs. In each scenario, a different industrial strategy is needed.

The present study found that the more intense the irradiation treatment, the less the number of viable cells although the more variable the number of survivors is. In other words, variability in the survivor number is a function of the inactivation achieved. The present work developed a model of linear equations that may be used to predict the data dispersion after a given preserving treatment and to calculate the expected frequency for the bacterial load within a batch (Table 4). Similar findings have been observed with heat inactivation (Aguirre et al., 2009). These findings indicate that the heating inactivation times or irradiation doses ( $D$  values) for the cells within a population are not identically distributed and that the application of preserving treatments of different severities allow the survival of different subpopulations. It is worth noting that all inocula were prepared with bacterial cells grown under optimum conditions in both the previous work (Aguirre et al., 2009) and the present study; other inoculum preparations may alter the thermal or radio-resistance of the cells and also the distribution of the final numbers of bacteria.

Our finding that the variability of the viable cell concentration increases with the severity of the preserving treatments is consistent with the results of other research groups. An increase in variability in *L. monocytogenes* viability was observed as more intense heating treatments were applied after milk pasteurisation (Piyasena and McKellar, 1999). Likewise, variability in the number of survivors amongst 10 *Listeria* strains (nine *monocytogenes* and one *innocua*) was greater after treatment at 500 MPa than after treatment at 400 MPa (Tay et al., 2003).

To calculate the lag phase, the number of cells per sample (slice or microplate well) was estimated by the Poisson distribution based on the number of negative samples as described by Baranyi et al. (2009). When the average number of cells per sample was higher than 2, the whole batch was discarded. In our worst case, growth was detected in 86% of samples, and then there were 1.97 cells per well (Table 5). For practical reasons, it was assumed that growth came from one single cell for estimating the lag period, although it is very likely that the estimated lag phase in samples with more than one cell is shorter than that in samples with just one cell. If there had been only one cell per sample, variability would have been higher. Nevertheless, the increase of the mean lag due to the stress and the increase of standard deviation (Table 5) are great enough to disguise the error in the estimation of number of cells starting the growth. On the other hand, there was a strong correlation between either the individual lag phases or their standard deviations and the inactivation degree (Table 6). These results indicate that the stress and injuries caused by irradiation affected the lag phase duration and its variability more than did the presence of more than one cell per sample.

To calculate the lag phase a constant  $\mu$  was assumed. This contrasts with the approach of Pin and Baranyi (2008) whose model predicts that the greater the standard deviation of the individual cell generation times is, the shorter the average population doubling time. Specific growth rate was calculated from the slope of the linear portion of the exponential growth phase for ham samples. This value must be an average of all individual rates of all cells able to duplicate. By using this  $\mu$  as a constant to calculate the lag phase, we assume that the average of all individual rates of all cells able to duplicate is the same as that previously calculated under the same conditions. Our approach differs from the model of Pin and Baranyi (2008) because these authors compared different scenarios,

all of them with the same average individual growth rate, but with different standard deviations. In our case, in contrast,  $\mu$  is calculated from experimental data and actual individual cell  $\mu$  variability is taken into account. In summary, our approach assumes only that the standard deviation of  $\mu$  is constant. The same approach may be used when estimating  $\mu$  using the Bioscreen apparatus.

Lag estimation (Eq. 3) is very sensitive to the value of the growth rate. A slight error in the  $\mu$  estimation may cause a considerable errors in the lag phase value because one of the terms of Eq. 3 is the time that one cell spends in generating more than twenty generations to reach the detection absorbance (i.e.,  $\frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu}$ ) and this term is very sensitive to  $\mu$ . If the doubling time of a cell is  $\ln 2/\mu$ , the time to twenty generations is  $20\ln 2/\mu$ . Thus, the error in estimating the  $\mu$  by Eq. 1 is multiplied by a factor of 20 in estimating the lag in Eq. 3. Similar reasoning applies to the lag phase estimation in ham samples, although the number of generations at  $t_{count}$  is usually smaller and the error in lag estimation is less amplified. Obviously, an accurate estimation of  $\mu$  is necessary to have a reasonably good estimation of lag.

Other authors have studied the lag phase variability in different circumstances and are in agreement with our findings. For instance, an increase in both the mean and standard deviation of the lag time distribution after sublethal heating of *Lactobacillus plantarum* has been reported (Smelt et al., 2002). Likewise, the standard deviation of individual *E. coli* O157:H7 lag times increased after treatments with acid, heat and starvation (Li et al., 2006). *E. coli* cells stressed either by heating at 50 °C or the presence of high NaCl concentrations, showed an increase in the time to first division and in the spread of the distributions that was proportional to the mean division time (Niven et al., 2008). Mean values and variability of individual *L. monocytogenes* lag phases increased as stress levels rose (Francois et al., 2006). On the other hand, not all stresses have the same consequences on the average and standard deviation of viable lag phases. Guillier et al. (2005) measured the average and variability of the *L. monocytogenes* lag phases after nine different stresses producing the same inactivation degree ( $-1.5 \log \text{ cfu/ml}$ ). For all stresses, the longer the average lag phase was, the greater the variability in the lag phase. The length of the lag phase and its variability depended on the stress as follows: HCl < lactic acid ~ NaOH ~ cold < starvation ~ NaCl ~ chlorine < heat ~ benzalkonium chloride (BAC). Furthermore, those authors found bimodal distributions for cold and BAC stresses, similarly to our results with *P. fluorescens* distribution on TSB (Fig. 3). Those authors stated that there is no a priori reason for this distribution shape, and that the presence of a certain percentage of cells with very long lag phases suggests that a mixture of two distributions might be acceptable. At the same time, the choice of bin intervals influences the distribution shape. When the intervals are increased, the bimodal shape is not as clear as it is with smaller bins.

Some information can be drawn from the scientific literature to explain why some individuals can be more resistant to stresses or successful at adapting than other individuals of the same strain. In response to heating treatments, cells synthesise heat shock proteins (HSPs), which stabilise cellular structures against the physical action of heat and aid in the proteolysis or refolding of aberrant proteins, denatured during heating (Hassani et al., 2007). On the other hand, heat favours the interaction of low-molecular-weight components and divalent cations in the heating medium with surface components of *Salmonella* Seftenberg cells, resulting in the stabilisation of the outer membrane and the subsequent increase in heat tolerance of cells (Manas et al., 2001). Depending on whether HSPs are synthesised on a larger or smaller scale, or whether there are more or less interactions between membrane components and cations and other molecules, an organism will be either more thermo-tolerant or more thermo-sensitive. The pH value of the medium in which cells receive the treatment may influence their adaptive response. As the increase in heat resistance is due to the presence of newly formed proteins, an acid pH environment could interfere with protein synthesis processes (Lund et al., 2000).

Strains are genetically different and this has physiological consequences, but marked heterogeneity occurs between individual cells within a clonal population (Guillier et al., 2005). Such heterogeneity has already been revealed in intracellular pH (Rechinger and Siegmund, 2002) and cell morphology (Rowan and Anderson, 1998). At this respect, daughter cells inherit a pole from the original cell and form a new pole after division, and after several divisions, cells with the original poles (called old poles) grow slower than those cells with newly formed components (Stewart et al., 2005). Years before, it was reported that whether or not there is an intrinsic inequality in the division of cytoplasmic material, there is one respect in which fission is certainly unsymmetrical, namely in the manner of growth and inheritance of the cell wall (Powell and Errington, 1963).

As there are many factors influencing the individual lag behaviour, accurate physiological explanations of lag time heterogeneity are hard to deduce (Swinnen et al., 2004). An interesting hypothesis has been came up: lag is determined by the amount of work the cell has to perform in order to restore a physiological state that allows the cell to multiply, as well as by the rate at which work can be performed (Robinson et al., 1998). This hypothesis is supported by results from other authors (Hornbaek et al., 2002), who observed that *Bacillus licheniformis* cells with higher intracellular pH started growing before those with a more acidic intracellular environment. According to the hypothesis, the “work” needed to start the bacterial division consists of neutralising the pH. Variability is doubtless a consequence of many other physiological differences between “sisters or brothers or, in general, relative cells”, which deserves deeper investigations.

As a general conclusion, it must be highlighted that taking into account the inactivation variability when predicting the efficacy of inactivation treatments, and integrating the lag variability in growth models, are critical factors for ensuring food safety.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support of the Spanish Ministry of Education and Science (projects AGL-2010-16598 and Consolider CSD20072007-0016). We thank Armando Chapin Rodríguez for his assistance in the manuscript writing and Carmen Bravo for her statistical support.

## References

- Aguirre, J.S., Pin, C., Rodríguez, M.R., García de Fernando, G.D., 2009. Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6992–6997.
- BACANOVA, 2005. Final Report on the European Project QLRT-2000-01145: Optimisation of Safe Food Processing Methods Based on Accurate Characterisation of Bacterial Lag Time using Analysis of Variance Techniques (BACANOVA). BACANOVA Consortium. European Commission, Brussels, Belgium.
- Baranyi, J., 2002. Stochastic modelling of bacterial lag phase. *International Journal of Food Microbiology* 73, 203–206.
- Baranyi, J., Pin, C., 1999. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 732–736.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277–294.
- Baranyi, J., George, S.M., Kutalik, Z., 2009. Parameter estimation for the distribution of single cell lag times. *Journal of Theoretical Biology* 259, 24–30.
- Bassen, M., Gupta, L., Jolly, L., Tewari, R., 1989. Thermal resistance of *Bacillus cereus* spores in custard preparations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 5, 515–516.
- Black, E.P., Linton, M., McCall, R.D., Curran, W., Fitzgerald, G.F., Kelly, A.L., Patterson, M.F., 2008. The combined effects of high pressure and nisin on germination and inactivation of *Bacillus* spores in milk. *Journal of Applied Microbiology* 105, 78–87.
- Box, G.E.P., Andersen, S.L., 1955. Permutation theory in the derivation of robust criteria and the study of departures from assumption. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 17, 1–34.
- Boynton, B.B., Welt, B.A., Sims, C.A., Balaban, M.O., Brecht, J.K., Marshall, M.R., 2006. Effects of low-dose electron beam irradiation on respiration, microbiology, texture, color, and sensory characteristics of fresh-cut cantaloupe stored in modified-atmosphere packages. *Journal of Food Science* 71, 149–155.
- Brewer, M.S., 2009. Irradiation effects on meat flavor: a review. *Meat Science* 81, 1–14.
- Cabeza, M.C., Cambero, I., de la Hoz, L., Ordonez, J.A., 2007. Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Journal of Food Protection* 71, 2001–2006.
- Cabeza, M.C., de la Hoz, L., Velasco, R., Cambero, M.I., Ordonez, J.A., 2009. Safety and quality of ready-to-eat dry fermented sausages subjected to e-beam radiation. *Meat Science* 83, 320–327.
- D'Arrigo, M., Garcia de Fernando, G.D., Velasco de Diego, R., Ordonez, J.A., George, S.M., Pin, C., 2006. Indirect measurement of the lag time distribution of single cells of *Listeria innocua* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2533–2538.
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L., 2000. Biological variability and exposure assessment. *International Journal of Food Microbiology* 58, 203–212.
- Francois, K., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., Debever, J., 2006. Risk assessment of *Listeria monocytogenes*: impact of individual cell variability on the exposure assessment step. *Risk Analysis* 26, 105–114.
- Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.C., 2005. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2940–2948.
- Hassani, M., Manas, P., Pagan, R., Condon, S., 2007. Effect of a previous heat shock on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pHs. *International Journal of Food Microbiology* 116, 228–238.
- Holm, S., 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6, 65–70.
- Hornbaek, T., Dynesen, J., Jakobsen, M., 2002. Use of fluorescence ratio imaging microscopy and flow cytometry for estimation of cell vitality for *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters* 215, 261–265.
- Hoz, L., Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Herrero, A.M., Ordonez, J.A., 2008. Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by e-beam radiation. *Journal of Food Protection* 71, 2001–2006.
- Johnson, K.M., Nelson, C.L., Busta, F.F., 1984. Influence of heating and cooling rates on *Bacillus cereus* spore survival and growth in a broth medium and in rice. *Journal of Food Science* 49, 34–39.
- Kelly, C.D., Rahn, O., 1932. The growth rate of individual bacterial cells. *Journal of Bacteriology* 23, 147–153.
- Koutsoumanis, K., 2008. A study on the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behavior of microbial populations. *International Journal of Food Microbiology* 128, 116–121.
- Li, Y., Odumeru, J.A., Griffiths, M., McKellar, R.C., 2006. Effect of environmental stresses on the mean and distribution of individual cell lag times of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 110, 278–285.
- Lianou, A., Stopforth, J.D., Yoon, Y., Wiedmann, M., Sofos, J.N., 2006. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *Journal of Food Protection* 69, 2640–2647.
- Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W., 2000. *Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, pp. 1234–1299.
- Manas, P., Pagan, R., Sala, F.J., Condon, S., 2001. Low molecular weight milk whey components protect *Salmonella senftenberg* 775 W against heat by a mechanism involving divalent cations. *Journal of Applied Microbiology* 91, 871–877.
- McKellar, R.C., Hawke, A., 2006. Assessment of distributions for fitting lag times of individual cells in bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology* 106, 169–175.
- Medina, M., Cabeza, M.C., Bravo, D., Cambero, I., Montiel, R., Ordonez, J.A., Nunez, M., Hoz, L., 2009. A comparison between e-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: microbiological aspects. *Food Microbiology* 26, 224–227.
- Mendonca, A.F., Romero, M.G., Lihono, M.A., Nannapaneni, R., Johnson, M.G., 2004. Radiation resistance and virulence of *Listeria monocytogenes* Scott A following starvation in physiological saline. *Journal of Food Protection* 67, 470–474.
- Metris, A., George, S.M., Mackey, B.M., Baranyi, J., 2008. Modelling the variability of single-cell lag times for *Listeria innocua* populations after sublethal and lethal heat treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6949–6955.
- Niven, G.W., Morton, J.S., Fuks, T., Mackey, B.M., 2008. Influence of environmental stress on distributions of times to first division in *Escherichia coli* populations, as determined by digital-image analysis of individual cells. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3757–3763.
- Patterson, M.F., 1988. Sensitivity of bacteria to irradiation of poultry meat under various atmospheres. *Letters in Applied Microbiology* 7, 55–58.
- Pin, C., Baranyi, J., 2008. Single-cell and population lag times as a function of cell age. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2534–2536.
- Piyasena, P., McKellar, R.C., 1999. Influence of guar gum on the thermal stability of *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, and gamma-glutamyl transpeptidase during high-temperature short-time pasteurization of bovine milk. *Journal of Food Protection* 62, 861–866.
- Piyasena, R., McKellar, R.C., Bartlett, F.M., 2003. Thermal inactivation of *Pediococcus* sp. in simulated apple cider during high-temperature short-time pasteurization. *International Journal of Food Microbiology* 82, 25–31.
- Powell, E.O., Errington, F.P., 1963. Generation times of individual bacteria: some corroborative measurements. *Journal of General Microbiology* 31, 315–327.
- R software from The R Foundation for Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0, 2008.
- Rechinger, K.B., Siegmund, H., 2002. Rapid assessment of cell viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by measurement of intracellular pH in individual cells using fluorescence ratio imaging microscopy. *International Journal of Food Microbiology* 75, 53–60.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M., 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 44, 83–92.
- Rowan, N.J., Anderson, J.G., 1998. Effects of above-optimum growth temperature and cell morphology on thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells suspended in bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2065–2071.

- Smelt, J.P., Otten, G.D., Bos, A.P., 2002. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. International Journal of Food Microbiology 73, 207–212.
- Stewart, E.J., Madden, R., Paul, G., Taddei, F., 2005. Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. PLoS Biology 3, e45.
- Swinnen, I.A., Bernaerts, K., Dens, E.J., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. International Journal of Food Microbiology 94, 137–159.
- Tay, A., Shellhammer, T.H., Yousef, A.E., Chism, G.W., 2003. Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. Journal of Food Protection 66, 2057–2061.
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical Analysis, 4th ed. pp. 663.
- Zhu, M.J., Mendonca, A., Ismail, H.A., Du, M., Lee, E.J., Ahn, D.U., 2005. Impact of antimicrobial ingredients and irradiation on the survival of *Listeria monocytogenes* and the quality of ready-to-eat turkey ham. Poultry Science 84, 613–620.
- Zhu, M.J., Mendonca, A., Ismail, H.A., Ahn, D.U., 2009. Fate of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat turkey breast rolls formulated with antimicrobials following electron-beam irradiation. Poultry Science 88, 205–213.



## ARTÍCULO N° 5

---

Comparación del efecto de la irradiación con electrones acelerados y del tratamiento térmico en la variabilidad de la inactivación de *Bacillus cereus* y la duración de la fase de latencia de las células supervivientes.

Artículo publicado bajo el título “*A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of Bacillus cereus inactivation and lag phase duration of surviving cells*” en International Journal of Food Microbiology (2012) 153, 444-452 y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, Juan A. Ordoñez, Gonzalo D. García de Fernando.

---





## A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of *Bacillus cereus* inactivation and lag phase duration of surviving cells

Juan S. Aguirre, Juan A. Ordóñez, Gonzalo D. García de Fernando \*

Depto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, Madrid 28040, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 August 2011

Received in revised form 7 December 2011

Accepted 11 December 2011

Available online 20 December 2011

#### Keywords:

*Bacillus cereus*

Variability

Inactivation

Lag phase

Heat treatment

Electron beam irradiation

### ABSTRACT

The effects of electron beam irradiation and heat treatments on the variability of inactivation of *Bacillus cereus* spores (CECT 131/ATCC 10876) and of the lag phase of single surviving cells have been studied. In general, dispersion in the number of survivors increased as the stress became more intense. A polynomial relationship was derived between the coefficient of variation of the survivor number and the inactivation achieved. Heat treatments caused wider distributions than irradiation for the same substrate and for a similar degree of microbial inactivation.

Increasing the intensity of the inactivation treatment lengthened the lag phase of survivors and increased its variability. Comparison of lag phases of heated and irradiated spores did not show any clear relationship. Heating did not affect the specific growth rate of surviving cells, whereas irradiation lowered the maximum specific growth rate in proportion to the dose applied. These results suggest that the shelf life of irradiated foods is longer than that of heated foods.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

There is no doubt that foodborne pathogenic bacteria are the cause of illness and death for many people each year, causing great economic losses and human suffering. The pathogenic bacterium *Bacillus cereus* is one of the most frequent food contaminants (Andersson et al., 1995), causing spoilage and food poisoning (Ehling-Schulz et al., 2004). This bacterium is usually found in a variety of foods. For example, *Bacillus* spp. and *B. cereus sensu lato* were found at prevalences of 95% and 76% in ready-to-eat cereals, though bacterial counts were low, with only 3.6% of the samples showing populations of more than 10,000 colony-forming units (cfu)/g based on both genus and species detection (Lee et al., 2009). Similar results were reported by Meldrum et al. (2009) when they analyzed more than 1,200 sauces served in kebab take-away restaurants.

The presence of *Bacillus cereus* is a perennial problem for many food industries because it is not always possible to apply sufficient heat to kill spores during food processing (Andersson et al., 1995). In addition, consumer demand for minimal processing of food products has made it attractive for the industry to apply mild preservative processes instead of harsher ones, even though this increases the microbiological risks.

Electron beam irradiation is an effective tool to eliminate pathogens present in foods (Patterson et al., 1993). Irradiation technology is being used in an increasing number of countries for decontamination and/or sterilization of dehydrated vegetables, fruits, meats, poultry, fish and seafood in order to improve product safety and shelf life, and an increasing number of clearances for radiation-decontaminated foods have been issued or are expected to be granted in the near future (Ayari et al., 2009).

Increasing evidence indicates that, even in a homogeneous environment, individual cells show heterogeneity in how they deal with stress. This biological variability may be due to strain variability (Lianou et al., 2006) and/or intrinsic cellular variability in how individual cells respond to environmental conditions (Nauta, 2000). This intrinsic variability may reflect the fact that the physiological state of cells is affected by their previous environment and exposure to stress conditions (Robinson et al., 2001). In addition, a microbial population contains stress-resistant and -sensitive cells; this heterogeneity can be due to genotype (Noma et al., 2006) or, in the case of clones, to non-genotypic differences (Humpheson et al., 1998; Booth, 2002; den Besten et al., 2006).

This biological variability has been studied with respect to the number of viable bacteria after heat inactivation (Aguirre et al., 2009) and irradiation (Aguirre et al., 2011), as well as with respect to individual cell lag phases after acidification (Rasch et al., 2007), heat (Metris et al., 2008), osmotic stress (Niven et al., 2008) and irradiation (Aguirre et al., 2011). However, no data are available on the effect of e-beam irradiation on inactivation variability, individual spore lag phases and lag phase variability.

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943744; fax: +34 91 3943743.  
E-mail address: [mingui@vet.ucm.es](mailto:mingui@vet.ucm.es) (G.D. García de Fernando).

The lag phase differs between spores and vegetative cells. In vegetative cells the lag phase reflects the time required for the cells to adapt to a new environment and start duplicating. Theoretically, if no adaptation is required, a vegetative cell can duplicate without any lag. In the case of spores, however, a lag phase is always observed; it reflects the time needed for a spore to transform into a vegetative cell, passing through the dormant phase, germination, elongation to the size of an adult cell and, eventually, division. Variability has been observed in all these phases in *Clostridium botulinum*, and the summation of all these steps means that single spores of this bacterium show substantial variability in their lag time (Stringer et al., 2011).

Guillier et al. (2005) studied the effect of nine preservation treatments of the same microbicidal efficacy on the individual lag phase of *L. monocytogenes*, and they ranked the stresses based on the lag phase duration of surviving cells: heat > benzalkonium chloride (BAC) > starvation > NaCl > NaOH > chlorine > lactic acid > cold > HCl. They also ranked them based on the lag phase variance: BAC > heat > chlorine > NaCl > starvation > NaOH > cold > lactic acid > HCl. In general, the longer the lag phase lasted, the larger its variance was. High variance means that some cells within the population have a very long lag phase, while some have a very short one; these few fast cells can unexpectedly shorten the population lag time (Baranyi, 2002), shortening the shelf life of a food product.

Quantification of microbial inactivation and of the lag phase of surviving cells is valuable for quantitative microbial risk assessment (QMRA), because it can take into account the variability and uncertainty of each parameter involved in estimating overall risk (Delignette-Muller and Rosso, 2000). Knowledge of the distribution of lag phases and, hence, the time needed to reach a given population size from individual spores (e.g., an infectious dose) is important for improving microbial growth prediction in food. This is particularly true when growth initiates from a low number of spores, as is the case for *Bacillus cereus* or *Clostridium botulinum*.

The aim of this work was to analyze and compare the inactivation of *Bacillus cereus* spores through E-beam irradiation and heating, as well as the lag phase of spores surviving these treatments.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strain and inoculum preparation

*Bacillus cereus* (CECT 131/ATCC 10876) was used. Sporulation was induced and harvesting performed according to Johnson et al. (1982) on fortified nutrient agar. Harvested spores were centrifuged at 5,000 g for 20 min at  $4 \pm 2$  °C (Sorvall RC5B), washed 5 times and stored in distilled water (ca.  $10^{10}$  spore/ml) at 4 °C until use.

Substrates for inoculation were sliced cooked ham (El Pozo Alimentación S.A., Murcia, Spain) previously sterilized by irradiation with 6 kGy, tryptic soy agar (TSA, Pronadisa, Spain), tryptic soy broth (TSB, Pronadisa), sterile whole milk (Asturiana, Asturias, Spain) and sterile saline solution (0.75% NaCl). *Bacillus cereus* spores were not heat-shocked before the inoculation in order to ensure as uniform a physiological state as possible, following the procedure of Wescoit et al. (1995).

### 2.2. Heat- and radio-resistance parameters

The method described by Leguerinel et al. (2005) was used to determine the heat resistance (*D* value) of *B. cereus* in whole milk, saline solution and TSB. The  $D_{10}$  value, defined as the dose in kGy necessary for a  $1 - \log_{10}$  reduction of the population, was estimated according to Cabeza et al. (2007) and Aguirre et al. (2011). The radiation dose absorbed was checked by measuring the absorbance of cellulose triacetate dosimeters attached to several sample bags.

*D* and  $D_{10}$  values were determined by linear regression; survival curves were obtained by plotting the decimal logarithm of survivor

number versus heating time or irradiation dose, respectively. The *D* and  $D_{10}$  values were determined from the slope of the linear portion of the curves, thereby excluding possible interference from shoulders and tails.

### 2.3. Maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ )

Maximum specific growth rates ( $\mu_{max}$ ) were estimated in ham and whole milk at 12 °C and in TSB at 22 °C from three replicate experiments. Growth curves were made with an initial cell concentration of ca.  $10^3$  spores per sample. Every day, 5 ham and 5 milk samples, randomly chosen, were diluted appropriately and plated onto TSA; cell concentration was checked using a spiral platter system (Eddy Jet; IUL Instruments, Barcelona, Spain). Plates were incubated at 37 °C and viable organisms were enumerated using an image analyzer (Countermath Flash; IUL Instruments). The growth data were fitted to the model of Baranyi and Roberts (1994) to determine kinetic parameters.

Maximum specific growth rate on TSB was estimated from turbidity growth curves in three replicate experiments using an automated spectrophotometer (Bioscreen C, Labsystems, Helsinki, Finland), as described by McKellar and Hawke (2006). Serial five-fold dilutions of each 24-h culture were prepared in fresh TSB to obtain dilutions from approximately  $10^7$  to  $10^0$  cfu ml<sup>-1</sup>. Twenty replicate samples (350 µl) from each dilution were inoculated into wells of Bioscreen microplates (Labsystems). The plates were loaded into the Bioscreen C operating at an incubation temperature of 22 °C. Turbidity measurements were determined at 600 nm at 15-min intervals, after shaking at medium intensity for 10 s. Plates were incubated for 96 h. Dilutions of each initial inoculum were plated by spreading onto TSA, then they were incubated at 37 °C and colonies were counted.

Using the Bioscreen device, the time to detection ( $T_d$ ), defined as the time required to reach an absorbance of 0.20, was obtained from each well, and a mean value was calculated for each dilution. The coefficient of determination ( $R^2$ ), standard error (*SE*) and slope of the regression of mean  $T_d$  versus the natural logarithm of the inoculum density were obtained using the Data Analysis Add-In of Microsoft Excel. The  $\mu_{max}$  was estimated from the reciprocal of the absolute value of the regression slope.

Since irradiation affects the  $\mu_{max}$  of surviving organisms (Cabeza et al., 2010), this parameter was calculated for spores in both ham and TSB irradiated with 0, 2, 3 or 4 kGy. The procedure was the same as that described above. Growth curves were determined in triplicate. As a control,  $\mu_{max}$  was also determined for heated spores.

The  $\mu_{max}$  was assumed to be constant throughout the exponential growth phase for all substrates (ham, TSB, milk).

### 2.4. Inactivation variability

To quantify the variability in the number of survivors after each heat treatment, 70–80 tubes from each treatment, each containing 9.9 ml saline solution or sterile whole milk, were immersed in a glycerol bath and allowed to reach 94 °C before being inoculated with 100 µl of the spore suspensions described above. When the heat treatment was complete, an aliquot (100 µl) was removed from each tube and immediately mixed with 900 µl of cold sterile saline solution immersed in an ice water bath. To minimize errors due to the high number of samples processed, the order for processing samples was the same for inoculation and for sampling, and the time spent inoculating was kept as close as possible to the time spent sampling. Subsequently, 100 µl of each cooled sample was further diluted if needed and plated onto TSA using a spiral platter. Plates were incubated at 37 °C for  $24 \pm 2$  h and cfu were enumerated with an image analyzer and, eventually, plates were kept at 37 °C for up to 4 days to verify that injured spores were recovered within the first 24 h.

To quantify the variability in the number of survivors after irradiation, 70–80 TSA plates and 70–80 ham slices were contaminated with the

spore suspensions described above. Inocula and melted TSA were mixed in plates to achieve cell concentrations from  $10^2$  to  $10^7$  spores/plate; after the medium solidified, plates and lids were bound together with Parafilm. Two batches of plates with two different bacterial concentrations were irradiated at different doses as follows: 0 kGy,  $10^2$  and  $10^3$  spores/plate; 1 kGy,  $10^3$  and  $10^4$  spores/plate; 2 kGy,  $10^4$  and  $10^5$  spores/plate; 3 kGy,  $10^5$  and  $10^6$  spores/plate; and 4 kGy,  $10^6$  and  $10^7$  spores/plate. These concentrations were used in order to reach a final number of survivors of approximately  $10^2$  spores/plate after treatment. Plates were incubated as described above.

Ham slices (1 mm thick) previously treated with 6 kGy were immersed one by one in a spore suspension to achieve initial loads from  $10^2$  to  $10^7$  spores/slice. The slices were put into sterile Stomacher plastic bags and heat-sealed. Two batches (70–80 samples in each) with two different bacterial concentrations were irradiated at different doses as follows: 0 kGy,  $10^2$  and  $10^3$  spores/slice; 1 kGy,  $10^3$  and  $10^4$  spores/slice; 2 kGy,  $10^4$  and  $10^5$  spores/slice; 3 kGy,  $10^5$  and  $10^6$  spores/slice; and 4 kGy,  $10^6$  and  $10^7$  spores/slice. The viable count in irradiated ham slices was determined using the same procedure as for estimating  $D_{10}$ .

Several samples (10–20) from every batch were not irradiated and used to determine initial microbial load.

### 2.5. Variability in lag phase duration

Individual spore lag times in TSB were estimated from turbidity growth curves generated with the Bioscreen C, as described by several authors (Metris et al., 2003; Guillier et al., 2005; Aguirre et al., 2009). Sterile plastic bags containing 200 ml of TSB and tubes with 9.9 ml of TSB were experimentally contaminated with *B. cereus* spore suspensions to achieve initial loads from  $10^1$  to  $10^5$  cfu/ml, and then samples were irradiated (bags) or heated (tubes) in order to achieve reductions of 0–4 log, respectively. An aliquot (10 ml) from sterile plastic bags and the entire content of tubes were mixed with 90 ml of sterile TSB, and 350  $\mu$ l of this suspension were transferred to 100 wells of a Bioscreen microplate. The wells of a second microplate were filled with 350  $\mu$ l of a 1:10 dilution of the same suspension to ensure that a majority of wells on at least one of the microplates contained only one cell.

The average number of cells per well was estimated according to the Poisson distribution based on the probability of having one cell per well (Baranyi et al., 2009). In this case

$$m = -\ln P \quad (1)$$

where  $m$  is the average number of cells per well and  $P$  is the probability of finding no growth in a well. Batches showing  $P$  values less than 0.14 (14% of wells with no growth) or higher than 0.85 were discarded. When  $P$  is lower than 0.14, the average number of cells per sample is higher than 2 and the individual lag estimations may be too inaccurate. When  $P$  is higher than 0.85, the data are insufficient to generate reliable frequency distributions.

Cultures were grown at 22 °C. The increase in optical density (OD) was measured as the absorbance at 600 nm using the Bioscreen C every 30 min for up to 2 weeks. Cultures were shaken for 10 s at medium intensity before measuring OD. Data were only considered when the average of cells per well was lower than 2 and higher than 0.36, based on the  $P$  cutoffs described above. The following assumptions were made to estimate lag times of single spores: (i) the distribution of detection time ( $T_d$ ) was a convolution of the distributions of single spore lag time and initial spore number; (ii) lag time was defined as the time needed for a spore to generate two daughter cells; (iii) after the first division, cells grew immediately at the maximum growth rate; and (iv) cells continued to grow at the maximum rate even after turbidity became visible.

Individual spore lag times were estimated using  $T_d$  as follows (Baranyi and Pin, 1999). Lag time was defined as the time required

for the OD at 600 nm to reach 0.2 units, equivalent to a concentration of ca.  $10^6$  cfu/well. This value was estimated by making a series of dilutions from a culture grown in TSB at 37 °C for 24 h, then measuring their OD using the Bioscreen. Bacterial counts were estimated by plating on TSA. Lag times were then calculated using the equation

$$\text{Lag} = T_d - \frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu_{\max}} \quad (2)$$

where  $N_d$  is the bacterial number at  $T_d$ ,  $N_0$  the initial number of spores per well under consideration, and  $\mu_{\max}$  is the maximum specific growth rate determined under the experimental conditions described above.

To estimate the individual spore lag times after irradiation of ham and heat treatment of milk, two dilutions of each sample at each dose were tested to confirm that one batch contained, on average, less than one cell per sample. Each one consisted of around 170 samples. Sterilized slices were placed individually in sterile plastic bags, and 9 ml of sterile whole milk in test tubes were inoculated with a spore suspension (ca.  $10^1$  to  $10^5$  cfu) and treated by irradiation or heat in order to reach a final load of less than one viable spore in at least one of the batches. After treatment, samples were incubated at 12 °C.

Aliquots of five ham and milk samples per day were randomly selected, plated into melted TSA and incubated at 37 °C for  $36 \pm 2$  h to check growth. When the bacterial count of one sample of a batch was approximately  $10^3$ – $10^4$  cfu, the entire batch was plated onto TSA as described above.

The average number of viable cells per sample was estimated using Eq. (1). Lag time was calculated from plate counts using Eq. (2) with the following modifications:  $T_d$  was replaced by  $T_{\text{count}}$ , defined as the time when the sample was plated out;  $\ln(N_d)$  was the natural logarithm of the cell number detected at  $T_{\text{count}}$ ; and  $\ln(N_0)$ , the natural logarithm of the initial number of bacteria, was defined as zero because we assumed that all samples contained only one cell.

### 2.6. Statistical analysis

Normal distribution fitting of the numbers of survivors and gamma distribution fitting of lag times of individual survivors were carried out using the Microsoft Excel Add-in Varifit (BACANOVA, 2005), kindly donated by the Computational Microbiology Group of the Institute of Food Research (Norwich, United Kingdom).

The variances in the distributions of the concentrations of survivors were compared by the Bartlett test (Zar, 1999) using StatGraphics Plus 5.0. The variances in the distributions of lag phases were compared using a permutation test (Box and Andersen, 1955) within R software (version 2.7.2, 2008). This permutation test is robust for non-normally distributed samples. A Holm–Bonferroni  $p$ -value correction was applied to the significance value ( $\alpha$ ) among variances of distributions (Holm, 1979).

The coefficient of variation (CV) was calculated to quantify the dispersion of the data.

Predictions of polynomial equations showing the relationship between the CV of survivor numbers and the inactivation achieved was validated with data from foods (the results with irradiated ham and heated milk) by the percentages of discrepancy and bias (Baranyi et al., 1999).

## 3. Results

### 3.1. Microbial inactivation ( $D_{10}$ and $D$ values) and $\mu_{\max}$

Experimental  $D_{10}$  and  $D$  values are shown in Table 1. *B. cereus* in food showed a greater resistance to both heat and irradiation than did *B. cereus* in culture medium or saline solution.

The  $\mu_{\max}$  of this bacterium was directly proportional to growth temperature and inversely proportional to the radiation applied

**Table 1**

Experimental  $D$  and  $D_{10}$  values of *Bacillus cereus* used to predict the inactivation necessary to obtain one viable spore per sample.

Treatment	Medium	$D$ value <sup>a</sup>	SE <sup>b</sup>
Irradiation (kGy)	Ham	0.95	0.019
	TSA	0.87	0.016
	TSB	0.85	0.015
Heat 94 °C (min)	Whole milk	9.26	<0.001
	Saline solution	8.64	<0.001
	TSB	8.49	0.005

<sup>a</sup>  $D_{10}$  value (kGy) for irradiation and  $D$  value (min) for heat treatment.

<sup>b</sup> Standard error of  $D_{10}$  and  $D$  values.

**Table 2**

Experimentally determined maximum specific growth rates ( $\mu_{\max}$ ) of *Bacillus cereus* used to estimate the lag phase. Growth rates shown are averages of three replicates.

Irradiation (kGy)	TSB, 22 °C		Ham, 12 °C		Milk, 12 °C	
	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	SE <sup>a</sup>	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	SE	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	SE
0	0.743	0.091	0.078	0.004	0.082	0.007
2	0.683	0.050	0.053	0.004		
3	0.567	0.054	0.037	0.004		
4	0.438	0.030	0.033	0.004		

<sup>a</sup> Standard error of  $\mu_{\max}$ .

(Table 2); the highest value (0.743 h<sup>-1</sup>) was obtained in non-irradiated TSB at 22 °C, and the lowest (0.033 h<sup>-1</sup>) in ham treated with 4 kGy and subsequently incubated at 12 °C.

### 3.2. Variability in number of survivors after inactivation treatment

Heat and irradiation were applied to *B. cereus* in different substrates to achieve a specified logarithmic reduction (Table 3). The mean, standard deviation ( $Sd$ ) and CV of survivors were calculated from data obtained from 70 to 81 samples (Table 3). Non-treated controls (between 9 and 15) always showed the smallest  $Sd$ . More severe heat or irradiation treatment resulted in fewer survivors but greater variability in the final numbers of viable bacteria; consequently, more severe treatments yielded larger differences between maximum and minimum cell concentrations (Table 3). Indeed, in the most intense treatment applied, which led to an average reduction of around 4 log,

the bacterial load differed by more than 2 orders of magnitude after heat treatment and more than 1 order after irradiation. Comparing the variances in both treatments showed that variability in the number of survivors was greater after heat treatment than after irradiation for a similar degree of inactivation. CV values of survivor number after the most intense treatments were approximately 10 times higher than those of untreated samples. In particular, CV values after heat treatment were higher than those after irradiation (Table 3). Fig. 1 shows the relationship between the CV of the logarithm of survivor number versus the inactivation achieved. Polynomial fitting of the experimental data resulted in a high coefficient of determination. Comparison of the data predicted by equations obtained in saline solution and TSA with experimental data obtained in foods showed a discrepancy percentage of 20.5 and 51.6% for heat and irradiation, while the bias % was -17.2 and -46.5%. These percentages indicate that variability of organism inactivation achieved in foods is reasonably similar to that in less complex substrates, and the sign of the bias shows that, as expected, such variability is higher in foods than in TSA or saline solution.

Distributions of bacterial inactivation in cooked ham and TSA after irradiation, as well as in milk and 0.75% saline solution after heat treatment, are shown in Fig. 2. The Bartlett test showed that the variability in the number of survivors was significantly lower for controls than for all treated samples (Table 4). In most cases, the variances in survivor number were significantly different ( $p < 0.05$ ) for both treatments, as revealed by a multiple comparison test applied within and between treatments.

### 3.3. Lag phase variability after heat or irradiation treatment

Table 5 shows lag phases of individual viable organisms after different irradiation and heat treatments. The mean,  $Sd$  and CV of individual lag phases were calculated from data obtained with 115–154 food samples and 100 TSB samples per batch. The average number of viable cells per sample ranged from 0.56 to 1.14. Lag phases of survivors after similar microbicidal treatments were shorter and less variable in TSB than in food, primarily because of incubation temperature. In all cases, untreated cells showed the smallest values of lag time and  $Sd$  of lag time. As the stress increased, the lag phase became longer and the  $Sd$  of lag phases increased. Lag phases of irradiated spores in ham were shorter than those of spores heated in milk for the same degree of

**Table 3**

Inactivation of *Bacillus cereus* in cooked ham and tryptic soy agar (TSA) after different irradiation treatments and in whole milk and saline solution after different heat treatments.

Unit operation	Medium	Expected number of log reductions	Number of samples	Average number of survivors (log cfu/sample)	$Sd$	Average of inactivation achieved (-log cfu/sample)	Min <sup>a</sup>	Max <sup>b</sup>	Coefficient of variation (%) (100 * $Sd$ /mean)	
Irradiation	Ham	0	15	7.13 <sup>c</sup>	0.082	0.00	7.03	7.31	1.2	
	Ham	2	74	5.07	0.168	2.06	4.89	5.56	3.3	
	Ham	3	76	4.12	0.275	3.01	3.42	4.42	6.7	
	Ham	4	73	3.13	0.343	3.99	2.90	4.29	10.9	
	TSA	0	10	7.34 <sup>d</sup>	0.038	0.00	7.29	7.39	0.5	
	TSA	2	74	5.33	0.155	2.02	4.76	5.56	2.9	
	TSA	3	70	4.22	0.196	3.12	3.69	4.79	4.7	
	TSA	4	81	3.26	0.282	4.09	2.58	4.07	8.7	
	Heat (94 °C)	Milk	0	10	8.71 <sup>e</sup>	0.069	0.00	8.54	8.78	0.8
		Milk	2	78	6.48	0.247	2.23	5.90	6.89	3.8
Milk		3	78	5.71	0.417	3.01	4.93	6.25	7.3	
Milk		4	73	4.65	0.543	4.06	3.33	5.63	11.7	
SS		0	9	8.51 <sup>e</sup>	0.054	0.00	8.39	8.58	0.6	
SS		2	78	6.41	0.203	2.10	6.30	7.19	3.2	
SS		3	78	5.59	0.343	2.92	4.41	6.08	6.1	
SS		4	73	4.50	0.439	4.01	3.22	5.21	9.8	

$Sd$ : Standard deviation (log cfu/sample).

SS: Saline solution (0.75% NaCl).

<sup>a</sup> Minimum concentration in a sample (log cfu/sample).

<sup>b</sup> Maximum concentration in a sample (log cfu/sample).

<sup>c</sup> Surviving organisms per slice (ca. 32 cm<sup>2</sup>).

<sup>d</sup> Surviving organisms per plate (50 cm<sup>2</sup>).

<sup>e</sup> Surviving organisms per ml.

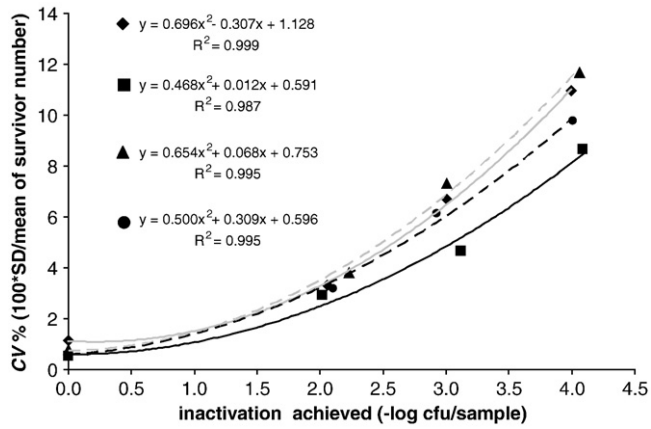


Fig. 1. Relationship between the coefficient of variation (CV) of survivor number and the inactivation achieved after different irradiation or heat treatments. Results are shown for irradiated cooked ham (diamonds) and tryptic soy agar (squares), and for heated whole milk (triangles) and saline solution (circles). Polynomial regression equations are shown.

inactivation, growth temperature and substrate, but they showed greater variability (Table 5). The opposite tendency was observed in TSB, with irradiated spores showing longer and less variable lag phases.

Unlike the variance of inactivation, the CV of lag phase distributions did not show a polynomial correlation with the inactivation degree achieved. In general, the standard deviation increased proportionally to the mean lag phase (Table 5). Increasing the intensity of the inactivation treatment lengthened the mean lag phase and increased the *Sd*

proportionally; as a result, the plot of lag phase CV versus inactivation degree tended to be parallel to the x-axis. The same finding has been reported by Aguirre et al. (2011). Therefore, lag phase variability was expressed in terms of the *Sd* of lag phase distributions.

Table 6 shows linear regression equations relating either the average individual lag phase or the *Sd* to inactivation. Coefficients of determination of the regression between the inactivation and lag *Sd* were similar (in the case of *Bacillus cereus* irradiated in TSB) or larger than those of the regression between inactivation and mean lag phase, indicating that the lag phase variability was more consistent with inactivation than the lag phase itself. This implies that the lag dispersion can be modeled relatively accurately.

Fig. 3 shows the distributions of lag phases of individual viable spores in cooked ham and whole milk at 12 °C and TSB at 22 °C after different irradiation or heat treatments. A permutation test showed that variances of the lag phase were significantly different ( $p < 0.05$ ) for the different treatments for the same substrate and growth temperature (Fig. 3). When this test was used to compare irradiation and heat treatments of similar intensity for the same growth temperature and similar substrates (ham and milk on one hand or TSB on the other), only the untreated samples showed no significant differences (data not shown).

In general, the survivor number and lag phase distributions did not show tails, especially at low log reductions. In fact, most distributions were nearly symmetrical. However, when the stress increased, the distributions took on asymmetrical and atypical shapes (Figs. 2 and 3), particularly at low temperatures (Fig. 3).

#### 4. Discussion

This study set out to determine the variability in the number of survivors and in the lag phase of individual spores of *Bacillus cereus* after

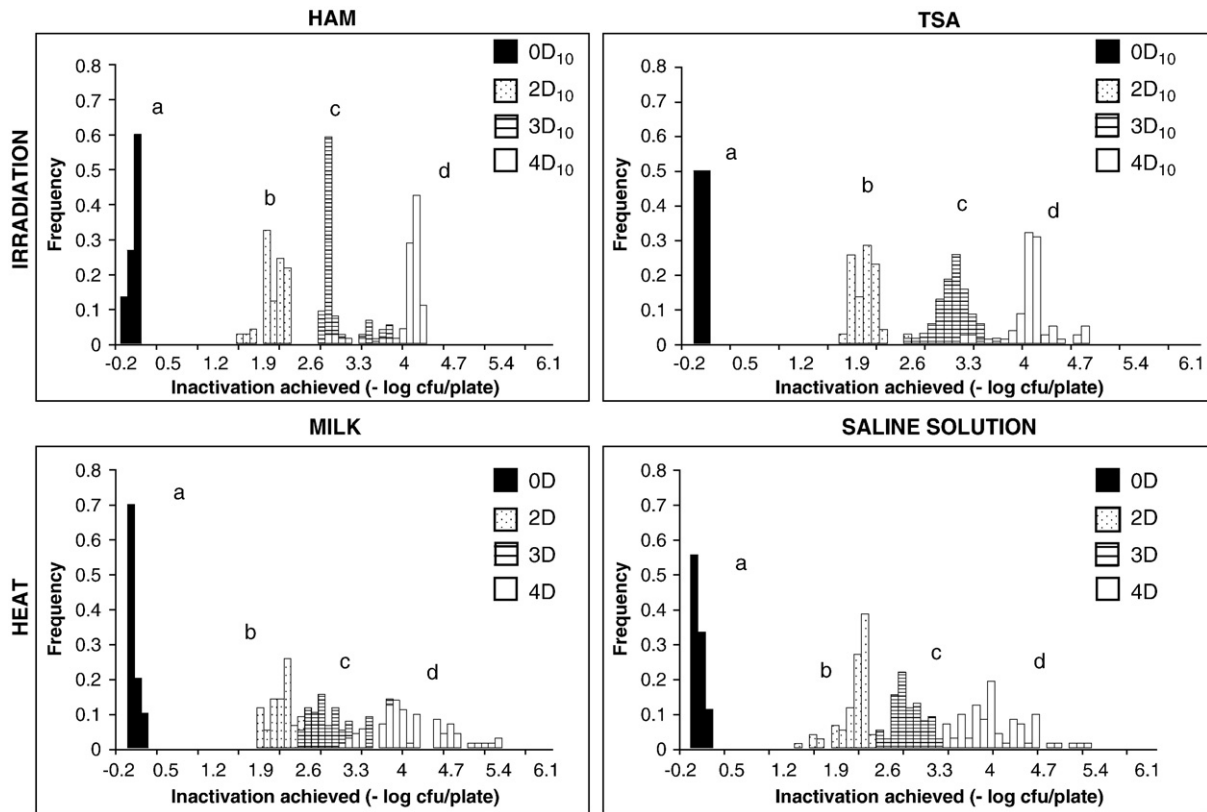


Fig. 2. Distributions of bacterial inactivation in irradiated cooked ham and tryptic soy agar (TSA) and in heated whole milk and saline solution (0.75%). The variances of distributions labeled with different letters are significantly different by the Bartlett test ( $p < 0.05$ ). 0D–4D and 0D<sub>10</sub>–4D<sub>10</sub> indicate the expected number of decimal reductions after heat and irradiation, respectively.

