



Universidad  
de Córdoba

Máster Oficial de  
Agroalimentación

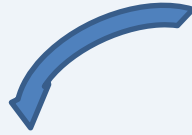
**Título: Influencia de las condiciones de temperatura, pH,  $a_w$  y concentraciones de inóculo sobre la probabilidad y cinética de crecimiento de cepas Verotoxigénicas de *Escherichia coli*.**

**Magdevis Yanet Rodríguez Caturla**

**Tutores de investigación: Prof. Dr. D. Gonzalo Zurera Cosano  
Dr. D. Antonio Valero Díaz**

**Curso  
2008 - 2009**

# INTRODUCCIÓN



**Los rumiantes han sido señalados como uno de los principales reservorios de *E. coli*.**  
(Marzocca y col., 2006)



**Se transmite por vía fecal-oral, y el vehículo más frecuente de infección humana, es la carne bovina picada mal cocinada, fundamentalmente las hamburguesas (Marzocca y col., 2006)**

## INTRODUCCIÓN

**También se han notificado toxiinfecciones vehiculadas por ensaladas, vegetales crudos, frutas y agua de bebida, leche, yogurt, quesos, mayonesa (Frías y col., 1996)**



**La higiene deficiente, junto con la diseminación secundaria por contacto interpersonal, constituye también otra vía de transmisión (Griffin y col., 1991).**

*Casos notificados de VTEC en humanos (2003-2007) y casos confirmados en el 2007<sub>1</sub> (EFSA, 2009)*

Países	2007			2006	2005	2004	2003	
	Tipo de notificación <sup>2</sup>	Casos	Casos confirmados					Casos 100,000
Austria	c	82	82	1.0	41	53	45	28
Belgica	c	47	47	0.4	46	47	45	47
Bulgaria <sup>3</sup>	o	0	0	0				
Chipre	-	-	-					
Republica Checa	-	-	-					
Dinamarca	c	161	156	2.9	146	154	163	128
Estonia	c	3	3	0.2	8	19	0	
Finlandia	c	12	12	0.2	14	21	10	14
Francia	c	57	57	0.1	67			
Alemania	c	870	870	1,1	1,183	1,162	903	1,100
Grecia	c	1	1	<0,1	1			
Hungría	c	1	1	<0,1	3	5	12	20
Irlanda	c	167	115	2,7	153	125	61	95
Italia	c	61	27	<0,1	17		3	5
Letonia	c	0	0	0				
Lituania	o	0	0	0	0			
Luxemburgo	c	1	1	0,2	2	8		
Malta	c	4	4	1,0	21	23		
Holanda	c	88	88	0,5	41	64	30	51
Polonia	c	2	2	<0,1	4	4	3	
Portugal	- <sup>4</sup>	-	-					
Rumania <sup>3</sup>	- <sup>4</sup>	-	-					
Eslovaquia	c	6	6	0,1	8	61	4	1
Eslovenia	c	4	4	0,2	30		2	
España	c	18	18	<0,1	13	16		
Suecia	c	262	262	2,9	265	336	149	52
Reino Unido	c	1,149	1,149	1,9	1,294	1,171	926	974
<b>UE Total</b>		<b>2,996</b>	<b>2,905</b>	<b>0.6</b>	<b>3,357</b>	<b>3,269</b>	<b>2,356</b>	<b>2,515</b>
Islandia	c	13	13	4.2	1			
Liechtenstein	-	-	-					
Noruega	c	26	26	0.6	50	18	12	15
Suiza	c	69	53	0.7	48	52	45	56

1. Número de casos confirmados del 2005-2007 y número total de casos del 2003-2004.

2. A: Informe de datos agregados; C: Basado en el informe de casos; -: no reportados; U: no especificados

3. Comienzan como miembros de la UE en el 2007.

4. No existe sistema de vigilancia

Herramientas para predecir el comportamiento microbiano.