**Table 4**

Comparison of the inactivation distributions achieved by irradiation and heat treatments using the Bartlett test. The x in a square means that the distributions obtained with the two inactivation treatments were not significantly different ( $p > 0.05$ ).

Unit operation	Substrate	Inactivation <sup>a</sup>	Heat				Irradiation							
			Saline solution		Milk		TSA		Ham					
			0	2	3	4	0	2	3	4				
Heat	Saline solution	0	■	■										
		2		■	■									
		3			■	■								
		4				■	■							
	Milk	0	x			■	■							
		2		x			■	■						
		3			x			■	■					
		4				x			■	■				
Irradiation	TSA	0	x			x			■	■				
		2							■	■				
		3								■	■			
		4									■	■		
	Ham	0	x			x						■	■	
		2		x						x			■	■
		3			x								■	■
		4				x			x					■

<sup>a</sup>Expected log reduction.

different inactivation treatments. As the treatments became more stressful, the variability of both parameters increased, potentially leading to undesirable safety outcomes in food production processes.

The inactivation of bacteria by irradiation and heat treatments fits first-order kinetics (data not shown). The  $D_{10}$  and  $D$  values reported in the literature for *Bacillus cereus* vary widely, from 0.32 kGy (Ayari et al., 2010) to 4 kGy reported by Monk et al. (1995) in their review, and from 21 s at 99 °C in phosphate buffer (Wescoit et al., 1995) to 46 s at 105 °C in distilled water (Fernandez et al., 1999). This variation probably reflects the fact that *B. cereus*  $D$  values depend on many factors, including substrate type, pH and water activity. The values found in this study (Table 1) fall within this wide range.

The number of surviving spores was lower, but also more variable, following more intense treatments (Table 3). This finding confirms results on vegetative organisms treated by heat (Piyasena and McKellar, 1999; Aguirre et al., 2009), high pressure (Tay et al., 2003), and irradiation (Aguirre et al., 2011).

Comparing the effect of heat and irradiation treatments on inactivation variability indicates that, for the same degree of inactivation, irradiation gives more homogeneous results than heating. Other factors also influence the variability, such as the substrate to which the treatment is applied. As expected, the more complex the substrate was, the greater the variability. The highest variability was found in heat-treated milk and the lowest in irradiated TSA (Table 3).

**Table 5**

Lag phase of viable single spores of *Bacillus cereus* after different irradiation and heat treatments in cooked ham, milk and tryptic soy broth (TSB).

Unit operation	Growth conditions	Number of log reductions	Total number of samples	Number of samples with growth	Average number of cells per sample <sup>a</sup>	Mean lag phase (h)	Sd (h)	Min. lag phase (h)	Max. lag phase (h)	Coefficient of variation (%) (100*Sd/mean)
Irradiation	Ham, 12 °C	0.0	135	70	0.77	30.3	4.8	17.6	40.2	15.9
		2.1	139	67	0.66	53.1	22.3	8.5	84.1	42.1
		3.0	154	71	0.62	78.8	37.9	15.9	146.1	48.1
		4.1	150	64	0.56	144.9	56.6	28.9	256.0	39.1
	TSB, 22 °C	0.0	100	62	0.97	11.1	1.1	8.4	15.2	9.8
		2.1	100	59	0.89	30.6	3.8	21.3	41.5	12.3
		3.2	100	57	0.84	60.7	5.7	43.7	64.0	9.4
		4.1	100	55	0.80	80.8	9.2	61.9	102.6	11.3
Heat	Milk, 12 °C	0.0	115	72	0.99	21.6	9.2	1.1	37.5	42.7
		2.2	120	69	0.84	63.6	22.0	22.8	107.7	34.6
		3.1	132	73	0.80	117.1	29.9	48.2	170.4	25.5
		4.1	138	70	0.71	206.8	37.6	132.9	290.3	18.2
	TSB, 22 °C	0.0	100	62	0.97	6.4	1.1	3.8	10.5	17.1
		2.1	100	60	0.92	20.0	5.7	5.1	31.5	28.4
		3.1	100	63	0.99	51.3	8.9	20.5	66.3	17.4
		4.1	100	68	1.14	76.8	14.3	47.0	109.0	18.6

Sd: Standard deviation.

<sup>a</sup> Calculated from Poisson distribution tables.

**Table 6**  
Linear regression equations relating either the average individual lag phases ( $y$ ) or the standard deviations ( $Sd$ ) ( $z$ ) with the inactivation ( $x$ ). The corresponding coefficients of determination ( $R^2$ ) are also shown.

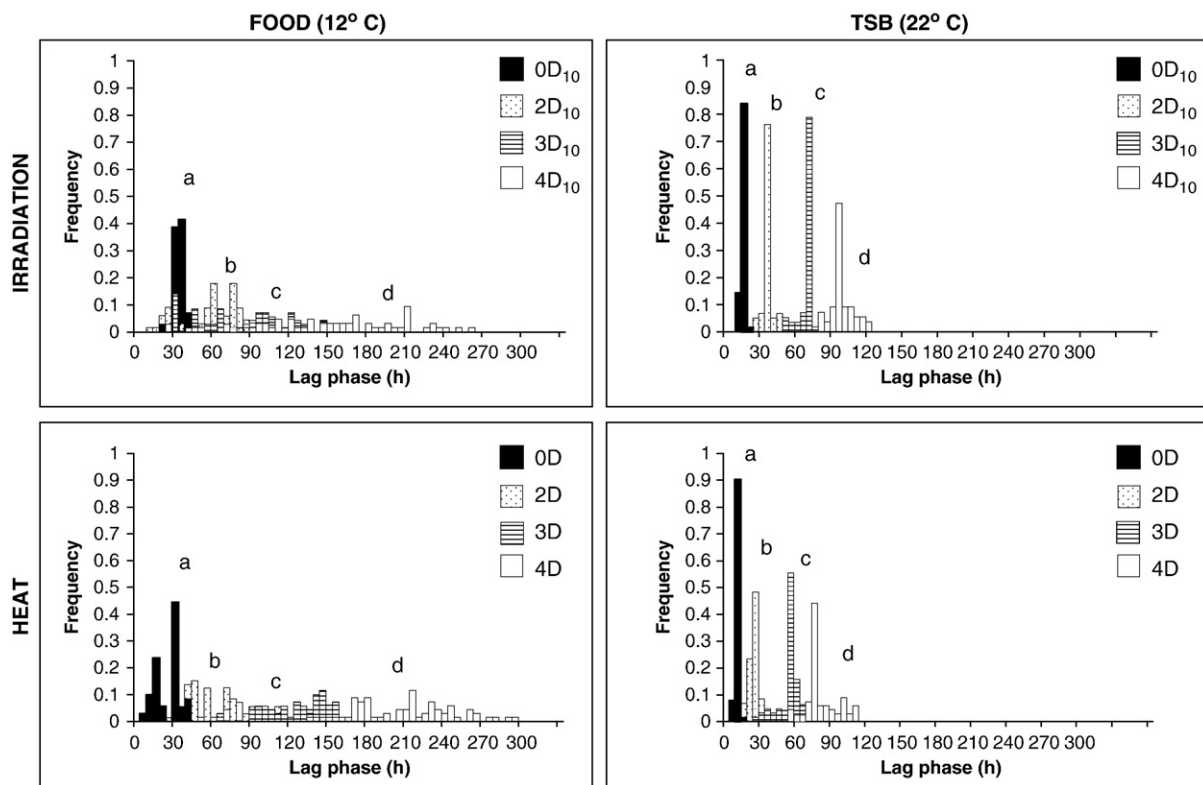
Unit operation	Substrate	Temp. (°C)	Average lag vs. inactivation		Sd lag vs. inactivation	
			Equation	$R^2$	Equation	$R^2$
Irradiation	Ham	12	$y = 26.01x + 16.95$	0.83	$z = 12.46x + 1.74$	0.96
	TSB	22	$y = 17.00x + 5.86$	0.94	$z = 1.86x + 0.58$	0.93
Heat	Milk	12	$y = 42.47x + 2.50$	0.86	$z = 6.90x + 8.45$	0.99
	TSB	22	$y = 17.02x - 0.94$	0.89	$z = 3.09x + 0.32$	0.95

CV, which equals  $Sd$  multiplied by 100 and divided by the mean, is a scaled measure that compares the degree of variation in situations in which means differ (Jongenburger et al., 2010). In the present study, when the mean log of survival number decreased, its  $Sd$  increased; therefore, a polynomial correlation was found between the CV and the inactivation achieved, regardless of the type or intensity of inactivation (Fig. 1). This relationship may prove useful for predicting the variability in survivor number after a preservative treatment. The relatively low discrepancy and bias obtained here suggest that polynomial equations relating the inactivation achieved with the variability (CV) in survivor number may be used to predict inactivation variability, which is highly relevant to QMRA.

Spore resistance is due to a variety of factors, including spore core dehydration and small acid-soluble proteins (SASPs). Heat inactivation is associated with damage to protein components in the membrane and inactivation of metabolic enzymes. Inactivation by irradiation, however, is presumably due to DNA damage. While heat-induced damage can be repaired during spore germination and outgrowth, DNA damage is more difficult to repair (Montville and Matthews, 2005). This may be one reason why variability in survivor number was greater after heat treatment than after irradiation in our study.

That  $\mu_{max}$  is not affected by sublethal injury is generally accepted. However, while pulsed electric fields inactivate *Escherichia coli*, they increase the specific growth rate of surviving cells (Aronsson et al., 2004). Conversely, Cabeza et al. (2010) showed that *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* cells irradiated by E-beam show longer doubling times than non-irradiated ones. The present study clearly shows a similar result: the specific growth rate of viable irradiated *B. cereus* cells was smaller than that of non-irradiated ones (Table 2). In addition, higher irradiation doses led to smaller  $\mu_{max}$ , such that the value after treatment with 4 kGy was less than half that of untreated cells. If the growth rate of viable cells after irradiation is slower than that of non-irradiated ones, this must be taken into consideration when lag phases are estimated, since this estimation is based on the specific growth rate [Eq. (2)].

More intense stress led to longer and more variable lag phases (Table 5). Other factors also affect the length and variability of the lag phase. For example, less favorable growth conditions lengthen the lag, and low amounts of inoculum, from 1 to 100 cells, influence the lag time. Cultures containing only a few cells show longer lag times, with greater variability, than those containing more cells (Pin and Baranyi, 2006). In the study by Pin and Baranyi (2006), the



**Fig. 3.** Distributions of lag times of single viable spores in cooked ham and whole milk at 12 °C and tryptic soy broth (TSB) at 22 °C after different irradiation or heat treatments. The variances of distributions labeled with different letters are significantly different by the permutation test ( $p < 0.05$ ). 0D–4D and 0D<sub>10</sub>–4D<sub>10</sub> indicate the expected number of decimal reductions after heat and irradiation, respectively.

inoculum size was estimated from the more probable number (MPN) based on a Poisson distribution. In our case, the inoculum amount is expected to have negligible influence on the lag phases because the average number of cells per sample ranged from 0.56 and 1.14 (Table 5), which means that in the first case, 57% of samples did not contain viable cells, 32% contained one cell, 9% two cells and 2% three cells, while the highest average of cells per sample indicates that 32% of samples had no viable cells, 36% had one, 21% had two, 8% had three, 2% had four, and 1% had five. In addition, there was a strong correlation between individual lag phases and the degree of inactivation, and between lag phase *Sd* and degree of inactivation (Table 6). These results indicate that the stress and injuries caused by either irradiation or heat affect the lag phase duration and its variability more than does the presence of more than one cell per sample.

Data from the present study confirm the findings of other authors. For instance, Lund et al. (1990) reported a large variation in the detection times of *C. botulinum* spores after different heat treatments, ranging from 23.3 h (*Sd*, 7.8 h) for unheated spores, 99.9 h (*Sd*, 42.6 h) for spores heat-treated for 20 s at 80 °C, and 160 h (*Sd*, 62.3 h) for spores heat-treated for 1 min. Smelt et al. (2008) and Stringer et al. (2009) found that as the intensity of heat treatments increased, the distribution of individual spore lag times of *Bacillus subtilis* and *C. botulinum*, respectively, broadened.

In all the cases mentioned, the variability of individual lag times seems to increase as microorganisms are injured or as growth conditions become less favorable. The nature of the stress also influences the lag phase duration and its variability. In the present study, comparison of heat and irradiation treatments that achieved a similar degree of inactivation shows that in TSB, heating induced shorter although more variable lag phases than did irradiation (Table 5). Different results were obtained for food substrates (ham and milk). Heat treatments led to a lag variability of up to 34.6%, while irradiation, to variability of up to 48.1%, both in terms of CV. In contrast, Guillier et al. (2005) observed that heat stress induced the greatest lag phase variability among nine food preservation treatments usually applied by the industry (excluding irradiation), with CV values ranging from 5 to 28%. The reason for these different results is most likely the growth temperature, which was 12 °C in our case and 30 °C in the work of Guillier et al. (2005). In support of the idea that growth conditions can affect the CV, Metris et al. (2003) observed a range of values from 5 to 10% as the growth conditions in TSB at 30 °C became less favorable when the pH was shifted from 4.5 to 7 and the NaCl concentration from 0.5 to 8%.

In the present work, we did not differentiate among the different stages of the spore lag phase, so our data represent global variability of the lag phase of single spores. Stringer et al. (2011) reported large variability during the different stages of the lag phase of *C. botulinum* spores. They studied the germination and outgrowth of spores separately and concluded that there was noticeable variability in both

phases, with the variability of one phase independent of that of the other. Thus, a spore with a short germination period may need a short or long outgrowth. These results suggest that spores within a single population are very heterogeneous, causing large variability in the individual lag times.

In real situations, preservative treatments usually inactivate most of the bacterial population, pathogens or not. Some of the surviving cells are unable to divide (viable, non-culturable), while a few can repair themselves and begin growing if the type of food and storage conditions permit. As a result of this growth, the surviving cells may pose a risk to consumers if the storage period is long enough. An understanding of the variability in survivor number and in the lag phases of individual cells after a given treatment would allow QMRA to accurately predict the health risk. To demonstrate this point, our experimental data can be cast into the frame of a QMRA (Table 7). Suppose that heating or irradiation is applied to packages containing, on average,  $10^2$  *B. cereus* spores, resulting in a 4-logarithmic reduction. Thus, the average number of viable spores per pack is  $10^{-2}$ , i.e. 0.1% of packages are expected to contain at least one viable spore. Standard deviations are 0.543 log cfu/pack for heating and 0.343 for irradiation (Table 3). According to the normal distribution, 95% of cases fall within the interval between mean + 1.96 \* *Sd* and mean – 1.96 \* *Sd*. This means that after heating, with 0.1% of packages on average containing at least one *B. cereus* spore, 95% of the batches (with each batch containing 1000 packages) will contain between 0.8 and 121.9 packs with spores. After irradiation, however, 95% of irradiated batches will contain between 2.1 and 48.5 packs (average, 10 packs) with spores. Assuming that spore lag phases are gamma distributed and that the mean lag phase is 207 h (*Sd*, 37.6 h) for heating, 95% of heated viable spores will have a lag phase lasting between 133 and 281 h. This means that the population will reach an infective dose of  $10^3$  (Granum, 1994) in 218–366 h in milk, assuming a constant  $\mu_{max}$  of  $0.082 \text{ h}^{-1}$  (Table 2). By the same reasoning, the time for irradiated spores to reach the infective dose at 12 °C is 244–466 h, since  $\mu_{max}$  is  $0.033 \text{ h}^{-1}$  (Table 2). As these examples illustrate, although the lag phases of irradiated cells are shorter than those of heat-treated cells, irradiation reduces the growth rate, so irradiated foods are expected to have longer shelf lives than heat-preserved foods.

The results of our study, together with previous work from several research groups, clearly indicates that knowledge about the variability of inactivation and lag phase of surviving cells is as essential to QMRA as are other, better-studied factors, like preservation treatments, storage conditions, and type of food product.

## Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the support of the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain), the Consolider Program CARNISENUSA CSD2007-0016 and AGL-2010-16598. We thank Carmen Bravo for

**Table 7**

Hypothetical quantitative risk microbiological assessment. An example of practical consequences of the inactivation and survivor lag phase variabilities from data shown in Tables 3 and 5. Maximum specific growth rates ( $\mu_{max}$ ) at 12 °C are shown in Table 2. The interval defined by the mean  $\pm 1.96 \cdot Sd$  comprises 95% of the data in a normal distribution.

Heating			Irradiation		
% of packs with spores	Spores/pack	Log spores/pack	Log spores/pack	Spores/pack	% of packs with spores
10.0	0.0100	–2	–2	0.0100	10.0
		0.543	<i>Sd</i>	0.343	
116.0	0.1160	–0.93572	Mean + 1.96 * <i>Sd</i>	–1.32772	47.0
0.9	0.0009	–3.06428	Mean – 1.96 * <i>Sd</i>	–2.67228	2.1
Time (h) at 12 °C to reach $10^3$	$\mu$ at 12 °C	Lag (h)	Lag (h)	$\mu$ at 12 °C	Time (h) at 12 °C to reach $10^3$
292	0.082	207	Mean	145	355
		37.6	<i>Sd</i>	56.7	
366		281	Mean + 1.96 * <i>Sd</i>	256	466
218		133	Mean – 1.96 * <i>Sd</i>	34	244

assistance with the statistical analysis and Armando Chapin Rodríguez for assistance with manuscript writing.

## References

- Aguirre, J.S., Pin, C., Rodríguez, M.R., García de Fernando, G.D., 2009. Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6992–6997.
- Aguirre, J.S., Rodríguez, M.R., García de Fernando, G.D., 2011. 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* 149, 236–246.
- Andersson, A., Ronner, U., Granum, P.E., 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology* 28, 145–155.
- Aronsson, K., Borch, E., Stenlof, B., Ronner, U., 2004. Growth of pulsed electric field exposed *Escherichia coli* in relation to inactivation and environmental factors. *International Journal of Food Microbiology* 93, 1–10.
- Ayari, S., Dussault, D., Millette, M., Hamdi, M., Lacroix, M., 2009. Changes in membrane fatty acids and murein composition of *Bacillus cereus* and *Salmonella Typhi* induced by gamma irradiation treatment. *International Journal of Food Microbiology* 135, 1–6.
- Ayari, S., Dussault, D., Millette, M., Hamdi, M., Lacroix, M., 2010. Response of *Bacillus cereus* to gamma-irradiation in combination with carvacrol or mild heat treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 8217–8224.
- BACANOVA, 2005. Final Report on the European Project QLRT-2000-01145: Optimisation of Safe Food Processing Methods Based on Accurate Characterisation of Bacterial Lag Time Using Analysis of Variance Techniques (BACANOVA). BACANOVA Consortium. European Commission, Brussels, Belgium.
- Baranyi, J., 2002. Stochastic modelling of bacterial lag phase. *International Journal of Food Microbiology* 73, 203–206.
- Baranyi, J., Pin, C., 1999. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 732–736.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277–294.
- Baranyi, J., Pin, C., Ross, T., 1999. Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology* 48, 159–166.
- Baranyi, J., George, S.M., Kutalik, Z., 2009. Parameter estimation for the distribution of single cell lag times. *Journal of Theoretical Biology* 259, 24–30.
- Booth, I.R., 2002. Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology* 78, 19–30.
- Box, G.E., Andersen, S.L., 1955. Permutation theory in the derivation of robust criteria and the study of departures from assumption. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 17, 1–34.
- Cabeza, M.C., Cambero, I., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., 2007. Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Journal of Food Protection* 71, 2001–2006.
- Cabeza, M.C., Cambero, M.I., Nunez, M., Medina, M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., 2010. Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Food Microbiology* 27, 777–782.
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L., 2000. Biological variability and exposure assessment. *International Journal of Food Microbiology* 58, 203–212.
- Den Besten, H.M., Mataragas, M., Moezelaar, R., Abee, T., Zwietering, M.H., 2006. Quantification of the effects of salt stress and physiological state on thermotolerance of *Bacillus cereus* ATCC 10987 and ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5884–5894.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition & Food Research* 48, 479–487.
- Fernandez, A., Salmeron, C., Martinez, A., 1999. Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology* 10, 158–162.
- Granum, P.E., 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Microbiology* 76, 61S–66S.
- Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.C., 2005. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2940–2948.
- Holm, S., 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6, 65–70.
- Humpheson, L., Adams, M.R., Anderson, W.A., Cole, M.B., 1998. Biphasic thermal inactivation kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 459–464.
- Johnson, K.M., Nelson, C.L., Busta, F.F., 1982. Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illnesses. *Journal of Food Science* 47, 1268–1271.
- Jongenburger, I., Reij, M.W., Boer, E.P., Gorris, L.G., Zwietering, M.H., 2010. Factors influencing the accuracy of the plating method used to enumerate low numbers of viable micro-organisms in food. *International Journal of Food Microbiology* 143, 32–40.
- Lee, H.Y., Chai, L.C., Tang, S.Y., Jinap, S., Ghazali, F.M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Son, R., 2009. Application of MPN-PCR in biosafety of *Bacillus cereus* s.l. for ready-to-eat cereals. *Food Control* 20, 1068–1071.
- Leguerinel, I., Spegagne, I., Couvert, O., Gaillard, S., Mafart, P., 2005. Validation of an overall model describing the effect of three environmental factors on the apparent D-value of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 100, 223–229.
- Lianou, A., Stopforth, J.D., Yoon, Y., Wiedmann, M., Sofos, J.N., 2006. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *Journal of Food Protection* 69, 2640–2647.
- Lund, B.M., Graham, A.F., George, S.M., Brown, D., 1990. The combined effect of incubation temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of non-proteolytic, type B *Clostridium botulinum*. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 481–492.
- McKellar, R.C., Hawke, A., 2006. Assessment of distributions for fitting lag times of individual cells in bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology* 106, 169–175.
- Meldrum, R.J., Little, C.L., Sagoo, S., Mithani, V., McLaughlin, J., de Pinna, E., 2009. Assessment of the microbiological safety of salad vegetables and sauces from kebab take-away restaurants in the United Kingdom. *Food Microbiology* 26, 573–577.
- Metris, A., George, S.M., Peck, M.W., Baranyi, J., 2003. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal of Microbiology Methods* 55, 821–827.
- Metris, A., George, S.M., Mackey, B.M., Baranyi, J., 2008. Modeling the variability of single-cell lag times for *Listeria innocua* populations after sublethal and lethal heat treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6949–6955.
- Monk, J.D., Beuchat, L.R., Doyle, M.P., 1995. Irradiation inactivation of food-borne microorganisms. *Journal of Food Protection* 58, 197–208.
- Montville, T.J., Matthews, K.R., 2005. Spores and their significance. In: Montville, T.J., Matthews, K.R. (Eds.), *Food Microbiology: An Introduction*. ASM Press, Washington, D.C. E.E.U.U.
- Nauta, M.J., 2000. Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *International Journal of Food Microbiology* 57, 9–18.
- Niven, G.W., Morton, J.S., Fuks, T., Mackey, B.M., 2008. Influence of environmental stress on distributions of times to first division in *Escherichia coli* populations, as determined by digital-image analysis of individual cells. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3757–3763.
- Noma, S., Kajiyama, D., Igura, N., Shimoda, M., Hayakawa, I., 2006. Mechanisms behind tailing in the pressure inactivation curve of a clinical isolate of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 109, 103–108.
- Patterson, M.F., Damoglou, A.P., Buick, R.K., 1993. Effects of irradiation dose and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on poultry meat. *Food Microbiology* 10, 197–203.
- Pin, C., Baranyi, J., 2006. Kinetics of single cells: observation and modeling of a stochastic process. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2163–2169.
- Piyasena, P., McKellar, R.C., 1999. Influence of guar gum on the thermal stability of *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, and gamma-glutamyl transpeptidase during high-temperature short-time pasteurization of bovine milk. *Journal of Food Protection* 62, 861–866.
- Rasch, M., Metris, A., Baranyi, J., Bjorn Budde, B., 2007. The effect of reuterin on the lag time of single cells of *Listeria innocua* grown on a solid agar surface at different pH and NaCl concentrations. *International Journal of Food Microbiology* 113, 35–40.
- Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J., Mackey, B.M., 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 70, 163–173.
- Smelt, J.P., Bos, A.P., Kort, R., Brul, S., 2008. Modelling the effect of sub(lethal) heat treatment of *Bacillus subtilis* spores on germination rate and outgrowth to exponentially growing vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* 128, 34–40.
- Stringer, S.C., Webb, M.D., Peck, M.W., 2009. Contrasting effects of heat treatment and incubation temperature on germination and outgrowth of individual spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2712–2719.
- Stringer, S.C., Webb, M.D., Peck, M.W., 2011. Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. *Food Microbiology* 28, 228–235.
- Tay, A., Shellhammer, T.H., Yousef, A.E., Chism, G.W., 2003. Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. *Journal of Food Protection* 66, 2057–2061.
- Wescott, G.G., Fairchild, T.M., Foegeding, P.M., 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus stearothermophilus* spore inactivation in batch and continuous flow systems. *Journal of Food Science* 60, 446–450.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th ed.



## ARTÍCULO N° 6

---

Mejora de la estimación de la fase de latencia de células individuales y micropoblaciones mediante la aplicación de la distribución de Poisson.

Artículo publicado bajo el nombre “*The Poisson Distribution Is Applied to Improve the Estimation of Individual Cell and Micropopulation Lag Phases*” en *Advances in Microbiology* (2012) 2, 146-161 y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, Carmen Bravo, Juan A. Ordoñez, Gonzalo D. García de Fernando

---

*Sábado*



# The Poisson Distribution Is Applied to Improve the Estimation of Individual Cell and Micropopulation Lag Phases

Juan Aguirre<sup>1</sup>, Carmen Bravo<sup>2</sup>, Juan A. Ordóñez<sup>1</sup>, Gonzalo García de Fernando<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Servicio Informático de Apoyo a Docencia e Investigación, Universidad Complutense, Madrid, Spain  
Email: [juaguirr@vet.ucm.es](mailto:juaguirr@vet.ucm.es)

Received January 24, 2012; revised February 14, 2012; accepted March 16, 2012

## ABSTRACT

Many articles dealing with individual cell lag phase determination assume that growth, when observed, comes from one cell. This assumption is not in agreement with the Poisson distribution, which uses the probability of growth in a sample to predict how many samples contain one, two, or some other number of cells. This article analyses and compares different approaches to improve the accuracy of lag phase estimation of individual cells and micropopulations. It argues that if the highest initial load, as predicted by the Poisson distribution, is assigned to the sample with the shortest lag phase, the second highest to the sample with the second shortest lag phase and so on, the resulting lag phase distributions would be more accurate. This study also proposes the use of a robust test, permutation test, to compare lag phase distributions obtained in different situations.

**Keywords:** Individual Cells; Micropopulations; Lag Phase; Poisson Distribution

## 1. Introduction

The measuring of any parameter characterizing the microbial growth is essential for any quantitative microbial risk assessment. Then, to know the microbial lag phase length of viable cells is critical, especially in RTE products, which nature and storing conditions may allow the growth of viable, pathogen or not, bacteria. In the case of populations of thousands or hundreds of viable cells, the lag phase, is quite reproducible if the pre-inoculation and growth conditions are constant. However, the lag phase of populations composed by few cells, or even by only individual cells, is inherently variable. Therefore, it is understandable that researchers [1-9] have paid attention to the distribution of single cells lag times and to the techniques that can measure them. Measuring the lag time of individual cells requires direct microscopic observation [4,8] or techniques to isolate single cells [10]. Cell isolation can be achieved by diluting [2], sorting by flow cytometry [11] or inactivating all organisms except one [9]. When growth is detected in some samples and not in others, it is commonly assumed that growth comes from one cell [12]. The number of samples must always be high for reliable mathematical treatment. It is recommended that approximately 100 samples show growth [13], and this figure must not be a high percentage of the

samples. Guillier *et al.* [5] stated that if 35% of samples show growth, this should not significantly affect individual cell lag phase distributions because at least 80% of samples contain one cell, according to the Poisson distribution function.

“Growth/no growth sampling” has been widely applied to foods and opaque liquids; in the special case of translucent liquids, an apparatus called the Bioscreen C can be used to construct 200 growth curves simultaneously for the same temperature, on the basis of the turbidity resulting from microbial growth. If the specific growth rate ( $\mu$ ) under the experimental conditions is known, the lag phase is determined using the following equations. In the case of translucent liquids analyzed using Bioscreen, the equation is [14]:

$$\text{Lag} = T_d - [Ln(N_d) - Ln(N_0)] \quad (1)$$

where  $T_d$  is the detection time, *i.e.* the time needed to reach an arbitrary absorbance (turbidity),  $Ln(N_d)$  is the natural logarithm of the number of cells generating such absorbance,  $Ln(N_0)$  is the natural logarithm of the number of organisms in the inoculum, and  $\mu$  is the specific growth rate. In the case of opaque samples [6], the equation is:

$$\text{Lag} = T_{\text{count}} - [Ln(x_{\text{count}}) - Ln(x_{\text{initial}})] \quad (2)$$

where  $T_{count}$  is the time between inoculation and plating of the sample,  $Ln(x_{count})$  is the natural logarithm of the cell number detected at  $T_{count}$ ,  $Ln(x_{initial})$  is the natural logarithm of the initial number of bacteria and  $\mu$  is the specific growth rate.

When a certain percentage of samples does not show growth, the assumption that growth in the other samples is due to one cell contravenes the predictions of the Poisson distribution. Several researchers have used the Poisson distribution to calculate the proportion of growth-positive samples initially containing more than one cell [5,11,15,16]. McKellar and Hawke [17] recognised that one of the limitations of the Bioscreen as a tool to study single cell behaviour is that it is difficult to ensure that the growth in any given positive well arose from a single cell. Earlier, some authors [2,15] performed a series of binary dilutions to have one cell per sample. Francois *et al.* [2] observed that single cells should be found in wells of Bioscreen microtitre plates where the mean cell number added to each well was less than one. These authors advocate pooling data from the last five binary dilution series to maximise the number of replicate wells; these series contained 0.7812, 0.3906, 0.1951, 0.0977, and 0.0977 cells per well, from a theoretical mean dilution range.

According to the Poisson probability function, if a determined number of occurrences ( $\rho$  is expected, then the probability that there are exactly  $k$  occurrences ( $k$  being a non-negative integer number,  $k = 0, 1, 2, \dots$ ) is:

$$\phi(k, \rho) = \frac{e^{-\rho} \rho^k}{k!} \tag{3}$$

where  $e$  is the base of the natural logarithm;  $k$  is, in our case, the number of organisms in a sample, and the probability of  $k$  is given by the function;  $\rho$  is a positive real number, which expresses the average number of

cells per sample; and  $k!$  is the factorial of  $k$ . To highlight the relevance of the data that Equation (3) offers, the **Table 1** has been built up. This table shows the percentages of samples predicted by Equation (3) that would contain a determined number of viable cells as a function of the percentage of samples, in which growth was detected. The average number of cell per sample ( $m$ ) is also shown in **Table 1**. This average is calculated by assuming that the number of cell per sample follows a Poisson distribution. Hence, the following equation was used:

$$m = Ln(P) \tag{4}$$

where  $P$  is the probability of there is not any viable cell in a sample. Applying Equation (3) to the data of Francois *et al.* [2], with an average number of cells per sample of 0.78, indicates that 65% of the positive samples contain one cell, 25.3% contain two, 6.6% three and 1.3% four. These figures suggest that the estimated lag phase determinations for individual cells will have a certain error. Indeed, Baranyi *et al.* [18] affirmed that the greater the Poisson parameter ( $\rho$ , average number of cells per sample), the less accurately Equations (1) and (2) estimate the distribution of the single cell lag time. If samples are considered to contain only one cell, the value of  $Ln(N_0)$  in Equation (1) and  $Ln(X_{initial})$  in Equation (2) is zero. However, if the predictions of the Poisson function are applied, we have to assume that some samples contain two, three or more cells, which is an undisputed fact in most real samples. In this case,  $Ln(N_0)$  and  $Ln(X_{initial})$  are positive numbers that lengthen the lag phase of such samples.

The aim of this study is to compare the individual cell and/or micropopulation lag phase distributions obtained by assuming that all samples with growth contain one

**Table 1. Percentage of samples with a determined number of cells, as predicted by Poisson function (Equation (3)).**

% of samples with growth	Average No. of cell/sample	% of samples with a determined No. of cells						
		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

cell, with the distributions obtained by assuming a different number of cells per sample according to the Poisson distribution function.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Simulation

A simulation was generated considering a different average number of cells per sample (0.2 - 2.0). To create the simulation, 100 values of lag phases were randomly generated by assigning them values from 40 to 180 arbitrary time units, following a gamma distribution with the following parameters: shape = 5.5, scale = 16.5, mean = 91.7 and standard deviation = 29.4. A specific growth rate ( $\mu$  of  $0.0693 \text{ h}^{-1}$ ) was also considered. The resulting distribution data are those of Scenario I (see next section).

### 2.2. Scenarios

Four scenarios were used to calculate the lag phase distributions: Scenario I assumes that all samples contain one cell. Scenarios II-IV use the Poisson distribution function to assign a number of cells to each sample. In Scenario II, the sample with the shortest lag phase contains the highest number of cells, according to the average number of cells per sample and the Poisson table [19], the sample with the second shortest lag contains the second highest number of cells, and so on. In Scenario III, the number of cells is randomly distributed among samples, regardless of the lag phase length. Scenario IV is calculated like Scenario II, except that all samples with more than one cell are not considered. From the data of Scenario I, lag phases were recalculated according to the assumptions of Scenarios II, III and IV and the corresponding distributions were obtained.

### 2.3. Statistical Analysis

Pairwise comparisons of the variances of lag phase distributions were carried out using a permutation test to analyse homogeneity of the two variances; this bilateral test assumes that the variances ratio is one. Permutation tests are non-parametric significance tests based on permutation resampling without replacement, with observed lag times drawn at random from the original data and reassigned to the two groups being compared. The distribution of possible variance ratios is calculated for all samples assuming the null hypothesis of homogeneity, and the observed ratio is positioned along this distribution. Values falling outside the main distribution rarely occur by chance and therefore give evidence of heterogeneity of variances [20]. Since our study involves multiple comparisons of several groups, a  $p$ -value correction must be applied in order to minimise the probability of

rejecting a true hypothesis. The Holm-Bonferroni  $p$ -value correction [21] was applied. This correction is less conservative than those of Bonferroni and Sidak [22], which are also applied in the permutation test program described in appendix A.

A permutation test routine including a multiple comparison test was programmed using R language [23], which is described in Annex 1.

### 2.4. Application of Scenarios to Experimental Data

To check how well the simulations mimic the reality, the four scenarios were applied to the lag phases of *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and *Listeria innocua* subjected to different irradiation treatments in tryptic soy broth (TSB) and cooked ham and subsequently incubated at different temperatures (experimental data from Aguirre *et al.* [9]). Lag phases were estimated according to Equations (1) and (2) after determining the percentage of samples without growth and considering the Poisson function predictions and the scenarios above described.

## 3. Results

### 3.1. Simulation

**Figure 1(a)** shows the increase in the mean lag and **Figures 1(b)** and **(c)** show, respectively, the decrease in the standard deviation and the coefficient of variation as a function of the average number of cells per sample. The dashed line in **Figure 1** shows the mean and standard deviations of the data in Scenario I. As expected, the greater the number of cells per sample is, the larger the difference between the mean and standard deviation of Scenario I data and those of the others. The distributions of Scenario III were not considered further because the averages were identical to those of Scenario II and their standard deviations were very close to those of Scenario I (data not shown).

Comparison of the distributions obtained in Scenarios I and II, I and IV and II and IV (**Figure 2**) shows that the higher the more probable number per sample is, the smaller the  $p$  value for comparisons of the mean and standard deviation, according to the permutation test. Significant differences ( $\alpha < 0.05$ ) were found among the three comparisons for the mean and between Scenarios I and II and I and IV for the standard deviation.

### 3.2. Application of Scenarios to Experimental Data

**Table 2** summarises the experimental data, including the expected inactivation according to the irradiation applied, the average number of surviving cells per sample and the

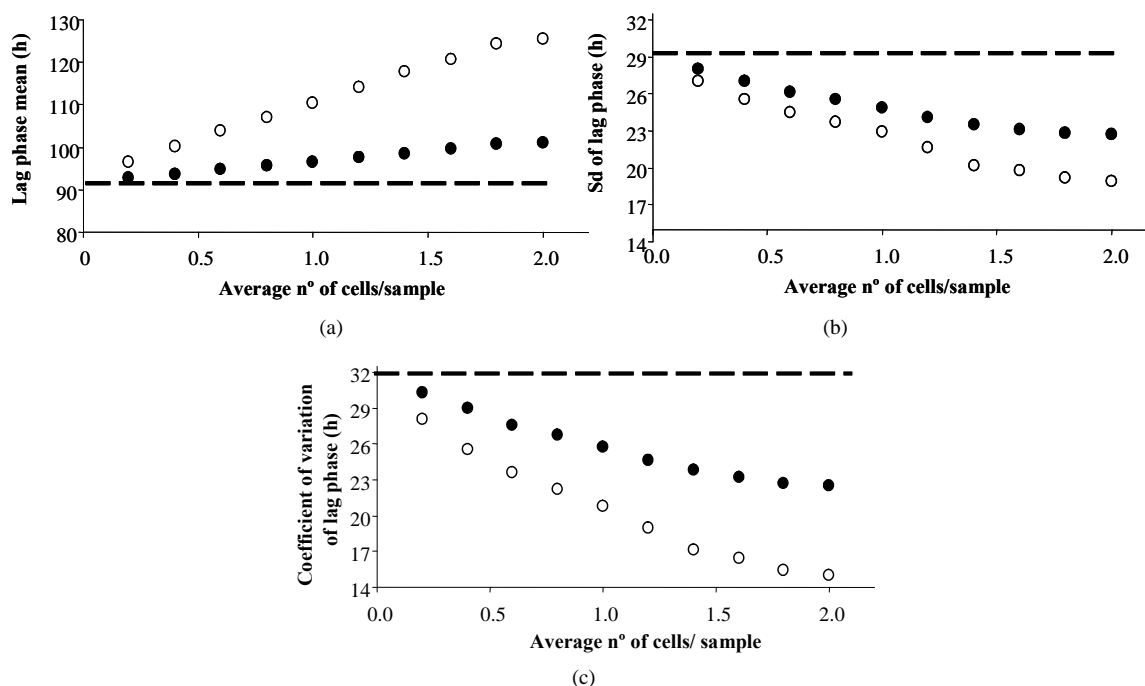


Figure 1. Effect of the average number of cells per sample on the mean (a), standard deviation (b) and coefficient of variation (Sd\*100/mean, C) of lag phase distribution in a model system assuming that lag phases follow a gamma distribution and that  $\mu = 0.0693 \text{ h}^{-1}$ . Dashed lines represent the mean, standard deviation and coefficient of variation assuming that all samples contain one cell (Scenario I). Solid symbols show the results assuming a variable number of cells per sample, and assuming that the sample with the shortest lag phase contains the highest number of cells, the sample with the second shortest lag contains the second highest number, and so on, according to the Poisson distribution function ((Scenario II). Empty symbols represent the results following the assumptions in (Scenario II but including only samples with one cell ((Scenario IV).

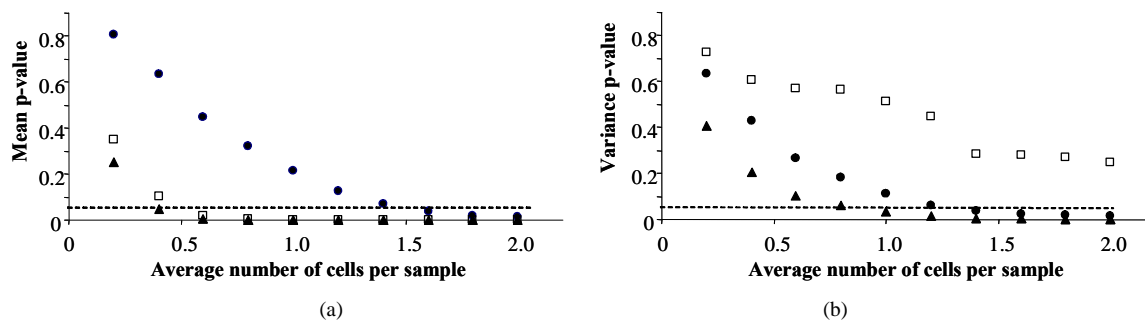


Figure 2. Comparison by permutation test of means (a) and variances (b) of lag phase distributions obtained when all samples with growth are assumed to contain one cell ((Scenario I) with those obtained under other assumptions ((Scenarios II and IV). The solid circles show the comparison between (Scenario I and (Scenario II, in which samples with growth are assumed to contain one or more cells according to the truncated Poisson distribution, and assuming that the sample with the shortest lag phase is supposed to have the highest inocula. The solid triangles show the comparison between (Scenario I and (Scenario IV, which makes the same assumptions as (Scenario II but excludes samples containing more than one cell. Empty squares show the comparison between (Scenarios II and IV. Dashed lines represent the  $\alpha$ -value = 0.05. Data below the line indicate significant differences.

characteristics of the distributions (mean, standard deviation and coefficient of variation) for each substrate, treatment (Aguirre *et al.* [9]) and scenario. Scenario III was not considered for the reasons mentioned above. As in the simulations, analysis of the experimental data showed that the mean lag phase when growth is assumed to be due to a variable number of cells (Scenario II) was

equal to, or higher than, the mean when growth is assumed to be due to a single cell (Scenario I). In contrast, the standard deviations in Scenario II were always lower than those in Scenario I, except in the case of *Salmonella* Enteritidis growing in ham at 7°C after no treatment.

The permutation test was used to compare the distributions between Scenarios I and II, I and IV and II and IV.

**Table 2. Lag phases of organisms surviving treatment on ham and TSB, as calculated using four scenarios. Explanation on scenarios is in legend of Figure 1.**

Organism	Substrate and growth temperature	Expected inactivation (log cycles)	Total n° of samples	N° of samples with growth	Average n° of cells per sample	Mean value of lag phase (h)	Sd (h)	Coefficient of variation (100 Sd/mean)	Mean value of lag phase (h)	Sd (h)	Coefficient of variation (100 Sd/mean)	Mean value of lag phase (h)	Sd (h)	Coefficient of variation (%) (100 Sd/mean)
<i>Enterococcus faecalis</i>	TSB, 18°C	0.00	100	79	1.56	6.09	2.16	35.45	7.38	1.13	15.31	7.38	2.47	33.52
		1.05	100	85	1.90	13.30	2.67	20.05	14.85	1.55	10.41	14.85	3.17	21.32
		2.10	100	76	1.43	30.84	3.53	11.44	32.00	2.58	8.06	32.00	3.37	10.52
	4.20	100	86	1.97	69.92	7.04	10.07	71.53	5.89	8.23	71.53	6.93	9.69	
	0.00	106	79	1.39	59.79	7.92	13.24	71.19	7.07	9.93	71.19	12.86	18.06	
	0.90	109	66	0.94	109.59	9.62	8.78	117.27	5.27	4.49	117.27	12.79	10.90	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Ham, 7°C	1.80	114	70	0.94	226.91	19.76	8.71	234.40	14.17	6.04	234.85	21.13	9.00
		3.59	121	68	0.78	458.30	29.58	6.45	464.51	23.11	4.98	464.51	29.08	6.26
		0.00	100	49	0.67	34.50	3.90	11.30	35.42	3.11	8.77	35.42	3.90	11.01
	2.40	100	50	0.69	89.79	6.06	6.75	90.69	5.21	5.75	90.69	6.07	6.70	
	4.79	100	75	1.39	150.10	8.92	5.94	151.96	7.66	5.04	151.96	9.86	6.49	
	5.99	100	52	0.73	187.33	13.44	7.17	188.36	12.39	6.58	188.36	12.95	6.87	
<i>Listeria innocua</i>	Ham, 7°C	0.00	99	43	0.56	265.38	4.82	1.82	271.82	10.90	4.01	271.82	11.50	4.23
		1.10	105	46	0.58	306.28	8.27	2.70	312.81	8.25	2.64	312.81	13.69	4.38
		2.19	115	47	0.53	433.17	22.75	5.25	439.56	17.96	4.09	439.56	26.09	5.93
	4.39	135	60	0.58	585.64	36.33	6.20	591.80	31.76	5.37	591.80	35.94	6.07	
	0.00	100	54	0.78	24.53	4.23	17.25	25.44	3.27	12.86	25.44	4.14	16.28	
	1.08	100	39	0.49	46.44	13.72	29.54	46.93	13.32	28.38	46.93	13.71	29.22	
TSB, 16°C	2.16	100	80	1.61	56.96	15.51	27.24	58.72	14.59	24.84	58.72	15.33	26.10	
	4.31	100	59	0.89	130.73	22.19	16.98	131.69	21.39	16.24	131.69	21.94	16.66	

Continued.

0.00	106	71	1.11	229.70	5.35	2.33	235.08	4.49	1.91	235.08	8.34	3.55	233.00	4.82	2.07
1.02	123	81	1.08	285.27	6.56	2.30	290.56	3.94	1.35	290.56	10.02	3.45	289.75	4.91	1.69
2.03	119	71	0.92	371.53	10.40	2.80	376.04	6.94	1.85	375.60	11.32	3.01	377.78	8.26	2.19
4.06	109	85	1.51	512.78	18.10	3.53	520.74	13.83	2.66	520.74	20.07	3.85	528.98	18.52	3.50
0.00	100	86	1.97	4.30	2.27	52.84	5.76	1.24	21.53	5.76	2.51	43.63	7.00	1.14	16.22
1.32	100	46	0.62	35.13	5.13	14.60	35.56	4.70	13.22	35.56	5.09	14.32	36.96	4.69	12.70
2.63	100	76	1.43	45.06	9.31	20.66	46.12	8.72	18.91	46.12	9.31	20.19	50.11	10.14	20.24
3.95	100	68	1.14	61.20	15.15	24.76	62.09	14.33	23.08	62.09	15.16	24.41	71.69	11.65	16.25
6.58	100	53	0.76	98.45	29.17	29.63	99.04	28.51	28.79	99.04	29.20	29.49	113.38	20.59	18.16
0.00	110	76	1.17	89.27	11.88	13.31	97.77	4.96	5.07	97.77	13.49	13.80	98.54	5.39	5.47
1.21	138	101	1.31	114.14	17.57	15.40	123.18	9.80	7.95	123.18	20.09	16.31	130.21	9.45	7.26
2.43	149	111	1.35	210.75	22.04	10.46	220.02	14.84	6.74	220.02	24.41	11.10	227.93	16.39	7.19
4.86	116	75	1.05	382.67	30.97	8.09	389.99	23.92	6.13	389.99	31.89	8.18	404.16	20.75	5.13
7.28	101	65	1.02	533.26	50.24	9.42	540.70	42.83	7.92	540.70	51.58	9.54	566.11	32.25	5.70
0.00	101	72	1.24	48.60	3.47	7.13	52.85	2.73	5.16	52.85	4.80	9.08	50.60	0.62	1.22
1.21	119	83	1.20	59.87	8.12	13.57	63.92	4.84	7.57	63.92	9.05	14.16	66.72	5.00	7.49
2.43	136	101	1.35	127.61	14.99	11.75	132.02	11.30	8.56	132.02	17.10	12.95	138.66	9.76	7.04
4.86	105	67	1.02	271.84	22.06	8.12	275.36	18.34	6.66	275.36	23.62	8.58	286.95	6.59	2.30
7.28	99	65	1.08	407.68	27.16	6.66	411.31	23.65	5.75	411.31	27.28	6.63	425.39	16.35	3.84

*Pseudo-  
monas  
fluorescens*

Several significant differences ( $\alpha < 0.05$ ) were found and in order to clarify the reasons of such differences, the average number of cells per sample and the specific growth rate were plotted (Figure 3).

#### 4. Discussion

Obviously, to consign to oblivion the Poisson function of distribution, when growth is observed in a determined percentage of homogeneous samples, and consider that this growth comes from one viable cell, is erroneous because the probability of that a significant number of samples contains more than one cell is very high (see Table 1); obviously, the higher the average number of cells per sample is, the higher the probability of finding

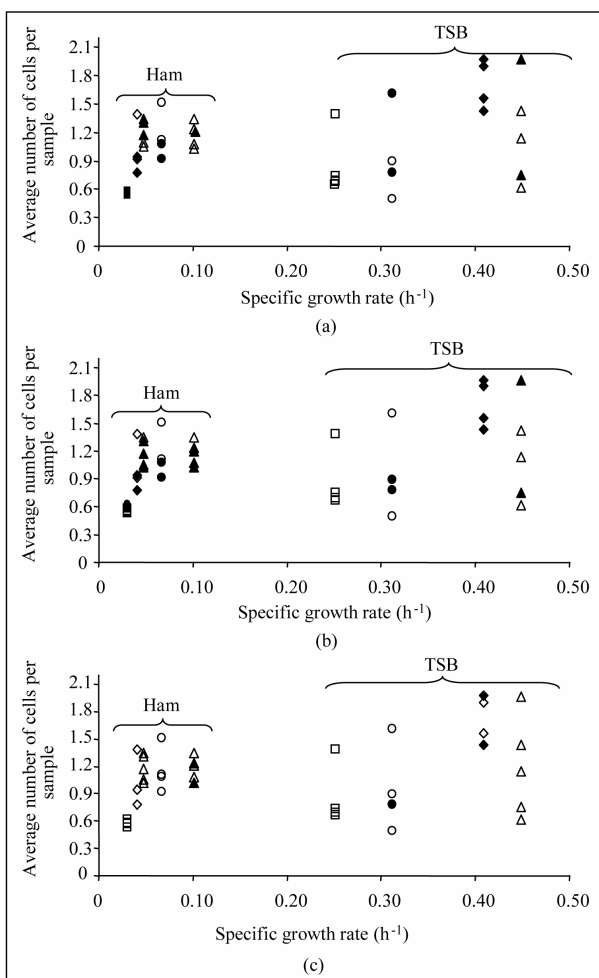
samples with more than one cell.

In order to determine more accurately the lag phase, we propose to assume that the sample with the shortest lag phase contains the highest number of cells, according to the Poisson distribution, the sample with the second shortest contains the second highest number of cells, and so on (Scenario II). This assumption is based on the fact that higher inocula need less number of duplications (*i.e.* less time) to reach a determined number of cells ( $T_d$  or  $T_{count}$  in Equations (1) and (2), respectively) and then, lag is actually longer than if the growth had been generated by only one cell. Furthermore, it is known that the lag phase of individual cells is variable [1,7,9] and, logically, it is more likely to find a fast cell in starting the growth in samples that contain higher number of cells and, obviously, lag phase of these samples must be shortened because of the “fast” cells. Pin and Baranyi [7], working with single cells and micropopulations, stated that samples with low initial number of cells, showed longer lag times—in average—than those initiated with more cells. All these reasonings support the starting hypothesis.

The greater the number of cells per sample is, the larger the difference between the mean and standard deviation of lag phase distributions (Figure 1). Then, when individual cell lag phases are determined, larger errors are expected as the number of cells per sample increases, confirming the Baranyi *et al.* [18] statement. In other words, in practical situations, the greater the number of samples with microbial growth is, the greater the expected errors in individual cell lag phase estimation. Figure 2 corroborates this finding since the higher the average number of cells per sample is, the more probably is to find significant differences ( $\alpha < 0.05$ ) between the distributions of all scenarios analyzed.

Remarkable differences between Scenarios I and IV were observed in both the mean and the standard deviation (Figure 1). It is important to remember that in this case, lag phase data, when one cell per sample is assumed (Scenario I), are compared with the lag phase data of cells with longer lags (IV), which are more likely to contain, actually, one cell. Samples with shorter lag phases are ignored in Scenario IV and, therefore, data from fast cells growing alone are not included. Then, the lag phase average is always biased to long times in this scenario.

Scenarios II and III should model the experimental data more closely than Scenario I because Equations (1) and (2), used to calculate the lag phase, reduce the time to reach a given microbial concentration ( $T_d$  or  $T_{count}$ ) by the time that the initial cell number takes to reach the given concentration  $\{[(Ln(N_d) - Ln(N_0))/\mu]$  or  $[(Ln(X_{count}) - Ln(X_{initial}))/\mu]\}$ . This is true regardless of the variability in growth rate observed in the first divisions of a cell [4], because this variability seems to be randomly distributed



**Figure 3.** Comparison of lag phase distributions between Scenarios I and II (a), I and IV (b), and II and IV (c) using the permutation test. Empty symbols indicate that there are no significant differences ( $\alpha > 0.05$ ) between distributions. Solid symbols indicate significant differences ( $\alpha < 0.05$ ). Data were taken from Aguirre *et al.* (2011) and correspond to *Listeria innocua* (circles), *Pseudomonas fluorescens* (triangles), *Salmonella Enteritidis* (squares) and *Enterococcus faecalis* (diamonds).

[24]. Recalculating the lag phases of samples more likely to contain more than one cell is easily accomplished by substituting  $N_0$  or  $X_{initial}$  in Equations (1) and (2), respectively, by the number of cells predicted by the Poisson function. When the lag phase is determined by Bioscreen or in food, assuming that all samples contain one cell, the sample with the shortest lag phase is most likely to contain the highest inoculum, and samples with the longest lag phases are most likely to contain only one cell. Based on this reasoning, if more accurate data on initial microbial concentration can be obtained, the quality of lag phase estimation will improve, although these estimations are not absolutely accurate due to the intrinsic cell variability. Actually, one cell may have a short lag phase, even shorter than that of a micropopulation of two medium or long lag phase cells, even considering that one cell have to duplicate once more than two cells to reach the same number of daughter cells and this duplication time is, of course, considered by Equations (1) and (2) when calculating lag phases.

The analysis of the experimental data of **Table 2** shows that the mean lag phase, when growth is assumed to be due to a variable number of cells (Scenario II), was higher than the mean when growth is assumed to be due to a single cell (Scenario I). Furthermore, the lower the lag phases of Scenario I were, the greater the percentage of increase (**Table 2**). This means that considering that all samples contain one cell in optimum growth conditions or in healthy cells, which imply short lag phases, generates relevant inaccuracies, while the lag phase determination of injured cells and at suboptimal growth conditions, the error may even become negligible (**Table 2**). These statements are only pertinent for the lag phase average because if we consider the transformation from Scenario I to Scenario II, data to data, it is evident that short lag phases estimated according to Scenario I are transformed in longer ones, probably in a non realistic way. An example is shown in **Tables 3** and **4**, which show the lag phases of non-radiated and irradiated (2 kGy) *Enterococcus faecalis* in TSB at 18°C, respectively (data of distributions are shown in **Table 2**). The analysis of the **Table 3** data allows to affirm that the recalculation of lag phases according to Scenario II, ascribing the highest number of cells to the sample with the shortest lag and the second highest number of cells to the second shortest, etc., result in a too long lag phases for such samples, which hardly correspond to a samples with five cells instead one (the first two data of the left columns of the **Table 3**). The analysis of **Table 4** data drives to the same reasoning, although the lengthening of lag phases due to the irradiation minimizes the differences. In contrast, the standard deviations in Scenario II were almost always lower than those in Scenario I (**Table 2**), which means a lower dispersion of data and, presumably, a

**Table 3.** Lag phases of non-radiated *Enterococcus faecalis* in TSB at 18°C calculated by Equation (1) considering a constant  $\mu$  of 0.409 and assuming: Scenario I: All samples contain 1 cell; Scenario II: The sample in column “Scenario I” with the shortest lag phase contains the highest inoculum, the second shortest, the second highest, and so on. Number of cells per sample was estimated according to the Poisson distribution considering that the average number of cells per sample was 1.56 (Table 2). Then, according to the Poisson function of distribution (Equation (3)), the first two samples must contain five cells, the next five samples four cells, the next thirteen samples three cells, the next twenty six samples two cells and the last thirty three samples one cell. n. Number of sample, decreasingly ordered according to the Scenario I lag phase.

n	Scenario I	Scenario II	n	I	II
1	2.7	6.5	40	5.9	7.6
2	2.7	6.5	41	6.2	7.9
3	2.7	6.1	42	6.2	7.9
4	2.9	6.3	43	6.2	7.9
5	3.0	6.4	44	6.7	8.4
6	3.1	6.5	45	6.7	8.4
7	3.1	6.5	46	6.7	6.7
8	3.2	5.8	47	6.7	6.7
9	3.2	5.8	48	7.0	7.0
10	3.2	5.8	49	7.2	7.2
11	3.2	5.8	50	7.2	7.2
12	3.2	5.8	51	7.2	7.2
13	3.6	6.1	52	7.2	7.2
14	3.7	6.3	53	7.2	7.2
15	3.7	6.3	54	7.7	7.7
16	3.7	6.3	55	7.7	7.7
17	3.7	6.3	56	7.7	7.7
18	4.2	6.8	57	7.7	7.7
19	4.2	6.8	58	7.7	7.7
20	4.2	6.8	59	7.8	7.8
21	4.2	5.9	60	8.0	8.0
22	4.7	6.4	61	8.2	8.2
23	4.7	6.4	62	8.2	8.2
24	4.7	6.4	63	8.2	8.2
25	4.7	6.4	64	8.2	8.2
26	4.7	6.4	65	8.3	8.3
27	4.7	6.4	66	8.4	8.4
28	4.8	6.5	67	8.5	8.5
29	5.0	6.7	68	8.7	8.7
30	5.0	6.7	69	8.7	8.7
31	5.2	6.9	70	9.2	9.2
32	5.2	6.9	71	9.2	9.2
33	5.2	6.9	72	9.2	9.2
34	5.5	7.2	73	9.2	9.2
35	5.7	7.4	74	9.7	9.7
36	5.7	7.4	75	9.7	9.7
37	5.7	7.4	76	9.7	9.7
38	5.7	7.4	77	9.8	9.8
39	5.7	7.4	78	10.7	10.7
Average (h)				6.09	7.38
Sd (h)				2.16	1.13

**Table 4. Lag phases of *Enterococcus faecalis* irradiated with 2 kGy in TSB at 18°C calculated by Equation (1) considering a constant  $\mu$  of 0.409 and assuming: Scenario I: All samples contain 1 cell; Scenario II: The sample in column "Scenario I" with the shortest lag phase contains the highest inoculum, the second shortest, the second highest, and so on. Number of cells per sample was estimated according to the Poisson distribution considering that the average number of cells per sample was 1.97 (Table 2). Then, according to the Poisson function of distribution (Equation (3)), the first sample must contain six cells, the next three samples five cells, the next nine samples four cells, the next eighteen samples three cells, the next twenty seven samples two cells and the last twenty seven samples one cell. n. Number of sample, decreasingly ordered according to the Scenario I lag phase.**

n	Scenario I	Scenario II	n	I	II
1	58.7	62.9	44	68.6	70.3
2	58.7	62.5	45	69.1	70.8
3	58.7	62.5	46	69.2	70.9
4	59.2	63.0	47	69.6	71.3
5	59.4	62.8	48	69.6	71.3
6	59.7	63.1	49	69.6	71.3
7	59.9	63.3	50	69.7	71.4
8	60.2	63.6	51	70.7	72.4
9	60.2	63.6	52	70.9	72.6
10	60.6	64.0	53	71.7	73.4
11	61.2	64.6	54	73.9	75.6
12	61.3	64.7	55	74.2	75.9
13	61.6	65.0	56	74.2	75.9
14	61.9	64.4	57	74.7	76.4
15	62.2	64.8	58	74.9	76.6
16	63.9	66.5	59	75.1	75.1
17	63.9	66.5	60	75.2	75.2
18	63.9	66.5	61	75.6	75.6
19	64.5	67.0	62	75.6	75.6
20	64.6	67.2	63	75.6	75.6
21	64.7	67.3	64	75.6	75.6
22	64.9	67.5	65	75.6	75.6
23	65.4	67.9	66	76.1	76.1
24	65.6	68.1	67	76.1	76.1
25	65.7	68.3	68	76.2	76.2
26	65.7	68.3	69	76.2	76.2
27	65.7	68.3	70	76.6	76.6
28	65.7	68.3	71	76.6	76.6
29	65.7	68.3	72	76.6	76.6
30	65.8	68.3	73	76.6	76.6
31	66.3	68.8	74	76.6	76.6
32	66.4	68.1	75	76.6	76.6
33	67.0	68.7	76	76.7	76.7
34	67.2	68.9	77	76.7	76.7
35	67.6	69.3	78	76.7	76.7
36	67.7	69.4	79	77.5	77.5
37	67.9	69.6	80	77.7	77.7
38	68.0	69.7	81	79.2	79.2
39	68.0	69.7	82	80.7	80.7
40	68.1	69.8	83	84.7	84.7
41	68.2	69.9	84	85.2	85.2
42	68.6	70.3	85	86.9	86.9
43	68.6	70.3			
		Average (h)	69.92	71.53	
		Sd (h)	7.04	5.89	

more accurate lag phase determinations when applying the Scenario II, which means that, in spite of the above discussed arguments, the average of the recalculated distribution (Scenario II) must be more realistic than that of Scenario I.

The robust permutation test (see Annex 1) is proposed to compare lag phase distributions. When this test was applied to the experimental data of Aguirre *et al.* [9], several significant differences ( $\alpha < 0.05$ ) were found between Scenarios I and II, I and IV and II and IV. From Figure 3, it may be deduced that the higher the average number of cells per sample was, the greater the probability that there would be significant differences in distributions between Scenario I and II or between I and IV. This is consistent with the predictions of the simulation generated in this study. The influence of the specific growth rate on the distributions is less clear.

## 5. Conclusion

To estimate lag phase, the assumption that growth comes from one cell in all samples when a certain percentage of them does not show microbial growth contradicts the Poisson distribution function. Taking into account the percentage of samples showing microbial development, the Poisson function allows ascribing higher inocula to the samples with shorter lag phases. Considering Poisson-based predictions of the number of cells per sample, instead of considering that all samples contain one cell, the accuracy of the average lag phase determinations of micropopulations will be improved. In fact, the more samples there are that contain more than one cell, the greater the improvement will be. This improvement is likely to be statistically significant mainly in cases where the average number of cells per sample is relatively high.

## 6. Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support of the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain), Program Consolider CARNISENUSA CSD2007-0016 and AGL-2010-16598. We thank Armando Chapin Rodríguez for his assistance in the manuscript writing.

## REFERENCES

- [1] P. J. Stephens, J. A. Joynson, K. W. Davies, R. Holbrook, H. M. Lappin-Scott and T. J. Humphrey, "The Use of an Automated Growth Analyser to Measure Recovery Times of Single Heat-Injured *Salmonella* Cells," *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 83, No. 4, 1997, pp. 445-455. doi:10.1046/j.1365-2672.1997.00255.x
- [2] K. Francois, F. Devlieghere, A. R. Standaert, A. H. Geeraerd, J. F. Van Impe and J. Debevere, "Modelling the Individual Cell Lag Phase. Isolating Single Cells: Protocol Development," *Letter of Applied Microbiology*, Vol. 37,

- No. 1, 2003, pp. 26-30.  
[doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01340.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01340.x)
- [3] A. Metris, S. M. George, M. W. Peck and J. Baranyi, "Distribution of Turbidity Detection Times Produced by Single Cell-Generated Bacterial Populations," *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 55, No. 3, 2003, pp. 821-827. [doi:10.1016/j.mimet.2003.08.006](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.006)
- [4] A. Elfving, Y. LeMarc, J. Baranyi and A. Ballagi, "Observing Growth and Division of Large Numbers of Individual Bacteria by Image Analysis," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 2, 2004, pp. 675-678. [doi:10.1128/AEM.70.2.675-678.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.675-678.2004)
- [5] L. Guillier, P. Pardon and J.C. Augustin, "Influence of Stress on Individual Lag Time Distributions of *Listeria monocytogenes*," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 6, 2005, pp. 2940-2948. [doi:10.1128/AEM.71.6.2940-2948.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2940-2948.2005)
- [6] M. D'Arrigo, G. D. Garcia de Fernando, R. Velasco de Diego, J. A. Ordonez, S. M. George and C. Pin, "Indirect Measurement of the Lag Time Distribution of Single Cells of *Listeria innocua* in Food," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 4, 2006, pp. 2533-2538. [doi:10.1128/AEM.72.4.2533-2538.2006](https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2533-2538.2006)
- [7] C. Pin and J. Baranyi, "Kinetics of Single Cells: Observation and Modeling of a Stochastic Process," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 3, 2006, pp. 2163-2169. [doi:10.1128/AEM.72.3.2163-2169.2006](https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2163-2169.2006)
- [8] G. W. Niven, J. S. Morton, T. Fuks and B. M. Mackey, "Influence of Environmental Stress on Distributions of Times to First Division in *Escherichia coli* Populations, as Determined by Digital-Image Analysis of Individual Cells," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 12, 2008, pp. 3757-3763. [doi:10.1128/AEM.02551-07](https://doi.org/10.1128/AEM.02551-07)
- [9] J. S. Aguirre, M. R. Rodriguez and G. D. Garcia de Fernando, "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*, Vol. 149, No. 3, 2011, pp. 236-246. [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.003](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.003)
- [10] I. A. Swinnen, K. Bernaerts, E. J. Dens, A. H. Geeraerd and J. F. Van Impe, "Predictive Modelling of the Microbial Lag Phase: A Review," *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 94, No. 2, 2004, pp. 137-159. [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.006](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.006)
- [11] J. P. Smelt, G. D. Otten and A. P. Bos, "Modelling the Effect Of Sublethal Injury on the Distribution of the Lag Times of Individual Cells of *Lactobacillus plantarum*," *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 73, No. 2-3, 2002, pp. 207-212.
- [12] A. Metris, S. M. George and J. Baranyi, "Use of Optical Density Detection Times to Assess the Effect of Acetic Acid on Single-Cell Kinetics," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 10, 2006, pp. 6674-6679. [doi:10.1128/AEM.00914-06](https://doi.org/10.1128/AEM.00914-06)
- [13] BACANOVA, "Final Report on the European Project QLRT-2000-01145: Optimisation of Safe Food Processing Methods Based on Accurate Characterisation of Bacterial Lag Time Using Analysis of Variance Techniquesm," BACANOVA Consortium, European Commission, Brussels, 2005.
- [14] J. Baranyi and C. Pin, "Estimating Bacterial Growth Parameters by Means of Detection Times," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 2, 1999, pp. 732-736.
- [15] R. C. McKellar and K. Knight, "A Combined Discrete-Continuous Model Describing the Lag Phase of *Listeria monocytogenes*," *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 54, No. 3, 2000, pp. 171-180. [doi:10.1016/S0168-1605\(99\)00204-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00204-4)
- [16] T. P. Robinson, O. O. Aboaba, A. Kaloti, M. J. Ocio, J. Baranyi and B. M. Mackey, "The Effect of Inoculum Size on the Lag Phase of *Listeria monocytogenes*," *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 70, No. 1-2, 2001, pp. 163-173. [doi:10.1016/S0168-1605\(01\)00541-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00541-4)
- [17] R. C. McKellar and A. Hawke, "Assessment of Distributions for Fitting Lag Times of Individual Cells in Bacterial Populations," *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 106, No. 2, 2006, pp. 169-175. [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.018](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.018)
- [18] J. Baranyi, S. M. George and Z. Kutalik, "Parameter Estimation for the Distribution of Single Cell Lag Times," *Journal of Theoretical Biology*, Vol. 259, No. 1, 2009, pp. 24-30. [doi:10.1016/j.jtbi.2009.03.023](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2009.03.023)
- [19] I. Espejo, F. Fernández, M. A. López, M. Muñoz, A. M. Rodríguez, A. Sánchez and C. Valero, "Estadística Descriptiva y Probabilidad," 3rd Edition, U.d.C., Cadiz, 2006. [http://knuth.uca.es/repos/1\\_edyp/pdf/-febrero06/lib\\_edyp.apendices.pdf](http://knuth.uca.es/repos/1_edyp/pdf/-febrero06/lib_edyp.apendices.pdf)
- [20] T. Hesterberg, D. S. Moore, S. Monaghan, A. Clipson, R. Epstein and G. P. McCabe, "Bootstrap Methods and Permutation Tests," In: W. H. McCabe, Ed., *Introduction to the Practice of Statistics* (5th Edition), Freeman & Co., New York, 2005, pp. 14.1-14.70.
- [21] S. Holm, "A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure," *Scandinavian Journal of Statistics*, Vol. 6, 1979, pp. 65-70.
- [22] H. Abdi, "Bonferroni and Sidák Corrections for Multiple Comparisons," In: C. S. Neil Salkind, Ed., *Encyclopedia of Measurement and Statistics*, Dallas, Thousand Oaks, 2007, pp. 103-107.
- [23] R Version 2.72, "Language and Environment for Statistical Computing," The R Foundation for Statistical Computing, 2008.
- [24] C. Pin and J. Baranyi, "Single-Cell and Population Lag Times as a Function of Cell Age," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 8, 2008, pp. 2534-2536. [doi:10.1128/AEM.02402-07](https://doi.org/10.1128/AEM.02402-07)

## Appendix A

```
#####
#####
# PROGRAM PERMUTA-
TION_VARIANCE_RATIO_TEST v2.0
#####
#####
# Authors: María del Carmen Bravo and Juan Aguirre -
November 2011
# This R program (http://cran.es.r-project.org/) applies
the permutation
# test to the null hypothesis of homogeneity of two vari-
ances.
# It applies a multiple test procedure to comparisons of
several variance
# pairs. To minimize the probability of rejecting a true
hypothesis,
# Bonferroni and Sidak p-value corrections, as well as
the less conservative
# Holm-Bonferroni corrections, are applied to the
p-values.
# The lag-time distribution of single cells of different
microorganisms is
# analysed. For each microorganism, the analysis is car-
ried out using 3, 4, or
# 5 dose or scenario groups. By default, the number of
variance pair
# comparisons in these cases are 3, 6 and 10, respec-
tively.
# All tests are bilateral (alternative hypothesis is non-
homogeneity).
# Extension to unilateral tests (alternative hypothesis is
that one variance
# is larger), and to different numbers of doses or scenar-
ios, is possible.
# Also the number of comparisons may be reduced.
# Permutation test:
# -----
# The homogeneity of two variances test is equivalent to
the variance
# ratio test, with the null hypothesis stating that the ratio
of variances
# is equal to 1.
# For two dose or scenario groups, the variances of the
lag-time of both
# groups and their ratio (variance_ratio) are computed.
# For a number of times, n_permutations:
# - Lag-time observations are randomly distributed
into the two dose
# or scenario groups. Original dose or scenario
sizes are maintained.
# - Variances of both groups and their ratio are com-
puted.
```

```
# A distribution of the variance ratios is obtained.
# If the variance_ratio value is an anomalous value of
this distribution,
# then the hypothesis of homogeneity of variances is
rejected.
# A histogram of the variance ratio distribution is gener-
ated.
# Bonferroni and Sidak p-value corrections:
# -----
# The output of each homogeneity of variances test is its
p-value and
# the corrected Sidak and Bonferroni p-values that take
into account the
# number of variance pair comparisons. The Bonferroni
correction is the
# test p-value multiplied by the number of comparisons.
This value
# must be compared to a multiple significance level al-
pha.
# Holm-Bonferroni p-value corrections:
# -----
# p-values of homogeneity of variance tests are ordered
from lower to higher.
# These values are compared to alpha/n_comparisons,
alpha/(n_comparisons-1),
# alpha/(n_comparisons-2),..., alpha, respectively. The
p-values must be lower # than this second set of values to
be significant with a multiple
# significance level alpha.
# References:
# -----
# Abdi, H. 2007. Bonferroni and Sidák corrections for
multiple comparisons.
# In: N.J. Salkind (ed.) Encyclopedia of Measurement
and Statistics, Thousand # Oaks, CA: Sage. pp. 103-107
# Hesterberg, T., Moore, D.S., Monaghan, S., Clipson,
A., Epstein, R., McCabe, # G.P., 2005, Bootstrap Meth-
ods and Permutation Tests. In: Moore, D.S. &
# McCabe, G.P.: Introduction to the Practice of Statistics,
Fifth Ed., W.H.
# Freeman & Co. pp. 14.1-14.70.
# Holm, S., 1979. A simple sequentially rejective multi-
ple test procedure.
# Scandinavian Journal of Statistics, 6, 65-70.
# R version 2.7.2, 2008. R: A Language and Environ-
ment for Statistical
# Computing. Reference Index. The R Foundation for
Statistical Computing.
# ISBN 3-900051-07-0.
# To run the program in R: Mouse-selection of several
sentences + F5

#####
#####
```

```

#                               Function definitions
#####
#####

# The function definitions part of the program is executed once.
# permutation_test function definition.
# g1, g2: ordinal numbers identifying dose or scenario groups.

permutation_test <- function(g1,g2) {

  assign("k",k+1,envir=.GlobalEnv)

  lag2g<-LAG[Key==keys[g1] | Key==keys[g2]]

  ng1<-n_groups[g1]
  ng2<-n_groups[g2]

  n1<-ng1
  n11<-ng1+1
  n2<-ng1+ng2

  variance_ratio<-var_groups[g1]/var_groups[g2]
  s_variance_ratio<-numeric(n2)
  s_variance_ratio<-variance_ratio

  for (i in 1:(n_permutations-1)) {
    s_lag2g<-sample(lag2g)

    s_variance_ratio<-c(s_variance_ratio,var(s_lag2g[1:n1])/
var(s_lag2g[n11:n2]))
  }

  position<-length(s_variance_ratio[s_variance_ratio<=variance_ratio])

  # p_inf: left tail estimated probability for variance_ratio value
  p_inf<-position/n_permutations
  p_sup<-1-p_inf

  p_value<-print_results
(g1,g2,variance_ratio,p_inf,p_sup)

# If the user does not want to see the histograms, add the
# symbol as the
# first character in the following two sentences.
win.graph()
  histogram(s_variance_ratio,g1,g2)

  p_value
}

#####
#####

# print_results function definition

print_results <- function (g1,g2,coc,p_inf,p_sup) {

  cat ('----- Permutation test
-----','\n")
  cat('Groups:', keys[g1],keys[g2],"\n")
  cat('Variance ratio:',coc,"\n")

  # p_value: p-value for the two-tailed test
  if (1/n_permutations < p_inf & p_inf <= 0.5)
p_value <- p_inf*2
  if (0 < p_sup & p_sup < 0.5) p_value <- p_sup*2
  # p_bon, p_sidak: corrected Bonferroni and Sidak
p_values for
# n_comparisons tests

  if ((1/n_permutations<p_inf & p_inf<=0.5) | (0<p_sup &
p_sup<0.5)) {
p_bon <- p_value*n_comparisons
  p_sidak <- 1-(1-p_value)^n_comparisons }

  if (p_inf==1/n_permutations | p_sup==0) {
    p_value <- 1/n_permutations
    p_bon <- 1/n_permutations
    p_sidak <- 1/n_permutations
    cat("Two-tailed p_value lower
than',1/n_permutations,"\n")
    cat('Bonferroni corrected p_value lower
than',1/n_permutations)
    cat("\n','Sidak corrected p_value lower
than',1/n_permutations,"\n")
  }

  if (p_value > 1/n_permutations) cat("Two-tailed
p_value:',p_value,"\n")

  if (1/n_permutations < p_value & p_value < alpha)
{
    cat('Bonferroni corrected
p_value:',p_bon,"\n")
    cat('Sidak corrected p_value:',p_sidak,"\n") }

  if (min(p_bon,p_sidak)>alpha )
  { cat("** Non significant differences between
variances **","\n") }
  if (min(p_bon,p_sidak)<alpha)
  { cat (** Variances of doses groups are different
**","\n") }

  cat
('-----','\n")
  p_value
}

```

```

}

# histogram function definition

histogram <-function (x,g1,g2) {

graph_name<-paste(file_name,sheet_name,'Groups:',key
s[g1],',and',keys[g2])
  hist(x, main = graph_name)  }

#####
#####
#                               End of function definitions
#####
#####

#####
#####
#                               Main program
#####
#####
# Program parameters:
# -----
# alpha: Multiple significance level for
n_comparisons of permutation
# test of the homogeneity of two variances.
Usual value: 0.05
# n_permutations: Number of permutations. Usual
value: 10000
# file_name: Name of the Excel file with the input
data
# sheet_name: Name of the Excel sheet with the input
data
# Name of columns: Key LAG
# Key refers to treatment names (doses or scenarios)
# LAG refers to LAG-time
# groups_number: Number of dose or scenario groups.
# Possible values: 3, 4, 5
# n_comparisons: Number of pairwise comparisons.
Values: 3, 6, 10
# for respective group_number values of 3, 4, 5
# Its value is used for p_value corrections
# keys: group_number dimension vector with dose or
scenario group names
# digits: Number of digits for output of numerical val-
ues
# output_file_name: Name of output file when user
wants program output
# diverted to a file instead of to the R terminal

# This main program must be executed once for all vari-
ance comparisons of
# lag-time distribution for each microorganism

# IMPORTANT NOTE: The user must assign values to
these program parameters
# -----
alpha <- 0.05
n_permutations <- 10000
# file_name and sheet_name are only necessary for the
output, to identify
# results
file_name <- 'file-name.xls'
sheet_name <- 'sheet-name'
groups_number <- 3

# Give the dose or scenario names in the case of
groups_number equal
# to 3, 4 or 5. Names are case-sensitive.
if (groups_number == 3) keys <- c('A','B','C')
if (groups_number == 4) keys <- c('A','B','C','D')
if (groups_number == 5) keys <- c('A','B','C','D','E')

# Output:
# -----
# Program output can be diverted to the R terminal (de-
fault) or to a file.
# If output is written to a file, specify the name of the file
# (for example: output_file_name="c:/output_files/Lag_
HAM.txt")
# and run the following two sentences without the #
symbol.

# output_file_name="complete-file-name"
# sink(file = output_file_name, append = TRUE, type =
"output",split = FALSE)

# the append = TRUE option means that the output will
be appended
# to the file; otherwise, it will overwrite the contents of
the file.
# If during an R session you want to divert output to the
R terminal,
# run the next sentence without the # symbol.

# sink(file=NULL)

#####                               Data entry
#####
# 1. Open the Excel file file_name, sheet sheet_name
# 2. Select the columns Key and LAG (names are
case-sensitive)
# 3. Click menu option Edit --> Copy (or CTRL + C )
# 4. Execute the next two R sentences
# If the decimal point is written as a comma in your input
data, read
# the note at the end of the program

```

```

data<- read.table("clipboard",header=T)
attach(data)

# digits controls the number of digits to print # when
printing numeric values.
# options(digits=5)

##### Running the analysis
#####
# User has two options:
# 1) Select all sentences through to the end of the pro-
gram and execute them
# 2) Execute the following command blocks as appropri-
ate

if (groups_number == 3) n_comparisons <- 3
if (groups_number == 4) n_comparisons <- 6
if (groups_number == 5) n_comparisons <- 10

cat('Input data: File ', file_name ', sheet ',
sheet_name,"\n")
cat('Number of doses or scenario groups:',groups_num-
ber,"\n")
cat('Number of comparisons:',n_comparisons,"\n")
cat('Multiple significance level:', alpha,"\n")

g1<-Key[Key==keys[1]]
ng1<-length(g1)
g2<-Key[Key==keys[2]]
ng2<-length(g2)
g3<-Key[Key==keys[3]]
ng3<-length(g3)

n_groups<-c(ng1,ng2,ng3)

var1<-var(LAG[Key==keys[1]])
var2<-var(LAG[Key==keys[2]])
var3<-var(LAG[Key==keys[3]])

var_groups<-c(var1,var2,var3)

# Running this block is required for groups_number > 3,
though it can be run
# for any value of groups_number.
if (groups_number>3) {
  g4<-Key[Key==keys[4]]
  ng4<-length(g4)
  n_groups<-c(n_groups,ng4)
  var4<-var(LAG[Key==keys[4]])
  var_groups<-c(var_groups,var4)
}

# Running this block is required for groups_number = 5,
though it can be run

```

```

# for any value of groups_number.
if (groups_number==5) {
  g5<-Key[Key==keys[5]]
  ng5<-length(g5)
  n_groups<-c(n_groups,ng5)
  var5<-var(LAG[Key==keys[5]])
  var_groups<-c(var_groups,var5)
}

# Continue running the program
std_groups <- sqrt(var_groups)
cat('Names of doses or scenario groups:', keys,"\n")
cat('Variances:', var_groups,"\n")
cat('Standard deviations:', std_groups,"\n")

# k: Initialization of the number of comparisons # per-
formed. User should not
# change this value
# k increments its value by one each time #permuta-
tion_test function is run
k<-0
c1<-numeric(n_comparisons)
c2<-numeric(n_comparisons)
p_values<-numeric(n_comparisons)

# Execution of the permutation_test function as permuta-
tion_test(g1,g2),
# where g1, g2: ordinal numbers identifying dose or
scenario groups.
# n_comparisons permutation_test definition functions
must be run.

p<-permutation_test(1,2); c1[k]<-1; c2[k]<-2;
p_values[k]<-p

p<-permutation_test(1,3); c1[k]<-1; c2[k]<-3;
p_values[k]<-p

p<-permutation_test(2,3); c1[k]<-2; c2[k]<-3;
p_values[k]<-p

# Running this block is required for groups_number > 3,
though it can be run
# for any value of groups_number.
if (groups_number>3) {
  p<-permutation_test(1,4); c1[k]<-1; c2[k]<-4;
  p_values[k]<-p
  p<-permutation_test(2,4); c1[k]<-2; c2[k]<-4;
  p_values[k]<-p
  p<-permutation_test(3,4); c1[k]<-3; c2[k]<-4;
  p_values[k]<-p
}

# Running this block is required for groups_number = 5,

```

```

though it can be run
# for any value of groups_number.
if (groups_number==5) {
  p<-permutation_test(1,5);  c1[k]<-1;  c2[k]<-5;
p_values[k]<-p
  p<-permutation_test(2,5);  c1[k]<-2;  c2[k]<-5;
p_values[k]<-p
  p<-permutation_test(3,5);  c1[k]<-3;  c2[k]<-5;
p_values[k]<-p
  p<-permutation_test(4,5);  c1[k]<-4;  c2[k]<-5;
p_values[k]<-p
}

# Continue running the program:
# -to control possible errors in k value and
# -to perform tests that apply Holm-Bonferroni p-value
corrections

if (k>n_comparisons) {
  cat ("***** ERROR *****","\n")
  cat ("The number of permutation tests run is greater
than', n_comparisons)
  cat ("\n",'Start the running of the program from
sentence k<-0' ) }

# ord_p: test p-values in order of increasing value
ord_p <- order(p_values)

# alpha_i: Holm-Bonferroni significance level for the ith
test for a multiple
# significance level alpha
alpha_i<-c(alpha/n_comparisons:1)

C<-matrix(c(c1[ord_p],c2[ord_p],p_values[ord_p],alpha
_i),nrow=n_comparisons)

aux<-numeric(n_comparisons)
for (i in 1:n_comparisons) {
  aux[i]<-0
  if (C[i,3]< C[i,4]) aux[i]<-1 }

CC<-matrix(c(C,aux),nrow=n_comparisons)

# L: number of significance tests
L <-sum(CC[,5])

# CCC: matrix of significance tests.
# columns 1 and 2: Identification numbers of
# dose or scenario groups
# column 3: p-value for the bilateral test
# column 4: alpha_i value to be compared with
p-value
CCC<-CC[,1:4][CC[,5]==1]

```

```

dim(CCC)<-c(L,4)

cat ("\n")
cat ("** Application of Holm-Bonferroni p-value correc-
tions **","\n")
cat ('-----','\n')
if (L==0) {
  cat ("** Non significant differences between any pair of
variances **","\n")}
if (L > 0) {
  cat ("** Pairs of variances that are different **","\n")
  cat ('Doses          Doses          p-value
H-B correction','\n')
  cat ('-----          -----          -----
-----','\n')
  for (i in 1:L) {
  cat(format(keys[CCC[i,1]],width=12),format(keys[CCC[
i,2]],width=12),
      format(CCC[i,3],width=8,digits=5),
      format(CCC[i,4],width=9,digits=5),"\n")}
  cat ('Significant because p-value < Holm-Bonferroni
correction','\n')
}
cat ('-----','\n')
cat
('*****
*****','\n")

# End of the program

# Notes:
# -----
# When running attach(data), the message
# The following object(s) are masked from data #
(position 3):
# Key LAG
# should be ignored
# For data in which the decimal is marked with a comma
instead of a period,
# use the following sentence without the # symbol
#data<-read.table("clipboard",dec="," ,header=T#)
# Data can be read from CSV files exported from Excel
# For data in which the decimal is marked with a # pe-
riod, use the following
# sentence without the # symbol
#data<-read.csv2("complete-file-name",header=T#)
# For data in which the decimal is marked with a comma,
use the following
# sentence without the # symbol
#data<- read.csv("complete-file-name",header=T)
# Example of complete-file-name:
# c:/data/VT2kgy.csv
# To avoid the following error
# Error en win.graph() : too many devices open

```

```
# close graphing devices when many are open
# To avoid the following error
# Error en var(LAG[Key == keys[1]]) : 'x' is empty
# ensure that the names in the column Key of the # Excel
file are
# the same as the names given in the sentence
# if (groups_number ...) keys <- c('A',...)
```

## ARTÍCULO N° 7

---

Modelado de la fase de latencia y su variabilidad de micropoblaciones de *Listeria innocua*.

Manuscrito en fase de segunda revisión bajo el nombre “*Modeling the Listeria innocua micropopulation lag phase and its variability*” en International Journal of Food Microbiology y cuyos autores son **Juan S. Aguirre**, Andrea González, Nicem Özcelik, María Rosa Rodríguez, Gonzalo D. García de Fernando.

---

*Domingo*



Elsevier Editorial System(tm) for International Journal of Food Microbiology

Manuscript Draft

Manuscript Number: FOOD-D-12-00099R1

Title: Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability

Article Type: Full Length Article.

Keywords: *Listeria innocua*, lag phase, variability, inoculum size, heat shock, growth temperature

Corresponding Author: Dr Gonzalo Garcia de Fernando.

Corresponding Author's Institution: Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense.

First Author: Juan S Aguirre.

Order of Authors: Juan S Aguirre; Andrea González; Nicem Özçelik; María R Rodríguez; Gonzalo Garcia de Fernando.

Abstract: *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability have been modeled as a function of growth temperature, intensity of heat stress, and the number of cells initiating growth. Micropopulation lag phases were found to correlate negatively with inoculum size and growth temperature and positively with heat shock intensity. Validation of the models using experimental milk samples indicated that the average lag phase duration predicted is shorter and more variable than the observed, meaning that they should be considered safe for risk assessment. Our results suggest that the effect of inoculum size on the population lag phase has both stochastic and physiological components.



## **Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability**

Juan S. Aguirre<sup>1</sup>, Andrea Gonzalez<sup>1</sup>, Nicem Özçelik<sup>1,2</sup>, María R. Rodríguez<sup>1</sup>, Gonzalo D. García de Fernando<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Depto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Ciudad Universitaria, Madrid 28040, Spain

<sup>2</sup> Food Engineering Department, Ege University, Bornova- Izmir, Turkey

### **Abstract.**

*Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability have been modeled as a function of growth temperature, intensity of heat stress, and the number of cells initiating growth. Micropopulation lag phases were found to correlate negatively with inoculum size and growth temperature and positively with heat shock intensity. Validation of the models using experimental milk samples indicated that the average lag phase duration predicted is shorter and more variable than the observed, meaning that they should be considered safe for risk assessment. Our results suggest that the effect of inoculum size on the population lag phase has both stochastic and physiological components.

**Keywords:** *Listeria innocua*, lag phase, variability, inoculum size, heat shock, growth temperature

\* Corresponding author: [mingui@vet.ucm.es](mailto:mingui@vet.ucm.es)

Tel. no. +34 91 3943744

Fax no. +34 91 3943743

## 1. Introduction

The microbial lag phase reflects the time required for cells to adapt to a new environment and start duplicating. Models of microbial growth give accurate estimates of specific growth rate but usually inaccurate estimates of lag time, probably because numerous factors influence lag time and controlling them all is not feasible.

The lag phase depends on many factors, including potentially all physical or chemical conditions of the growth environment. In addition, cell injuries caused by heating, freezing, drying (Mackey and Kerridge, 1988), irradiation (Aguirre et al., 2011) and other preservation treatments (Robinson et al., 2001) considerably extend the lag phase and increase its variability. Many microbiologists have studied the effect of inoculum size on bacterial lag time (Augustin et al., 2000; Duffy et al., 1994; Gay et al., 1996; Mackey and Kerridge, 1988; Pascual et al., 2001; Pin and Baranyi, 2006; Pin et al., 1999; Robinson et al., 2001; Stephens et al., 1997), and their studies have come to contradictory conclusions. Some studies have suggested that inoculum size has no effect on lag phase duration, but these studies were carried out under optimal or near-optimal microbial growth conditions in broth culture (Brouillaud-Delattre et al., 1997; Duffy et al., 1994; Jason, 1983) and food (Mackey and Kerridge, 1988). Conversely, studies conducted under suboptimal growth conditions have reported that inoculum size influences lag phase (Augustin et al., 2000; Gnanou Besse et al., 2006; Pin and Baranyi, 2006; Robinson et al., 2001). This influence on lag phase has been reported either when the inoculum was very small (Augustin et al., 2000) or when only a small proportion of the population was able to grow as a result of an applied stress (Augustin et al., 2000; Pascual et al., 2001). Robinson et al. (2001) observed that, in media containing inhibitory concentrations of NaCl, both the mean lag time and variations between replicate inocula increased as the inoculum size became smaller. Those authors identified two types of inoculum size effects on population lag: a cooperative or inhibitory effect of high cell concentrations, and a statistical effect at low cell concentrations arising from the variability in individual lag times. There is little information about the possible effects of cell - cell interactions on lag time, although cell signalling has been shown to affect the emergence of cells from dormancy (Mukamolova et al., 1998), and some evidence suggests that pheromone-like substances may promote bacterial growth (Kaprelyants et al., 1999).

Baranyi and his team (Baranyi, 1998; Baranyi and Pin, 1999; Pin and Baranyi, 2006; Baranyi et al., 2009) analyzed the effects of inoculum size on population lag and showed that as the size of the inoculum decreases, the population lag time increases by an amount that depends on the distribution of individual lag times and the maximum specific growth rate. They suggested that population lag time must be less than the average lag time of the individual cells in the population, since cells with short lags begin to multiply at once and their descendants dominate the population. They also observed that the smaller the inoculum is, the more variable is the lag phase. How exactly does inoculum size affect lag phase variability? There is no completely satisfactory answer to this question. Although McKellar and Knight (2000) modeled the lag phase of *Listeria monocytogenes* at the nearly optimal growth temperature of 30 °C by taking into account the variability of individual cells, this kind of model is unlikely to be reliable under suboptimal or stress conditions, when the lag phase becomes longer and more variable (Baranyi, 2002; Gnanou Besse et al., 2006; Metris et al., 2003; Robinson et al., 2001).

Predictive microbiology modellers have developed systems that accurately describe microbial behavior. Growth kinetics (Juneja and Marks, 2006; Pin and Baranyi, 2006), growth/no growth boundaries (Koutsoumanis, 2008; Mejlholm et al., 2010), and growth effects of different kinds of stress (e.g. irradiation, high pressure, heat) (Aguirre et al., 2011; Black et al., 2008; Smelt et al., 2008; Zhu et al., 2008) have been studied to improve the accuracy of growth models. This research has increased our understanding of the variability in microbial response to the environment (Aguirre et al., 2009; Francois et al., 2006; Koutsoumanis, 2008; Metris et al., 2005), and it shows that lag phase varies broadly in many situations (Aguirre et al., 2011; Lianou and Koutsoumanis, 2011; Stringer et al., 2011). Thus, in order to make accurate predictions about small populations of cells, it is particularly important to take into account this variability, particularly when the cells have been exposed to stress (Li et al., 2006).

Since natural contamination of foods may occur with very few cells, and these cells are frequently stressed by food processing conditions, it is essential to generate improved models that take into account what injuries cells have suffered before they contaminate food and that use a stochastic approach to deal with variability in the behavior of individual cells and micropopulations (Guillier et al., 2005). The objective of this study was to model the lag time of micropopulations and individual cells, as well

as the variability in that lag time, following different heat shocks and subsequent growth at different refrigeration temperatures.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Bacterial strain and inoculum preparation

*Listeria innocua* (CECT 910, NCTC 11288, ATCC 33090) was kept frozen at -20 °C in tryptic soy broth (TSB; Pronadisa, Madrid, Spain) supplemented with 20% glycerol. The strain was subcultured twice in sterile TSB at 37 °C for 24 h to reach the stationary phase, with a concentration of *ca.* 10<sup>9</sup> cfu/ml. Cell suspensions were then used to inoculate sterile TSB solution or commercial sterile whole milk (Asturiana, Asturias, Spain).

### 2.2. *L. innocua* growth and inactivation parameters

The decimal reduction time (*D* value) in whole milk was taken from Aguirre et al. (2009) and the *D* value in TSB was calculated by log linear regression.

The maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) was estimated in TSB at 7, 11 and 16 °C from turbidity growth curves in three replicate experiments using an automated spectrophotometer (Bioscreen C, Labsystems, Helsinki, Finland) kept in a cold room at  $5 \pm 1$  °C. Serial five-fold dilutions of each 24-h culture were prepared in fresh TSB to obtain dilutions from approximately 10<sup>7</sup> to 10<sup>0</sup> cfu ml<sup>-1</sup>. Twenty replicate samples (350  $\mu$ l) from each dilution were inoculated into wells of Bioscreen microplates. The plates were loaded into the Bioscreen C at an incubation temperature of 7, 11 or 16 °C. After shaking at medium intensity for 10 s, turbidity measurements were determined using a wide band filter at 420 to 580 nm at 30-min intervals. Plates were incubated for enough time to reach stationary phase in the most dilute samples. Dilutions of each initial inoculum were plated by spreading onto TSA, then they were incubated at 37 °C and finally colonies were counted. Using the Bioscreen device, the time to detection ( $T_d$ ), defined as the time required to reach an absorbance of 0.20, was obtained from each well, and a mean value was calculated for each dilution. The  $\mu_{max}$  was estimated from the reciprocal of the absolute value of the regression slope.

The  $\mu_{max}$  in whole milk was estimated at 7 and 12 °C in a cooled incubator (model FOC225I, Velp Scientifica, Usmate, Italy) (Aguirre et al., 2012b).