De utilidad para diseñar formulaciones más seguras que inhiban el desarrollo.

Cuantificando dicho comportamiento a través de expresiones matemáticas (Whiting y col., 1994)

Factores que delimitan la interfaz de crecimiento/no crecimiento como: pH, Temperatura,  $a_w$

Cinética del crecimiento (Fase lag)  
(Métris y col., 2003)

Td: Describe el comportamiento cinético influenciado por las condiciones medioambientales

## Monitorización del crecimiento

La Turbidimetría como método rápido e indirecto de monitorización del crecimiento microbiano.

Representa el desarrollo de una población microbiana en tiempo real.

Método válido, fiable y rápido para la elaboración de modelos predictivos de crecimiento, supervivencia e inhibición de microorganismos en alimentos (Dalgaard y col., 2001).

## Introducción

### Modelos de Probabilidad

Estos modelos permiten definir con cierta precisión la zona de crecimiento/no crecimiento de los microorganismos utilizando uno o más factores de forma controlada (Salter y col., 2001).

Concentración de inóculo

Skandamis y col. (2007)

# OBJETIVOS

# Objetivos

- 1. Estudio de la cinética de crecimiento de 4 cepas *E. coli* (O55:H6; O59:H21; O158:H23 y O157:H7) sometidas a diferentes condiciones de pH, temperatura y concentraciones de inóculo, y selección de la mejor adaptada en condiciones limitantes y más rápido crecimiento en condiciones óptimas.**
- 2. Desarrollo de modelos de probabilidad de crecimiento en función del pH y  $a_w$ , a diferentes temperaturas y concentraciones de inóculo.**
- 3. Descripción del comportamiento cinético de la cepa de *E. coli* seleccionada a través de la cuantificación de los tiempos de detección.**

# MATERIAL Y MÉTODOS



## Material y Métodos

Cepas de *E. coli*  
Investigadas

Cepas liofilizadas,  
procedentes de la  
Colección Española  
de Cultivos Tipo  
(CECT, Burjassot-  
Valencia, España)

**O55:H6**

**O59:H21**

**O158:H23**

**O157:H7**

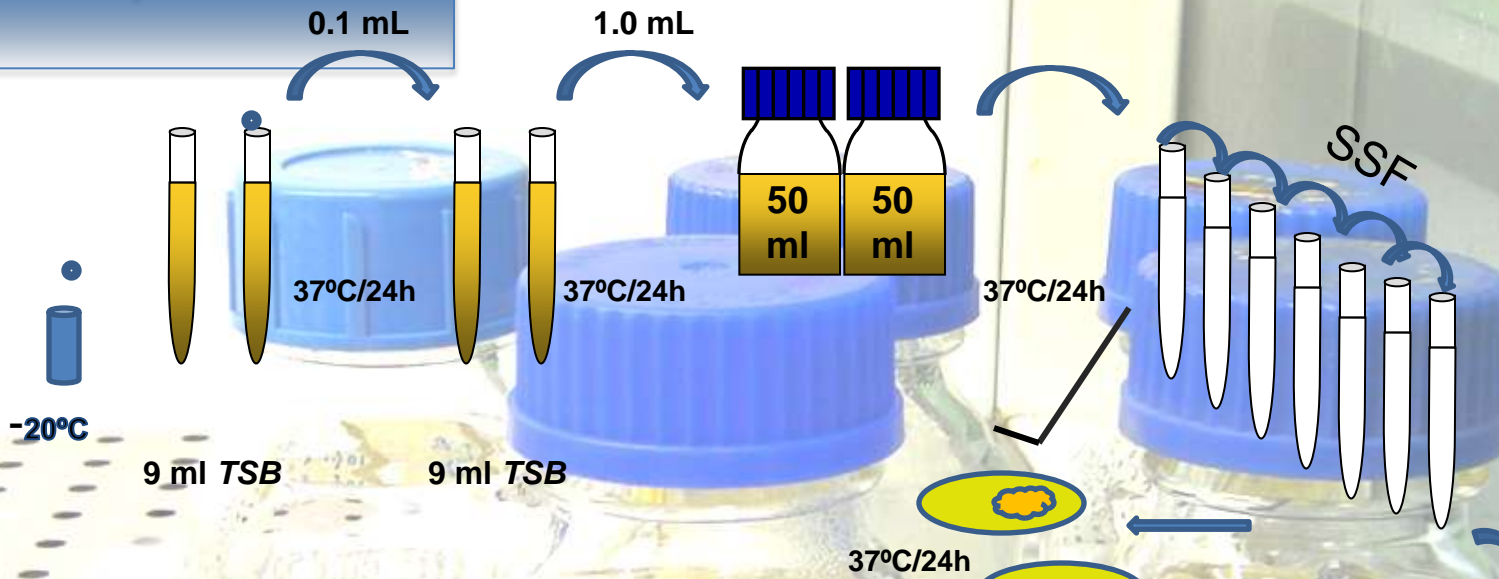
Cepa Aislada de alimentos contaminados y presenta propiedades virulentas (Pelayo y col., 1999).