### 2.3. Heat shock, inoculum size and growth temperature

Heat treatment at 54 °C was applied to obtain 0, 3 and 5 logarithmic reductions ( $D$ ) in TSB ( $D_{54^{\circ}\text{C}} = 6.6$  min for TSB) and 1, 3 and 5 reductions in whole milk [ $D_{54^{\circ}\text{C}} = 13.7$  min (Aguirre et al., 2009)] in a temperature-controlled water bath (model TFB, Bunsen S.A., Marid, Spain). Temperature was monitored with a thermocouple (Testo AG 720, Kirchzarten, Germany). Tubes containing 9 ml of TSB or whole milk were kept in the water bath and, once at 54 °C, were inoculated with 1 ml of the abovementioned *L. innocua* suspension to yield the samples that would be treated for 5 log reductions ( $5D$  samples).  $5D$  samples were diluted to a concentration around  $10^7$  cfu/ml to obtain  $3D$  samples. Unheated samples were inoculated with a suspension of  $10^4$  cfu/ml. All tests were performed 3 times. When the heat shock was completed, the contents of the TSB tubes were mixed with 90 ml of cold TSB in a flask immersed in an ice water bath, where the flask was kept for 1 min in order to end the heat shock but minimize the possible adverse effects of cold. From these mother solutions, half-dilutions were prepared in order to obtain several inoculum sizes ranging from around 200 cells/ml down to 1 cell/ml (Table 3). The same procedure was used to obtain different inocula to analyze the lag phase in TSB at 7, 11 and 16 °C.

For experiments with milk, 100  $\mu\text{l}$  of heat-shocked *L. innocua* suspensions in whole milk (see Table 1 for inoculum sizes) were mixed with 900  $\mu\text{l}$  of cold, sterile whole milk in an Eppendorf tube and incubated at 7 or 12 °C. Each batch was composed of at least 150 samples. To estimate the average number of cells per well, 1 ml from each dilution were mixed with melted tryptic soy agar (TSA; Pronadisa) in plates and incubated at 37 °C for  $48 \pm 2$  h. Approximately 20 plates were counted for each dilution and treatment.

#### 2.4. Lag time in TSB (Bioscreen)

Once the heat shock was completed, samples were half-diluted down to 1 cell/ml. Then micropopulation and individual cell lag times were estimated in TSB from turbidity growth curves generated using the Bioscreen C, as described in several studies (Aguirre et al., 2009; Guillier et al., 2005; Metris et al., 2003). To do this, 300  $\mu$ l from the diluted samples (50 samples per dilution) were transferred to the two microplates of the Bioscreen (50 wells per dilution). To estimate the initial average number of cells per well, 300  $\mu$ l from each dilution were mixed with molten TSA in plates and incubated at 37 °C for  $48 \pm 2$  h. Approximately 20 plates were counted for each dilution and treatment.

Cultures were grown at 7, 11 and 16 °C. The increase in optical density (OD) was tracked by measuring absorbance in the wavelength range from 420 to 580 nm using the Bioscreen C every 30 min for up to 4 weeks at 7 °C, 15 days at 11 °C and 8 at 16 °C. Cultures were shaken for 10 s at medium intensity before OD was measured.

Lag times were estimated using the detection time, defined as the time required for the OD in the wavelength range between 420 and 580 nm to reach 0.2 units, which corresponds to a concentration of *ca.*  $10^7$  cfu/well. This value was checked by preparing a dilution series from a culture grown in TSB at 37 °C for 24 h. ODs of the dilutions were measured using the Bioscreen, bacterial counts were estimated by plating on TSA, and lag times were estimated based on the following equation (Baranyi and Pin, 1999):

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

where  $N_d$  is the bacterial number (cfu) at  $T_d$ ,  $N_0$  the number of cells (cfu) initiating growth in the well under consideration, and  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) is the specific growth rate determined from the growth curve obtained under the experimental conditions described above.

### 2.5. Modeling the effect of heat shock, inoculum size and growth temperature on lag phase

Two polynomial models were fitted to the data (eq. 2) using the Microsoft Excel Add-in polynomial regression data analysis. One model quantifies the effect of heat shock, inoculum size and growth temperature on the average lag phase of *L. innocua* in TSB. The second quantifies the effect of the same factors on the standard deviation (*Sd*) of the lag phase (*z*).

The general polynomial model developed in the present study takes the form

$$\ln(y \text{ (or } z)) = a_0 + a_1T + a_2D + a_3C + a_{12}TD + a_{13}TC + a_{23}DC + a_{11}T^2 + a_{22}D^2 + a_{33}C^2 \quad (2)$$

where *y* is the average lag phase; *z*, the *Sd* of lag phase; *T*, the growth temperature (°C); *D*, the average number of logarithmic reductions achieved in the population; *C*, the decimal logarithm of the average number of cells per well (inoculum size); and  $a_0 \dots a_{33}$ , the coefficients to be estimated.

### 2.6. Model validation in whole milk

To validate the models generated, lag phase data were obtained in milk and compared to the model predictions.

To estimate the average number of cells per sample, the entire contents of the Eppendorf tubes immediately after the heat shock (see section 2.3) were mixed with molten TSA in plates and kept at 37 °C for  $48 \pm 2$  h. Approximately 20 samples were counted for each treatment.

After the third day of incubation, growth was checked daily by plating 100 µl of 5 samples into molten TSA and incubating at 37 °C for  $32 \pm 2$  h. When the cell number in any sample was found to be higher than *ca.*  $10^4$  cfu, 100 µl of all remaining samples were plated into TSA using a spiral platter system (Eddy Jet, IUL Instruments, Barcelona, Spain) and the sampling times were recorded. Plates were then incubated at 37 °C for  $48 \pm 2$  h and colonies were counted using an image analyzer (Counterstat

Flash, IUL Instruments, Barcelona, Spain). To ensure an adequate number of colonies, two dilutions per sample were prepared.

Lag time was calculated from the plate counts using equation (1) and replacing  $T_d$  with  $T_{count}$ , defined as the time when the sample was plated out. In this case,  $Ln(Nd)$  was the natural logarithm of the cell number detected at  $T_{count}$ , and  $Ln(N_0)$  the natural logarithm of the average initial number of bacteria after heat shock, as determined by direct counting of 20 samples (see section 2.6).

Table 1 summarizes the conditions chosen for validation (inoculum sizes, logarithmic reduction and growth temperature).

In order to compare data from the model system in TSB with data from milk and thereby validate the model predictions, the accuracy factor ( $A_f$ ) and bias factor ( $B_f$ ) were estimated according to the equations of Ross (1996):

$$A_f = 10^{\left(\sum |\log(X_{pred}/X_{obs})|/n\right)} \quad (3)$$

$$B_f = 10^{\left(\sum \log(X_{pred}/X_{obs})/n\right)} \quad (4)$$

### 2.7. Other statistical analysis

To find the best fit, a family of distributions was fitted to the experimental data using EasyFit 5.5 software (Mathware Technologies). The chi-square test was applied to find the goodness of the fit, being gamma distribution the best, followed by lognormal and normal distributions.

Variances in the distributions of lag phases were compared using a permutation test, as described by Aguirre et al. (2011, 2012a).

Coefficient of variance ( $CV$ ) was calculated to quantify the dispersion of the data. Since  $CV$  is the standard deviation divided by the mean ( $CV = 100 \cdot Sd / \text{mean}$ ), this scaled measure compares the degree of variation between populations with different means (Jongenburger et al., 2010).

The probability density function [ $f(x)$ ] of a gamma-distribution estimated with Microsoft Excel was used to calculate the predicted lag phase distributions:

$$f(x) = \frac{\lambda e^{-\lambda x} (\lambda x)^{\kappa-1}}{\Gamma(\kappa)} \quad (5)$$

where  $x$  is a lag phase;  $f(x)$ , its relative frequency;  $\lambda$ , rate;  $\kappa$ , shape;  $e$ , the base of the natural logarithm; and  $\Gamma(\kappa)$ , the gamma function, which was calculated using the Microsoft Excel function tool. The rate and shape were used to characterize the gamma distribution and were calculated by simple calculus according to the following equations, using the mean and  $Sd$  predicted by the models:

$$\lambda = \text{mean} / \text{variance} \quad (6)$$

$$\kappa = \lambda * \text{mean} \quad (7)$$

The eq (5) can be used replacing the rate by the scale ( $\theta$ ), being:

$$\theta = 1 / \lambda \quad (8)$$

### *2.8. Simulation of population growth on the basis of lag phases of individual cells*

Simulations were performed to analyze whether the effect of inoculation size on the lag phase duration of a population reflects only a stochastic effect or includes a physiological effect as well, such as a quorum-sensing process or other type of intercellular communication. The growth of populations of individual cells with a previously determined lag phase (see section 2.4) and constant  $\mu_{max}$  for a given growth temperature (see Table 2) was simulated using Microsoft Excel.

### 3. Results

#### 3.1. Specific growth rate

Table 2 shows the maximum specific growth rates ( $\mu_{max}$ ) of *L. innocua* on TSB and milk. The highest rate was 0.31 h<sup>-1</sup> on TSB at 16 °C, reflecting the well-known mesophilic character of this species. Growth was slightly slower in milk than in TSB, although the differences were negligible.

**Table 1.** Number of surviving cells per sample for *Listeria innocua* cultured in whole milk at the indicated growth temperatures, following heat treatment at 54°C to achieve the indicated log reductions in population size. Data are the average of direct counts of ca. 20 plates.

Growth temperature (°C)	No. of logarithmic reductions in population					
	1		3		5	
	Av.	Sd.	Av.	Sd.	Av.	Sd.
7	1.3	1.3	0.7	0.6	0.9	0.9
	5.7	5.2	2.1	1.6	11.5	5.1
	34.5	8.7	16.7	5.6	27.1	7.9
	55.7	9.3	71.4	12.2	42.5	9.0
	117.8	17.5	126.1	18.6	89.3	15.0
				131.3	21.2	
12	1.2	1.2	0.9	0.7	0.7	0.8
	2.6	2.4	2.4	2.7	7.5	3.4
	30.4	6.3	18.4	5.6	20.1	6.3
	85.5	13.6	63.4	10.9	39.3	8.1
	122.5	18.5	111.3	16.8	76.3	12.3
					121.5	17.8

Av. Average number of cells per sample. Sd. standard deviation

**Table 2.** Maximum specific growth rates ( $\mu_{max}$ ) of *Listeria innocua* on different substrates. Data are the average of three replicates.

Substrate	Temperature (°C)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	SE <sup>a</sup>
TSB	7	0.09	0.016
TSB	11	0.14	0.001
TSB	16	0.31	0.007
Whole milk	7	0.08	0.009
Whole milk	12	0.14	0.006

<sup>a</sup> Standard error of  $\mu_{max}$

### 3.2. Effect of heat shock, inoculum size and growth temperature on the lag phase

Average lag phase and *Sd* of micropopulations were calculated from *ca.* 100 samples and are shown in Table 3. In all cases, the lag phase of micropopulations correlated negatively with inoculum size and growth temperature and positively with heat shock intensity. The longest lag phase was detected in the micropopulations very likely to be composed of one cell that survived the most severe heat shock and then were incubated at the lowest temperature. Conversely, untreated micropopulations showed shorter lag phases than heat-shocked ones, and the higher the growth temperature was, the shorter was the lag phase. The lag phase variability (*Sd*) also correlated negatively with inoculum size and growth temperature and positively with heat shock intensity. On the other hand, the *CVs* were similar at all incubation temperatures (Table 3), although the differences between lag phases were remarkable. For example, average lag phases of the smallest inocula surviving a 5*D* heat treatment were 304, 212 and 92 h at 7, 11 and 16 °C, while the corresponding *CVs* were 41, 38 and 34% (Table 3).

Figure 1 shows the lag phase frequency distributions for different inoculum sizes of *L. innocua* grown on TSB at different temperatures after heat treatment at 54 °C to achieve 0, 3 and 5 logarithmic reductions. Histogram analysis shows that the frequency of shorter lag phase bins increased as inoculum size increased. In other words, the average lag phase of small inocula was longer and more variable than that of an inoculum of a hundred cells. In general, the lag phase distributions showed no tails, especially when inocula were large; in these cases, the shape was approximately symmetrical. However, with greater heat stress and smaller inoculum, the shape of the distributions lost symmetry and tails appeared, particularly at lower growth temperatures. The best fit of our experimental data was checked using EasyFit 5.5 software (Mathwave Technologies). The chi-square test was applied to find the goodness of the fit; the gamma distribution showed the best fit in almost all distributions, followed by lognormal and normal distributions. For this reason, the gamma distribution was chosen. Furthermore, the skewness of the distributions were generally positive (Table 3), indicating that the tail on the right side is longer than that of the left side and the bulk of the values lie to the left of the mean, a typical shape of gamma distributions, characterized by  $\kappa$  values  $> 1$ .

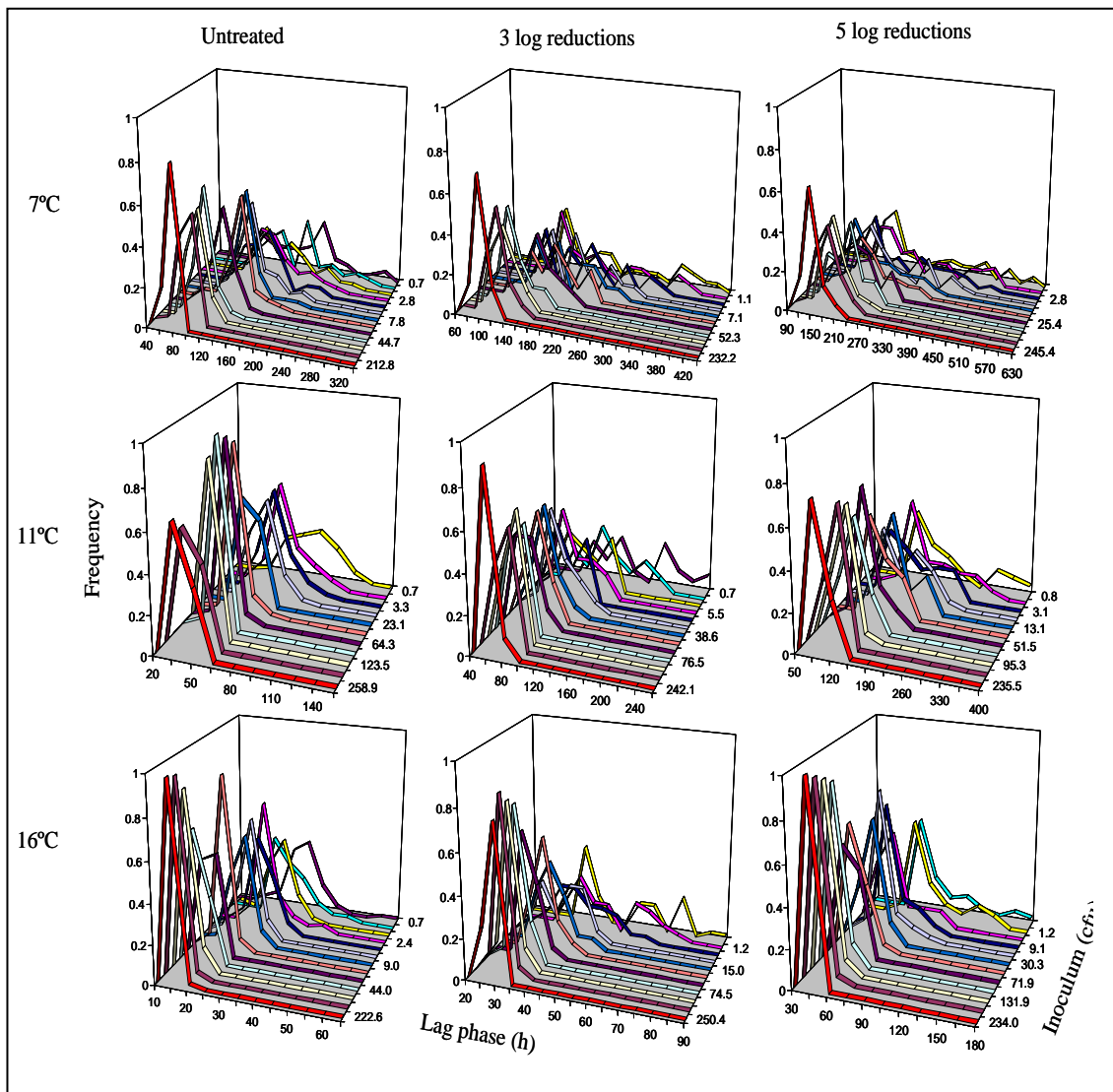
Table 3 shows significant differences ( $\alpha < 0.05$ ) among the lag phase distributions of cells that had been heat-treated in the same way and incubated at the same temperature; these differences are due to different numbers of cells initiating growth, as calculated using the permutation test. The greater the difference is between the average number of cells in the inoculum, the more probable it is that the lag phase distributions differ significantly.

No. of Log reduction	Growth temperature																		
	7°C						11°C						16°C						
	Average cell/sample	Sd <sup>a</sup>	Average lag phase (h)	Sd	CV <sup>b</sup> (%)	Skewness	Average cell/sample	Sd	Average lag phase (h)	Sd (h)	CV (%)	Skewness	Average cell/sample	Sd	Average lag phase (h)	Sd (h)	CV (%)	Skewness	
0	212.8	27.4	64.9 a	6.1	9.3	-0.604	258.9	48.0	33.8 a	2.9	8.6	0.126	222.6	26.0	13.7 a	0.8	5.8	-0.371	
	151.5	19.5	80.3 ab	8.1	10.1	-0.378	174.3	26.0	36.0 ab	3.2	8.8	0.595	141.5	15.8	13.9 a	0.8	6.0	0.636	
	83.2	10.2	84.3 b	10.4	12.3	0.333	123.5	50.5	38.6 abc	3.5	9.1	0.643	83.5	9.5	14.0 a	0.9	6.3	0.572	
	44.7	6.1	89.4 c	12.3	13.8	0.705	89.4	9.2	40.5 abc	3.8	9.3	0.476	44.0	4.4	14.6 ab	1.0	6.6	0.097	
	23.3	3.1	108.9 cd	15.6	14.3	-0.228	64.3	6.6	41.5 bcd	5.1	12.2	0.971	21.8	4.3	15.3 abc	1.3	8.6	0.974	
	12.8	2.5	124.2 de	20.4	16.4	0.193	33.8	9.0	45.7 cde	5.6	12.1	1.384	12.0	1.9	17.5 cbd	1.6	9.3	0.994	
	7.8	2.3	130.2 df	22.4	17.2	0.887	23.1	4.1	49.7 ef	6.7	13.5	0.211	9.0	1.4	21.1 cde	2.8	13.3	-0.236	
	6.6	1.3	135.6 dg	24.8	18.3	1.109	7.5	2.7	54.6 efg	9.3	17.0	1.135	5.0	1.4	21.3 def	3.1	14.5	-0.310	
	3.8	1.8	143.5 efgh	31.6	22.0	1.142	3.3	2.2	60.2 fg	12.7	21.1	1.005	3.5	1.2	23.7 defg	4.3	18.2	-0.587	
	2.8	1.6	152.7 efgh	36.0	23.6	0.867	2.1	1.2	65.3 gh	14.9	22.8	1.022	2.4	1.3	24.3 efg	4.9	20.1	1.913	
	2.1	1.1	160.6 fgh	40.2	25.0	0.707	0.7	0.6	84.2 h	20.7	24.6	0.648	2.0	0.9	25.6 efg	5.3	20.8	-0.661	
	1.1	1.0	175.2 h	47.7	27.2	0.529							1.5	1.0	27.8 fg	6.0	21.5	1.383	
	0.7	0.7	187.4 h	52.9	28.2	0.281							0.7	0.7	31.8 g	7.2	22.6	1.711	
3	232.2	27.2	91.7 a	11.6	12.7	0.412	242.1	30.8	54.3 a	5.5	10.1	-0.784	250.4	45.5	26.1 a	1.6	6.1	0.120	
	146.9	18.2	112.5 ab	16.1	14.3	0.454	162.4	18.8	60.4 ab	7.0	11.7	0.271	150.5	19.6	26.8 a	1.7	6.3	0.382	
	91.3	10.2	112.8 abc	17.1	15.1	0.373	98.0	13.5	62.2 abc	7.7	12.4	0.266	101.2	14.5	27.5 ab	1.9	6.8	-0.147	
	52.3	7.5	119.6 abcd	21.2	17.7	0.927	76.5	8.6	62.2 abc	7.9	12.7	0.323	74.5	10.9	28.6 abc	2.0	7.0	0.187	
	25.6	5.2	150.6 bcde	29.6	19.7	0.436	60.4	10.0	64.1 abcd	10.0	15.7	0.342	56.8	9.5	29.4 abc	2.6	8.8	0.571	
	15.7	4.2	172.9 cde	36.9	21.4	0.269	50.9	7.8	69.9 abcd	11.2	16.1	0.325	23.0	4.5	32.7 bcd	3.8	11.5	0.895	
	7.1	3.2	180.4 de	42.9	23.8	0.473	38.6	2.5	71.5 abcde	14.4	20.1	0.882	15.0	2.3	33.5 cde	5.4	16.1	1.073	
	3.6	2.3	190.6 e	49.7	26.1	0.503	22.1	5.2	82.6 bcde	17.5	21.2	0.911	8.4	3.1	35.8 def	6.9	19.3	-0.038	
	2.7	2.1	202.7 e	60.7	29.9	0.525	8.5	2.7	84.1 cde	19.7	23.5	0.273	4.9	1.2	40.3 ef	8.9	22.1	0.407	
	1.1	1.6	219.9 e	73.1	33.2	0.887	5.5	2.0	88.4 def	22.1	25.1	0.355	1.2	0.8	47.7 ef	12.3	25.7	0.321	
	0.7	0.8	234.3 e	88.6	37.8	0.698	2.7	1.7	96.0 def	26.6	27.7	0.380	0.6		53.3 f	16.0	30.0	0.416	
							1.3	0.9	123.1 ef	37.6	30.6	0.389							
							0.7	0.7	155.5 f	53.8	34.6	0.334							
5	245.4	31.3	134.9 a	20.6	15.3	0.742	235.5	31.3	80.5 a	11.4	14.2	-0.747	234.0	47.4	36.5 a	2.5	6.9	-0.378	
	152.7	22.4	156.9 ab	26.5	16.9	0.716	165.3	19.2	90.4 ab	13.8	15.2	0.457	160.3	8.3	38.3 a	2.8	7.2	0.265	
	87.2	12.1	165.8 abc	30.6	18.4	0.910	95.3	11.2	92.9 ab	15.7	16.9	0.268	131.9	12.0	39.3 ab	3.1	7.9	1.559	
	48.2	7.0	185.2 bcd	41.3	22.3	0.174	69.4	7.3	100.8 abc	19.6	19.5	0.828	80.3	80.3	42.0 ab	3.3	7.9	0.378	
	25.4	5.2	200.0 bcde	49.0	24.5	0.314	51.5	5.2	111.9 abcd	24.3	21.7	1.130	71.9	8.8	45.0 abc	3.9	8.6	2.101	
	14.6	4.1	214.4 cde	56.9	26.6	0.714	25.3	4.8	131.6 bcde	31.0	23.6	0.754	43.9	43.9	45.4 abcd	5.3	11.7	2.175	
	6.5	3.2	228.7 de	65.9	28.8	0.738	13.1	2.3	142.7 cdef	36.1	25.3	0.755	30.3	5.4	48.7bcde	7.1	14.6	1.508	
	4.1	2.6	245.7 de	78.2	31.8	0.982	7.4	1.8	153.0 defg	42.5	27.8	0.385	21.3	4.3	55.9 cde	11.0	19.6	1.743	
	2.8	2.2	265.0 e	89.9	33.9	0.684	3.1	1.4	160.9 efg	50.4	31.3	0.430	9.1	2.3	59.7 def	13.8	23.1	1.198	
	1.4	1.9	293.8 e	109.2	37.2	0.782	1.5	1.0	176.9 fg	59.9	33.9	0.720	4.4	1.8	68.7 ef	17.6	25.6	1.232	
	0.7	0.6	304.3 e	124.3	40.9	0.895	0.8	0.7	212.5 g	80.1	37.7	0.952	1.2	1.0	84.6 f	24.1	28.5	1.282	
													0.8	0.6	91.6 f	31.1	34.0	1.303	

<sup>a</sup>. Standard deviation, <sup>b</sup>. Lag phase coefficient of variation ( $Sd*100/\text{mean}$ ).

Average cell per sample come from 20 direct plate counts. Average lag phases come from at least 100 data.

**Table 3.** Effect of inoculum size, heat shock intensity and growth temperature on lag phase duration and variability of *Listeria innocua* in TSB. Lag phase durations marked with different superscript letters in the same square show significant differences ( $\alpha < 0.05$ ) in their distributions, based on the permutation test.



**Figure 1.** Lag phase distributions of micropopulations of *Listeria innocua* grown in TSB at different temperatures after heat treatment at 54 °C to give 0, 3 and 5 log reductions.

To integrate the effects of heat shock intensity, growth temperature and inoculum size on the population lag phase and on its variability, polynomial models were generated (eq. 2). The coefficients are shown in Table 4. Parameters with coefficient *p*-values higher than 0.05 were not considered in the model.

**Table 4.** Polynomial coefficients to model the lag phase duration and its *Sd* for *Listeria innocua* in TSB, based on the eq. (2). The corresponding coefficients of determination ( $R^2$ ) and root mean square error are shown.

Polynomial Coefficients	Average lag phase	<i>SE</i>	<i>p</i> -value	<i>Sd</i>	<i>SE</i>	<i>p</i> -value
$a_0$	6.2733	0.0879	<0.05	4.1961	0.1760	<0.05
$a_1$	-0.1411	0.0156	<0.05	0.0039	0.0312	0.90
$a_2$	-0.0021	0.0147	0.89	0.0921	0.0295	<0.05
$a_3$	-0.3941	0.0367	<0.05	-0.4443	0.0735	<0.05
$a_{12}$	0.0109	0.0008	<0.05	0.0095	0.0016	<0.05
$a_{13}$	0.0021	0.0021	0.33	-0.0284	0.0042	<0.05
$a_{23}$	0.0041	0.0037	0.28	0.0111	0.0075	0.14
$a_{11}$	-0.0027	0.0007	<0.05	-0.0095	0.0013	<0.05
$a_{22}$	0.0098	0.0022	<0.05	0.0102	0.0044	<0.05
$a_{33}$	0.0044	0.0111	0.69	-0.0558	0.0223	<0.05
$R^2$		0.99			0.99	
RMSE		9.11			2.98	

$\alpha = 0.05$

*SE*. Standard error, *Sd*. Standard deviation

RMSE. Root Mean Square Error

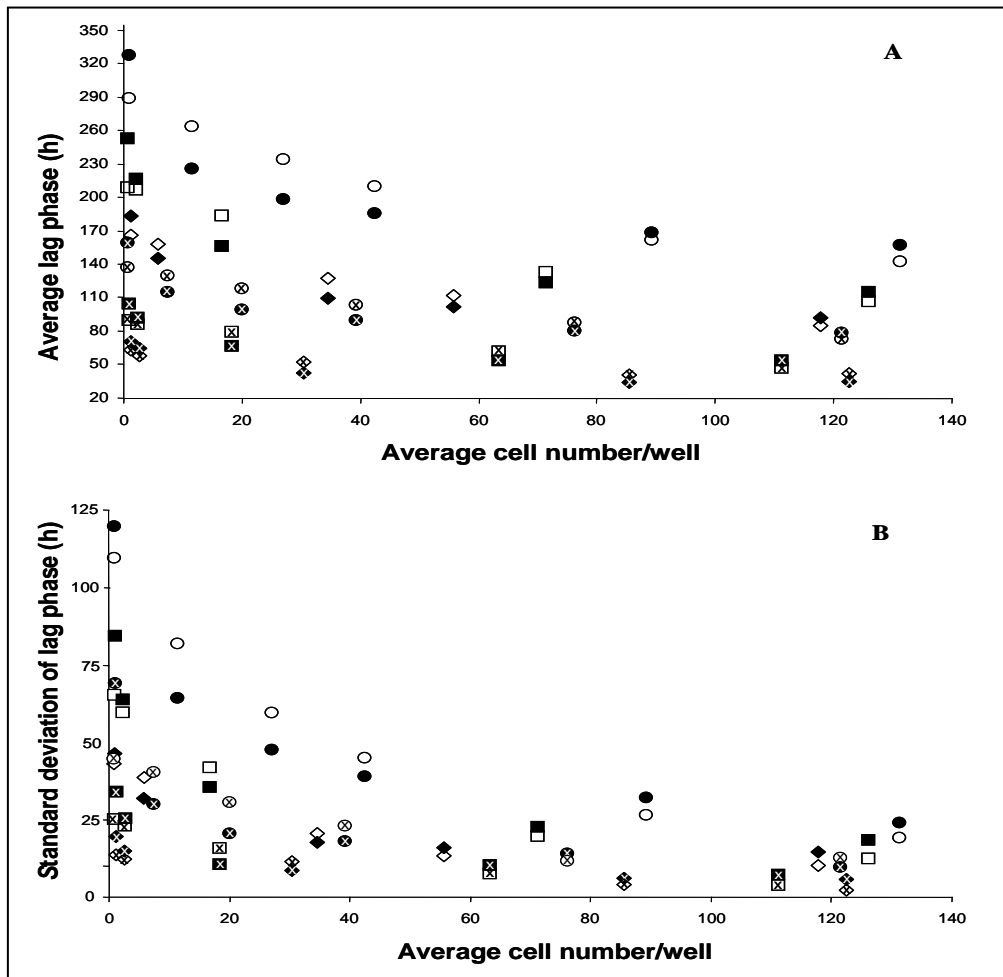
### 3.3. Model validation

To validate the models generated, their predictions were compared with experimental lag phase data of *L. innocua* in milk. Comparison of the observed and predicted average lag phases (Figure 2-A) and *Sds* (Figure 2-B) under the conditions described in Table 1 shows that the predictions of both models showed good agreement with observations, although the predicted lag phase was generally slightly shorter than observed. *Af* was 1.109 for the average lag phase and 1.136 for *Sd*; *Bf* was 0.990 for the average lag phase and 1.028 for *Sd*.

### 3.4. Application of the models

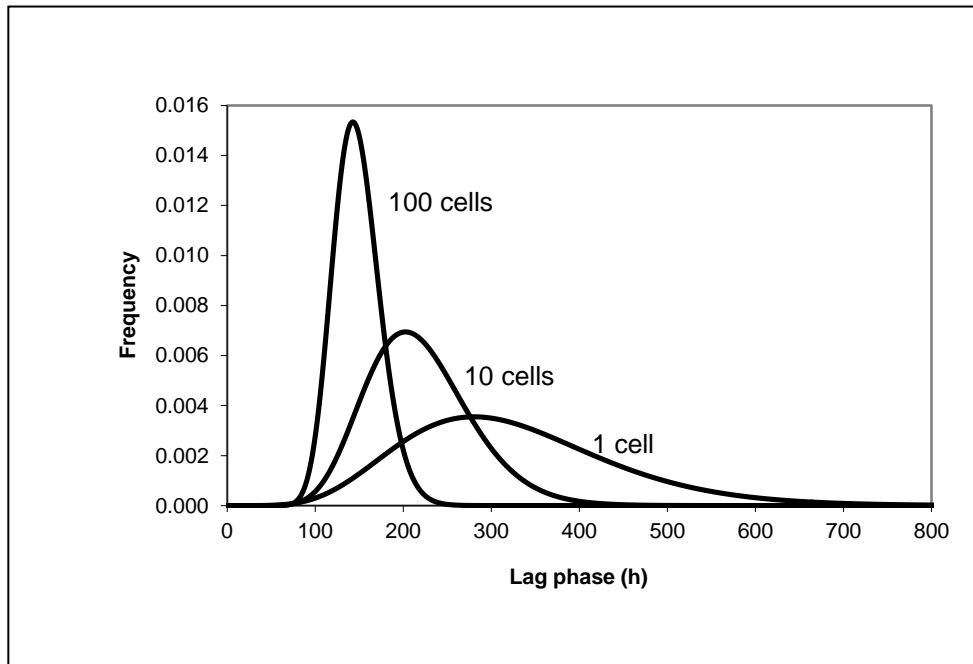
The models predict the lag phase and *Sd* (Table 4). Both parameters were estimated for each heat treatment, growth temperature and inoculum size, then these parameters were used to simulate the lag phase distributions after assuming that lag phases fit a gamma distribution (Baranyi and Pin, 2001). Simulations were performed by applying eq. 5 to several inoculum sizes containing *L. innocua* micropopulations that survived 5 logarithmic reductions and were grown at 7 °C. Predicted rates were 0.023, 0.062 and 0.212 for 1, 10 and 100 cells, respectively, while the corresponding shapes were 7.39, 13.59 and 31.28. The larger the inoculum is, the larger are the rate and shape

and, as expected, the narrower is the lag phase distribution (Fig. 3). The difference between the broad dispersion in the predicted lag phases of individual cells and the relatively narrow distribution of lag phases for a population of 100 cells is remarkable.

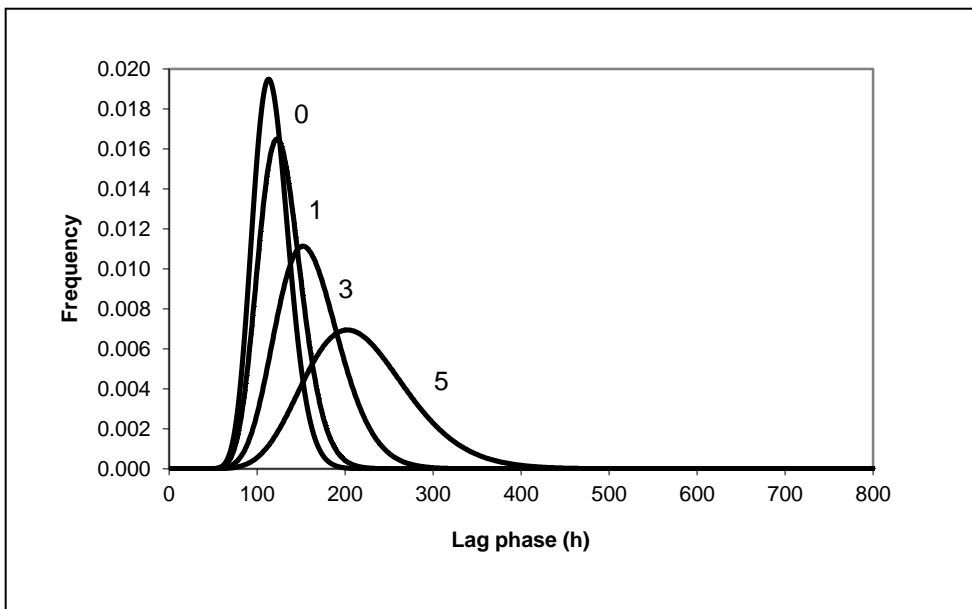


**Figure 2.** Validation of a model to predict the average lag phase and its variability in *Listeria innocua* growing in whole milk. Predicted lag phase (solid symbols) and observed lag phase (empty symbols) are given for different inoculum sizes (A), together with the standard deviation of the lag phase (B). Cultures were treated at 54 °C to give decimal reductions of 1 (diamonds), 3 (squares) or 5 (circles), and then incubated at 7 °C (symbols without x) or 12 °C (symbols with x).

Our model may also be applied to predict lag phase distributions for a given number of survivors after different heat treatments. Figure 4 is an example of such predictions and shows the frequency distribution of lag phases of 10 viable cells after heat treatments inactivating 0, 90, 99.9 and 99.999% of the initial population. The corresponding rates are 0.271, 0.211, 0.119 and 0.062; the shapes are 31.68, 26.83, 19.16 and 13.59. The more intense the inactivating treatment is, the smaller are the rate and shape, yielding a wider distribution.



**Figure 3.** Frequency distribution of lag phases simulated by applying the eq. (5). Rate and shape were calculated with eqs. (6) and (7), where mean and *Sd* were predicted by the models described in Table 4. In this simulation, *Listeria innocua* cultures of different inoculum sizes (1, 10, 100 cells) were subjected to 5 logarithmic reductions using heat treatment, then incubated at 7 °C.

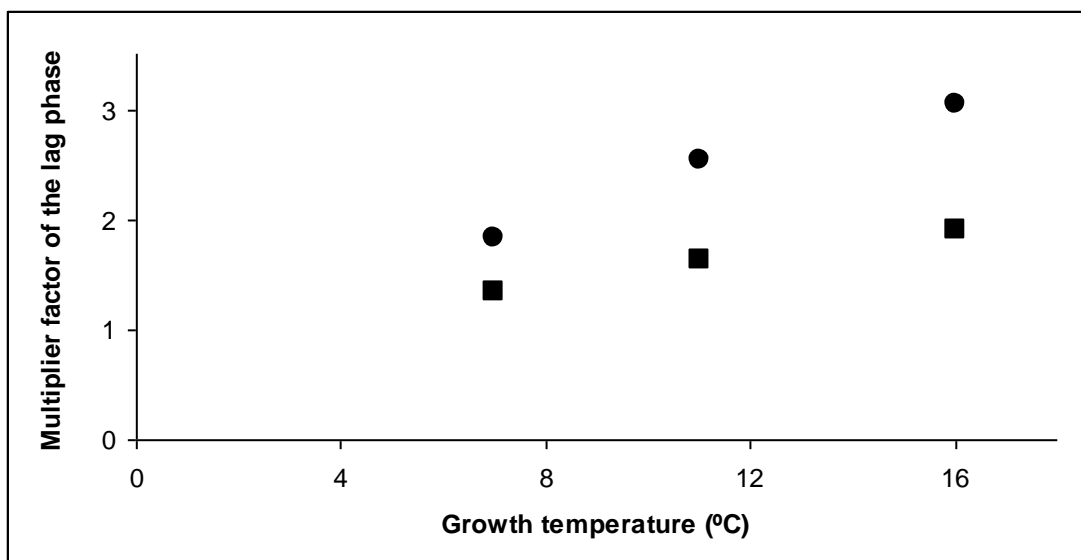


**Figure 4.** Frequency distribution of lag phases simulated by applying the eq. (5). Rate and shape were calculated with eqs. (6) and (7), where mean and *Sd* were predicted by the models described in Table 4. Effect of heat stress (numbers beside the curves show the decimal reduction achieved) on the lag time distribution of *Listeria innocua* (10 cells) at 7°C.

#### 4. Discussion

In this work, models have been developed to describe the effect of inoculum size, heat shock intensity and growth temperature on the lag phase of *L. innocua* and its variability.

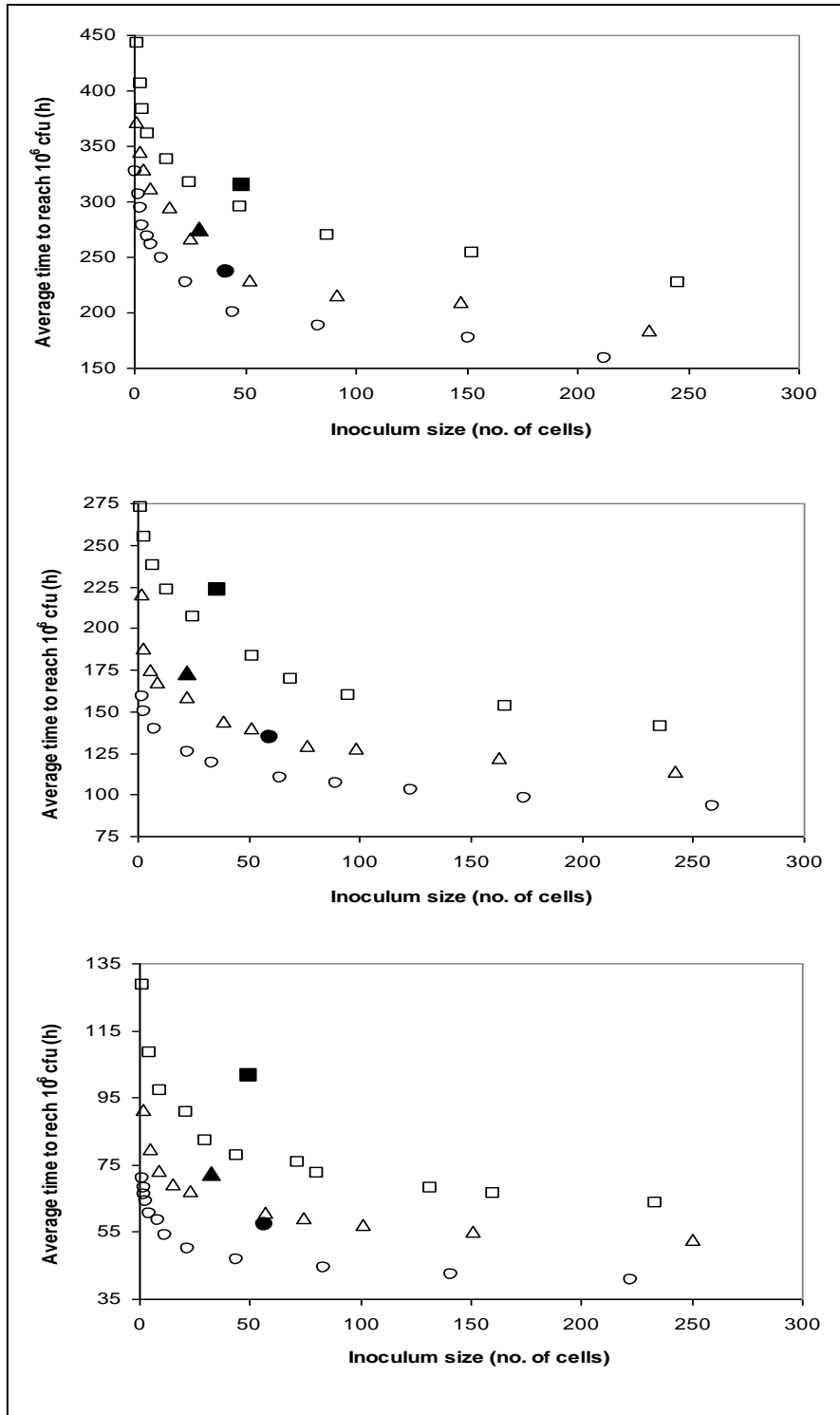
The data in Table 3 provide insight into which parameters exert greater influence on the micropopulation lag phase and its variability. As expected, the higher the incubation temperature is, the shorter and less variable is the lag phase. The more intense the heat treatment is, the longer and more variable is the survivor lag phase, since repair of sublethal injury requires biosynthesis to restore lost components, which introduces a delay before cell division is possible and leads to different recovery times depending on how damaged the cells are. Similar to the effect of heat treatment, the smaller the inoculum is, the longer and more variable is the lag phase. Close analysis of the data reveals that these three variables interact to influence the lag phase. Nevertheless, the parameter with the greatest effect on the lag phase duration is the growth temperature, since in the narrow interval from 7 to 16 °C examined here, the lag phase of unstressed cells grown at 16 °C was less than 25% of the lag at 7 °C (Table 3). In fact, the higher the growth temperature is, the more the lag phase lengthens as a consequence of heat treatment (Figure 5).



**Figure 5.** Effect of heat stress intensity on the lag phase of surviving *Listeria innocua* grown in TSB. Cultures subjected to a 3D treatment are shown as squares; cultures subjected to 5D treatment, as circles. Comparisons are shown between heat-treated and untreated cultures of the same inoculum size grown at the same temperature.

These findings indicate that the lag phases of organisms that survive heat treatments and are then maintained under refrigeration, which is common in the industrial preparation of many foods, are actually quite long. Even so, a drop in the storage temperature will not affect the lag phase duration as dramatically as it does the specific growth rate: the value of  $\mu_{max}$  falls by approximately 50% when the growth temperature falls by 3-4 °C in the interval between 0 and 10 °C, as reported by studies of *Listeria monocytogenes* and *innocua* growth in broth and foods (Combase, 2011).

In contrast to the situation with lag phase duration, the parameter with the greatest effect on lag phase variability is inoculum size (Table 3). Pin and Baranyi (2006) simulated the growth of populations containing 1, 2, 4, 8, 16 and 100 cells based on the lag phases of individual cells observed by Elfwing et al. (2004) and concluded that growth curves initiated with few cells showed longer lag times than those initiated with more cells. They also found that lag time variances were greater at small inoculum sizes. This has been called the stochastic effect (Baranyi, 2002), since it is due to a statistical effect arising from the lag phase variability of individual cells. Our experimental data confirm these simulations of the stochastic effect and the statements of Pin and Baranyi (2006), who observed that the effect of inoculum size on lag time can be observed with small inocula, although this assertion should be treated with caution, because the threshold number of cells needed to detect an effect of inoculum size on lag phase duration depends on the distribution of single-cell lag times and any factor that affects this distribution. Indeed, differences in lag time duration have been reported for relatively large inocula when cells were severely stressed by starvation (Augustin et al., 2000; Gay et al., 1996) or heating (Stephens et al., 1997), or when the growth conditions were very close to the growth/no growth boundary (Pascual et al., 2001; Robinson et al., 2001), since the lag phase distribution of individual cells shows considerable spread under these conditions. In contrast to these findings, Robinson et al. (2001) observed that under optimal conditions, lag times of uninjured *L. monocytogenes* grown at 37 °C were little affected by inoculum size and there was little variation between replicate inocula even at very low cell numbers, but the inclusion of 1.2 M NaCl in the growth medium triggered an influence of inoculum size on lag phase duration. Our data with unstressed cells showed an effect of inoculum size on lag phase at a growth temperature of 16 °C. These differences indicate that any deviation from optimal growth conditions may affect lag phase duration and its variability.



**Figure 6.** Comparison of times required for micropopulations with different inocula (empty symbols) to reach  $10^6$  cells with those times predicted by a simulation (solid symbols) of a population formed by cells, which lag phases have been used to build individual cell distributions (average number of cells per sample lesser than 1, Table 3) at 7°C (A), 11°C (B) and 16°C (C) for untreated cells (squares), heat treated to decline the population in 3 log reductions (triangles) and 5 log reductions (circles). Growth specific rates are assumed to be constant ( $0.09$ ,  $0.14$  and  $0.31 \text{ h}^{-1}$  for 7, 11 and 16°C, respectively).

The effect of inoculum size on lag phase duration and its variability may be a purely stochastic process. However, it may also have a physiological basis, for example in cell-cell interactions that affect bacterial growth, as proposed by Kaprelyants and Kell (1996). That study found that prokaryotes communicate with each other using signaling molecules, many of which were found to stimulate bacterial growth. According to Mukamolova et al. (2002), the social behavior of cells is important for many different cellular processes associated with multiplication, differentiation, survival in changing environments and death. For example, acylated homoserine lactones have been shown to shorten the lag phase of *Nitrosomonas europaea* in biofilms in a concentration-dependent manner (Batchelor et al., 1997), suggesting that these signaling molecules are responsible for a cooperative effect among cells. In order to determine whether the effect of inoculum size on lag phase in our study has only a stochastic component or also includes a physiological one, we simulated the growth of a population of cells with known lag phases (average number of cells per sample < 1, Table 3) and a constant  $\mu_{max}$  from Table 2. Likewise, the growth of micropopulations with inocula > 1 cell was simulated based on the lag phases in Table 3 and the same  $\mu_{max}$ . The predicted times for micropopulations of all inoculum sizes to reach  $10^6$  cells were longer than the observed times (Figure 6). This suggests that the effect of inoculum size on the lag phase cannot be attributed solely to a stochastic process; instead, the presence of other cells, even in very low numbers, seems to shorten the micropopulation lag phase.

In our study, micropopulation lag phases were found to correlate negatively with inoculum size and growth temperature and positively with heat shock intensity. This behavior is consistent with the idea that cell-cell interactions influence bacterial multiplication. Based on the scenario suggested by Kaprelyants and Kell (1996), the larger the cell population is, the more signal substance will be released and one cell will quickly receive enough signaling molecules to initiate growth. If, however, there are very few cells, they will need more time to synthesize and release an adequate number of signaling molecules to initiate multiplication. Furthermore, the ability of cell-cell interaction to reduce lag time will depend on cell concentration and the proximity of cells to one another. If a solid food contains a relatively small number of cells per gram, these cells may be completely isolated from each other, without any chance of

communication. As a consequence, their lag times may be much longer than those predicted by models based on inocula of “only” hundreds or thousands of cells per ml.

Thus, stochastic and cell-cell communication processes are not mutually exclusive but instead may work together to explain the effect of inoculum size on lag phase duration and variability. Future work is needed to explore this interplay since communication between bacterial cells is not well documented, and the complex intracellular processes that occur during the lag phase are poorly understood. In addition, any physiological explanation of lag phase duration and variability will need to take into account that a quorum-sensing effect seems unlikely at very low inoculum densities (Gnanou Besse et al., 2006). It may be that the relative contribution of stochastic and physiological processes to the lag phase changes with cell number, such that the stochastic effect predominates at low inoculum sizes.

Stephens et al. (1997) suggested another factor to explain lag phase variability. They showed that the variability in lag times of heat-injured cells is likely to be due to the fact that the cells were in different stages of the cell cycle when they were exposed to heat. Large cells at the end of the cell cycle are more heat-resistant than small cells that have just formed. This results in different lag phases for the cells surviving the heat treatment.

Baranyi and Roberts (1994) suggested that lag should be considered a consequence of both the present and past environments of the cells. They defined a parameter called the initial physiological state of the cells ( $\alpha_0$ ), a dimensionless number between 0 and 1 that quantifies the suitability of the current environment for the population (i.e. the history effect) (Baranyi and Pin, 2001).

$$\text{Ln}(\alpha_0) = - \text{Lag} / \mu_{max} \quad (9)$$

Rescaling this parameter to obtain the inverse of the physiological state led to a new parameter  $h_0$ , or the work to be done by the population to adapt to the new environment (Robinson et al., 1998):

$$h_0 = -\text{Ln}(\alpha_0) \quad (10)$$

This is equal to the product of the lag and the  $\mu_{max}$ . Several authors (Robinson et al., 1998; McKellar et al., 2002; Pin et al., 2002) have shown that  $h_0$  is constant for the same organism grown under the same conditions but at different temperatures, which

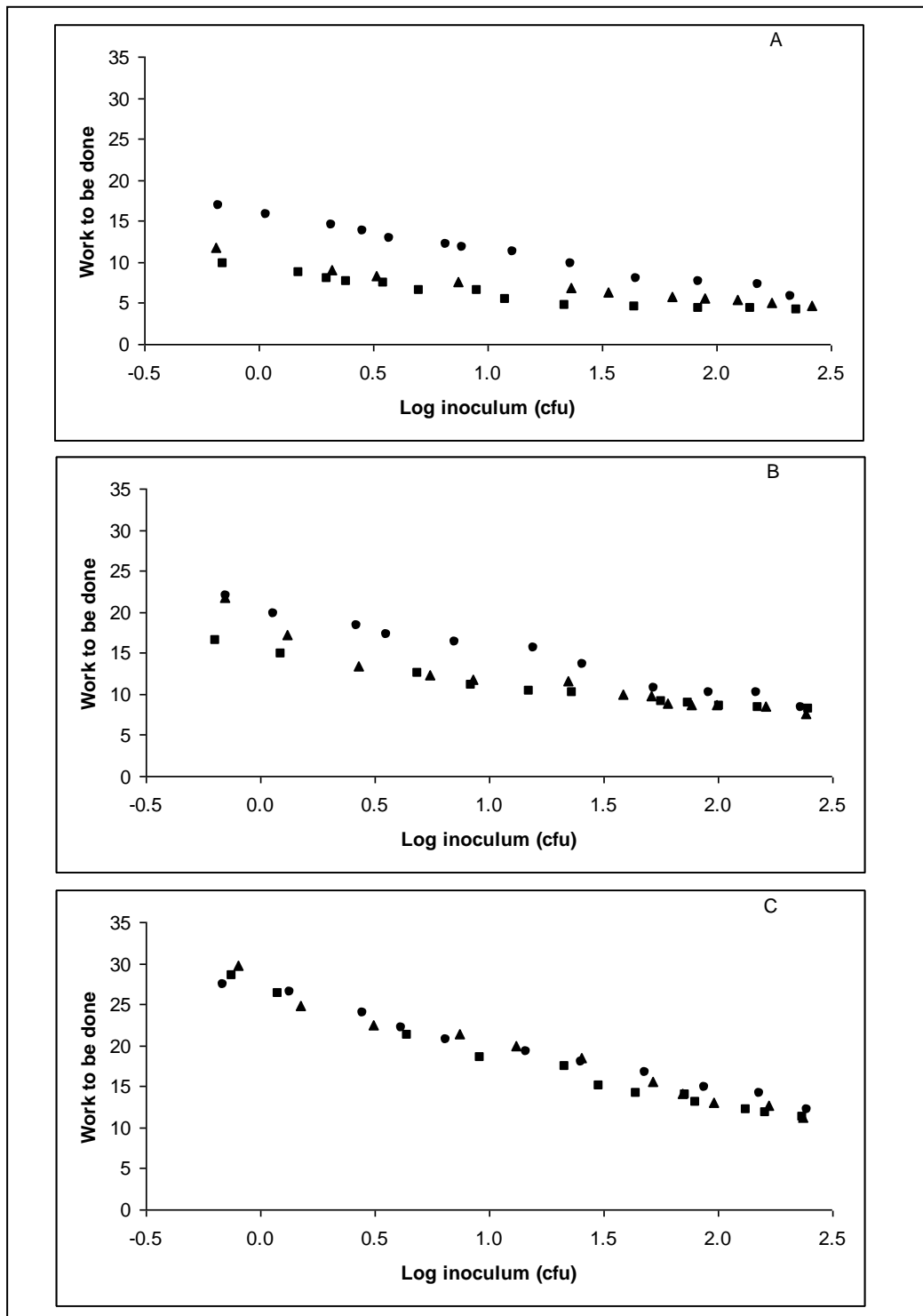
reflects the proportionality between the growth rate and the time spent by cells to adapt. As temperature decreases, a longer adaptation time is needed and the duplication is faster.

Equations (9) and (10) do not consider the inoculum size, which our results show to affect lag phase and consequently  $h_0$ . Figure 7 shows the effect of the inoculum size on the work to be done under our experimental conditions. The larger the inoculum is, the smaller is  $h_0$ , which is consistent with the idea that a physiological process contributes to lag phase duration and variability. Cells may interact each other and shorten the adaptation time to the new growth conditions. From the data of D'Arrigo et al. (2006) and Metris et al. (2008), the work to be done by *L. innocua* that survived heat treatments of different intensity was calculated and compared with data in Figure 7. In all cases, the same tendency was observed: the work to be done increases with the degree of the stress applied to cells. Surprisingly, however, the  $h_0$  of unheated cells depends on inoculum size and growth temperature (Fig. 6A), whereas that of the most stressed cells depends only on inoculum size (Fig. 6C).

The polynomial models in Table 4 estimate the lag phase and its variability as a function of growth temperature, the stress intensity (in terms of the average number of log reductions in the population), and the number of surviving cells initiating growth. The model predictions were compared with experimental lag phase data of *L. innocua* in milk (Figure 2). The  $Af$  [eq. (3)] indicates the spread of the observations around the model predictions: ideally the  $Af$  should be 1, but  $Af$  typically increases by 0.10-0.15 for every variable in the model (Ross et al., 2000). Therefore, a model that satisfactorily predicts the effect of three variables (growth temperature, heat treatment and inoculum size) on the microbial lag phase could be expected to have an  $Af$  of 1.3-1.5. Our validation trials produced an  $Af$  of 1.109 for lag duration and 1.136 for  $Sd$ , both of which are well below these limits.

A  $Bf$  [eq. (4)] for lag phase greater than 1 indicates that the model over-estimates lag phase values and is fail-safe, whereas a value less than 1 indicates that it is fail-dangerous (Jeyamkonda et al., 2001). The models described in the present study gave a  $Bf$  of 0.990 for lag duration and 1.028 for  $Sd$ , indicating that the average lag phase duration predicted will be shorter and more variable than the real one, meaning that they should be considered safe for risk assessment. Since our modelling approach shows

good fit to reality, it may significantly improve predictive tools for quantitative risk assessment.



**Figure 7.** Effect of inoculum size on the work to be done by cells to adapt to the present environment. Cells were left untreated (A) or heat-treated to produce a 3-log reduction (B) or 5-log reduction (C) at 7 °C (circles), 11 °C (triangles) and 16 °C (squares).

This sensitivity of lag phase to environmental factors highlights the usefulness of the models described in the present study. The data in Table 5 and the distributions in Figure 3 show that for cells that survive 5 log reductions due to heat treatment and are then incubated at 7 °C, the expected average lag phase for 1 cell is twice that of 100 cells, and the difference in the spread of the expected lag phase distribution is even more remarkable (Figure 3). These predictions may be useful for quantitative microbial risk assessment, when considered together with other sources of randomness, such as uncertainty, variability, consumption data, and dose-response. In this regard, the relative importance of the variability of inputs has recently been studied by Ellouze et al. (2011) and Busschaert et al. (2011).

In conclusion, the effect of inoculum size, stress and growth conditions of survivors on the lag phase of *L. innocua* and its variability depend on a complex set of interactions. Factors that appear to modulate this effect include the physiological state of the cell, level of stress applied, and growth temperature. It is important to understand how these interactions affect the lag phase in order to predict and control microbial growth in food. The population size of a pathogen in food depends on its initial concentration, as well as on many other factors. Consequently, when performing quantitative microbial risk assessment studies, it is important to take into account the initial contamination level, not only because this number is important in itself, but because it significantly affects the lag phase duration and its variability.

## **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the support of the Program Consolider CARNISENUSA CSD2007-0016 and AGL-2010-16598 of the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). We thank Armando Chapin Rodríguez, PhD for his assistance with manuscript writing.

## References.

- Aguirre, J.S., Bravo, M.C., Ordoñez, J.A., Garcia de Fernando, G.D. 2012a. The Poisson distribution is applied to improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. *Advances in Microbiology*, 2, 146-161.
- Aguirre, J.S., Ordoñez, J.A., Garcia de Fernando, G.D., 2012b. A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of *Bacillus cereus* inactivation and lag phase duration of surviving cells. *International Journal of Food Microbiology* 153, 444–452.
- Aguirre, J.S., Pin, C., Rodriguez, M.R., García de Fernando, G.D., 2009. Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6992-6997.
- Aguirre, J.S., Rodriguez, M.R., Garcia de Fernando, G.D., 2011. 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* 149, 236-246.
- Augustin, J.C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V., 2000. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1706-1710.
- Baranyi, J., 1998. Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. *Journal of Theoretical Biology* 192, 403-408.
- Baranyi, J., 2002. Stochastic modelling of bacterial lag phase. *International Journal of Food Microbiology* 73, 203-206.
- Baranyi, J., George, S.M., Kotalik, Z., 2009. Parameter estimation for the distribution of single cell lag times. *Journal of Theoretical Biology*, 259 (1), 24-30.
- Baranyi, J., Pin, C., 1999. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 732-736.
- Baranyi, J., Pin, C., 2001. A parallel study on bacterial growth and inactivation. *Journal of Theoretical Biology* 210, 327-336.
- Baranyi, J. Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (3-4), 277-94.
- Batchelor, S.E., Cooper, M., Chhabra, S.R., Glover, L.A., Stewart, G.S., Williams, P., Prosser, J.I., 1997. Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2281-2286.
- Black, E.P., Linton, M., McCall, R.D., Curran, W., Fitzgerald, G.F., Kelly, A.L., Patterson, M.F., 2008. The combined effects of high pressure and nisin on germination and inactivation of *Bacillus* spores in milk. *Journal of Applied Microbiology* 105, 78-87.
- Brouillaud-Delattre, A., Maire, M., Collette, C., Mattei, C., Lahellec, C., 1997. Predictive microbiology of dairy products: influence of biological factors affecting growth of *Listeria monocytogenes*. *J AOAC Int* 80, 913-919.
- Busschaert, P., Geeraerd, A.H., Uyttendaele, M., Van Impe, J.F., 2011. Sensitivity analysis of a two-dimensional quantitative microbiological risk assessment: keeping variability and uncertainty separated. *Risk Analysis* 31(8), 1295-1307
- Combase. 2011. <http://www.combase.cc/index.php/en/combase-browser>.
- D'Arrigo, M., Garcia de Fernando, G.D., Velasco de Diego, R., Ordonez, J.A., George, S.M., Pin, C., 2006. Indirect measurement of the lag time distribution of single cells of *Listeria innocua* in food. *Applied and Environmental Microbiology* 72(4), 2533-2538.
- Duffy, G., Sheridan, J.J., Buchanan, R.L., McDowell, D.A., Blair, I.S., 1994. The effect of aeration, initial inoculum and meat microflora on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in selective enrichment broths. *Food Microbiology* 11, 429- 438.
- Elfving, A., LeMarc, Y., Baranyi, J., Ballagi, A., 2004. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 675-678.

- Ellouze, M., Gauchi, J.P., Augustin, J.C., 2011. Use of global sensitivity analysis in quantitative microbial risk assessment: application to the evaluation of a biological time temperature integrator as a quality and safety indicator for cold smoked salmon. *Food Microbiology* 28 (4), 755-769.
- Francois, K., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Nadal, P., Van Impe, J.F., Debevere, J., 2006. Single cell variability of *Listeria monocytogenes* grown on liver pate and cooked ham at 7 degrees C: comparing challenge test data to predictive simulations. *Journal of Applied Microbiology* 100, 800-812.
- Gay, M., Cerf, O., Davey, K.R., 1996. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* at 14 degrees C. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 433-438.
- Gnanou Besse, N., Audinet, N., Barre, L., Cauquil, A., Cornu, M., Colin, P., 2006. Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structured media. *International Journal of Food Microbiology* 110, 43-51.
- Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.C., 2005. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2940-2948.
- Jason, A.C., 1983. A deterministic model for monophasic growth of batch cultures of bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 49, 513-536.
- Jeyamkonda, S., Jaya, D.S., Holle, R.A., 2001. Microbial growth modelling with artificial neural networks. *International Journal of Food Microbiology* 64, 343-354.
- Jongenburger, I., Reij, M.W., Boer, E.P., Gorris, L.G., Zwietering, M.H., 2010. Factors influencing the accuracy of the plating method used to enumerate low numbers of viable micro-organisms in food. *International Journal of Food Microbiology* 143, 32-40.
- Juneja, V.K., Marks, H.M., 2006. Growth kinetics of *Salmonella spp.* pre- and post-thermal treatment. *International Journal of Food Microbiology* 109, 54-59.
- Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., 1996. Do bacteria need to communicate with each other for growth? *Trends in Microbiology* 4, 237-242.
- Kaprelyants, A.S., Mukamolova, G.V., Korner, S.S., Weichart, D.H., Young, M., Kell, D.B., 1999. Intracellular signalling and the multiplication of prokaryotes: bacterial cytokines. *Symposia of the Society for General Microbiology* 57, 33-69.
- Koutsoumanis, K., 2008. A study on the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behavior of microbial populations. *International Journal of Food Microbiology* 128, 116-121.
- Li, Y., Odumeru, J.A., Griffiths, M., McKellar, R.C., 2006. Effect of environmental stresses on the mean and distribution of individual cell lag times of *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 110, 278-285.
- Lianou, A., Koutsoumanis, K.P., 2011. Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food Microbiology* 28, 828-837.
- Mackey, B.M., Kerridge, A.L., 1988. The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of salmonellae in minced beef. *International Journal of Food Microbiology* 6, 57-65.
- McKellar, R.C., Knight, K., 2000. A combined discrete-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 54, 171-180.
- McKellar, R.C., Lu, X., Knight, K.P., 2002. Growth pH does not affect the initial physiological state parameter ( $p_0$ ) of *Listeria monocytogenes* cells. *International Journal of Food Microbiology* 73(2-3), 137-144.
- Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D., Dalgaard, P., 2010. Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* - An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. *International Journal of Food Microbiology* 141, 137-150.
- Metris, A., George, S.M., Peck, M.W., Baranyi, J., 2003. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal of Microbiological Methods* 55, 821-827.

- Metris, A., Le Marc, Y., Elfwing, A., Ballagi, A., Baranyi, J., 2005. Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 100, 13-19.
- Metris, A., George, S.M., Mackey, B.M., Baranyi, J., 2008. Modeling the variability of single-cell lag times for *Listeria innocua* populations after sublethal and lethal heat treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (22), 6949-6955
- Mukamolova, G.V., Kaprelyants, A.S., Young, D.I., Young, M., Kell, D.B., 1998. A bacterial cytokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8916-8921.
- Mukamolova, G.V., Turapov, O.A., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., Young, M., 2002. The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Molecular Microbiology* 46, 611-621.
- Pascual, C., Robinson, T.P., Ocio, M.J., Aboaba, O.O., Mackey, B.M., 2001. The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. *Letters in Applied Microbiology* 33, 357-361.
- Pin, C., Baranyi, J., 2006. Kinetics of single cells: observation and modeling of a stochastic process. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2163-2169.
- Pin, C., Garcia de Fernando, G., Ordonez, J.A., Baranyi, J., 2002. Analysing the lag-growth rate relationship of *Yersinia enterocolitica*. *International Journal of Food Microbiology* 73 (2-3), 197-201.
- Pin, C., Sutherland, J.P., Baranyi, J., 1999. Validating predictive models of food spoilage organisms. *Journal of Applied Microbiology* 87, 491-499.
- Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J., Mackey, B.M., 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 70, 163-173.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M., 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 44 (1-2), 83-92.
- Ross, T., 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 501-508.
- Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S., 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* 62, 231-245.
- Smelt, J.P., Bos, A.P., Kort, R., Brul, S., 2008. Modelling the effect of sub(lethal) heat treatment of *Bacillus subtilis* spores on germination rate and outgrowth to exponentially growing vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* 128, 34-40.
- Stephens, P.J., Joynson, J.A., Davies, K.W., Holbrook, R., Lappin-Scott, H.M., Humphrey, T.J., 1997. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *Journal of Applied Microbiology* 83, 445-455.
- Stringer, S.C., Webb, M.D., Peck, M.W., 2011. Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. *Food Microbiology* 28, 228-235.
- Zhu, M.J., Mendonca, A., Ismail, H.A., Ahn, D.U., 2008. Effects of irradiation on survival and growth of *Listeria monocytogenes* and natural microflora in vacuum-packaged turkey hams and breast rolls. *Poultry Science* 87, 2140-2145.

## **V. DISCUSIÓN GENERAL**

---



## V. DISCUSIÓN GENERAL

Los próximos párrafos no quieren ser repetitivos. No pretenden reincidir en las afirmaciones y especulaciones vertidas en los artículos que han formado el cuerpo de los resultados de esta tesis, por lo que el lector puede echar de menos muchas reflexiones y disquisiciones que expliquen y discutan las posibles causas de la variabilidad. Esta discusión va a ceñirse a la parte más práctica de la variabilidad, una faceta que ha quedado algo diluida, quizás olvidada, en los trabajos publicados. ¿Qué consecuencias tiene y cómo puede aprovecharse la industria alimentaria de los modelos que la predicen? Es de esperar que se encuentren respuestas a esas preguntas al finalizar la lectura de esta tesis.

Que la Biología no es una ciencia exacta es incuestionable, pero en muchas ocasiones los científicos tienden a olvidarse de ello. El comportamiento microbiano es variable, pero, afortunadamente, ni voluble ni caprichoso. El control de calidad de la industria necesita saber las probabilidades reales de supervivencia de un microorganismo determinado en unas condiciones concretas y esto solo se consigue si se conoce la variabilidad del comportamiento de esa bacteria en un entorno y condiciones particulares. Lo mismo cabe decir de la fase de latencia. ¿Qué probabilidad hay de que la fase de latencia del o los supervivientes a un tratamiento de conservación sea larga o corta? La vida útil del alimento depende de ella; su salubridad también.

La piedra angular de esta tesis es la cuantificación de la variabilidad del comportamiento microbiano, desde un punto de vista matemático, en dos aspectos fundamentales para la industria alimentaria, la inactivación microbiana y la fase de latencia de microorganismos supervivientes a procesos inactivantes. La finalidad última es entender mejor la eficacia de los procesos de conservación de los productos alimenticios y contribuir con datos que, quizás, permitan mejorar la precisión de los modelos matemáticos predictivos del crecimiento microbiano.

La variabilidad de la inactivación microbiana es particularmente útil para los alimentos mínimamente procesados, en los que se busca una mayor preservación de sus atributos sensoriales y una menor pérdida del valor nutritivo mediante la aplicación de unas condiciones de procesado menos drásticas, con el consiguiente incremento del riesgo microbiológico. Si a un alimento tradicionalmente estéril, se le aplicase un tratamiento

menos drástico, será más probable que se mantenga viable algún microorganismo, aunque sea de forma esporádica. La supervivencia microbiana a cualquier tratamiento conservante no es constante. No todos los individuos de una población microbiana, incluso aunque hayan tenido un origen común, se comportan de la misma manera. Este hecho implica que el número de supervivientes a una determinada operación no sea tan constante como le gustaría a la industria alimentaria. La variabilidad de la resistencia microbiana a la inactivación puede conducir, en el caso de los productos que acabamos de comentar, a la asunción de unos riesgos sanitarios incompatibles con los objetivos de la seguridad alimentaria.

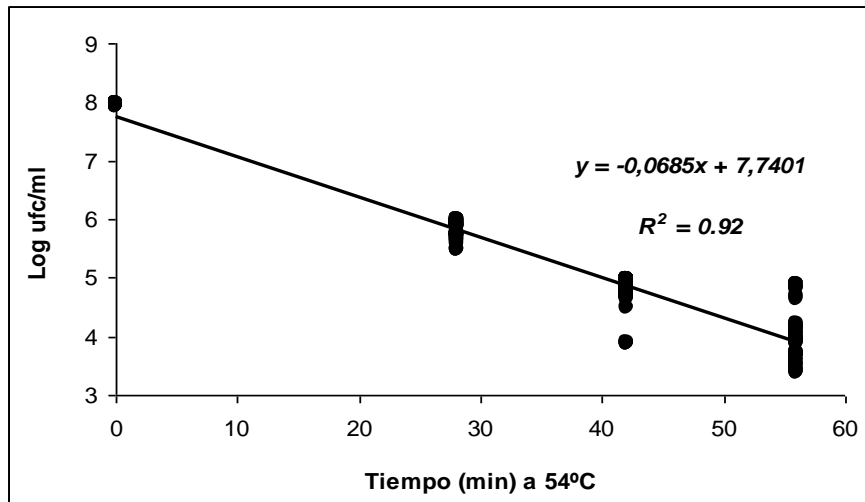
Así mismo, la variabilidad de la fase de latencia de células individualizadas, ya sean patógenas o no, supervivientes a los procesos de conservación de la industria alimentaria puede ser relevante, pues cabe la posibilidad de que tratamientos con la misma eficacia microbicida provoquen fases de latencia diferentes en los microorganismos supervivientes y viables. Este logro podría redundar en una aplicación práctica a corto plazo, ya que podría aprovecharse para alargar la vida útil de los alimentos y que estos fueran sanitariamente más seguros.

### **5.1. Análisis de la variabilidad de la inactivación**

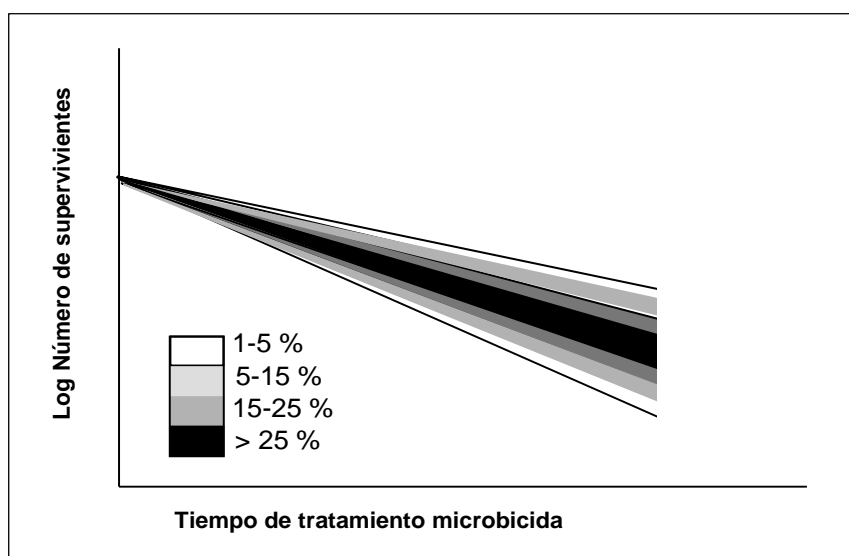
Gracias a los estudios experimentales realizados dentro de esta tesis se ha evidenciado que cuanto más intensos son los tratamientos conservantes aplicados, menor es el número de supervivientes, pero este número es más variable; es decir, existe una mayor dispersión de datos, con lo que las distribuciones de frecuencias se hacen más anchas, se aplanan. Las desviaciones estándar de los recuentos de los lotes control siempre fueron menores que las de los supervivientes a los tratamientos conservantes y, en éstos últimos, las desviaciones estándar aumentaban en la medida que se intensificaba el grado de inactivación microbiana. Este comportamiento se observó tanto en irradiación como en tratamientos térmicos.

Esta variabilidad es notable y la industria alimentaria debe considerarla detenidamente porque implica unas diferencias excesivas y, quizás, inadmisibles, en la posible carga inicial de un producto, con las lógicas consecuencias en su vida útil y su potencial peligrosidad. El análisis de riesgos microbiológicos debe contemplarla. Los incrementos de la variabilidad de la inactivación microbiana conforme se intensifican los

tratamientos higienizantes justifica la aplicación de tratamientos conservantes “sobredimensionados”, más intensos de los estrictamente necesarios, predichos por los valores  $D$  y  $z$ . Piénsese que el valor  $D$  a un determinada temperatura es una media que se ha obtenido con una serie de datos experimentales que, en realidad, se caracterizan por estar más o menos dispersos, dispersión que se cuantifica con la desviación estándar. Obsérvese la Figura 4 para una mejor comprensión del alcance práctico de tal variabilidad.



**Figura 4.** Inactivación de *Listeria innocua* en leche. En la figura aparecen cerca de 200 datos (10 para el control y algo más de 60 para cada uno de los tratamientos térmicos). Se muestra la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de determinación. El valor  $D$  es el valor absoluto del inverso de la pendiente de la ecuación mostrada.



**Figura 5.** Gráfica de inactivación de microorganismos considerando las distribuciones de frecuencias del número de supervivientes.

Para aplicar la variabilidad de la inactivación en la práctica deben utilizarse distribuciones de frecuencias en las que se refleje la probabilidad de que, tras aplicar un determinado tratamiento microbicida, se logre una inactivación determinada. En la Figura 5 se esquematiza una posible forma de presentación de tales distribuciones de frecuencia.

Ya se ha visto que conforme se intensifica el tratamiento microbicida, el número de supervivientes es menor, pero más variable. La cuantificación de tal variabilidad debe ofrecer el mismo resultado –o muy similar; considérese que el objeto de estudio es la variabilidad, por lo que sería un oxímoron si fuera *invariable*- siempre que haya supervivientes, pero tiene un límite práctico crítico, ya que al llegarse a la frontera entre presencia (uno o más supervivientes) y ausencia (ninguno) en las muestras (llámense envases en la industria alimentaria), la variabilidad cambia notablemente. Veamos un ejemplo que esclarezca esta afirmación. Se aplica un tratamiento microbicida a 50 muestras iguales y se obtienen los siguientes recuentos (ufc):

705	621	772	948	697
909	835	357	877	706
354	251	216	288	411
270	630	379	554	121
755	901	847	952	846
341	625	540	804	836
308	608	603	125	854
947	924	828	927	183
387	685	535	274	854
376	414	821	401	358

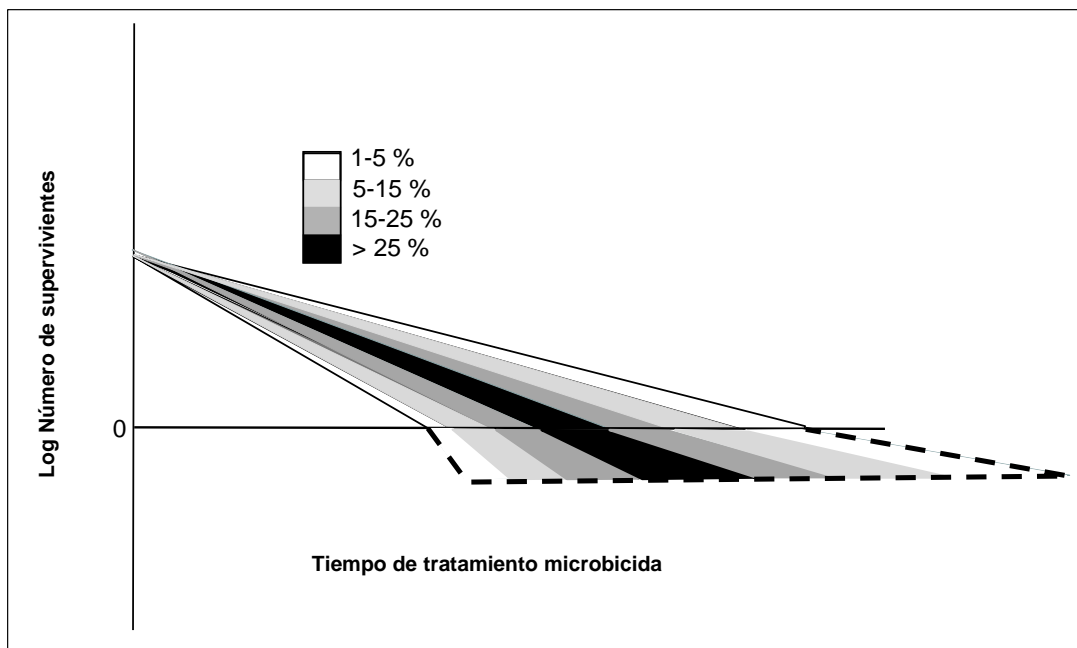
La media de esta distribución de datos es 595 supervivientes, su desviación estándar (*Sd*) 257 y su coeficiente de variación (desviación estándar multiplicada por 100 y dividido por la media) es de 43,2 %. Pero, si el tratamiento aplicado hubiere reducido 300 veces más la población, el número teórico de supervivientes (las cifras anteriores divididas por 300) hubiera sido:

2.4	2.1	2.6	3.2	2.3
3.0	2.8	1.2	2.9	2.4
1.2	0.8	0.7	1.0	1.4
0.9	2.1	1.3	1.8	0.4
2.5	3.0	2.8	3.2	2.8
1.1	2.1	1.8	2.7	2.8
1.0	2.0	2.0	0.4	2.8
3.2	3.1	2.8	3.1	0.6
1.3	2.3	1.8	0.9	2.8
1.3	1.4	2.7	1.3	1.2

cuya media y *Sd* son 1,98 y 0,86 respectivamente, valores que coinciden con la división de las media y *Sd* de la distribución primera por 300, mientras que el coeficiente de variación (*CV*) es, obviamente, idéntico al anterior. Pero, claro, no es posible que en una muestra pueda existir un número decimal de viables. Por lo que, en realidad, el número de supervivientes sería:

2	2	2	3	2
3	2	1	2	2
1	0	0	1	1
0	2	1	1	0
2	3	2	3	2
1	2	1	2	2
1	2	2	0	2
3	3	2	3	0
1	2	1	0	2
1	1	2	1	1

cuya media es 1,56, su *Sd* 0,91 y su *CV* ya no es igual a los anteriores; ahora es 58,2 %. En resumen, la cuantificación de la variabilidad se mantiene constante, o al menos dentro de unos valores muy similares, hasta que deja de haber viables en un porcentaje de muestras, por lo que no pueden extrapolarse libremente datos de variabilidad de inactivación a casos de ausencia / presencia, ya que las predicciones en este caso habrán de ajustarse a una *Sd* algo mayor, es decir, la variabilidad, desgraciadamente, se incrementa. La consecuencia práctica de este hecho es obvia. Si se ha modelado la inactivación microbiana con muestras en las que siempre existen viables y se ha considerado la variabilidad, las distribuciones del número de supervivientes que pueden predecir tales modelos con verosimilitud siempre deben contemplar supervivientes. Por tanto, si quiere irse más allá y modelar las condiciones de tratamiento, a partir de una carga inicial determinada y conocida, para que permanezca activo -de media- solo un microorganismo en, pongamos por caso, cada diez envases (número medio de supervivientes de 0,1 por envase), será necesario recabar datos en esas condiciones para poder determinar las distribuciones de frecuencias del número de muestras con supervivientes y, tras modelar la variabilidad de la distribución, poder predecir las probabilidades de que, tras un determinado tratamiento microbicida, exista una determinada proporción de envases con microorganismos activos. La Figura 6 trata de mostrar estos hechos de forma esquemática. Obsérvese que por debajo de 1 superviviente ( $\log_{10} 1 = 0$ ), las distribuciones se abren, indicando una mayor variabilidad.

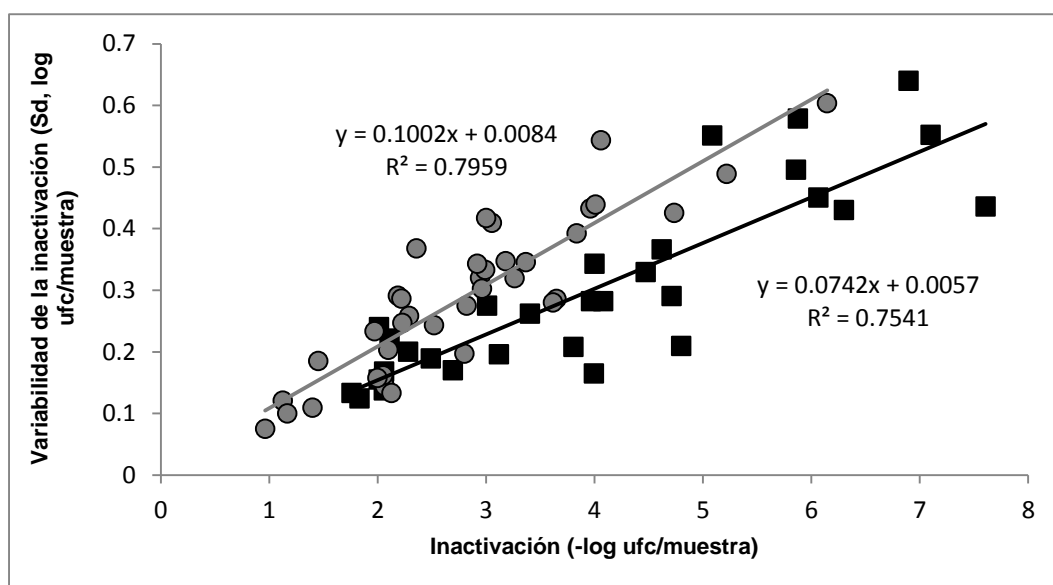


**Figura 6.** Gráfica de inactivación de microorganismos considerando las distribuciones de frecuencias del número de supervivientes en muestras con viables (por encima del eje de abscisas) y en muestras con y sin viables (por debajo del eje).

Lo suscrito en el párrafo anterior significa, a nivel práctico, que si tenemos  $10^6$  viables por envase y aplicamos un tratamiento  $7D$ , de media quedaría 1 viable por cada diez envases, pero en realidad, si consideramos cientos o miles de envases y escogemos al azar varios “minilotes” de 10 envases habrá bastantes de esos lotes sin ningún microorganismo, muchos con 1, menos con 2, aún menos con 3 y más esporádicos serían los lotes con 4 viables. Por mera lógica, cuantos más envases se muestrearan de una sola vez, más nos acercaríamos a la proporción de 1/10.

Los modelos que se preocupan de la variabilidad convierten esos adverbios (bastantes, muchos, menos, etc.) en cifras y ofrecen a la industria la posibilidad de ostentar un mejor control de los tratamientos a aplicar para alcanzar los objetivos de seguridad alimentaria que persigan. Debe tenerse en cuenta que el número de supervivientes y, sobre todo, la ausencia/presencia de ciertos patógenos determinan la categorización de los productos y el rechazo/aceptación de los lotes para su comercialización. Es imprescindible conocer cómo varía el número de supervivientes en función de la intensidad de los tratamientos aplicados para controlar metódicamente los procesos y comprender los recuentos de la carga microbiana de cualquier producto.

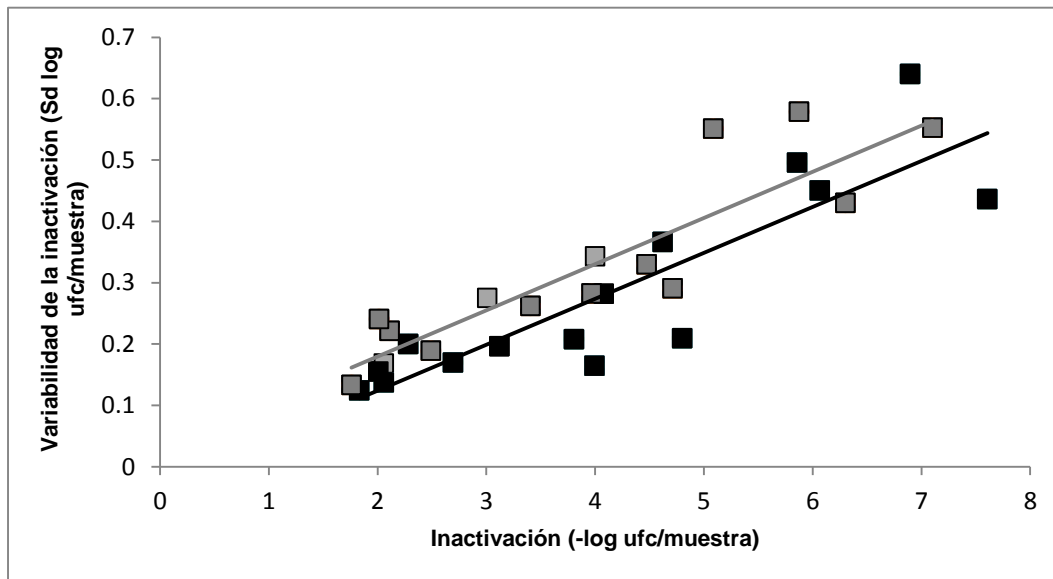
Tratamientos con el mismo poder microbicida, ¿pueden conllevar una diferente variabilidad en el número de supervivientes? Supóngase que se aplica un tratamiento con electrones acelerados y uno térmico a una serie de muestras, todas ellas con la misma microbiota, y que tales tratamientos reducen esa carga en la misma proporción. Puede afirmarse que la media del número de supervivientes debe ser la misma en ambos casos, pero ¿lo será su desviación estándar? Para responder a esta pregunta, se han reunido todos los datos obtenidos en esta Tesis y se han graficado. El resultado se muestra en la Figura 7. No se ha observado ningún efecto en la variabilidad de la inactivación debido a la naturaleza de los microorganismos. Al mismo efecto microbicida, le correspondía una similar variabilidad. Así se han reunido los datos de inactivación y su variabilidad en las Figuras 7, 8 y 9.



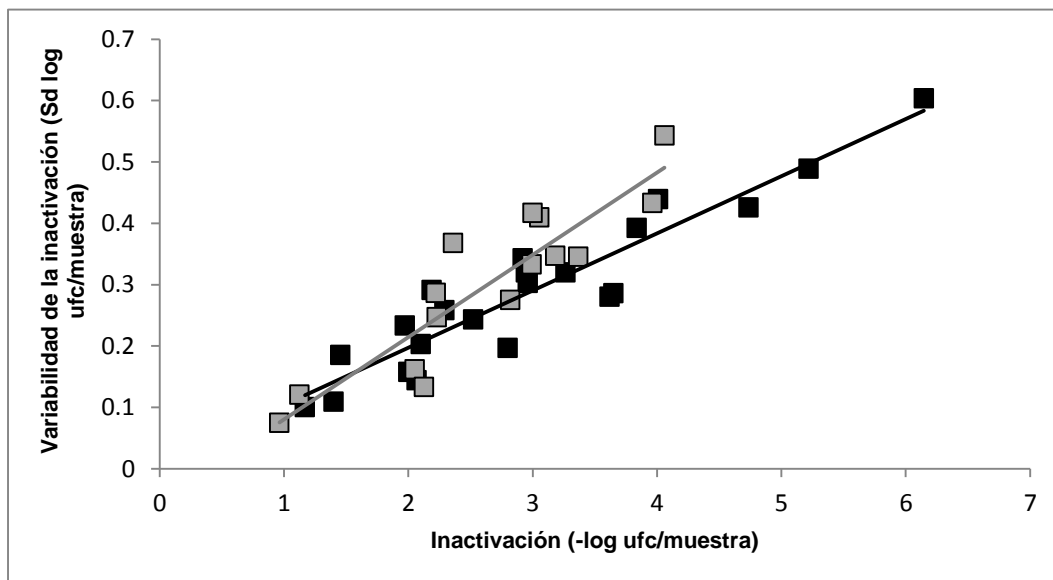
**Figura 7.** Efecto de tratamientos térmicos (círculos grises) y de irradiación (cuadrados negros) en la variabilidad del número de supervivientes de diversos microorganismos.

Es evidente que el tratamiento con calor genera una mayor variabilidad que parece pueda ser aún mayor si la inactivación sobrepasara los casi siete ciclos logarítmicos, límite aplicado en este trabajo. Las implicaciones prácticas de este hecho es que la irradiación, de permitirse su aplicación de forma rutinaria en los alimentos, conllevaría una menor variabilidad, lo que viene a significar que podría reducirse algo la dosis de irradiación necesaria para llegar a los objetivos de seguridad alimentaria marcados por la industria.

A la vista de la Figura 7, no queda claro si existe un efecto del sustrato en la variabilidad de la inactivación. Para aclarar este punto se han separado los datos de alimento y sistema modelo y así han surgido las Figuras 8 y 9.



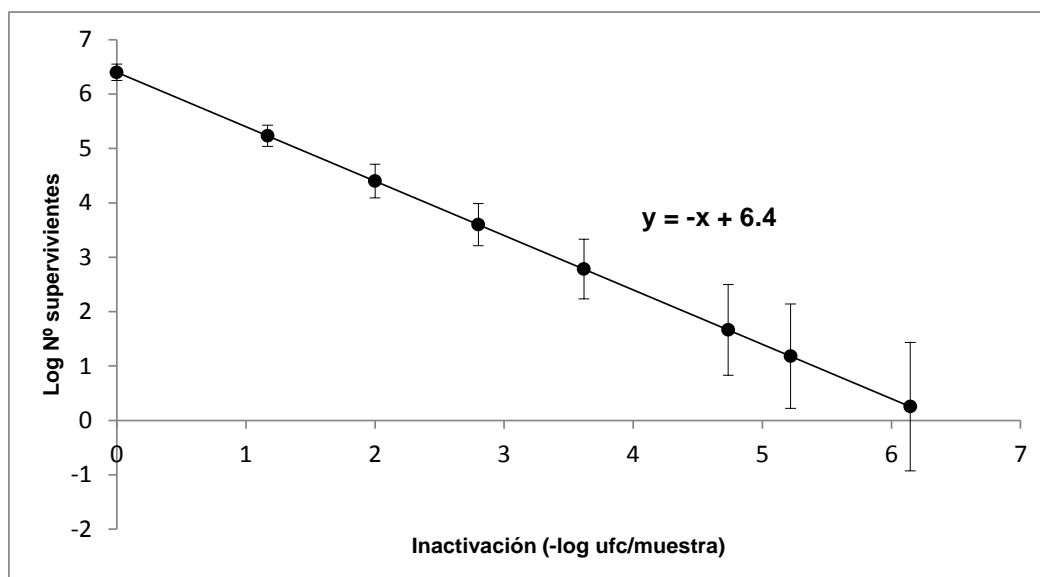
**Figura 8.** Efecto de la irradiación en la variabilidad de la inactivación de varios microorganismos en jamón (cuadros grises) y TSA (cuadros negros).



**Figura 9.** Efecto de tratamientos térmicos en la variabilidad de la inactivación de varios microorganismos en leche (cuadros grises) y TSB (cuadros negros).

Es notable el paralelismo mostrado por las líneas de tendencia en el caso de irradiación (Figura 8). Se aprecia que la variabilidad de la inactivación en el alimento es

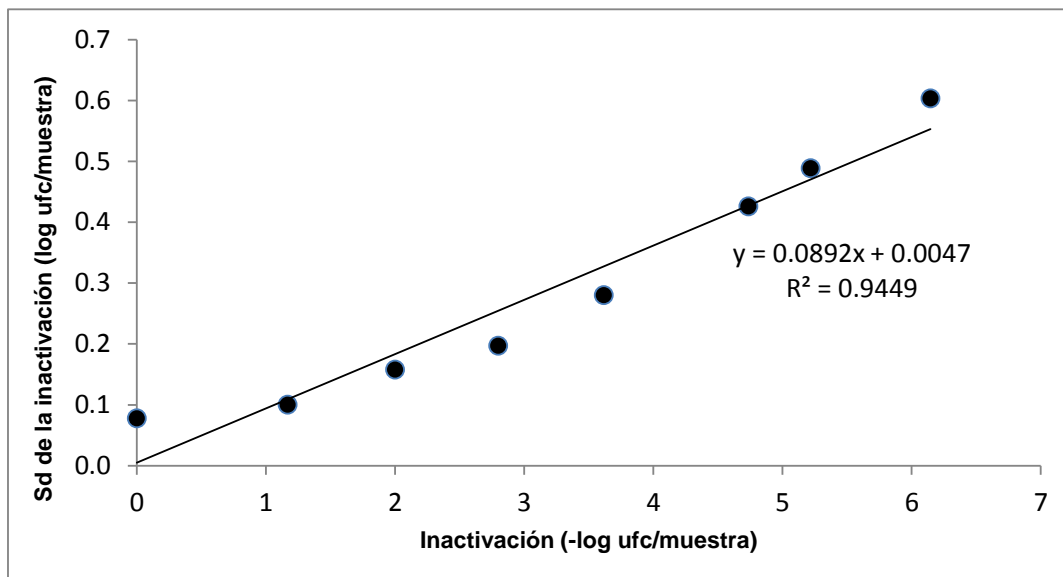
mayor que la observada en las placas de agar, pero siempre guardan prácticamente la misma distancia, cifrándose ésta en torno a seis centésimas del logaritmo decimal del número de supervivientes. En cambio, la variabilidad de los tratamientos térmicos microbicidas en función del sustrato demuestra que no se seguía la misma tendencia. El efecto microbicida es más variable en el alimento (leche) que en el sustrato modelo (TSB o solución salina), pero las diferencias se van incrementando conforme aumentamos la intensidad del tratamiento térmico (Figura 9). Este hecho mueve a reflexionar acerca de la importancia de disponer de modelos matemáticos que contemplen la variabilidad del efecto microbicida de los tratamientos por calor y, además, que dichos modelos se hayan desarrollado en un sustrato lo más parecido posible al alimento con el que se trabaje porque, si se pretende disminuir drásticamente la carga microbiana, habrá que aplicar un tratamiento bastante más severo que el predicho por los tradicionales valores  $D$  y  $z$  si, realmente, se pretende tener la seguridad de que solo un pequeño porcentaje de muestras o envases de un lote incumplan la pretensión del objetivo de seguridad establecido (FSO). Quizás un ejemplo práctico ayude a comprender la relevancia que la variabilidad puede alcanzar en un modelo de inactivación y en el FSO. Se ha analizado la inactivación térmica -y su variabilidad- de *Listeria innocua* a 54°C, obteniéndose los datos que se reflejan en la Figura 10 (datos no publicados).