Cepa Enterotoxigénica y responsable de enfermedades en humanos. (Arthur y col., 2002).

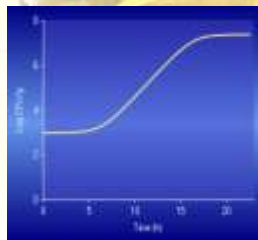
Cepa patogénica se relaciona con brotes de enteritis en niños (Rowe y col., 1974).

Cepa implicada en brotes severos, causante de 76 millones de casos de enfermos y relacionada con 5.000 muertes anuales en los E.U (Frenzen y col., 2005).

# Material y Métodos



El modelo primario de Baranyi, incluido en el programa Excel Dmfit, se ajustó a los valores de Abs obtenidos.



Parámetros cinéticos de crecimiento:  
fase lag (h) y  $\mu_{\text{max}}$  ( $\text{h}^{-1}$ )

Mediciones a 600 nm, durante 30 días



Bioscreen C (Labsystems, Finlandia)

Temperatura: 8 y  $16^{\circ}\text{C}$

Concentración inóculo:  
100 y 10.000 ufc/mL



Placas microtiter  
10 x 10 pocillos

pH: 5.50 y 7.00  
 $a_w$ : 0.999  
Concentración de inóculo:  
100 y 10.000 ufc/mL

## Material y Métodos

### Variables fijas

Temperatura: 8, 12, 16°C

Concentración de inóculo: 100, 1.000 y 10.000 ufc/mL

Cepa  
seleccionada

### Variables independientes

pH: 7.00 - 5.00 a 0.25 niveles

a<sub>w</sub>: 0.999 – 0.960 a 0.01 niveles

Monitorización de crecimiento durante 30 días  
Consideró crecimiento a 0.350 OD  
Recuento en placa > 0.5 log ufc/mL de su concentración inicial

Factores	Condición	Probabilidad
pH	5.00	1 (crecimiento)
Aw	0.999	0 (no crecimiento)
.	.	.

## Material y Métodos

Modelo de Polinómico de Regresión Logística implementado en SPSS v 15.0 (Chicago, Illinois). Se utilizó un método de regresión por pasos.

## Modelo de probabilidad

Relaciona las variables independientes (pH y Aw) con la probabilidad de crecimiento.

Fueron escaladas en el rango de 0.1-0.9

B)

$$\text{logit } P = \text{Ln} \left( \frac{P}{1 - P} \right) = a_0 + a_1 * \text{pH} + a_2 * a_w + a_3 * (\text{pH} * a_w) + a_4 * \text{pH}^2 + a_5 * a_w^2$$

Predicción de crecimiento/no crecimiento cuando  $P=0.01$ , importante para la obtención de estimaciones más seguras y posible aplicación del modelo en materia de seguridad alimentaria.