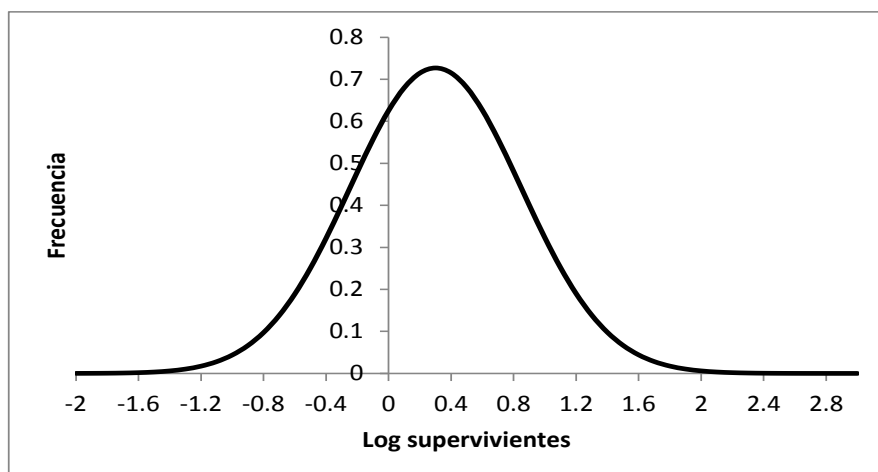
**Figura 10.** Inactivación de *L. innocua* a 54°C. Se muestran las medias del número de supervivientes  $\pm 1,96 \cdot Sd$ , lo que indica que entre los extremos de la barra se incluyen el 95 % de los datos. Cada punto es media de unas 70 determinaciones, excepto el dato de muestras no tratadas, que es media de 10.

A la vista de la gráfica 10, si la carga inicial en un producto coincide con la mostrada en la figura, y se fija un FSO de 2 células por envase, debería aplicarse un tratamiento de 6,1 ciclos logarítmicos para lograrlo. Pero ese tratamiento dejaría 2 células, de media, por envase y no 2 viables como máximo en todos los envases. Es muy probable que haya envases sin viables y, claro está, otros que contengan más de 2. Para poder determinar qué probabilidad se tiene de que haya un determinado número de supervivientes en un envase, ha de modelarse la variabilidad. Para ello se grafica el efecto de la inactivación en la desviación estándar (Figura 11).

Con ayuda de las ecuaciones de las Figuras 10 y 11, se tienen los datos necesarios para simular distribuciones normales de frecuencia, calculadas con la función DISTR.NORM de Microsoft Excel. De esta manera, para tener 2 células de media por envase hay que aplicar un tratamiento de 6,1 ciclos, predicho por la ecuación mostrada en la Figura 10, y este tratamiento conlleva una *Sd* de 0,5488 (predicha por la ecuación mostrada en la Figura 11). Con estos datos se obtiene la distribución de frecuencias del número de supervivientes mostrada en la Figura 12.

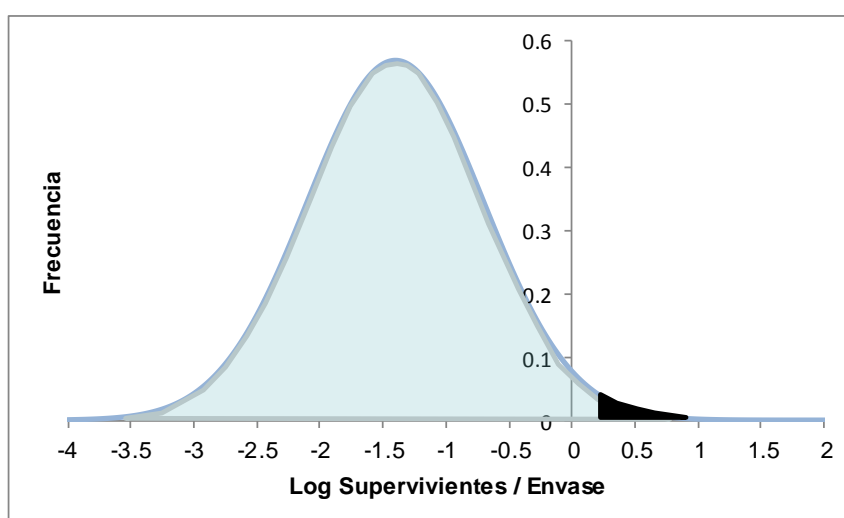


**Figura 11.** Efecto de la inactivación en el grado de variabilidad de la inactivación en términos de la desviación estándar de los obtenidos experimentalmente.



**Figura 12.** Distribución de frecuencias del número de supervivientes para una media de 2 ( $\log_{10} 2 = 0,3010$ ) y una *Sd* de 0,5488.

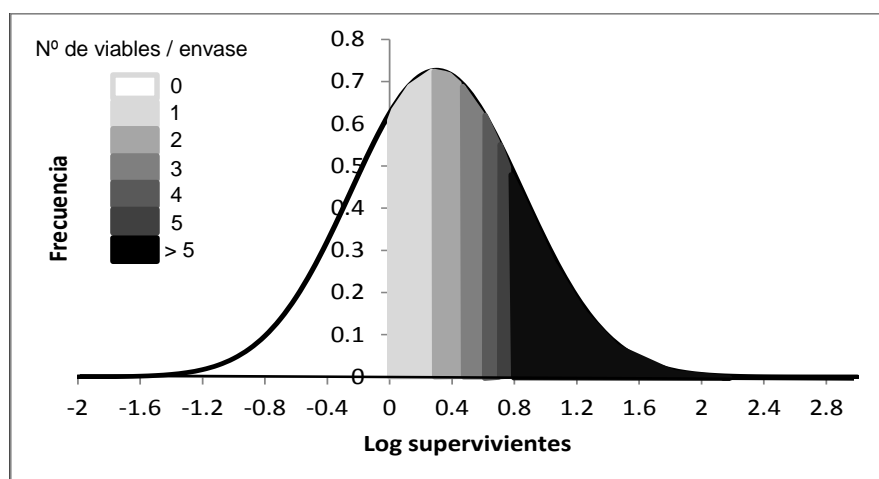
Es evidente que la mitad de los envases de ese supuesto lote contendrán menos de 2 células y la otra mitad más. Parece obvio que este resultado no debe satisfacer a una industria cuyo FSO sea que sus envases contengan 2 ó menos células. Entonces, ¿qué tratamiento debe aplicarse en este ejemplo para que un determinado porcentaje, pequeño, por ejemplo el 1 %, de los envases contengan 2 o menos células? La respuesta está en las predicciones de los modelos aquí desarrollados. En efecto, si el tratamiento térmico aplicado hubiera sido de 7,8 ciclos logarítmicos, la media de supervivientes sería de 0,04 por envase, con una *Sd* de 0,70, lo que arrojaría la distribución de frecuencias mostrada en la Figura 13 en la que el área encerrada en la esquina de la derecha (más oscura), supone el 1 % del total, que representa el porcentaje de muestras que contendrán 2 o más células.



**Figura 13.** Distribución de frecuencias del número de supervivientes para que existan 2 células o más en el 1 % de los envases. Zona más oscura de la gráfica

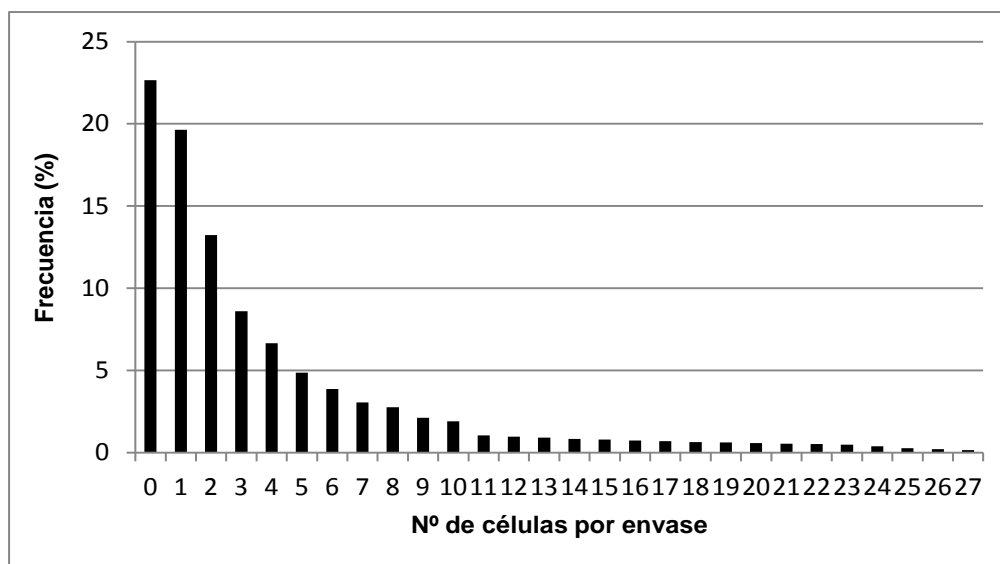
La aplicación de estos modelos debe permitir a la industria aquilatar lo más posible el tratamiento microbicida a aplicar para conseguir un FSO concreto.

Quizás merezca la pena explicar un poco mejor el significado de estas distribuciones. Para generarlas se ha utilizado la función DISTR.NORM de Microsoft Excel introduciendo valores de supervivientes de entre -4 y 7 (en términos de logaritmo decimal de supervivientes), en intervalos de 0,1, lo que arroja un total de 101 datos; para cada uno de ellos, la distribución normal le asigna una determinada probabilidad y la suma de todas esas probabilidades es 10. Si en vez de 101 datos se hubiera trabajado con 201 (intervalos de 0,05), la suma de todas las probabilidades hubiera sido 20. Por tanto, las probabilidades asociadas al número de supervivientes en las Figuras 12 y 13 han de considerarse sobre 10. Por ejemplo, según la Figura 12, a 1 célula ( $\log_{10} 1 = 0$ ) le correspondería una probabilidad de 0,6 sobre 10, o lo que es lo mismo, el 6 %. En realidad, esto no es cierto porque no hay números decimales de organismos vivos; entonces, la probabilidad de que quede un solo microorganismo, en realidad, viene representada por toda el área encerrada entre la curva y los valores 0 y 0,3010, que corresponde al  $\log_{10} 2$ , del eje de abscisas, la probabilidad de que queden 2 viables, será el área entre la curva y los valores 0,3010 y 0,477 ( $\log_{10} 3$ ) y así sucesivamente. La Figura 14 muestra algunas de esas áreas.



**Figura 14.** Distribución de frecuencias del número de supervivientes para una media de 2 ( $\log_{10} 2 = 0,3010$ ) y una *Sd* de 0,5488. Se muestran las áreas que determinan la probabilidad de que sobreviva 1, 2, 3, 4 5 ó más células

La Figura 14 todavía no es lo suficientemente clara y no permite ver qué porcentaje de muestras o envases contienen un número determinado de viables. Es decir, hay que traducir el área encerrada en cada intervalo a un porcentaje de envases. Este dato puede obtenerse de las tablas generadas con la función DISTR.NORM de Microsoft Excel, sumando las probabilidades que le corresponden a los datos comprendidos entre los logaritmos de dos número consecutivos, por ejemplo menos de 1, entre 1 y 2, entre 2 y 3, etc. o con la ayuda de algún paquete estadístico, como @Risk (Palisade corporation, New York, EEUU). Finalmente, estos datos se ponderan y pueden ofrecerse en términos de porcentajes de muestras o envases con un número determinado de viables, como se muestra en la Figura 15.



**Figura 15.** Porcentajes de muestras o envases con un número de viables determinado; la media de supervivientes por envase es 2. Los datos de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 viables se corresponden con las áreas mostradas en la Figura 14.

## 5.2. Efecto del estado fisiológico en la variabilidad de la inactivación

Otro hecho a considerar en la inactivación microbiana es el efecto del estado fisiológico de los microorganismos. Se ha observado, mediante tratamientos térmicos, que los microorganismos en fase estacionaria muestran una mayor termorresistencia que aquellos que estaban en fase de crecimiento exponencial, lo cual tiene concordancia con lo dicho por Mackey (2000), quien justificó su hallazgo aduciendo que el estado fisiológico está comprometido durante el crecimiento exponencial debido a las constantes

multiplicaciones, mientras que las células han alcanzado una “edad adulta y desarrollada” en la fase estacionaria que les confiere mayor resistencia [298].

Durante el estudio del efecto del estado fisiológico en la resistencia al calor también se observó que al aumentar la intensidad de los tratamientos térmicos, el número de supervivientes disminuía pero la variabilidad aumentaba. El análisis de la variabilidad de la inactivación en función del estado fisiológico de las bacterias en el momento del tratamiento reveló que los resultados más variables se obtuvieron con las células en el momento de crecimiento más rápido (12 h de incubación) y al final de la fase exponencial (24 h), mientras que la termorresistencia de los microorganismos en fase estacionaria, además de ser mayor fue menos variable. Por otra parte, las células muestreadas al inicio de la fase exponencial eran menos termorresistentes que el resto, pero la variabilidad de su inactivación fue similar a la de las células en fase estacionaria.

Puede que se echen en falta datos del comportamiento microbiano en la fase de latencia, es decir, antes de arrancar la multiplicación. No obstante, debe considerarse que durante esta fase las bacterias se adaptan a las nuevas condiciones imperantes y que su estado fisiológico será idéntico, en un principio, al que tenían en el medio y fase donde se encontrasen (fase exponencial o estacionaria) y que poco a poco, su estado fisiológico se acercará al que tienen los microorganismos en la fase exponencial de crecimiento. Además, el número de microorganismos que las muestras deben contener para que al aplicar un tratamiento que reduce la población en 3 ciclos logarítmicos y que permita hacer recuentos en placa de los supervivientes es muy elevado, incompatible con un inóculo razonable (para una fase de latencia). Por consiguiente, ante la dificultad de tener una concentración microbiana compatible con una fase de latencia y con un tratamiento que reduzca la población en 999 partes de 1000 y que el estado fisiológico de esa fase debe ser similar a la de los microorganismos que puedan detectarse en la fase exponencial o estacionaria, se optó por no analizar la variabilidad de la inactivación de las bacterias en fase de latencia.

### **5.3. Análisis de la variabilidad en la fase de latencia**

El conocimiento de la fase de latencia es relevante para la industria alimentaria ya que condiciona, entre otros factores, la vida útil y la seguridad de los alimentos. Así

mismo, conocer la variabilidad de esta fase, permitirá un ajuste más preciso y convincente de la vida útil de los alimentos.

Conociendo la incidencia de un determinado patógeno, un determinado inóculo, su fase de latencia, incluyendo su variabilidad, y su tasa máxima de crecimiento en unas condiciones determinadas, puede predecirse la frecuencia con que unas pocas células pueden multiplicarse y llegar a una concentración peligrosa e inaceptable en un tiempo concreto. Obviamente, el análisis de riesgos y control de puntos críticos necesita manejar estos datos y cualquier otro factor que pueda afectar a la vida útil de un alimento.

Las condiciones en que se procesa un producto son decisivas a la hora de determinar su vida útil y los riesgos que su consumo puede entrañar. En efecto, cuanto más drásticas sean las condiciones de procesado, menos microorganismos supervivientes quedarán, más larga será la vida útil porque la carga inicial será menor, y se corren menos riesgos sanitarios porque será menos probable la supervivencia de los patógenos. Todo lo que acaba de afirmarse es válido siempre que no se produzcan contaminaciones post-proceso. Pensemos ahora en los microorganismos que sobreviven al proceso y forman la “microbiología del alimento” en cuestión, porque de su número, naturaleza y capacidad de crecimiento (estado fisiológico) va a depender la vida útil y la peligrosidad o seguridad del producto. Si la flora residual es termófila y el alimento se distribuye y almacena en refrigeración, la vida útil no dependerá de la microbiología del alimento ni se asumen riesgos de que los patógenos puedan crecer. En cambio, si la microbiota resistente al procesado puede multiplicarse en las condiciones de almacenamiento, la vida útil dependerá, quizás por completo, de la rapidez con que pueda multiplicarse esta microbiota y, si existen patógenos y proliferan, los riesgos sanitarios son evidentes. De todo esto puede deducirse que la naturaleza y el número de supervivientes a un proceso van a determinar la vida útil de un alimento y los riesgos sanitarios que su consumo entraña. Pero existe un tercer factor de importancia: la capacidad de crecimiento de esta microbiota. Esta capacidad viene determinada en gran medida por el estado fisiológico de los microorganismos [23]. Los tratamientos microbicidas dañan en mayor o menor medida a los microorganismos que son capaces de crecer posteriormente y estos daños necesitan de una reparación antes de que se inicie la proliferación [228, 229]. Si la cantidad de trabajo a realizar por las células para repararse es mucho y las condiciones de almacenamiento no son las apropiadas e incluso se alejan mucho de ellas, es posible que esta reparación no se logre y las células no sean viables. Cuando las condiciones de

almacenamiento permiten el crecimiento microbiano, la capacidad de multiplicación de los microorganismos gana en importancia, y su estado fisiológico determina si el crecimiento se iniciará antes o después. Es de suponer que si las reparaciones necesarias (trabajo a realizar) son muchas y complejas, el tiempo para llevarlas a cabo será largo y la fase de latencia será, en consonancia, prolongada.

Al analizar la variabilidad de la fase de latencia de células individualizadas previamente sometidas a diferentes grados de inactivación se ha observado que a medida que se intensifica el estrés sobre las células, más prolongada es la fase de latencia de los microorganismos que permanecen viables y existe una variabilidad inherente a cada organismo que influye en la fase de latencia de células individualizadas o de micropoblaciones. Cuanto más intenso es un tratamiento conservante, menos supervivientes quedan, sus fases de latencia son más prolongadas y son más variables. La primera observación -prolongación de la fase de latencia- era de esperar, ya que cuanto más drásticas son las condiciones de un proceso conservante, más daño sufre toda la microbiota y aquellas bacterias que permanecen viables necesitan de más reparaciones para expresar esa viabilidad. Tampoco sorprende la mayor variabilidad de la fase de latencia de las células que han sobrevivido a tratamientos más enérgicos, con diferencias cada vez más notables entre las más “rápidas” y más “lentas” en iniciar su multiplicación.

Los modelos matemáticos del crecimiento microbiano desarrollados hasta el momento predicen con meridiana exactitud la  $\mu_{max}$ , pero han venido fracasando una y otra vez en las predicciones de la fase de latencia [78, 212, 247, 299, 300], quizás debido a su variabilidad. No obstante, ninguno de los modelos contemplaba la variabilidad de tales parámetros, entonces, ¿por qué las predicciones de la  $\mu_{max}$  eran precisas y no las de la fase de latencia cuando se sabe que la  $\mu_{max}$  no es constante? [123]. La variabilidad de la  $\mu_{max}$  se ha constatado midiendo el tiempo que tarda en dividirse una sola célula. Ahora cambiemos el orden de magnitud y pasemos de una célula a una población, incluso generada por una única célula, y supongamos que el tiempo invertido en cada una de las divisiones de cada célula es aleatorio. Incluso en estas circunstancias, si comparamos el tiempo que tarda un mismo inóculo en alcanzar una determinada carga final, siempre que las condiciones tanto intrínsecas del inóculo como las extrínsecas sean idénticas, ha de ser constante porque son necesarias millones de divisiones para que una célula o un grupo de células forme una colonia o una población de millones de individuos y los tiempos -de duplicación- largos de unas células se compensarán con tiempos cortos de otras. Por

consiguiente, la  $\mu_{max}$  que puede medirse, una vez determinada la curva de crecimiento, viene a representar la media de todas las tasas específicas de crecimiento de todas las células que se han dividido. Esto se ha observado innumerables veces cuando se ha investigado el crecimiento microbiano y se ha determinado el tiempo de generación de un cultivo. Lo mismo podría decirse de la fase latencia de una población de cientos o miles de individuos. Habrá células de fase de latencia corta (rápidas en iniciar el crecimiento) y larga (lentas), pero estas diferencias quedan maquilladas por el propio número de células y la fase de latencia de inóculos grandes es siempre más homogénea que el de inóculos más pequeños. A pesar de esta reflexión, más matemática que biológica, los modelos no han logrado predecir con una mínima exactitud la fase de latencia de poblaciones de miles de individuos. Quizás sean demasiados los factores que la controlan.

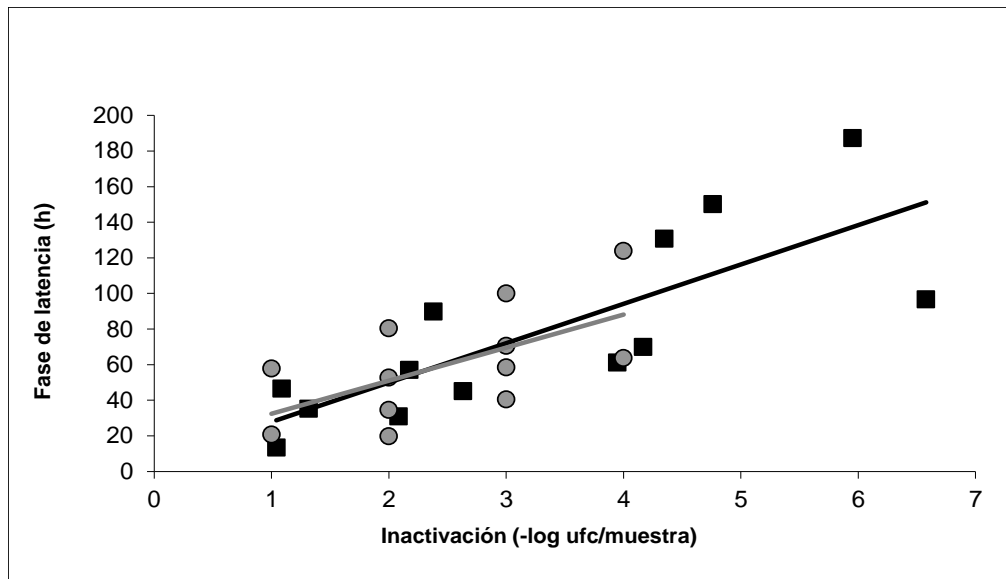
Por otra parte, en la bibliografía existe muy poca información acerca de la fase de latencia de bacterias individualizadas [211, 218, 270, 301, 302]. En cualquier trabajo que determine la fase de latencia, ésta hace referencia a la de una población más o menos numerosa, pero nunca a la de un solo microorganismo. Y la fase de latencia de una población coincidirá con la de todos sus componentes únicamente en el caso –utópico- de que todos los componentes de la población tengan la misma fase de latencia. Además puede asegurarse que cuanto más variable sea la fase de latencia de las células de una población más se alejará la fase de latencia de la población de la media de las fases de latencia de los individuos que la forman. En el momento en que este tiempo de adaptación sea diferente para cada individuo de una población, la fase de latencia de ésta no será la media de las fases de latencia de sus componentes, porque los microorganismos que entran antes en fase exponencial de crecimiento “tirarán” de la población y serán los responsables de la fase latencia de la población, dejando a los más lentos un papel irrelevante. Pongamos un ejemplo muy sencillo. Sea una población de 4 células (A, B, C, D); todas se multiplican con la misma velocidad (tiempo de duplicación = 1 hora), pero sus fases de latencia no son iguales, una de ellas es muy rápida en adaptarse y tiene una fase de latencia de 0 horas, mientras que las otras tres son más lentas y sus fases de latencia son idénticas, 4 horas. La fase de latencia media de las cuatro células -la población- es 3 horas, pero la fase de latencia real no es ésta ni mucho menos. La célula A, cuya fase de latencia es cero, “manda” en la población y la “inunda” con sus descendientes, mientras que las B, C y D, más lentas, cuando pueden empezar a multiplicarse ya no tienen ningún peso en la fase de latencia de la población. La Tabla 6

ilustra la evolución del número de células en las primeras 6 horas de cultivo de la simulación y de ella puede deducirse que la fase de latencia real de la población sería menos de 1 hora. Este ejemplo solo es válido si se asume que todas las células tienen el mismo tiempo de duplicación.

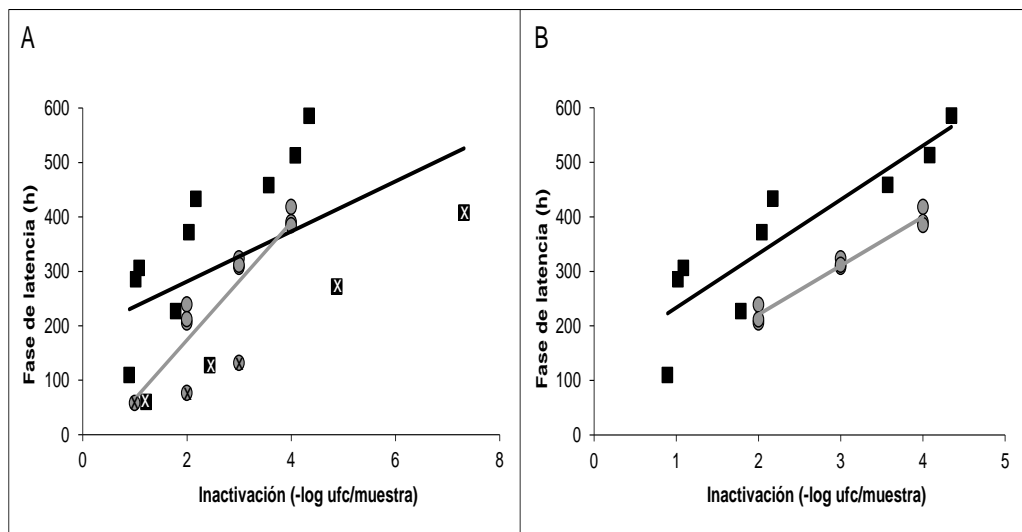
**Tabla 6.** Ejemplo numérico que ilustra cómo afecta la fase de latencia de las células mejor adaptadas a la fase de latencia de una población. Se supone que todas las células se multiplican a la misma velocidad (tiempo de duplicación = 1 hora). La fase de latencia de la población no coincide con la media de las fases de latencia de cada componente de la población.

Célula	Fase de latencia (h)	Nº células 0 horas	Nº células 1 horas	Nº células 2 horas	Nº células 3 horas	Nº células 4 horas	Nº células 5 horas	Nº células 6 horas
A	0	1	2	4	8	16	32	64
B	4	1	1	1	1	1	2	4
C	4	1	1	1	1	1	2	4
D	4	1	1	1	1	1	2	4
Población		4	5	7	11	19	38	76

Permítasenos profundizar un poco más en el análisis de la variabilidad de la fase de latencia de células individualizadas. La Figura 16 muestra el efecto de la intensidad de tratamientos de inactivación por calor e irradiación en la fase de latencia de microorganismos individualizados supervivientes creciendo en TSB a 16°C (*L. innocua*, *S. entérica* Enteritidis y *P. fluorescens*) y 18°C (*E. faecalis*). Se han unido los datos de todos los microorganismos analizados en esta tesis porque, aunque en ocasiones hay diferencias entre unos y otros, éstas son significativas o no de forma anárquica y no siguen una norma, siendo la tendencia en todos ellos la misma. Cuanto más intensos son los tratamientos conservantes y menos microorganismos se mantienen viables, las células resistentes presentan una fase de latencia más prolongada. Este hecho no es sorprendente, ya que los tratamientos más intensos deben conllevar una mayor cantidad de daños y las células tardarán más tiempo en repararlos. Lo mismo cabe decir de los datos obtenidos en alimentos con los mismos microorganismos tras pasar por tratamientos microbicidas similares, como puede verse en la Figura 17.



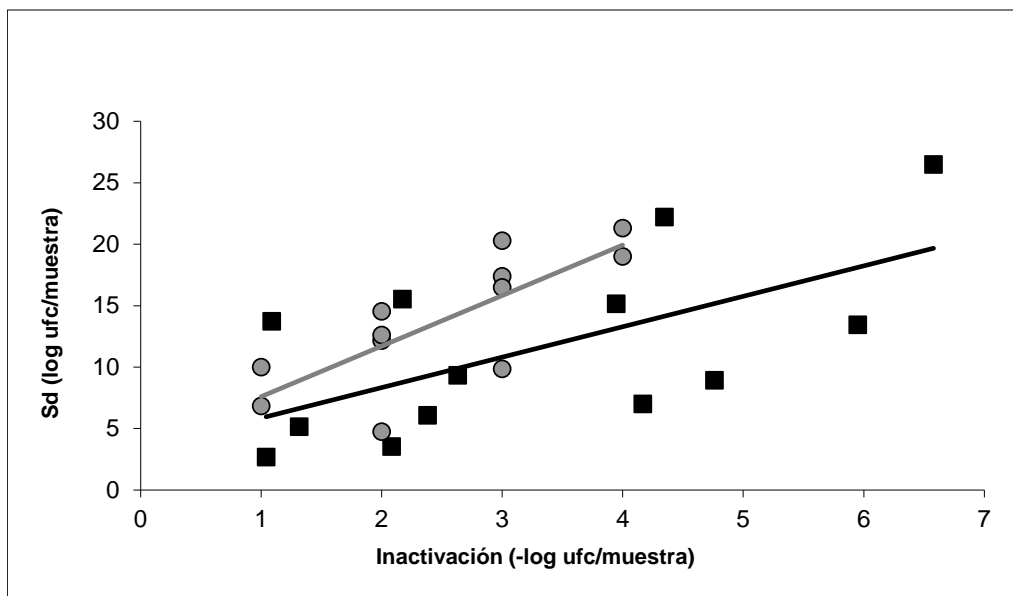
**Figura 16.** Efecto de la intensidad de tratamientos de inactivación por calor (círculos grises) e irradiación (cuadrado negros) en la fase de latencia de microorganismos individualizados supervivientes a tales tratamientos y que después crecen en TSB a 16°C (*L. innocua*, *S. Enteritidis* y *P. fluorescens*) o 18°C (*E. faecalis*). Cada dato es media de en torno a 70 muestras.



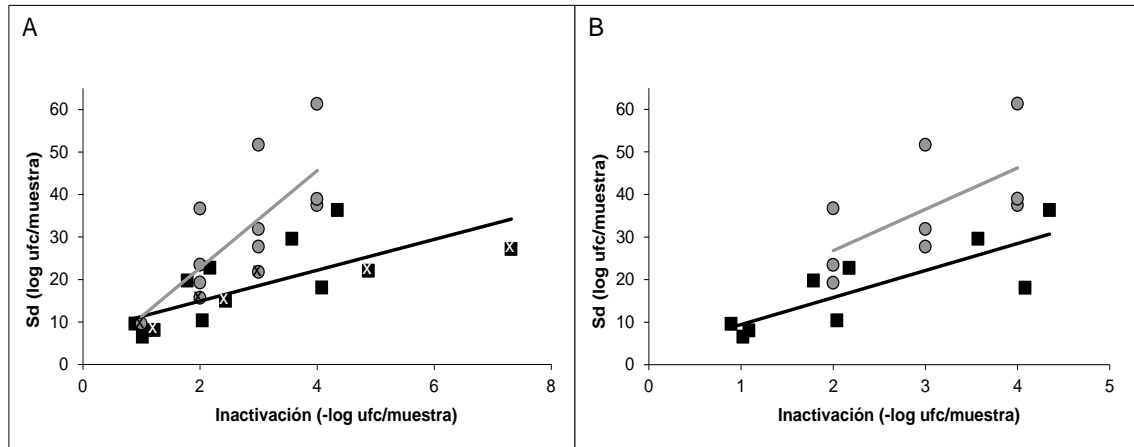
**Figura 17.** Efecto de la intensidad de tratamientos de inactivación por calor en leche (círculos grises) e irradiación en jamón cocido (cuadrado negros) en la fase de latencia de microorganismos individualizados supervivientes a tales tratamientos y que después crecen en los mencionados alimentos a 7°C. La Figura A incluye los datos de *P. fluorescens* (símbolos con aspas) y la B los excluye.

Si se consideran las Figuras 16 y 17B se aprecia un paralelismo notable en el efecto de la inactivación en la duración de la fase de latencia, pero si se consideran los

resultados obtenidos con *P. fluorescens* en alimentos (Figura 17A), la tendencia se modifica, influida por la mayor adaptabilidad de esta especie a las condiciones de refrigeración, dado su carácter psicrotrofo. Este efecto se minimiza al crecer los microorganismos a 16°C (Figura 16), aunque las fases de latencia más cortas también corresponden a *P. fluorescens* (datos no resaltados). Por otra parte se observa que el medio de crecimiento es influyente; mientras que en TSB, ambos tratamientos prolongan de la misma manera la fase de latencia (las líneas de tendencia son casi paralelas, Figura 16), la fase de latencia en leche, un medio líquido, donde los microorganismos fluyen más libremente que en jamón cocido, es más corta. Las Figuras 18 y 19 muestran el efecto de la intensidad de los tratamientos microbicidas (calor e irradiación) en la variabilidad de la fase de latencia en términos de la *Sd* de las distribuciones obtenidas.



**Figura 18.** Efecto de la intensidad de tratamientos de inactivación por calor (círculos grises) e irradiación (cuadrado negros) en la variabilidad (*Sd*) de la fase de latencia de microorganismos individualizados supervivientes a tales tratamientos y que después crecen en TSB a 16°C (*L. innocua*, *S. Enteritidis* y *P. fluorescens*) o 18°C (*E. faecalis*).



**Figura 19.** Efecto de la intensidad de tratamientos de inactivación por calor en leche (círculos grises) e irradiación en jamón cocido (cuadrado negros) en la variabilidad ( $Sd$ ) de la fase de latencia de microorganismos individualizados supervivientes a tales tratamientos y que después crecen en los mencionados alimentos a 7°C. La Figura A incluye los datos de *P. fluorescens* (símbolos con aspás) y la B los excluye.

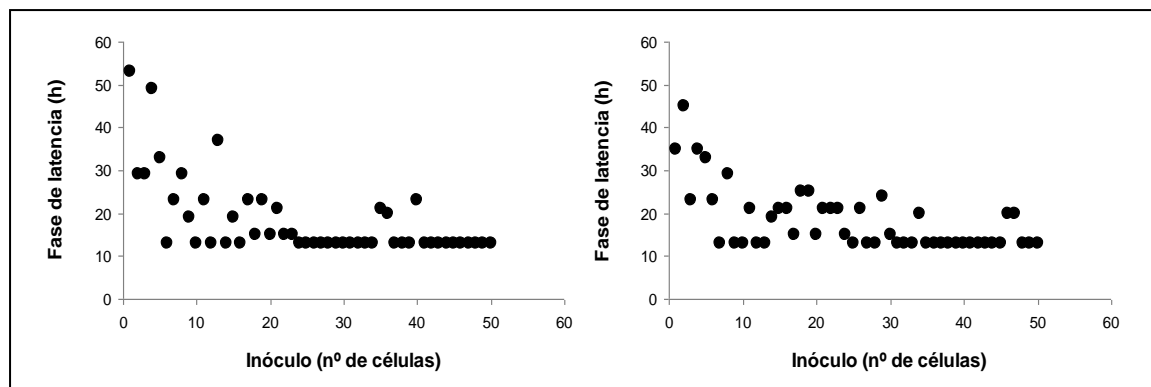
Es obvio que conforme el tratamiento microbicida se hace más intenso, la variabilidad de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes aumenta. La menor variabilidad se observó en *P. fluorescens* (Figura 19B) y, nuevamente, la exclusión de los datos de ese microorganismo (Figura 19A) hace que se armonicen más las tendencias en leche (tratamientos térmicos) y jamón cocido (irradiación), pero si se comparan las Figuras 17B y 19B se observa que éstas se han invertido; mientras la fase de latencia en jamón irradiado es más larga, pero menos variable, la fase de latencia en leche tratada térmicamente es más corta pero más variable. Esta mayor variabilidad indica que, para el mismo tratamiento microbicida, la misma letalidad, los daños causados por el calor en los microorganismos que se mantienen viables pueden ser más heterogéneos, mientras que los causados por la irradiación deben ser más homogéneos.

Hasta ahora se ha discutido la fase de latencia, y su variabilidad, de células individualizadas, pero no cabe duda de que también es interesante conocer la fase de latencia de poblaciones. Ya se ha discutido antes que las poblaciones muy numerosas (miles o cientos de bacterias) presentan fases de latencia más homogéneas y, si se va reduciendo el número de células que la forman, es de esperar que la fase de latencia vaya prolongándose. Es decir, al ir reduciéndose el tamaño del inóculo, su fase de latencia se irá prolongando. Pero esto está sujeto a las leyes del azar. Veamos una simulación que ayude a comprenderlo. Sean 50 células, cuyas fases de latencia, en horas, se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Fases de latencia simuladas de 50 células. Los datos se eligieron aleatoriamente entre valores de 10 y 90 h.

12	22	28	35	42	52	56	66	72	85
12	22	32	35	47	53	57	67	76	87
18	22	34	39	50	54	59	68	80	87
19	23	34	39	50	54	60	68	82	88
20	24	35	40	52	56	66	70	83	90

Asumiendo que transcurrida la fase de latencia, el crecimiento se inicia inmediata y constantemente, se han calculado las fases de latencia de diferentes inóculos, siempre eligiendo al azar las células que lo integran, formados por 1, 2, 3 células hasta las 50. Esto se ha hecho dos veces; las fases de latencia resultantes en las dos simulaciones se recogen en la Figura 20.

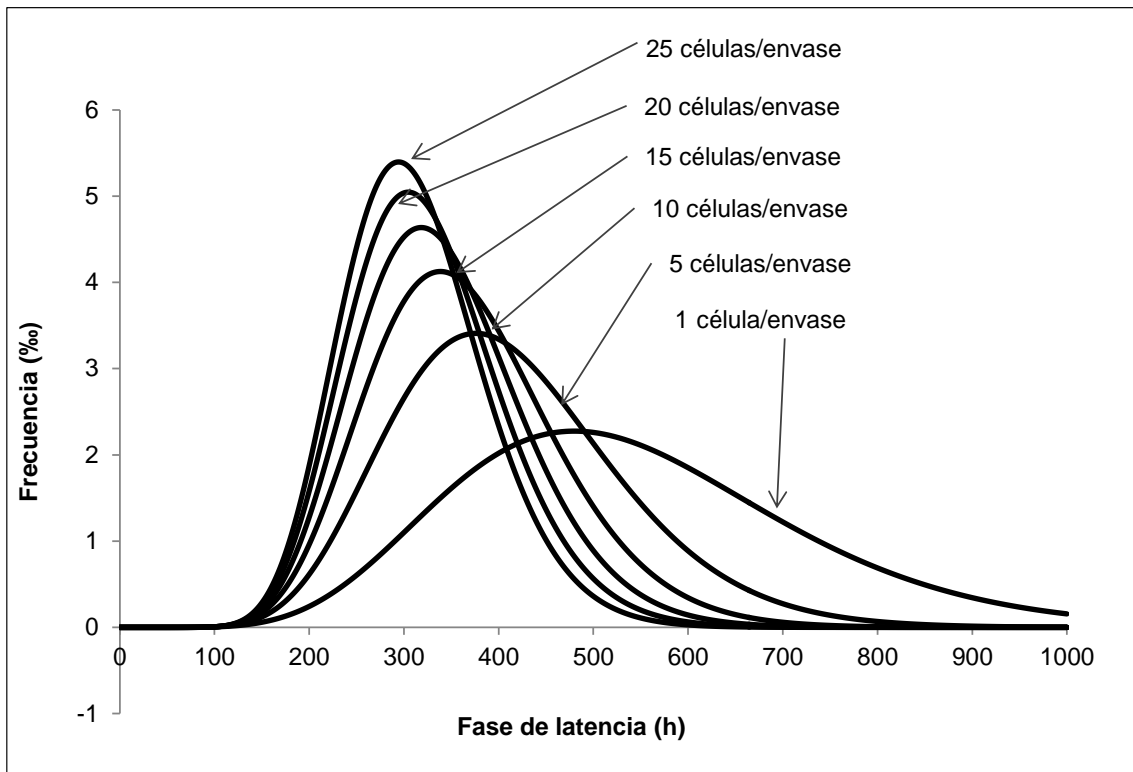


**Figura 20.** Fases de latencia de inóculos compuestos de un número diverso de células cuyas fases de latencia se muestran en la Tabla 7.

Las dos nubes de puntos mostradas en la Figura 20 se han confeccionado eligiendo al azar los integrantes del inóculo de entre las células cuyas fases de latencia se muestran en la Tabla 7. Las dos difieren. Si dividiéramos las figuras en dos mitades, imponiendo la frontera en torno a 20 células, comprobaríamos que las partes izquierdas de las figuras, con los inóculos menores, presentan más diferencias que las partes derechas. Es decir, cuanto mayor es el inóculo, más homogénea y corta es la fase de latencia, ya que es más probable que las células más rápidas en iniciar el crecimiento estén presentes en tales muestras. En el caso presentado, cuando la fase de latencia de la población se hace

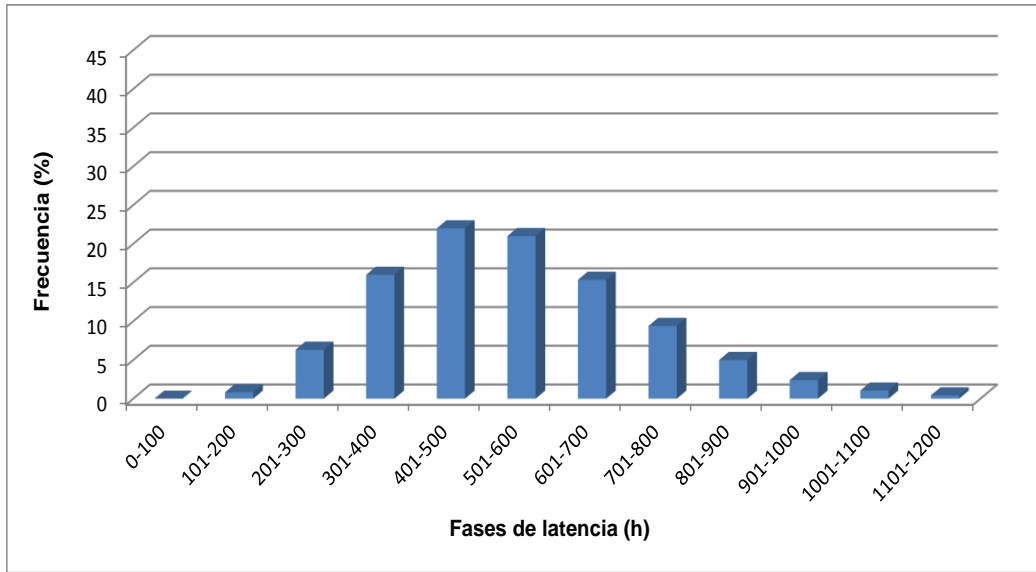
mínima es que una o las dos células cuya fase de latencia es 12 (Tabla 7) formaban parte de ella. Si hubiéramos confeccionado más gráficas de la misma manera, siempre eligiendo al azar las células integrantes del inóculo, la probabilidad de que dos de ellas fueran iguales es remotísima.

En el ejemplo anterior solo se ven las diferencias entre las fases de latencia de muestras con un número diferente de células, pero esto se aleja de la realidad práctica. En la industria se aplica un tratamiento microbicida a una materia prima que contiene una determinada cantidad y diversidad de microorganismos. El objetivo del tratamiento es reducir el número del microorganismo o microorganismos más resistente(s) hasta unos niveles aceptables desde el punto de vista higiénico sanitario. Ya se ha visto en esta discusión general las distribuciones del número de supervivientes y qué tratamiento hay que aplicar para conseguir un determinado FSO (Figuras 12-15). Ahora cabe preguntarse cómo será la fase de latencia de las células que sobrevivan a esos tratamientos. Otra vez habrá que recurrir a distribuciones para incluir la variabilidad inherente a este proceso en las predicciones. En el manuscrito “Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability” se muestran las distribuciones de la fase de latencia de diferentes tamaños de inóculo y la metodología que permite predecirlas. En realidad, los modelos generados en dicho trabajo predicen la distribución de frecuencias de fases de latencia en función del tratamiento al que sobreviven las bacterias, la temperatura de crecimiento y el tamaño del inóculo. Retomando el ejemplo de inactivación que se ha venido ilustrando a lo largo de esta discusión (Figuras 12-15), en el que se reduce la carga inicial en 6,1 ciclos logarítmicos y suponiendo que la temperatura de incubación sea de 4°C, y que el microorganismo objetivo sea *L. innocua*, el émulo de *L. monocytogenes*, pueden predecirse las distribuciones de frecuencia de las fases de latencia, tal como se muestra en la Figura 21, para un número de supervivientes diverso, entre 1 y 25 células por envase o muestra.

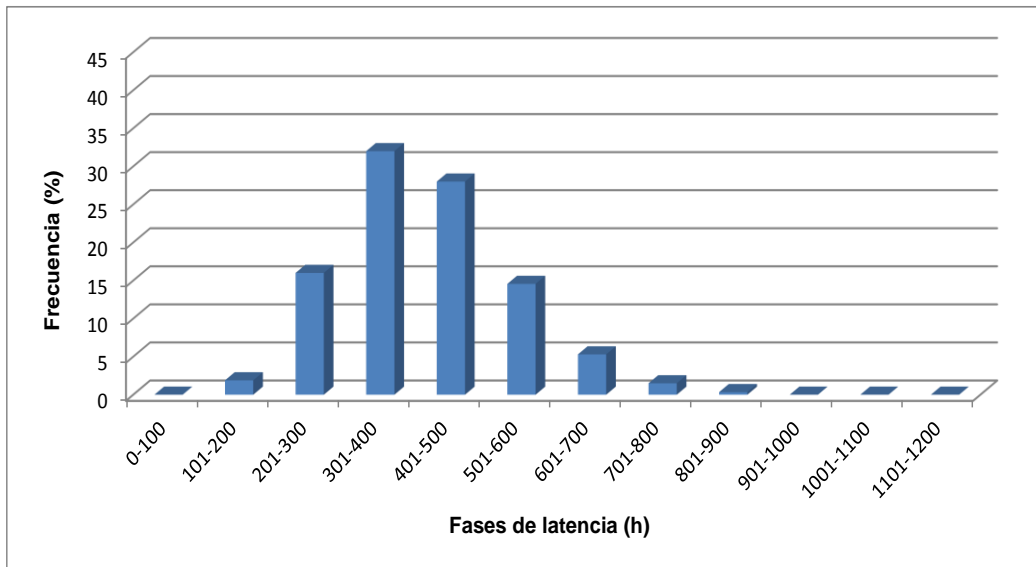


**Figura 21.** Predicción de las distribuciones de frecuencias de las fases de latencia de diferentes inóculos supervivientes a un tratamiento microbicida que reduce la carga en 6,1 ciclos y se almacenan a 4°C. Para la predicción se han utilizado datos de *L. innocua* (Aguirre et al., 2012. Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. Int. J. Food Microbiol.)

Estas distribuciones indican el porcentaje de muestras con una determinada carga inicial (1, 5, 10, etc.) que tendrán una determinada fase de latencia. Para que pueda observarse más nítidamente este extremo se incluyen las Figuras 22, 23 y 24, en las que se muestran histogramas de frecuencias de las fases de latencia predichas para los envases que contienen 1, 5 y 25 células respectivamente.



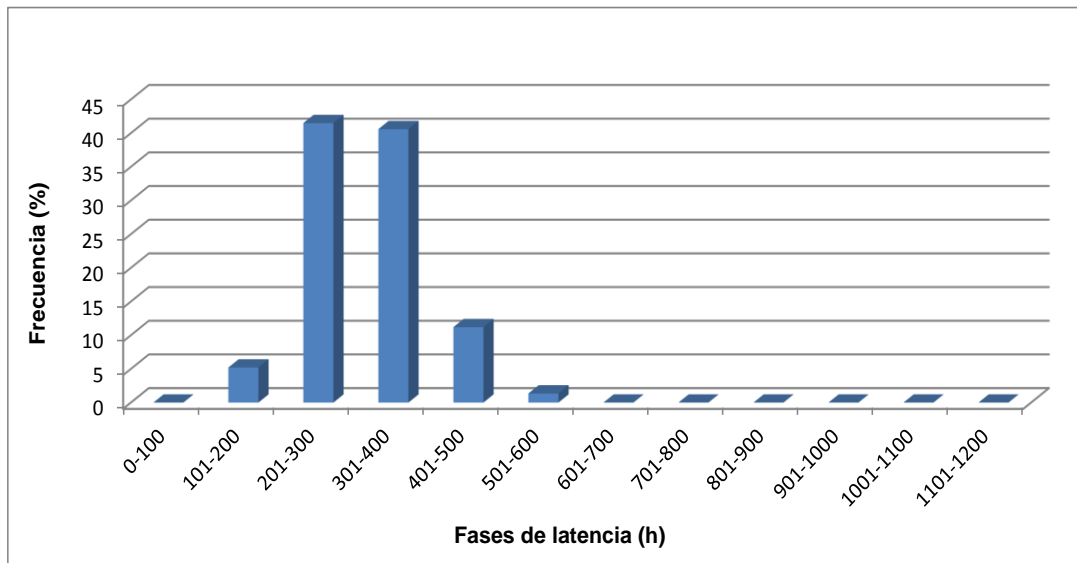
**Figura 22.** Porcentaje de envases con una determinada fase de latencia. En todos ellos existe 1 célula.



**Figura 23.** Porcentaje de envases con una determinada fase de latencia. En todos ellos existen 5 células.

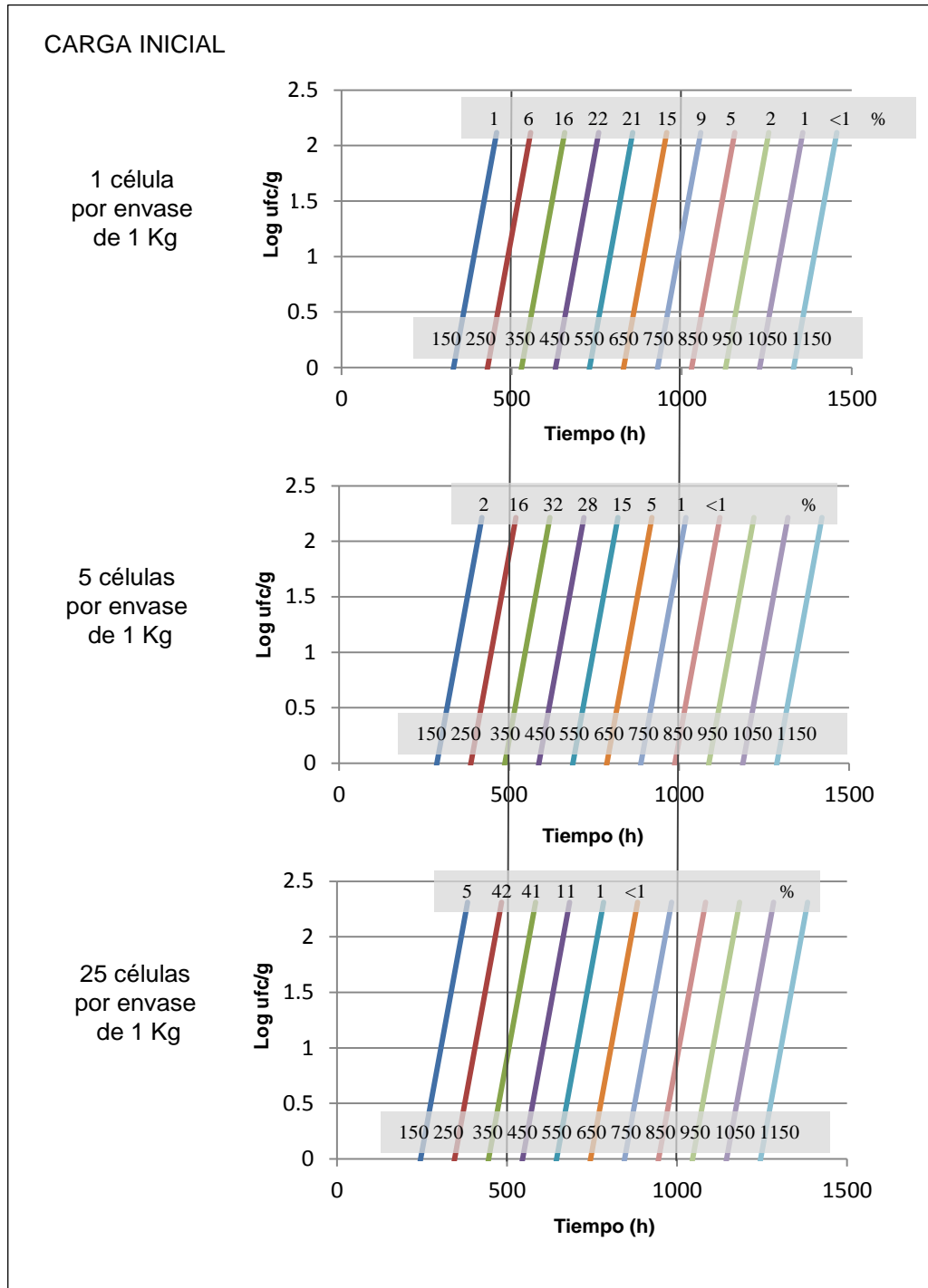
El análisis de estos tres histogramas permite comprender que cuanto mayor es el número de supervivientes en un envase, menos variable será su fase de latencia, aunque siga sujeta a ciertos márgenes. Debe resaltarse que las fases de latencia mínimas en los tres histogramas coinciden, pero el porcentaje de muestras que tienen esa mínima fase de latencia, entre 100 y 200, es diferente, desde menos del 1 % cuando solo hay una célula hasta el 5 % cuando hay 25 células, pasando por el 2 % en el caso de 5 células. En

cambio, las probabilidades de encontrar un envase con 25 células y una fase de latencia muy larga, por encima de 600 horas (Figura 24), es mínima, mientras que la tercera parte de los envases con 1 célula tendrán más de esas 600 horas de fase de latencia (Figura 22).



**Figura 24.** Porcentaje de envases con una determinada fase de latencia. En todos ellos existen 25 células.

Para terminar con estas disquisiciones se puede calcular el tiempo que tardarían estas muestras en alcanzar una carga determinada, por ejemplo, 100 células por gramo de producto, límite permitido para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de esa bacteria, que no sean destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que no se superará este límite durante toda la vida útil del producto) [9]. La  $\mu_{max}$  de ese microorganismo a 4°C es 0,02 h<sup>-1</sup> de acuerdo con la predicción de Combase [303], que viene a significar un tiempo de duplicación de 18 horas. Consideremos este tiempo de duplicación constante a lo largo del crecimiento y simulémosle en los distintos casos que se han venido estudiando hasta ahora. Para ello vamos a considerar como fase de latencia la media de los intervalos analizados (por ejemplo, del intervalo 101-200, la media se considera 150 h y así sucesivamente) para cada uno de los tres tamaños de inóculo, 1, 5 y 25 células por envase, siendo el peso neto de estos de 1000 g. La Figura 25 muestra las curvas de crecimiento simuladas con esas premisas. Se observa claramente en qué medida se deja notar el peso de la fase de latencia en el tiempo que se tarda en alcanzar el límite contemplado de 100 ufc/g, incluso cuando se comparan cargas iniciales de 1 y 25 células.

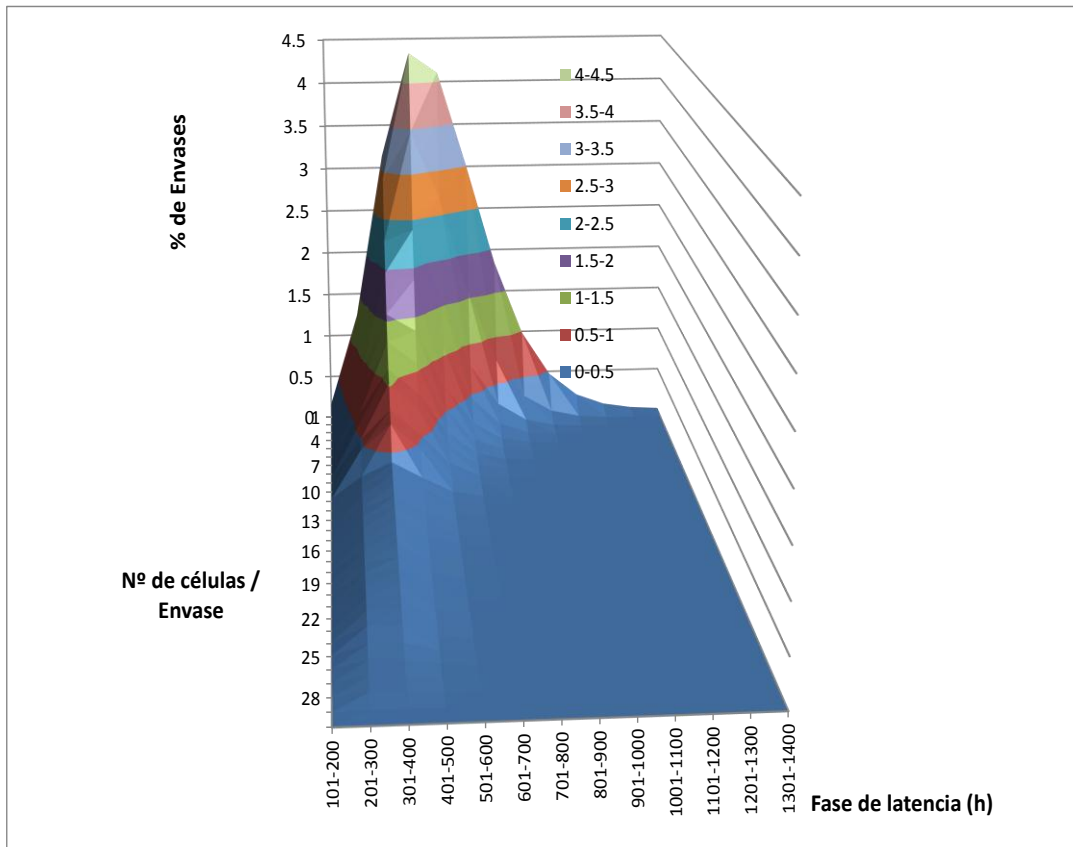
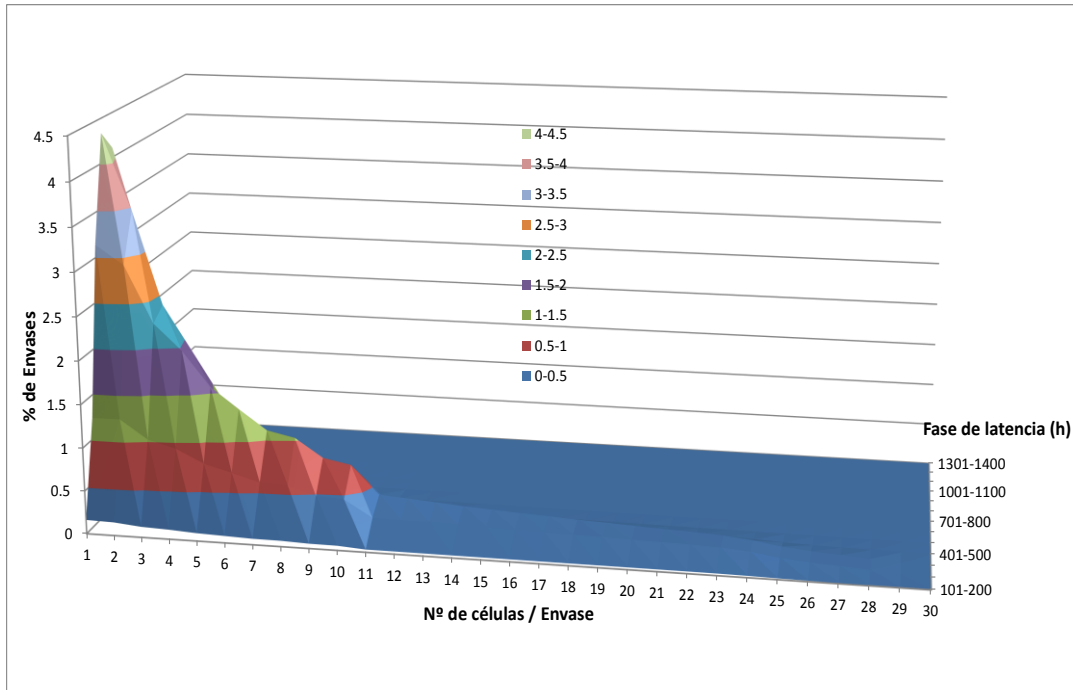


**Figura 25.** Curvas de crecimiento de *L. monocytogenes* simuladas de acuerdo con diferentes fases de latencia (cifras de la base de las curvas, medias de los intervalos mostrados en las Figuras 22-24). En la parte de arriba se muestran los porcentajes de envases con la fase de latencia correspondiente y la carga inicial señalada a la izquierda de las gráficas). Las líneas verticales que cortan los ejes en los valores 500 y 1000 son solo guías que facilitan la comparación de los tiempos necesarios para alcanzar la dosis infectiva.

Con los datos que se están manejando, lo que finalmente debe saberse es qué porcentaje de envases o muestras van a alcanzar la tasa infectiva en un tiempo determinado, para poder establecer, con un criterio sólido, la vida útil del producto. Para ello, primero se genera una tabla (Tabla 8) en la que se especifica el número de envases (sobre un millón) que contendrán 1, 2, 3, etc. células con una determinada fase de latencia (en realidad, un intervalo de fases de latencia. Los datos para su construcción se han mostrado en las Figuras 14, 15 y parte de la distribución de las fases de latencia en la 21. La Figura 26 recoge los datos de la Tabla 8, pero expresados en porcentajes.

**Tabla 8.** Porcentaje de envases que contendrán un determinado número de células y número de envases por millón de unidades que contendrán una determinada carga inicial y una fase de latencia concreta (en realidad, un intervalo de fases de latencia).

Nº cél/env	% de envases	Nº Env /millón	Intervalos de fases de latencia												
			101-200	201-300	301-400	401-500	501-600	601-700	701-800	801-900	901-1000	1001-1100	1101-1200	1201-1300	1301-1400
0	22.66	226600													
1	19.63	196300	1626	12411	31408	43353	41065	30150	18430	9815	4694	2060	843	325	119
2	13.23	132300	1549	12451	29253	34710	26887	15600	7351	2962	1057	342	102	29	8
3	8.6	86000	1238	10260	22692	23953	15907	7714	2983	973	278	71	17	4	0
4	6.66	66600	1114	9406	19713	18824	10970	4571	1496	408	97	20	4	0	
5	4.87	48700	918	7852	15656	13667	7091	2583	729	170	34	6	1	0	
6	3.88	38800	809	6975	13272	10669	4979	1605	396	80	14	2	0		
7	3.06	30600	696	6033	10981	8175	3458	995	217	38	6	0			
8	2.76	27600	679	5896	10284	7121	2784	711	138	22	3	0			
9	2.12	21200	559	4861	8138	5261	1859	435	76	11	1	0			
10	1.91	19100	537	4665	7506	4544	1477	315	49	6	0				
11	1.05	10500	313	2715	4204	2389	717	139	20	2	0				
12	0.98	9800	309	2669	3981	2129	592	105	14	1	0				
13	0.91	9100	302	2599	3738	1885	487	80	9	0					
14	0.84	8400	292	2506	3479	1657	398	60	6	0					
15	0.79	7900	288	2454	3291	1483	332	46	5	0					
16	0.74	7400	281	2387	3095	1321	277	36	3	0					
17	0.7	7000	277	2339	2933	1187	233	28	2	0					
18	0.65	6500	268	2245	2724	1048	193	21	2	0					
19	0.62	6200	265	2208	2595	949	164	17	1	0					
20	0.58	5800	257	2127	2422	843	137	13	0						
21	0.55	5500	252	2073	2289	759	116	10	0						
22	0.52	5200	247	2012	2154	681	98	8	0						
23	0.48	4800	235	1903	1977	596	81	6	0						
24	0.4	4000	202	1623	1637	472	61	4	0						
25	0.28	2800	146	1162	1138	313	38	3	0						
26	0.22	2200	107	848	807	212	24	2	0						
27	0.15	1500	83	649	600	151	16	1	0						
28	0.1	1000	57	441	396	96	10	0							
29	0.03	300	17	135	118	27	3	0							
30	0.001	10	0	5	4	1	0								



**Figura 26.** Porcentaje de envases que contendrán un determinado número de células y una fase de latencia concreta (en realidad, un intervalo de fases de latencia). Para su mejor comprensión se ofrecen dos vistas de la misma figura.

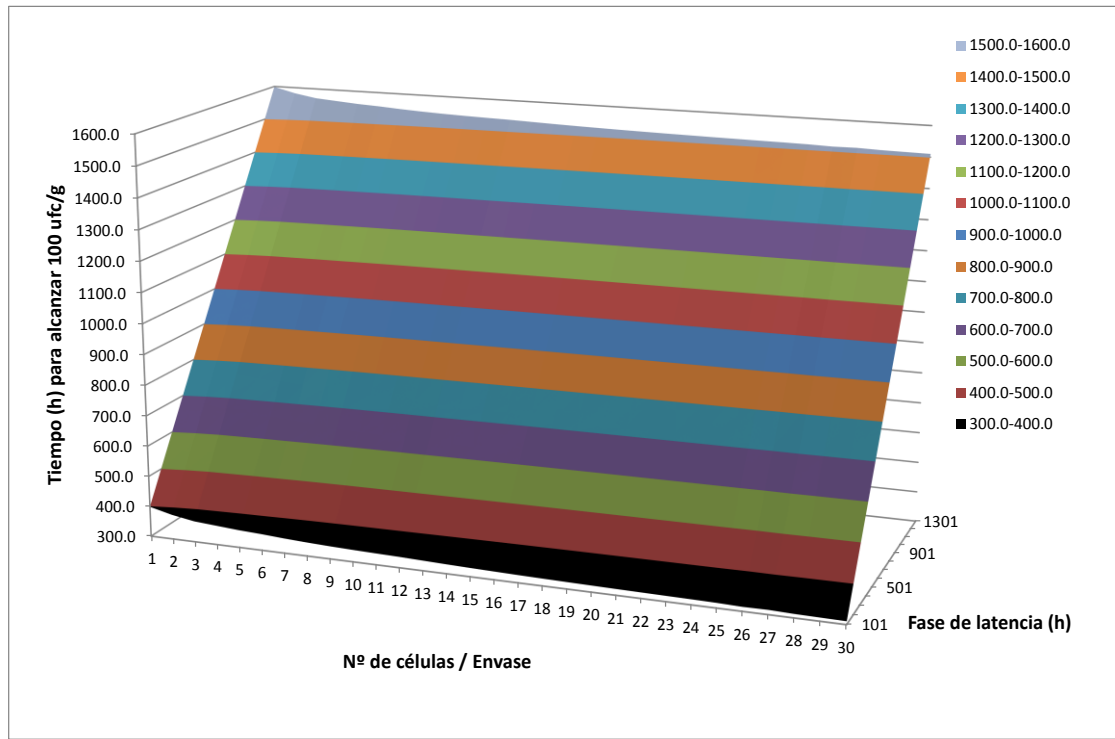
Para complementar la Tabla 8, se ha generado otra (Tabla 9) y la Figura 27, en las que se especifican los tiempos necesarios para alcanzar 100 ufc/g, la cantidad de *L. monocytogenes* que no debe alcanzarse, en cada una de las condiciones mostradas en la Tabla 8, siempre en las condiciones simuladas que venimos arrastrando en este ejemplo, es decir, almacenamiento a 4°C, para un tiempo de duplicación de 18 h. La simulación nos dice que los envases que alcanzan antes la tasa vetada son los que contienen 29 células y se caracterizan por tener la fase de latencia más corta, 101 horas. Se ha utilizado la cifra más baja de cada intervalo para simular el crecimiento por motivos de seguridad. Entonces, de acuerdo con las predicciones aquí desglosadas, podría fijarse una vida útil de menos de 311 horas, es decir, 12 días (288 h) y, teóricamente, se tendría una certeza casi completa de que ningún envase, de entre 1 millón, alcanzaría la tasa infectiva de *L. monocytogenes*.

**Tabla 9.** Tiempos necesarios para llegar a 100 ufc de *L. monocytogenes* /g a 4°C. Son predicciones a partir de las fases de latencia mínimas de los intervalos mostrados en la Tabla 8 y un tiempo de generación de 18 horas.

Nº cél /envase	Lag (h)												
	101	201	301	401	501	601	701	801	901	1001	1101	1201	1301
1	398.5	498.5	598.5	698.5	798.5	898.5	998.5	1098.5	1198.5	1298.5	1398.5	1498.5	1598.5
2	380.5	480.5	580.5	680.5	780.5	880.5	980.5	1080.5	1180.5	1280.5	1380.5	1480.5	1580.5
3	368.0	468.0	568.0	668.0	768.0	868.0	968.0	1068.0	1168.0	1268.0	1368.0	1468.0	1568.0
4	362.5	462.5	562.5	662.5	762.5	862.5	962.5	1062.5	1162.5	1262.5	1362.5	1462.5	1562.5
5	357.0	457.0	557.0	657.0	757.0	857.0	957.0	1057.0	1157.0	1257.0	1357.0	1457.0	1557.0
6	353.3	453.3	553.3	653.3	753.3	853.3	953.3	1053.3	1153.3	1253.3	1353.3	1453.3	1553.3
7	348.4	448.4	548.4	648.4	748.4	848.4	948.4	1048.4	1148.4	1248.4	1348.4	1448.4	1548.4
8	344.5	444.5	544.5	644.5	744.5	844.5	944.5	1044.5	1144.5	1244.5	1344.5	1444.5	1544.5
9	341.4	441.4	541.4	641.4	741.4	841.4	941.4	1041.4	1141.4	1241.4	1341.4	1441.4	1541.4
10	339.0	439.0	539.0	639.0	739.0	839.0	939.0	1039.0	1139.0	1239.0	1339.0	1439.0	1539.0
11	337.0	437.0	537.0	637.0	737.0	837.0	937.0	1037.0	1137.0	1237.0	1337.0	1437.0	1537.0
12	335.3	435.3	535.3	635.3	735.3	835.3	935.3	1035.3	1135.3	1235.3	1335.3	1435.3	1535.3
13	332.8	432.8	532.8	632.8	732.8	832.8	932.8	1032.8	1132.8	1232.8	1332.8	1432.8	1532.8
14	330.4	430.4	530.4	630.4	730.4	830.4	930.4	1030.4	1130.4	1230.4	1330.4	1430.4	1530.4
15	328.3	428.3	528.3	628.3	728.3	828.3	928.3	1028.3	1128.3	1228.3	1328.3	1428.3	1528.3
16	326.5	426.5	526.5	626.5	726.5	826.5	926.5	1026.5	1126.5	1226.5	1326.5	1426.5	1526.5
17	324.8	424.8	524.8	624.8	724.8	824.8	924.8	1024.8	1124.8	1224.8	1324.8	1424.8	1524.8
18	323.4	423.4	523.4	623.4	723.4	823.4	923.4	1023.4	1123.4	1223.4	1323.4	1423.4	1523.4
19	322.1	422.1	522.1	622.1	722.1	822.1	922.1	1022.1	1122.1	1222.1	1322.1	1422.1	1522.1
20	321.0	421.0	521.0	621.0	721.0	821.0	921.0	1021.0	1121.0	1221.0	1321.0	1421.0	1521.0
21	319.9	419.9	519.9	619.9	719.9	819.9	919.9	1019.9	1119.9	1219.9	1319.9	1419.9	1519.9
22	319.0	419.0	519.0	619.0	719.0	819.0	919.0	1019.0	1119.0	1219.0	1319.0	1419.0	1519.0
23	318.1	418.1	518.1	618.1	718.1	818.1	918.1	1018.1	1118.1	1218.1	1318.1	1418.1	1518.1
24	317.3	417.3	517.3	617.3	717.3	817.3	917.3	1017.3	1117.3	1217.3	1317.3	1417.3	1517.3
25	316.2	416.2	516.2	616.2	716.2	816.2	916.2	1016.2	1116.2	1216.2	1316.2	1416.2	1516.2
26	314.0	414.0	514.0	614.0	714.0	814.0	914.0	1014.0	1114.0	1214.0	1314.0	1414.0	1514.0
27	314.8	414.8	514.8	614.8	714.8	814.8	914.8	1014.8	1114.8	1214.8	1314.8	1414.8	1514.8
28	312.4	412.4	512.4	612.4	712.4	812.4	912.4	1012.4	1112.4	1212.4	1312.4	1412.4	1512.4
29	311.3	411.3	511.3	611.3	711.3	811.3	911.3	1011.3	1111.3	1211.3	1311.3	1411.3	1511.3
30	310.3	410.3	510.3	610.3	710.3	810.3	910.3	1010.3	1110.3	1210.3	1310.3	1410.3	1510.3

La Figura 27 permite observar que en las condiciones analizadas, el tiempo preciso para llegar a la dosis infectiva depende fundamentalmente de la fase de latencia, por lo

que puede comprenderse la imperiosa necesidad de conocer a la perfección este valor para poder determinar con unas mínimas garantías sanitarias la vida útil del alimento.

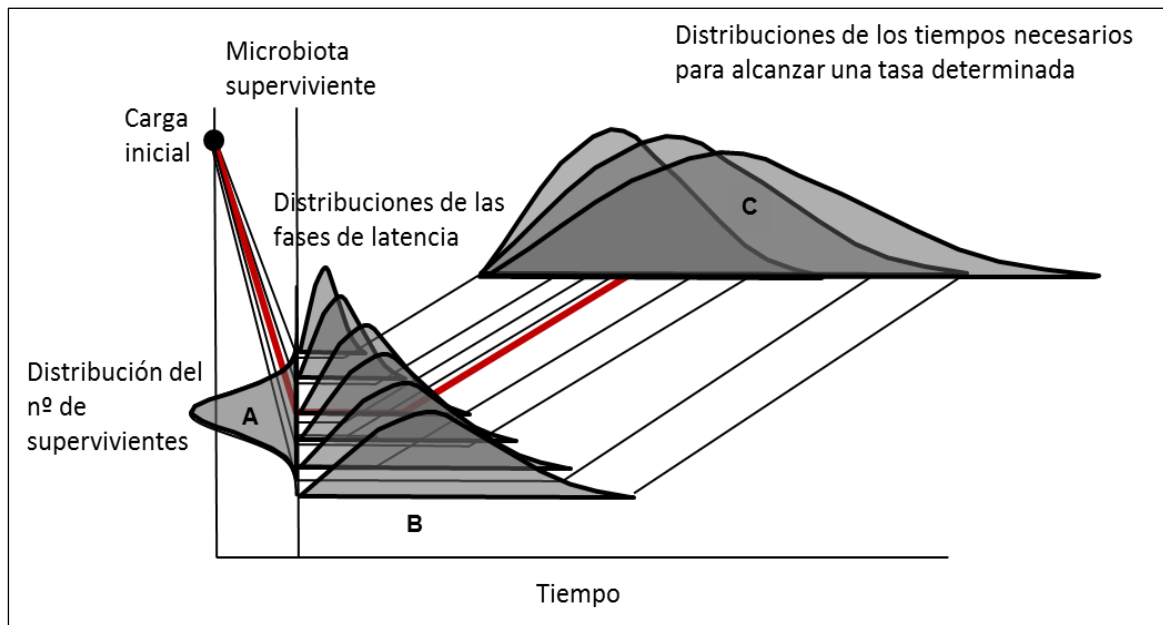


**Figura 27.** Tiempo necesario para alcanzar 100 ufc de *L. monocytogenes* /g de producto a 4°C. Son predicciones a partir de las fases de latencia mínimas de los intervalos mostrados en la Tabla 8 y un tiempo de generación de 18 horas.

Si se diera 1 día más de vida útil, es decir, 13 días o 312 h, la predicción dice que el 1,3 % de los envases habrían alcanzado la dosis infectiva. Esa cifra proviene de la suma de porcentajes de los envases con 28, 29 y 30 células y con una fase de latencia de 101 horas. En realidad, considerando que el intervalo de fases de latencia con el que se ha trabajado es de 100 horas y que se ha predicho el crecimiento a partir de la fase de latencia mínima, es muy poco probable que en esos 13 días un envase pudiera contener las infectivas 100 células. Al industrial le quedaría la responsabilidad de sopesar los posibles beneficios o perjuicios que pudieran significarle esas 24 horas de vida útil de más.

Antes de terminar esta discusión, parece más que justificado volver a incidir, a modo de resumen colofón final, en la importancia que tiene la variabilidad, tanto de la inactivación microbiana como de la fase de latencia de los microorganismos que superan

un tratamiento conservante y forman la microbiota que puede crecer en un producto, significando un riesgo sanitario o de deterioro. Fijémonos en la Figura 28; en ella se aprecian tres distribuciones que son críticas para el control microbiológico de los alimentos.



**Figura 28.** Simulación de la evolución de la carga microbiana de un producto sometido a un tratamiento conservante que deja un número determinado de viables, ilustrado con la distribución de frecuencias A. Dependiendo del tratamiento conservante y del número de viables que queden, se tendrá una de las posibles distribuciones de frecuencias de fases de latencia (distribuciones B). A cada fase de latencia le corresponderá una determinada fase de crecimiento exponencial que hará que se alcance una determinada concentración microbiana en unos tiempos variables, ilustrados por las distribuciones C.

La primera distribución (A), la del número de supervivientes, se ajusta a una distribución normal y su amplitud depende de la intensidad del tratamiento microbicida. Cuanto más intenso, menor será el número de supervivientes, pero más variable. La segunda distribución, B, en realidad pueden ser muchas, tal como se muestra en la Figura 28, corresponde a las fases de latencia y adquieren la típica forma de una distribución gamma, con una cola más larga hacia la derecha. La amplitud de la distribución de las fases de latencia depende de diversos factores. A destacar son la intensidad del tratamiento al que hayan sobrevivido las bacterias o, generalizando algo más, las condiciones por las que hayan pasado, y la cantidad de microorganismos presentes. Cuanto mayor es el número de viables en una muestra, más estrecha será la distribución. Cuanto más intenso haya sido el tratamiento conservante (estrés previo) al que sobrevive

la población, más dispersa será la distribución. ¿Por qué aparecen muchas distribuciones de fases de latencia en la gráfica? Porque a cada condición que pueda darse (por ejemplo, para cada par tiempo temperatura con un efecto microbicida concreto), le corresponderá un número variable de supervivientes y a cada número de supervivientes, le corresponde una distribución de fases de latencia. Afortunadamente, en esta tesis se ha demostrado que esta variabilidad puede modelarse y predecirse, por lo que conociendo la carga inicial del producto y la intensidad del tratamiento conservante pueden predecirse ambas distribuciones, la del número de supervivientes y la de sus fases de latencia.

Si se conoce la distribución de las fases de latencia y se conoce la  $\mu_{max}$  de la microbiota presente, puede predecirse fácilmente la distribución de los tiempos que tardará la población en alcanzar una determinada concentración (distribuciones C). Nuevamente se muestran varias distribuciones porque a cada tratamiento conservante le corresponderá una distribución del número de supervivientes (A) y a cada número de supervivientes, le corresponderá una distribución de fases de latencia (B) y para cada fase de latencia le corresponderá una única fase de crecimiento exponencial porque consideramos  $\mu_{max}$  constante. En la Figura 28, la distribución C es más dispersa que las A y B porque es resultado de la combinación de las anteriores y, lógicamente, es de esperar que sea más ancha.

Si se modelan las distribuciones esquematizadas en la Figura 28 para el caso particular de un producto, y la validación de tales modelos homologa su aplicación, la industria dispondrá de una herramienta efficacísima para ajustar sus tratamientos y podrá ejercer un control preciso y riguroso de sus procesos, cuantificando con mayor precisión que hasta el momento los riesgos microbiológicos que esté dispuesta a asumir, siempre desde una perspectiva probabilística, disminuyendo la incertidumbre que el azar y el desconocimiento conllevan.

FIN



## **VI. CONCLUSIONES**

---



## **VI. CONCLUSIONES**

**PRIMERA.** La inactivación microbiana está sujeta a cierta variabilidad, que puede cuantificarse y modelarse matemáticamente.

**SEGUNDA.** 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 modelo.

**TERCERA.** Cada tratamiento conservante implica un grado de variabilidad de la inactivación propio. Los tratamientos térmicos conllevan una mayor variabilidad que los de irradiación con electrones acelerados, aunque las diferencias no suelen ser significativas.

**CUARTA.** La variabilidad de la inactivación es menor en fase estacionaria que en las otras fases del crecimiento microbiano.

**QUINTA.** La fase de latencia de los microorganismos está sujeta a cierta variabilidad, que puede cuantificarse y modelarse matemáticamente.

**SEXTA.** 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 substrato donde crece el microorganismo es más complejo y cuando la temperatura de crecimiento se aleja de la óptima.

**SÉPTIMA.** Los tratamientos térmicos conllevan una menor fase de latencia y una mayor variabilidad que los de irradiación con electrones acelerados, aunque las diferencias no suelen ser significativas.

**OCTAVA.** Desde el punto de vista de la variabilidad, la irradiación es una excelente alternativa a los tratamientos térmicos porque, tanto para la inactivación como para la fase de latencia de los supervivientes a los tratamientos, arroja resultados más homogéneos, menos variables.

**NOVENA.** Los factores que contribuyen a prolongar la fase de latencia de un microorganismo, aumentan también su variabilidad.

**DÉCIMA.** Cuanto menor es el tamaño del inóculo, más larga y variable es la fase de latencia de la población por dos motivos: a) es más probable que haya una célula con fase de latencia corta que reduce la de la población y b) 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.

**UNDÉCIMA.** La inclusión de la variabilidad en los modelos predictivos es fundamental para que las predicciones del comportamiento microbiano sean más realistas y seguras.

**DUODÉCIMA.** La aplicación de modelos predictivos que contemplan la variabilidad de la inactivación y de la fase de latencia es útil para la estimación de la probabilidad de que una población microbiana se desarrolle. Quizás sea en los alimentos listos para el consumo y en los mínimamente procesados donde pueda sacarse más provecho de la aplicación de tales modelos.

**DECIMOTERCERA.** Es obvio que cualquier plan de análisis de riesgos y control de puntos críticos debe considerar la variabilidad de la inactivación y de la fase de latencia microbiana y es muy recomendable que aplique modelos matemáticos que contemplan tal variabilidad.

**DECIMOCUARTA.** En la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico es crucial conocer el nivel de contaminación, no solo porque este número es importante en sí mismo, sino también porque tiene influencia directa en la duración y variabilidad de la fase de latencia.

## **VI. CONCLUSIONS**

---



## **VI. CONCLUSIONS**

**FIRST.** Microbial inactivation shows variability, which can be quantified and modeled mathematically.

**SECOND.** The more intense a preservation treatment is, the smaller is the number of survivors, but the greater is the variability in that number. This variability is greater in foods than in model systems.

**THIRD.** Each preservation treatment induces a certain variability of inactivation. Thermal treatments are associated with greater variability than treatments with accelerated electrons, although the differences usually do not reach statistical significance.

**FOURTH.** Variability of inactivation is lower when bacteria are treated during the stationary phase than during other stages of growth.

**FIFTH.** The lag phase of microorganisms shows variability, which can be quantified and modeled mathematically.

**SIXTH.** The more intense the preservation treatment is, the longer and more variable is the lag phase of the surviving microorganisms. This variability is greater when the microorganism is growing on a complex substrate and when the growth temperature is far from optimal.

**SEVENTH.** Thermal treatments induce a shorter and more variable lag phase than are treatments with accelerated electrons, although the differences usually do not reach statistical significance.

**EIGHTH.** Irradiation is an excellent alternative to thermal treatment because it gives more homogeneous (less variable) results with respect to the number of survivors and their lag phases.

**NINTH.** The factors that help prolong microbial lag phase also increase its variability.

**TENTH.** The smaller the inoculum is, the longer and more variable is the lag phase of the population. This is true for two reasons: a) there is more likely to be a cell with a short lag phase that reduces the population lag phase; b) a mechanism of intercellular cooperation may exist that shortens the population lag phase, even when the population contains only a few dozen cells.

**ELEVENTH.** Including variability in predictive models is essential for making predictions of microbial behavior more accurate and safer.

**TWELFTH.** Predictive models that take into account the variability of inactivation and of the lag phase are useful for estimating the probability that a microbial population will grow. Such models may prove most useful in the context of ready-to-eat and minimally processed foods.

**THIRTEENTH.** It is clear that any risk analysis or critical point assessment should take into account the variability of microbial inactivation and of the lag phase. Such analyses would do well to apply mathematical models that include this variability.

**FOURTEENTH.** Determining the level of microbiological contamination is crucial for quantitative microbial risk assessment, not only because the level is important in itself, but also because it directly influences lag phase duration and variability.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

---



## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Baranyi, J. y Roberts, T.A., *Mathematics of predictive food microbiology*. International Journal of Food Microbiology, 1995. 26(2): p 199-218.
2. Esty, J.R. y Meyer, K.F., *The Heat Resistance of B. Botulinus botulinus and allied anaerobes*. Journal of Infectious Diseases, 1922. 31: p. 650-663.
3. Ball, C.O., *Thermal process time for canned food*. B. National Research Council, 1923. 7: p. 1-76.
4. Scott, W.J., *The growth of microorganisms on ox muscle. I. The influence of water content of substrate on rate of growth at -1 °C*. Journal of Council Science Industrial Research of Australia, 1936. 9: p. 177-182.
5. Scott, W.J., *The growth of microorganisms on ox muscle. II. The influence of temperature*. Journal of Council Science Industrial Research of Australia, 1937. 10: p. 338-350.
6. McMeekin, T.A., Olley, J., Ross, T., y Ratkowsky D., *Predictive microbiology*, ed. J.W.S. Ltd. 1993, Chichester, UK.
7. McKellar, R.C. y Lu, X., *Modelling Microbial Responses in Foods*, ed. C. press. 2003, Boca Raton, Fla. EEUU.
8. Fratamico, P.M., Bhunia, A.K., y Smith, J.L., *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*, ed. C.A. Press. 2005, Norfolk, UK.
9. UE, *Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de las Comunidades Europeas de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios*, ed. DO L 338 de 22 de Diciembre 2005.p. 1-33.
10. AESAN, *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para Listeria monocytogenes en determinados productos alimenticios*, ed. Revista del Comité Científico de la AESAN N° 14. 2011. p. 43-63., Madrid, España.
11. Roberts, T.A. y Jarvis, B, *Predictive modelling of food safety with particular reference to Clostridium botulinum in model cured meat systems*. Society of Applied Bacteriology Symposium Ser, 1983. 11: p. 85-95.
12. DRAE, *Diccionario de la lengua española*. 2001, Real Academia Española, 22ª edición. p. 1-9.
13. Ramos, A., Sánchez, P., Ferrer, J., Barquín, J., y Linares, P., *Modelos matemáticos de optimización*, in *Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Departamento de Organización Industrial*. 2011, Universidad Pontificia Comillas: Madrid, España.
14. McDonald, K. y Sun D.W., *Predictive food microbiology for the meat industry: a review*. International Journal of Food Microbiology, 1999. 52(1-2): p. 1-27.
15. Whiting, R.C. y Buchanan, R., *A Classification of models in predictive microbiology- a replay to K.R. Davey*. Food Microbiology 1993. 10: p. 175-177.
16. Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J., y Van Impe, J.F., *Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling*. International Journal of Food Microbiology, 2004. 91(3): p. 229-44.

17. Gibson, A.M., Bratchell, N., y Roberts, T.A., *The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of Clostridium botulinum type A in pasteurized pork slurry*. Journal of Applied Bacteriology, 1987. 62(6): p. 479-90.
18. Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Cenens, C., y Van Impe, J.F., *Application of artificial neural networks as a non-linear modular modeling technique to describe bacterial growth in chilled food products*. International Journal of Food Microbiology, 1998. 44(1-2): p. 49-68.
19. Davey, K.R., *Modelling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth*. International Journal of Food Microbiology, 1994. 23(3-4): p. 295-303.
20. Davey, K.R., *A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase*. Journal of Applied Bacteriology, 1989. 67(5): p. 483-8.
21. Davey, K.R., *Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth*. Journal of Applied Bacteriology, 1991. 70: p. 253- 257.
22. Bazin, M.J. y Prosser, J.I., *Modelling microbial ecosystems*. Society of Applied Bacteriology Symposium Ser, 1992. 21: p. 89S-95S.
23. Baranyi, J. y Roberts, T.A., *A dynamic approach to predicting bacterial growth in food*. International Journal of Food Microbiology, 1994. 23(3-4): p. 277-94.
24. Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Martens, T., De Baerdemaeker, J., y Vandewalle, J., *Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing*. Applied and Environmental Microbiology, 1992. 58(9): p. 2901-9.
25. Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Schellekens, M., Martens, T., y De Baerdemaeker, J., *Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach*. International Journal of Food Microbiology, 1995. 25(3): p. 227-49.
26. Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., y Van't Riet, K., *Some aspects of modelling microbial quality of food*. Food Control, 1993. 4: p. 89- 96.
27. McKellar, R.C. y Lu, X., *Modelling Microbial Responses in Foods*, ed. C. press. 2003, Boca Raton, Fla. EEUU.
28. van Boekel, M.A., *Statistical aspects of kinetics modelling for food science problems*. Journal of Food Science, 1996. 61: p. 477- 485.
29. Baranyi, J., Robinson, T.P., Kaloti, A., y Mackey, B.M., *Predicting growth of Brochothrix thermosphacta at changing temperature*. International Journal of Food Microbiology, 1995. 27(1): p. 61-75.
30. Gibson, A.M., Bratchell, N., y Roberts, T.A., *Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature*. International Journal of Food Microbiology, 1988. 6(2): p. 155-78.
31. McClure, P.J., Cole, M.B., y Davies, K.W., *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*. International Journal of Food Microbiology, 1994. 23(3-4): p. 359-75.

32. 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., *Quantitative microbiology: a basis for food safety*. Emerging Infectious Diseases, 1997. 3(4): p. 541-9.
33. Ross, T. y McMeekin, T.A., *Predictive microbiology and HACCP*. En: Advances in Meat Research: HACCP in Meat, Poultry and Fish Processing 10. 1995, UK: Chapman and Hall. 330-357.
34. Roberts, T.A., *Microbial growth and survival: developments in predictive modelling*. Food Technology, 1997. 51.
35. Buchanan, R.L., *Predictive food microbiology*. Trends in Food Science, 1993. 4: p. 4 -11.
36. Ratkowsky, D.A. y Ross, T., *Modelling the bacterial growth/ no growth interface*. Letter of Applied Microbiology, 1995. 20(1): p. 29-33.
37. Presser, K.A., Ross, T., y Ratkowsky, D.A., *Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of Escherichia coli as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity*. Applied and Environmental Microbiology 1998. 64(5): p. 1773-1779.
38. Swinnen, I.A., Bernaerts, K., Dens, E.J., Geeraerd, A.H., y Van Impe, J.F., *Predictive modelling of the microbial lag phase: a review*. International Journal of Food Microbiology, 2004. 94(2): p. 137-159.
39. Zwietering, M.H., I. Jongenburger, F.M. Rombouts, y K. van 't Riet, *Modeling of the Bacterial Growth Curve*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. 56(6): p. 1875-1881.
40. Hills, B.P. yK.M. Wright, *A new model for bacterial growth in heterogeneous systems*. J Theor Biol, 1994. 168(1): p. 31-41.
41. McKellar, R.C., *A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics*. International Journal of Food Microbiology, 1997. 36(2-3): p. 179-186.
42. Buchanan, R.L., R.C. Whiting, y W.C. Damert, *When is simple good enough. Comparison of the Gompertz, Baranyi and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves*. Food microbiology, 1997. 14: p. 313-326.
43. Ratkowsky, D.A., J. Olley, T.A. McMeekin, y A. Ball, *Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures*. J Bacteriol, 1982. 149(1): p. 1-5.
44. Huang, L., A. Hwang, y J. Phillips, *Effect of temperature on microbial growth rate-mathematical analysis: the arrhenius and eyring-polanyi connections*. J Food Sci, 2011. 76(8): p. E553-60.
45. Buchanan, R.L. yJ.G. Phillips, *Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of Listeria monocytogenes*. Journal of food protection, 1990. 53: p. 370-376.
46. McClure, P.J., J. Baranyi, E. Boogard, T.M. Kelly, y T.A. Roberts, *A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of Brochothrix thermosphacta*. International Journal of Food Microbiology, 1993. 19(3): p. 161-718.

47. Zurera-Cosano, G., Castillejo-Rodriguez, A.M., Garcia-Gimeno, R.M., y Rincon-Leon, F., *Performance of response surface and Davey model for prediction of Staphylococcus aureus growth parameters under different experimental conditions*. Journal of Food Protection, 2004. 67(6): p. 1138-1145.
48. Horowitz, J., Normand, M.D., Corradini, M.G., y Peleg, M., *Probabilistic model of microbial cell growth, division, and mortality*. Applied and Environmental Microbiology, 2010. 76(1): p. 230-242.
49. Garcia-Gimeno, R.M., Hervas-Martinez, C., Rodriguez-Perez, R., y Zurera-Cosano, G., *Modelling the growth of Leuconostoc mesenteroides by Artificial Neural Networks*. International Journal of Food Microbiology, 2005. 105(3): p. 317-332.
50. Buchanan, R.L., Smith, J.L., McColgan, C., Marner, B.S., Golden, M.H., y Dell, B., *Response surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the aerobic and anaerobic growth of Staphylococcus aureus 196E*. Journal of Food Safety, 1993. 13: p. 159-175.
51. Whiting, R.C., *Microbial modeling in foods*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1995. 35(6): p. 464-494.
52. Whiting, R.C. y Buchanan, R., *Microbial modelling*. Food Technology, 1994. 48: p. 113- 120.
53. Baranyi, J. y Tamplin, M.L., *ComBase: a common database on microbial responses to food environments*. Journal of Food Protection, 2004. 67(9): p. 1967-1971.
54. Buchanan, R.L. y Klawitter, L.A., *Effect of temperature history on the growth of Listeria monocytogenes Scott A at refrigeration temperatures*. International Journal of Food Microbiology, 1991. 12(2-3): p. 235-245.
55. Dalgaard, P., Buch, P., y Silberg, S., *Seafood Spoilage Predictor--development and distribution of a product specific application software*. International Journal of Food Microbiology, 2002. 73(2-3): p. 343-349.
56. Ross, T., Ratkowsky, D.A., Mellefont, L.A., y McMeekin, T.A., *Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of Escherichia coli*. International Journal of Food Microbiology, 2003. 82(1): p. 33-43.
57. McClure, P.J., Blackburn, C.W., Cole, M.B., Curtis, P.S., Jones, J.E., Legan, J.D., Ogden, I.D., Peck, M.W., Roberts, T.A., y Sutherland, J.P., *Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK food micromodel approach*. International Journal of Food Microbiology, 1994. 23(3-4): p. 265-275.
58. MicroHibro, <http://www.microhibro.com/>. 2012.
59. Dalgaard, P. y Jorgensen, L.V., *Predicted and observed growth of Listeria monocytogenes in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon*. International Journal of Food Microbiology, 1998. 40(1-2): p. 105-115.
60. te Giffel, M.C. y Zwietering, M.H., *Validation of predictive models describing the growth of Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 1999. 46(2): p. 135-149.
61. Rodriguez Perez, M., *Desarrollo y Validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial en productos cárnicos*, in *Depto de Bromatología y Tecnología de los Alimentos*. 2003, Universidad de Córdoba: Córdoba. p. 274.