Probabilidad de crecimiento de 0 a 1

Variables escaladas

Evaluación de la Bondad de Ajuste del modelo

Índices de error



■ Estadísticos de Hosmer- Lemeshow (HL)

■  $R^2$

■ % casos correctamente clasificados (%c)

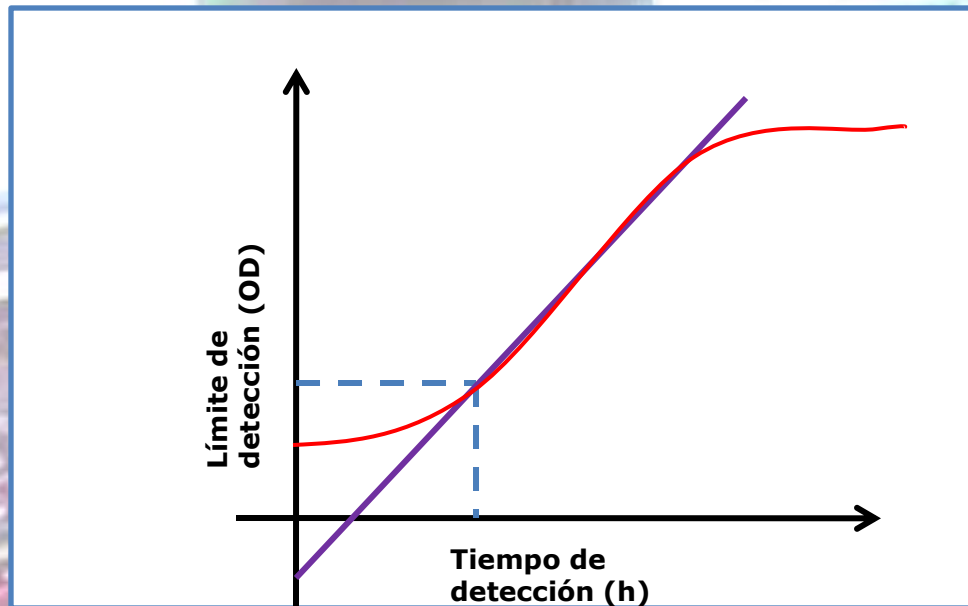
## Material y Métodos

### Cálculo del tiempo de detección ( $T_D$ )

El  $T_D$  se define como el tiempo que tarda una población microbiana en alcanzar el Límite de detección.

Límite de Detección = promedio OD (blancos) + 3 X Desviación Estándar (DE) (Vermeulen y col., 2007)