62. Pin, C. y Baranyi, J., *Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms*. International Journal of Food Microbiology, 1998. 41(1): p. 59-72.
63. Breidt, F. y Fleming, H.P., *A theoretical model for the competitive growth of bacteria on food surfaces*. In: *Food Microbiology and Food Safety into the next Millennium*. in *Seventeenth International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH)*. 1999. Netherlands.
64. Vereecken, K.M. y J.F. Van Impe, *Analysis and practical implementation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 2002. 73(2-3): p. 239-250.
65. Vereecken, K.M., Devlieghere, F., Bockstaele, A., y Van Impe, J.F., *A model for lactic acid-induced inhibition of Yersinia enterocolitica in mono- and co-culture with Lactobacillus sakei*. Food Microbiol, 2003. 20: p. 701-713.
66. Wilson, P.D. *Microbial modelling in structured foods*. in *Predictive Modelling in Foods*. 2000. KULeuven/BioTeC, Belgium.
67. Vereecken, K.M., Bernaerts, K., Boelen, T., Dens, E.J., Geeraerd, A.H., y Van Impe, J.F., *State of the art in predictive food microbiology*. Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent., 1998. 63(4): p. 1429-1437.
68. Hills, B.P., Manning, C.E., Ridge, Y., y Brocklehurst, T., *Water availability and the survival of Salmonella typhimurium in porous systems*. International Journal of Food Microbiology, 1997. 36(2-3): p. 187-198.
69. Brocklehurst, T.F. y Wilson, P., *The role of lipids in controlling microbial growth*. Grasas y Aceites, 2000. 51: p. 66-73.
70. Wimpenny, J.W., Leistner, L., Thomas, L.V., Mitchell, A.J., Katsaras, K., y Peetz, P., *Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions*. International Journal of Food Microbiology, 1995. 28(2): p. 299-315.
71. Dens, E.J. y Van Impe, J.F., *On the importance of taking space into account when modelling microbial competition in structured foods*. Mathematics and Computers in Simulation, 2000. 53(4-6): p. 443-448.
72. Begot, C., Lebert, I., y Lebert, A., *Variability of the response of 66 Listeria monocytogenes and Listeria innocua strains to different growth conditions*. Food Microbiology, 1997. 14(403-412).
73. Zwietering, M.H., *Quantitative risk assessment: is more complex always better? Simple is not stupid and complex is not always more correct*. International Journal of Food Microbiology, 2009. 134(1-2): p. 57-62.
74. Annino, J.S. y E.C. Russell, *The ten most frequent causes of simulation analysis failure and how to avoid them*. Simulation, 1979. 32: p. 137-140.
75. Valero, A., *Aplicaciones de modelos predictivos en evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en alimentos minimamente procesados*, in *Depto de Bromatología y Tecnología de los Alimentos*. 2006, Universidad de Córdoba: Córdoba. p. 362.
76. Hyndman, R.J. y Kostenko, A.V., *Minimum sample size requirements for seasonal forecasting models*. Foresight, 2007(6): p. 12-15.

77. Poschet, F. y Van Impe, J.F., *Quantifying the uncertainty of model outputs in predictive microbiology: a Monte-Carlo analysis*. Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent, 1999. 64(5): p. 499-506.
78. Baty, F. y Delignette-Muller, M.L., *Estimating the bacterial lag time: which model, which precision?* International Journal of Food Microbiology, 2004. 91(3): p. 261-277.
79. Walker, S.J. y Jones, J.E., *Protocols for data generation for predictive modelling*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1993. 12: p. 273 - 276.
80. Baranyi, J., Ross, T., McMeekin, T., y T. Roberts, *Effects of parameterization on the performance of empirical models used in predictive microbiology*. Food Microbiology, 1996. 13: p. 83-91.
81. Delignette-Muller, M.L., Rosso, L., y Flandrois, J.P., *Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models*. International Journal of Food Microbiology, 1995. 27(2-3): p. 139-146.
82. Barbosa-Canovas, G.V., Tapia, M., y Pilar Cano, M., *Novel Food Processing Technologies*, ed. C. Press. 2005.
83. Sutherland, J.P. y Bayliss, A.J., *Predictive modelling of growth of Yersinia enterocolitica: the effects of temperature, pH and sodium chloride*. International Journal of Food Microbiology, 1994. 21(3): p. 197-215.
84. Ratkowsky, D.A., *Principles of nonlinear regression modeling*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1993. 12(3-5): p. 195-199.
85. Ernstberger, S.L., *Sensitivity methods for dynamical systems*, in *Computational Mathematics*. 2008, North Carolina State University: Raleigh, North Carolina, USA.
86. Rasch, M., *Experimental design and data collection*. In: *Modelling microbial responses in food*. CRC Series in Contemporary Food Science, ed. R.C.M.a.X.L. (ed.). Vol. 1-14. 2004.
87. Bratchell, N., Gibson, A.M., Truman, M., Kelly, T.M., y Roberts, T.A., *Predicting microbial growth: the consequences of quantity of data*. International Journal of Food Microbiology, 1989. 8(1): p. 47-58.
88. Poschet, F., Bernaerts, K., Geeraerd, A.H., Scheerlinck, N., Nicolai, B.M., y Van Impe, J.F., *Sensitivity analysis of microbial growth parameter distribution with respect of data quality and quantity by using Monte Carlo analysis*. Mathematics and Computers in Simulation, 2004. 65: p. 231- 243.
89. Anderson, M. y Calderón, V., *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Segunda edición, ed. E.D.d.S. S.a. 1999, Madrid, España. p. 125 - 138.
90. Food and Drug Administration (FDA), *Bacteriological Analytical Manual*, Bureau of Foods. Division of Microbiology. Ed., 6a. 1984 Washington DC, USA.
91. McMeekin, T.A., Olley, J., Ross, T., y Ratkowsky, D., *Predictive microbiology: Theory and Application*, ed. J.W.S. Ltd. 1993, Chichester, UK.
92. Firstenberg-Eden, R. y Eden, G., *Impedance Microbiology*, ed. J.W. Sons. 1984, New York, USA. 170.
93. Lindberg, C.W. y Borch, E., *Predicting the aerobic growth of Y. enterocolitica O:3 at different pH-values, temperatures and L-lactate concentrations using conductance measurements*. International Journal of Food Microbiology, 1994. 22(2-3): p. 141-153.

94. Fehlhaber, K. y Kruger, G., *The study of Salmonella enteritidis growth kinetics using Rapid Automated Bacterial Impedance Technique*. J Appl Microbiol, 1998. 84(6): p. 945-949.
95. Koutsoumanis, K., Tassou, C.C., Taoukis, P.S., y Nychas, G.J., *Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on Salmonella enteritidis as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements*. Journal of Applied Microbiology, 1998. 84(6): p. 981-987.
96. Davey, H.M. y Kell, D.B., *Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses*. Microbiology Review, 1996. 60(4): p. 641-696.
97. Novo, D., Perlmutter, N., Hunt, R., y Shapiro, H., *Multiparameter flow cytometry analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability and bacterial counts of Staphylococcus aureus and Micrococcus luteus*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. 44: p. 827- 834.
98. Santiesteban-Lopez, N.A. y Lopez-Malo, A, *Descripción e importancia de algunos modelos predictivos utilizados como herramienta para la conservación de alimentos*. Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos, 2008. 2(2): p. 14- 26.
99. Sorensen, B.B. y Jakobsen, M., *The combined effects of temperature, pH and NaCl on growth of Debaryomyces hansenii analyzed by flow cytometry and predictive microbiology*. International Journal of Food Microbiology, 1997. 34(3): p. 209-220.
100. Bajaj, V.K., Rai, T., y Kanawjia, S.K., *Biotechnological applications for analysis of food and food additives*. Indian Dairyman, 1991. 43: p. 505- 513.
101. Baumgart, J., *Rapid detection of microorganisms in factory laborios (Schnellnachweis von Mikroorganismen im Betrieslabor)*. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 1992. 82: p. 579-588.
102. McClure, P.J., Cole, M.B., Davies, K.W., y Anderson, W.A., *The use of automated turbidimetric data for the construction of kinetic models*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1993. 12: p. 277 - 285.
103. Begot, C., Desnier, I., Daudin, J.D., Labadie, J.C., y Lebert, A., *Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements*. Journal of Microbiological Methods, 1996. 25: p. 225 - 232.
104. Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L., y Tomassone, R., *A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration*. International Journal of Food Microbiology, 1997. 46(3): p. 251-261.
105. Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., y McMeekin, T.A., *Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data*. International Journal of Food Microbiology, 1994. 23(3-4): p. 391-404.
106. Chorin, E., Thuault, D., Cleret, J.J., y Bourgeois, C.M., *Modelling Bacillus cereus growth*. International Journal of Food Microbiology, 1997. 38(2-3): p. 229-234.
107. Hudson, J.A., *Effect of pre-incubation temperature on the lag time of Aeromonas hydrophila*. Letter of Applied Microbiology, 1993. 16: p. 274-276.

108. Hudson, J.A. y Mott, S.J., *Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of Pseudomonas fragi*. Journal of Food Safety, 1994. 14: p. 329- 339.
109. McKellar, R.C. y Hawke, A., *Assessment of distributions for fitting lag times of individual cells in bacterial populations*. International Journal of Food Microbiology, 2006. 106(2): p. 169-175.
110. Aguirre, J.S., Rodriguez, M.R., y Garcia 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): p. 236-246.
111. Wu, Y., Griffiths, M.W., y McKellar, R.C., *A comparison of the bioscreen method and microscopy for the determination of lag times of individual cells of listeria monocytogenes*. Letter of Applied Microbiology, 2000. 30(6): p. 468-472.
112. 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*. 2003b. Katholieke Universiteit Leuven/BioTec, Belgium: In: Van Impe, J. F.M, Geeraerd, A.H., Leguérinel, I.
113. Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., y Debevere, J., *Modelling the individual cell lag phase. Isolating single cells: protocol development*. Letter of Applied Microbiology, 2003a. 37(1): p. 26-30.
114. Rattanasomboon, N., Bellara, S.R., Harding, C.L., Fryer, P.J., Thomas, C.R., Al-Rubeai, M., y McFarlane, C.M., *Growth and enumeration of the meat spoilage bacterium Brochothrix thermosphacta*. International Journal of Food Microbiology, 1999. 51(2-3): p. 145-158.
115. Bioscreen. <http://www.bioscreen.fi/index.html>. 2002
116. Orskov, J., *Method for the isolation of bacteria in pure culture from single cells and procedure for the direct tracing of bacterial growth on a solid medium*. Journal of Bacteriology, 1922. 7(6): p. 537- 549.
117. Kelly, C.D. y Rahn, O., *The Growth Rate of Individual Bacterial Cells*. Journal of Bacteriology, 1932. 23(2): p. 147-153.
118. Powell, E.O., *An improved culture chamber for the study of living bacteria*. J R Microsc Soc, 1956. 75(4): p. 235-243.
119. Berg, H.C. y Block, S.M., *A miniature flow cell designed for rapid exchange of media under high-power microscope objectives*. Journal of General Microbiology, 1984. 130(11): p. 2915-2920.
120. Lawrence, J.R., Korber, D.R., y Caldwell, D.E., *Computer-enhanced darkfield microscopy for the quantitative analysis of bacterial growth and behaviour on surfaces*. Journal of Microbiological Methods, 1989. 10: p. 123- 128.
121. James, G.A., Korber D.R., Caldwell, D.E., y Costerton, J.W., *Digital Image Analysis of Growth and Starvation Responses of a Surface-Colonizing Acinetobacter sp.* Journal of Bacteriology, 1995. 177(4): p. 907-915.
122. Caldwell, D.E. y Lawrence, J.F., *Growth kinetics of Pseudomonas fluorescens microcolonies within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments*. Microb Ecol, 1986. 12: p. 299-312.

123. Elfving, A., LeMarc, Y., Baranyi, J., y Ballagi, A., *Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. 70(2): p. 675-678.
124. Niven, G.W., Fuks, T., Morton, J.S., Rua, S.A., y Mackey, B.M., *A novel method for measuring lag times in division of individual bacterial cells using image analysis*. Journal of Microbiology Methods, 2006. 65(2): p. 311-317.
125. Niven, G.W., Morton, J.S., Fuks, T., y Mackey, B.M., *Influence of environmental stress on distributions of times to first division in Escherichia coli populations, as determined by digital-image analysis of individual cells*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. 74(12): p. 3757-3763.
126. Koutsoumanis, K.P. *Behavioral noise and colonial growth dynamics of single microbial cells*. in *6th International Conference on Predictive Modeling in Foods*. 2009. Washington, 8th-12th Septiembre. USA.
127. Smits, W.K., Kuipers, O.P., y Veening, J.W., *Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation*. Nature Reviews Microbiology, 2006. 4(4): p. 259-271.
128. Wakamoto, Y., Inoue, I., Moriguchi, H., y Yasuda, K., *Analysis of single-cell differences by use of an on-chip microculture system and optical trapping*. Fresenius Journal Analytical Chemistry, 2001. 371(2): p. 276-281.
129. Siegal-Gaskins, D. y Crosson, S., *Tightly regulated and heritable division control in single bacterial cells*. Biophys J, 2008. 95(4): p. 2063-2072.
130. Baranyi, J., Pin, C., y Ross, T., *Validating and comparing predictive models*. International Journal of Food Microbiology, 1999. 48(3): p. 159-166.
131. Pin, C., Sutherland, J.P., y Baranyi, J., *Validating predictive models of food spoilage organisms*. Journal of Applied Microbiology, 1999. 87(4): p. 491-499.
132. Koutsoumanis, K. *Predictive microbiology tools for shelf life and safety management in the food chain*. in *SAFE Consortium/ AZTI-Tecnalia Food Safety Seminar*. 2010. Derio-Bilbao, 25 de Octubre, España.
133. Van Impe, J.F., Versyck, K.J., y Geeraerd, A.H., *Validation of predictive models: definitions and concepts*. *Predictive modellings of microbial growth and survival in foods*. , C.O.d.p.o.d.l.C. Europea, Editor. 1996: Luxemburgo. p. 31 - 38.
134. Whiting, R.C., *Microbial database building: what have we learned?* Food Technology, 1997. 51: p. 82 - 87.
135. Raevuori, M. y Genigeorgis, C., *Effect of pH and sodium chloride on growth of Bacillus cereus in laboratory media and certain foods*. Applied Microbiology, 1975. 29(1): p. 68-73.
136. Zhao, L., Montville, T.J., y Schaffner, D.W., *Time-to-detection, percent-growth-positive and maximum growth rate models for Clostridium botulinum 56A at multiple temperatures*. International Journal of Food Microbiology, 2002. 77(3): p. 187-197.
137. Ross, T. y McMeekin, T.A., *Predictive microbiology*. International Journal of Food Microbiology, 1994. 23(3-4): p. 241-264.
138. Jones, J.E., Walker, S.J., Sutherland, J.P., Peck, M.W., y Little, C.L., *Mathematical modelling of the growth, survival and death of Yersinia enterocolitica*. International Journal of Food Microbiology, 1994. 23(3-4): p. 433-447.

139. Zwietering, M.H., Cuppers, H.G., de Wit, J.C., y K. van 't Riet, *Evaluation of data transformation and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. 60(1): p. 195-203.
140. Wijtzes, T., McClure, P.J., Zwietering, M.H., y Roberts, T.A., *Modelling bacterial growth of Listeria monocytogenes as a function of water activity, pH and temperature*. International Journal of Food Microbiology, 1993. 18(2): p. 139-149.
141. Nerbrink, E., Borch, E., Blom, H., y Nesbakken, T., *A model based on absorbance data on the growth rate of Listeria monocytogenes and including the effects of pH, NaCl, Na-lactate and Na-acetate*. International Journal of Food Microbiology, 1999. 47(1-2): p. 99-109.
142. Sutherland, J.P., Bayliss, A.J., y Roberts, T.A., *Predictive modelling of growth of Staphylococcus aureus: the effects of temperature, pH and sodium chloride*. International Journal of Food Microbiology, 1994. 21(3): p. 217-236.
143. Perez, F., Valero, A., Todd, E.C., Carrasco, E., Garcia-Gimeno, R.M., y Zurera, G., *Modeling transfer of Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus during slicing of a cooked meat product*. Meat Science, 2007. 76(4): p. 692-699.
144. Hervas, C., Algar, J.A., y Silva, M., *Optimization of computational neural network for its application to the prediction of microbial growth in foods*. Food Science Technology International, 2001. 7: p. 159-163.
145. Ross, T., *Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology*. Journal of Applied Microbiology, 1996. 81(5): p. 501-508.
146. Ross, T., Dalgaard, P., y Tienungoon, S., *Predictive modelling of the growth and survival of Listeria in fishery products*. International Journal of Food Microbiology, 2000. 62(3): p. 231-245.
147. Mejlholm, O. y Dalgaard, P., *Modeling and predicting the growth of lactic acid bacteria in lightly preserved seafood and their inhibiting effect on Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 2007. 70(11): p. 2485-2497.
148. Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D., y Dalgaard, P., *Predicting growth rates and growth boundary of Listeria monocytogenes - An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood*. International Journal of Food Microbiology, 2010. 141(3): p. 137-150.
149. Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., y Debevere, J.M., *Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of Fusarium verticillioides and F. proliferatum on corn*. International Journal of Food Microbiology, 2005. 105(1): p. 35-52.
150. Baranyi, J. y Pin, C., *Estimating bacterial growth parameters by means of detection times*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. 65(2): p. 732-736.
151. International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF), *Microorganismos de los alimentos 7. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria*, ed. Acribia. 2004, Zaragoza, España.

152. Cabeza, M.C., *Eliminación de Salmonelas de la cáscara de huevo mediante termoultrasonificación*, in *Depto de Bromatología y Tecnología de los Alimentos*. 2010, Universidad Complutense de Madrid: Madrid. p. 295.
153. Ross, T. y McMeekin, T.A., *Predictive microbiology and HACCP*. In: *Pearson, A. M., Duston, T. R. (eds) HACCP in Meat, Poultry and Fish Processing Advances in Meat Research, 10.*, ed. B.A.a. Professional. 1997, London. 330- 354.
154. Miles, D.W. y Ross, T., *Identifying and quantifying risks in the food production chain*. Food Australia, 1999. 51.
155. McMeekin, T.A. y Ross, T., *Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management*. International Journal of Food Microbiology, 2002. 78(1-2): p. 133-153.
156. Buchanan, R.L. y Whiting, R.C., *Risk assessment: a means for linking HACCP plans and public health*. Journal of Food Protection, 1998. 61(11): p. 1531-1534.
157. Lammerding, A.M. y Fazil, A., *Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment*. International Journal of Food Microbiology, 2000. 58(3): p. 147-157.
158. Nauta, M.J., *Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible?* International Journal of Food Microbiology, 2002. 73(2-3): p. 297-304.
159. van Gerwen, S.J. y Zwietering, M.H., *Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments*. Journal of Food Protection, 1998. 61(11): p. 1541-1549.
160. Walls, I. y Scott, V.N., *Use of predictive microbiology in microbial food safety risk assessment*. International Journal of Food Microbiology, 1997. 36(2-3): p. 97-102.
161. Nauta, M.J., Jacobs-Reitsma, W.F., y Havelaar, A.H., *A risk assessment model for Campylobacter in broiler meat*. Risk Analysis, 2007. 27(4): p. 845-861.
162. Delignette-Muller, M.L. y Cornu, M., *Quantitative risk assessment for Escherichia coli O157:H7 in frozen ground beef patties consumed by young children in French households*. International Journal of Food Microbiology, 2008. 128(1): p. 158-164.
163. Ross, T., Rasmussen, S., Fazil, A., Paoli, G., y Sumner, J., *Quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat meats in Australia*. International Journal of Food Microbiology, 2009. 131(2-3): p. 128-137.
164. Mataragas, M., Zwietering, M.H., Skandamis, P.N., y E.H. Drosinos, *Quantitative microbiological risk assessment as a tool to obtain useful information for risk managers--specific application to Listeria monocytogenes and ready-to-eat meat products*. International Journal of Food Microbiology, 2010. 141 Suppl 1: p. S170-179.
165. Augustin, J.C., *Challenges in risk assessment and predictive microbiology of foodborne spore-forming bacteria*. Food Microbiology, 2011. 28(2): p. 209-213.
166. Malakar, P.K., Barker, G.C., y Peck, M.W., *Quantitative risk assessment for hazards that arise from non-proteolytic Clostridium botulinum in minimally processed chilled dairy-based foods*. Food Microbiol, 2011. 28(2): p. 321-330.

167. Perez-Rodriguez, F. y Zwietering, M.H., *Application of the Central Limit Theorem in microbial risk assessment: High number of servings reduces the Coefficient of Variation of food-borne burden-of-illness*. International Journal of Food Microbiology, 2012.
168. Lammerding, A.M., *An overview of microbial food safety risk assessment*. Journal of food protection, 1997. 60: p. 1420- 1425.
169. Hoornstra, E. y Notermans, S., *Quantitative microbiological risk assessment*. International Journal of Food Microbiology, 2001. 66(1-2): p. 21-29.
170. Codex, *Establishment of sampling plans for microbiologically safety criteria for foods in international trade including recommendations for control of Listeria monocytogenes. Document prepared by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods for the Codex Committee on Food Hygiene, 31st session 29 November-4 December 25 1999, Codex Alimentarius Commission.*, ed. C.A. Comission. 1999, Washington D.C., E.U.
171. Hathaway, S.C. y Cook, R.L., *A regulatory perspective on the potential uses of microbial risk assessment in international trade*. International Journal of Food Microbiology, 1997. 36(2-3): p. 127-133.
172. Jay, J.M., Loessner, M., y Golden, D.A., *Microbiología moderna de los alimentos*. 5ª edición, ed. S.A. Acribia. 2005, Zaragoza, España.
173. Moats, W.A., *Kinetics of thermal death of bacteria*. Journal of Bacteriology, 1971. 105: p. 165-171.
174. Szybalski, W., *Effect of elevated temperatures on DNA and some polynucleotides: Denaturation, renaturatio and cleavage of glycosidic and phosphate ester bonds*. En *Thermobiology*, ed. A.H.R.e.A. Press. 1967, London, UK. 73-121.
175. Aljarallah, K.M. y Adams, M.R., *Mechanisms of heat inactivation in Salmonella serotype Typhimurium as affected by low water activity at different temperatures*. Journal of Applied Microbiology, 2007. 102(1): p. 153-160.
176. Anderson, W.A., Hedges, N.D., Jones, M.V., y Cole, M.B., *Thermal inactivation of L. monocytogenes studied by differential scanning calorimetry*. Journal of General Microbiology, 1991. 137: p. 1419-1424.
177. Mackey, B.M., Miles, C.A., Parsons, S.E., y Seymour, D.A., *Thermal denaturation of whole cells and cell components of Escherichia coli examined by differential scanning calorimetry*. Journal of General Microbiology, 1991. 137: p. 2361-2374.
178. Stephens, P.J. y Jones, M.V., *Reduced ribosomal thermal denaturation in Listeria monocytogenes following osmotic and heat shocks*. FEMS Microbiology Letter, 1993. 106(2): p. 177-182.
179. Sapru, V. y Labuza, T.P., *Glassy state in bacterial spores predicted by polymer glass-transtion theory*. Journal of Food Science, 1993. 58: p. 445-448.
180. Taneja, S. y Ahmad, F., *Increased thermal stability of proteins in presence of amino acids*. Biochemical Journal, 1994. 303: p. 147-153.
181. Berger, J.A. y Marr, A.G., *Sonic disruption of spores of Bacillus cereus*. Journal of General Microbiology, 1960. 22: p. 147-157.

182. Rodríguez, A.C., Smerage, G.H., Teixeira, A.A., Lindsay, J.A., y Busta, F.F., *Population model of bacterial spores for validation of dynamic thermal processes*. Journal of Food Process Engineering, 1992. 15: p. 1-30.
183. Condon, S., Palop, A., Raso, J., y Sala, F.J., *Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores Bacillus subtilis*. Letter of Applied Microbiology, 1996. 22: p. 149-152.
184. Lema, M.W., Brown, A., Builer, C.A., y Hoffman, P.S., *Heat shock responsable in Legionella pneumophila*. Canadian Journal of Microbiology, 1988. 34: p. 1148-1153.
185. Mackey, B.M. y Derrick, C.M., *Elevation of the heat resistance of Salmonella typhimurium by sublethal heat shock*. Journal of Applied Bacteriology, 1986. 61: p. 389-393.
186. Murano, E.A. y Pierson, M.D., *Effect of heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of E. coli O157:H7*. Journal of food protection, 1992. 55: p. 171-175.
187. Tsuchido, T., Takano, M., y Skibasaki, I., *Effect of temperature elevating process on the subsequent isothermal death of E. coli K12*. Journal of Fermentation Technology, 1984. 52: p. 788-792.
188. Put, H.M. y Aalbersberg, W.I., *Occurrence of Bacillus subtilis with high heat resistance*. Journal of Applied Bacteriology, 1967. 30(3): p. 411-419.
189. Hassani, M., Condon, S., y Pagan, R., *Predicting microbial heat inactivation under nonisothermal treatments*. Journal of Food Protection, 2007. 70(6): p. 1457-1467.
190. Manas, P., Pagan, R., Raso, J., y Condon, S., *Predicting thermal inactivation in media of different pH of Salmonella grown at different temperatures*. International Journal of Food Microbiology, 2003. 87(1-2): p. 45-53.
191. AESAN, *NUEVAS TECNOLOGÍAS Y SEGURIDAD ALIMENTARIA*, ed. J.A. Ordóñez. 2010, Madrid, España.
192. Ordoñez, J.A., Cambero, I., Fernández, L., García, M.L., García de Fernando, G.D., De la Hoz, L., y Selgas, M.D., *Tecnología de los alimentos. Vol. I: Componentes de los alimentos y procesos*. Editorial Síntesis S.A., ed. J.A. Ordoñez. 1999, Madrid, España.
193. Galán, M. (1999) *Esterilización por Ionización. Acelerador de electrones*. Industria Farmaceutica, 79-83
194. *Directiva 1999/2/EC del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes*. Diario Oficial L 66, 13.3.1999, ed. C. Parlamento Europeo. 1999. 16-23.
195. *Directiva 1999/3/EC del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999, por la que se establece la lista de alimentos e ingredientes alimentarios a los que se puede tratar con radiaciones ionizantes en la Comunidad Europea*. Diario Oficial L 66, 13.3.1999, ed. C. Parlamento Europeo. 1999. 24-25.
196. *Real Decreto 348/2001 de 4 de abril de 2001, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimentarios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes*. 2006.

197. Comunidad Europea, *Lista de instalaciones autorizadas para el tratamiento de alimentos e ingredientes alimentarios con radiaciones ionizantes en los Estados miembros*, ed. Diario Oficial de la Unión Europea (12.1.2012). 2012, Brussels, Belgium. 6-9.
198. *Report from the Commission to the European Parliament and the Council of Food and Food Ingredients treated with ionising radiation for the year 2010.*, ed. E. Commission. 2012, Brussels, Belgium. 1-19.
199. *Food irradiation: Requirements for the development, validation and routine control of the process of irradiation using ionizing radiation for the treatment of food. ISO 14470:2011*, ed. (ISO). 2011.
200. *Food Irradiation*. 2005, Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention.
201. Cabeza, M.C., Cambero, I., de la Hoz, L., y Ordonez, J.A., *Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate Listeria Monocytogenes from ready-to-eat (RTE) cooked ham*. Journal of Food Protection, 2007. 71(10): p. 2001-2006.
202. Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., y Van Impe, J.F., *GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves*. International Journal of Food Microbiology, 2005. 102(1): p. 95-105.
203. Buchanan, R.L., Golden, M.H., y Phillips, J.G., *Expanded models for the non-thermal inactivation of Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology, 1997. 82(5): p. 567-577.
204. Madigan, M., Martinko, J.M., y Parker, J., *Brock Biología de los Microorganismos*. 8ª edición, ed. E.P.H. Iberia. 1999. 149-177.
205. Prescott, L.M., Harley, J.P., y Klein, D.A., *Microbiología*. 4ª edición, ed. M.-H. Interamericana. 1999. 114-136.
206. Cabeza, M.C., Cambero, M.I., Nunez, M., Medina, M., de la Hoz, L., y J.A. Ordonez, *Lack of growth of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham*. Food Microbiology, 2010. 27(6): p. 777-782.
207. Aguirre, J.S., Ordoñez, J.A., y Garcia de Fernando, G.D., *A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of Bacillus cereus inactivation and lag phase duration of surviving cells*. International Journal of Food Microbiology, 2012. 153: p. 444-452.
208. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., y Montville, T.J., *Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana. En: Microbiología de los alimentos. Fundamentos y Fronteras.*, ed. S.A. Acribia. 2000, Zaragoza, España. 13- 30.
209. Gill, C.O., Harrision, J., y Phillips, D.M., *Use of atemperaturefunctionintegrationtechnique to assess the hygienic adequacy of abeefcarcasscoolingprocess*. Food Microbiology, 1991. 8(2): p. 83-94.
210. McMeekin, T.A., Olley, J., Ratkowsky, D.A., y Ross, T., *Predictive microbiology: towards the interface and beyond*. International Journal of Food Microbiology, 2002. 73(2-3): p. 395-407.
211. Pin, C. y Baranyi, J., *Single-cell and population lag times as a function of cell age*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. 74(8): p. 2534-2536.
212. Augustin, J.C. y Carlier, V., *Mathematical modelling of the growth rate and lag time for Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 2000. 56(1): p. 29-51.

213. Delignette-Muller, M.L., *Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics*. International Journal of Food Microbiology, 1998. 43(1-2): p. 97-104.
214. Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., y 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): p. 83-92.
215. Buchanan, R.L. y Cygnarowicz, M.L., *A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase*. Food Microbiology, 1990. 7: p. 237-240.
216. Mellefont, L.A., McMeekin, T.A., y Ross, T., *Effect of relative inoculum concentration on Listeria monocytogenes growth in co-culture*. International Journal of Food Microbiology, 2008. 121(2): p. 157-168.
217. Skandamis, P.N., Stopforth, J.D., Kendall, P.A., Belk, K.E., Scanga, J.A., Smith, G.C., y Sofos, J.N., *Modeling the effect of inoculum size and acid adaptation on growth/no growth interface of Escherichia coli O157:H7*. International Journal of Food Microbiology, 2007. 120(3): p. 237-249.
218. Pin, C. y Baranyi, J., *Kinetics of single cells: observation and modeling of a stochastic process*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. 72(3): p. 2163-2169.
219. Gnanou Besse, N., Audinet, N., Barre, L., Cauquil, A., Cornu, M., y Colin, P., *Effect of the inoculum size on Listeria monocytogenes growth in structured media*. International Journal of Food Microbiology, 2006. 110(1): p. 43-51.
220. Zwietering, M.H., de Wit, J.C., Cuppers, H.G., y van 't Riet, K., *Modeling of Bacterial Growth with Shifts in Temperature*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. 60(1): p. 204-213.
221. Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J.C., y Lebert, A., *Effects of pH or a(w) stress on growth of Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 1998. 42(1-2): p. 71-77.
222. Augustin, J.C., Rosso, L., y Carlier, V., *A model describing the effect of temperature history on lag time for Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 2000. 57(3): p. 169-181.
223. Dufrenne, J., Delfgou, E., Ritmeester, W., y Notermans, S., *The effect of previous growth conditions on the lag phase time of some foodborne pathogenic micro-organisms*. International Journal of Food Microbiology, 1997. 34(1): p. 89-94.
224. Li, Y., Odumeru, J.A., Griffiths, M., y McKellar, R.C., *Effect of environmental stresses on the mean and distribution of individual cell lag times of Escherichia coli O157:H7*. International Journal of Food Microbiology, 2006. 110(3): p. 278-285.
225. Lianou, A. y Koutsoumanis, K.P., *Effect of the growth environment on the strain variability of Salmonella enterica kinetic behavior*. Food Microbiology, 2011. 28(4): p. 828-837.
226. Palumbo, S.A., Jenkins, R.K., Buchanan, R.L., y Thayer, D.W., *Bacterial communities in acidic and circumneutral streams*. 1986. 49(3): p. 189- 191.
227. Augustin, J.C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., y Carlier, V., *Significance of inoculum size in the lag time of Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. 66(4): p. 1706-1710.
228. Mackey, B.M. y Derrick, C.M., *The effect of sublethal injury by heating, freezing, drying and gamma-radiation on the duration of the lag phase of*

- Salmonella typhimurium*. Journal of Applied Bacteriology, 1982. 53(2): p. 243-251.
229. Albertson, N.H., Nystrom, T., y Kjelleberg, S., *Macromolecular synthesis during recovery of the marine Vibrio sp. S4 from starvation*. Journal of General Microbiology, 1990. 136: p. 2201-2207.
230. Whiting, R.C. y Bagi, L.K., *Modeling the lag phase of Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 2002. 73(2-3): p. 291-295.
231. Kaprelyants, A.S. y Kell, D.B., *Do bacteria need to communicate with each other for growth?* Trends in Microbiology, 1996. 4(6): p. 237-42.
232. Kaprelyants, A.S., Mukamolova, G.V., Kormer, S.S., Weichart, D.H., Young, M., y Kell, D.B., *Intracellular signalling and the multiplication of prokaryotes: bacterial cytokines*. Symposia of the Society for General Microbiology, 1999. 57: p. 33-69.
233. Eifert, J.D., Gennings, C., Carter, J., Duncan, S.E., y Hackney, C.R., *Predictive model with improved statistical analysis of interactive factors affecting the growth of Staphylococcus aureus 196E*. Journal of food protection, 1996. 59: p. 608-614.
234. Krist, K.A., Ross, T., y McMeekin, T.A., *Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity*. International Journal of Food Microbiology, 1998. 43(3): p. 195-203.
235. International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF), *Ecología microbiana de los alimentos 1. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos*, ed. Acribia. 1983, Zaragoza, España.
236. Cossins, A.R. y Sinensky, M., *Adaptation of membranes to temperature, pressure and exogenous lipids*. In: M. Shinitzky (ed.), *Physiology of membrane fluidity*, ed. C. Press. 1984, Boca raton, Florida. E.U. 1 - 20.
237. Sinensky, M., *Homeoviscous adaptation- a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1974. 71(2): p. 522-525.
238. Csonka, L.N., *Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress*. Microbiological Reviews, 1989. 53: p. 121- 147.
239. Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., y Ross, T., *Modelling the growth rate of Escherichia coli as a function of pH and lactic acid concentration*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. 63(6): p. 2355-2360.
240. Garcia de Fernando, G., *Historial académico, docente e investigador que presenta Gonzalo D. García de Fernando Minguillón para participar en la prueba de habilitación a catedrático de universidad en el área de tecnología de los alimentos*. 2005, Universidad Complutense de Madrid. p. 185.
241. Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Witt, J.C., y van't Riet, K., *Modeling of bacterial growth as a function of temperature*. Applied and Environmental Microbiology, 1991. 57(4): p. 1094-1101.
242. Zaika, L.L., Moulden, E., Weimer, L., Phillips, J.G., y Buchanan, R.L., *Model for the combined effects of temperature, initial pH, sodium chloride and sodium nitrite concentrations on anaerobic growth of Shigella flexneri*. International Journal of Food Microbiology, 1994. 23(3-4): p. 345-58.
243. Fernandez, P.S., George, S.M., Sills, C.C., y Peck, M.W., *Predictive model of the effect of CO<sub>2</sub>, pH, temperature and NaCl on the growth of Listeria*

- monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 1997. 37(1): p. 37-45.
244. Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., y Thuault, D., *Modelling the growth kinetics of Listeria monocytogenes as a function of temperature, pH and organic acid concentration*. International Journal of Food Microbiology, 2002. 73(1): p. 219-237.
245. Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., y Sofos, J.N., *Modeling the boundaries of growth of Salmonella Typhimurium in broth as a function of temperature, water activity, and pH*. Journal of Food Protection, 2004. 67(1): p. 53-59.
246. Pin, C., Velasco de Diego, R., George, S., Garcia de Fernando, G.D., y Baranyi, J., *Analysis and validation of a predictive model for growth and death of Aeromonas hydrophila under modified atmospheres at refrigeration temperatures*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. 70(7): p. 3925-3932.
247. Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., 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*. International Journal of Food Microbiology, 2005. 100(1-3): p. 41-53.
248. Zuliani, V., Lebert, I., Augustin, J.C., Garry, P., Vendevre, J.L., y Lebert, A., *Modelling the behaviour of Listeria monocytogenes in ground pork as a function of pH, water activity, nature and concentration of organic acid salts*. Journal of Applied Microbiology, 2007. 103(3): p. 536-550.
249. Emborg, J. y Dalgaard, P., *Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by Morganella psychrotolerans*. International Journal of Food Microbiology, 2008. 128(2): p. 226-233.
250. Valero, A., Perez-Rodriguez, F., Carrasco, E., Fuentes-Alventosa, J.M., Garcia-Gimeno, R.M., y Zurera, G., *Modelling the growth boundaries of Staphylococcus aureus: Effect of temperature, pH and water activity*. International Journal of Food Microbiology, 2009. 133(1-2): p. 186-194.
251. Guevara, L., A. Martinez, P.S. Fernandez, y M. Muñoz, *Comparison of probabilistic and deterministic predictions of time to growth of Listeria monocytogenes as affected by pH and temperature in food*. Foodborne Pathog Dis, 2011. 8(1): p. 141-148.
252. Antolinos, V., Muñoz, M., Ros-Chumillas, M., Periago, P.M., Fernandez, P.S., y Le Marc, Y., *Modelling the effects of temperature and osmotic shifts on the growth kinetics of Bacillus weihenstephanensis in broth and food products*. International Journal of Food Microbiology, 2012. 158(1): p. 36-41.
253. Pagan, R., Condon, S., y Sala, F.J., *Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. 63(8): p. 3225-3232.
254. Hesse, W., *Über das Verhalten pathogener Mikroorganismen in pasteurisierter Milch*. Medical Microbiology and Immunology, 1960. 34: p. 346-348.
255. Moureau, M.H., Bretey, J., y Roy, D., *[Thermo-resistance of Mycobacterium tuberculosis. Relation to its pathogenicity. Human, BCG, avian, paratuberculosis strains. Part I]*. Ann Inst Pasteur (Paris), 1960. 99: p. 421-432.

256. Schöne, N., *A new probabilistic approach in predictive microbiology*, in *Molecular Bioinformatics*. 2011, Goethe Universität Frankfurt: Frankfurt, Germany.
257. Vose, D., *Risk Analysis: A Quantitative Guide*. Wiley & Sons, New York, 2008. 3rd edition: p. 47p.
258. Lianou, A., Stopforth, J.D., Yoon, Y., Wiedmann, M., y Sofos, J.N., *Growth and stress resistance variation in culture broth among Listeria monocytogenes strains of various serotypes and origins*. Journal of Food Protection, 2006. 69(11): p. 2640-2647.
259. Nauta, M.J., *Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models*. International Journal of Food Microbiology, 2000. 57(1-2): p. 9-18.
260. Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J., y Mackey, B.M., *The effect of inoculum size on the lag phase of Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 2001. 70(1-2): p. 163-173.
261. Noma, S., Kajiyama, D., Igura, N., Shimoda, M., y Hayakawa, I., *Mechanisms behind tailing in the pressure inactivation curve of a clinical isolate of Escherichia coli O157:H7*. International Journal of Food Microbiology, 2006. 109(1-2): p. 103-108.
262. Booth, I.R., *Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress*. International Journal of Food Microbiology, 2002. 78(1-2): p. 19-30.
263. den Besten, H.M., M. Mataragas, R. Moezelaar, T. Abee, y M.H. Zwietering, *Quantification of the effects of salt stress and physiological state on thermotolerance of Bacillus cereus ATCC 10987 and ATCC 14579*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. 72(9): p. 5884-5894.
264. Humpheson, L., M.R. Adams, W.A. Anderson, y M.B. Cole, *Biphasic thermal inactivation kinetics in Salmonella enteritidis PT4*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. 64(2): p. 459-464.
265. Baranyi, J., *Predictive microbiology. Potentials and limitations. The science of quantitative microbial ecology of food.*, I.o.F. Research., Editor. 2007: Norwich, UK.
266. Ghanem, R. y Red-Horse, J., *Propagation of probabilistic uncertainty in complex physical systems using a stochastic finite element approach*. Physica D, 1999. 133: p. 137-144.
267. Baranyi, J., S.M. George, y Z. Kutalik, *Parameter estimation for the distribution of single cell lag times*. Journal of Theoretical Biology, 2009. 259(1): p. 24-30.
268. Francois, K., F. Devlieghere, M. Uyttendaele, A.R. Standaert, A.H. Geeraerd, P. Nadal, J.F. Van Impe, y J. Debevere, *Single cell variability of Listeria monocytogenes grown on liver pate and cooked ham at 7 degrees C: comparing challenge test data to predictive simulations*. Journal of Applied Microbiology, 2006. 100(4): p. 800-812.
269. Koutsoumanis, K., *A study on the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behavior of microbial populations*. International Journal of Food Microbiology, 2008. 128(1): p. 116-121.
270. Metris, A., S.M. George, B.M. Mackey, y J. Baranyi, *Modeling the variability of single-cell lag times for Listeria innocua populations after*

- sublethal and lethal heat treatments*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. 74(22): p. 6949-6955.
271. Smelt, J.P., G.D. Otten, y A.P. Bos, *Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of Lactobacillus plantarum*. International Journal of Food Microbiology, 2002. 73(2-3): p. 207-212.
272. Augustin, J.C., V. Carlier, y J. Rozier, *Mathematical modelling of the heat resistance of Listeria monocytogenes*. J Appl Microbiol, 1998. 84(2): p. 185-191.
273. Withell, E.R., *The significance of the variation in shape of time-survivor curves*. The Journal of Hygiene, 1942. 42(2): p. 124-183.
274. Douglas, S.A., M.J. Gray, A.D. Crandall, y K.J. Boor, *Characterization of chocolate milk spoilage patterns*. Journal of Food Protection, 2000. 63(4): p. 516-521.
275. Grant, I.R., H.J. Ball, S.D. Neill, y M.T. Rowe, *Inactivation of Mycobacterium paratuberculosis in cows' milk at pasteurization temperatures*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. 62(2): p. 631-636.
276. Hassani, M., P. Manas, R. Pagan, y S. Condon, *Effect of a previous heat shock on the thermal resistance of Listeria monocytogenes and Pseudomonas aeruginosa at different pHs*. International Journal of Food Microbiology, 2007. 116(2): p. 228-238.
277. Lund, B.M., T.C. Baird-Parker, y G.W. Gould, *Microbiological Safety and Quality of Food*. Book. 2000, Gaithersburg, Maryland.: Aspen Publishers, Inc. 1234-1299.
278. Manas, P., R. Pagan, F.J. Sala, y S. Condon, *Low molecular weight milk whey components protect Salmonella senftenberg 775W against heat by a mechanism involving divalent cations*. Journal of Applied Microbiology, 2001. 91(5): p. 871-877.
279. Stewart, E.J., R. Madden, G. Paul, y F. Taddei, *Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division*. PLoS Biol, 2005. 3(2): p. e45.
280. Diggle, S.P., A. Gardner, S.A. West, y A.S. Griffin, *Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal?* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2007. 362(1483): p. 1241-1249.
281. De la Iglesia, R., *Seminario de investigación bibliográfico. Mecanismos Eucariontes de quorum quenching*, in Depto de Genética Molecular y Microbiología. 2006, Pontificia Universidad de Católica de Chile: Santiago.
282. Diggle, S.P., S.A. Crusz, y M. Camara, *Quorum sensing*. Curr Biol, 2007. 17(21): p. R907-10.
283. Mukamolova, G.V., O.A. Turapov, K. Kazarian, M. Telkov, A.S. Kaprelyants, D.B. Kell, y M. Young, *The rpf gene of Micrococcus luteus encodes an essential secreted growth factor*. Molecular Microbiology, 2002. 46(3): p. 611-621.
284. Baranyi, J., *Stochastic modelling of bacterial lag phase*. International Journal of Food Microbiology, 2002. 73(2-3): p. 203-206.
285. D'Arrigo, M., Garcia de Fernando, G.D., Velasco de Diego, R., Ordonez, J.A., George, S.M., y Pin, C., *Indirect measurement of the lag time distribution of single cells of Listeria innocua in food*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. 72(4): p. 2533-2538.

286. Guillier, L., P. Pardon, y J.C. Augustin, *Influence of stress on individual lag time distributions of Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. 71(6): p. 2940-2948.
287. Hornbaek, T., J. Dynesen, y M. Jakobsen, *Use of fluorescence ratio imaging microscopy and flow cytometry for estimation of cell vitality for Bacillus licheniformis*. FEMS Microbiology Letter, 2002. 215(2): p. 261-265.
288. Aguirre, J.S., C. Pin, M.R. Rodriguez, y G.D. Garcia de Fernando, *Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food*. Applied and Environmental Microbiology, 2009. 75(22): p. 6992-7.
289. Lederberg, J., *Infectious disease as an evolutionary paradigm*. Emerging Infectious Diseases, 1997. 3(4): p. 417-423.
290. Kennedy, S., *Epidemiology. why can't we test our way to absolute food safety?* Science, 2008. 322(5908): p. 1641-1643.
291. Delignette-Muller, M.L. y Rosso, L., *Biological variability and exposure assessment*. International Journal of Food Microbiology, 2000. 58(3): p. 203-212.
292. Membre, J.M. y Lambert, R.J., *Application of predictive modelling techniques in industry: from food design up to risk assessment*. International Journal of Food Microbiology, 2008. 128(1): p. 10-15.
293. Standaert, A.R., K. Francois, F. Devlieghere, J. Debevere, J.F. Van Impe, y A.H. Geeraerd, *Modeling individual cell lag time distributions for Listeria monocytogenes*. Risk Analysis, 2007. 27(1): p. 241-254.
294. 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(1-2): p. 139-159.
295. Brouillaud-Delattre, A., M. Maire, C. Collette, C. Mattei, y C. Lahellec, *Predictive microbiology of dairy products: influence of biological factors affecting growth of Listeria monocytogenes*. J AOAC Int, 1997. 80(4): p. 913-919.
296. Duffy, G., J.J. Sheridan, R.L. Buchanan, D.A. McDowell, y I.S. Blair, *The effect of aeration, initial inoculum and meat microflora on the growth kinetics of Listeria monocytogenes in selective enrichment broths*. Food Microbiology, 1994. 11: p. 429- 438.
297. Jason, A.C., *A deterministic model for monophasic growth of batch cultures of bacteria*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1983. 49(6): p. 513-536.
298. Mackey, B.M., *Injured bacteria*. En Lund B.M., Baird-Parker T.C., Gould G.W., (eds). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. 2000, Gaithersburg, Maryland.: Aspen Publishers, Inc. 315-341.
299. Delignette-Muller, M.L., Baty, F., Cornu, M., y Bergis, H., *Modelling the effect of a temperature shift on the lag phase duration of Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 2005. 100(1-3): p. 77-84.
300. Metris, A., S.M. George, M.W. Peck, y J. Baranyi, *Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations*. Journal of Microbiological Methods, 2003. 55(3): p. 821-827.
301. Metris, A., Y. Le Marc, A. Elfwing, A. Ballagi, y J. Baranyi, *Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of E. coli*. International Journal of Food Microbiology, 2005. 100(1-3): p. 13-19.
302. Miled, R.B., Guillier, L., Neves, S., Augustin, J.C., Colin, P., y Besse, N.G., *Individual cell lag time distributions of Cronobacter (Enterobacter*

- sakazakii*) and impact of pooling samples on its detection in powdered infant formula. *Food Microbiology*, 2011. 28(4): p. 648-655.
303. Combase, <http://www.combase.cc/index.php/en/combase-browser>. 2011.
304. Malakar, P.K., Barker, G.C., Zwietering, M.H., y Van't Riet, K., *Relevance of microbial interactions to predictive microbiology*. *International Journal of Food Microbiology*, 2003. 84(3): p. 263-272.