$$T_D = (\text{límite de detección} - \text{intersección}) / \text{Pendiente}$$

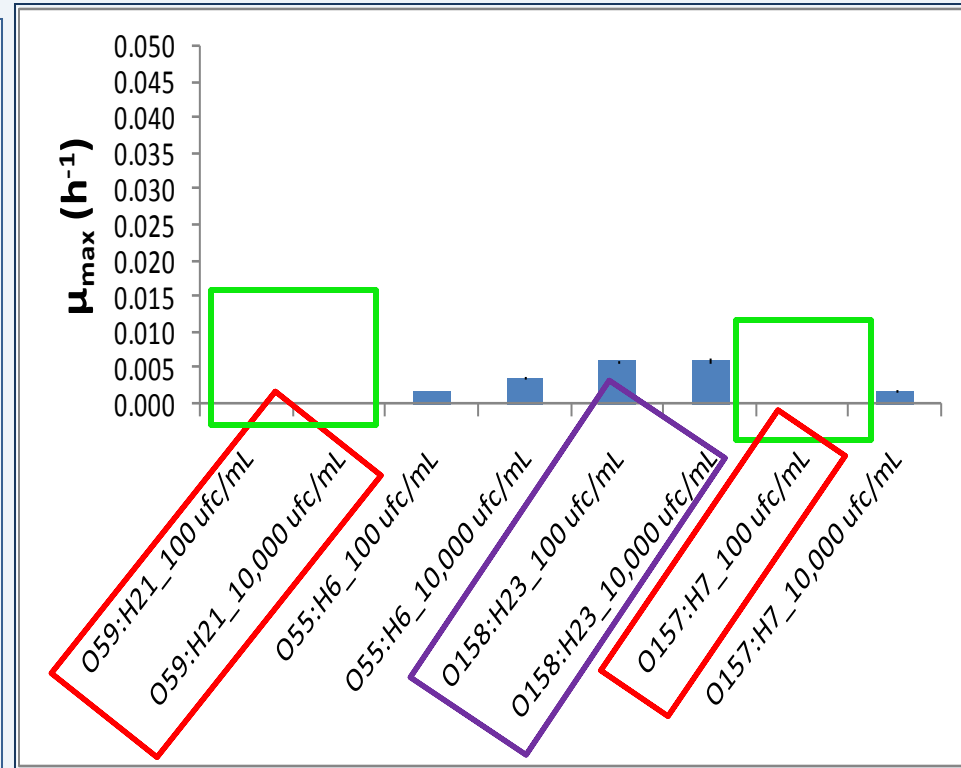
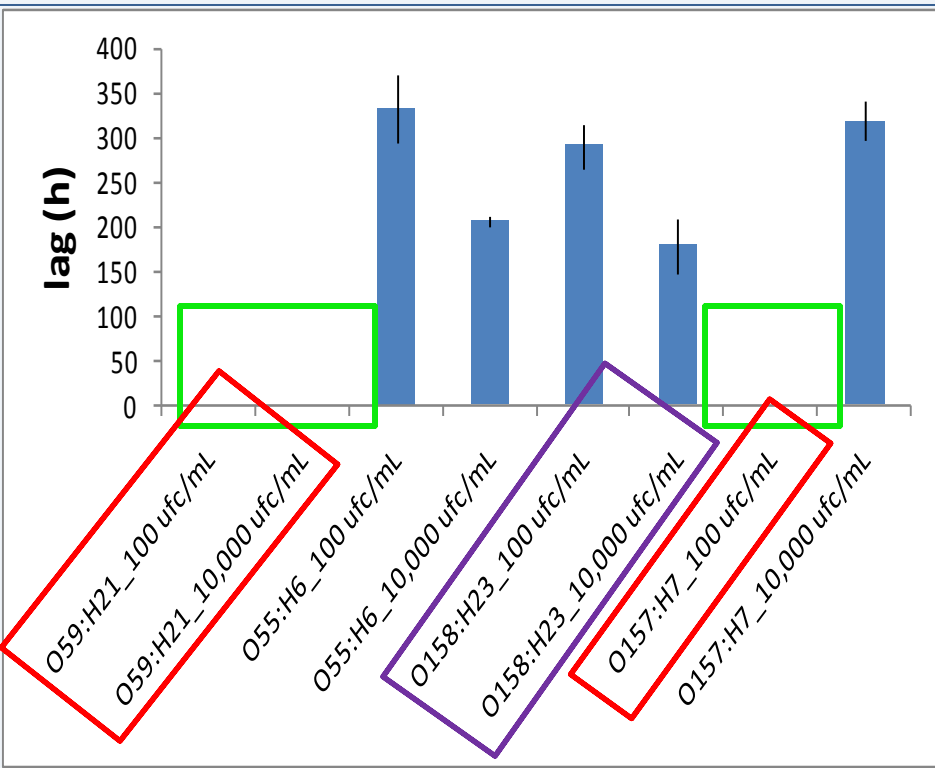


# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

# Resultados y Discusión

## Estudio del comportamiento cinético de las cepas de *E. coli*

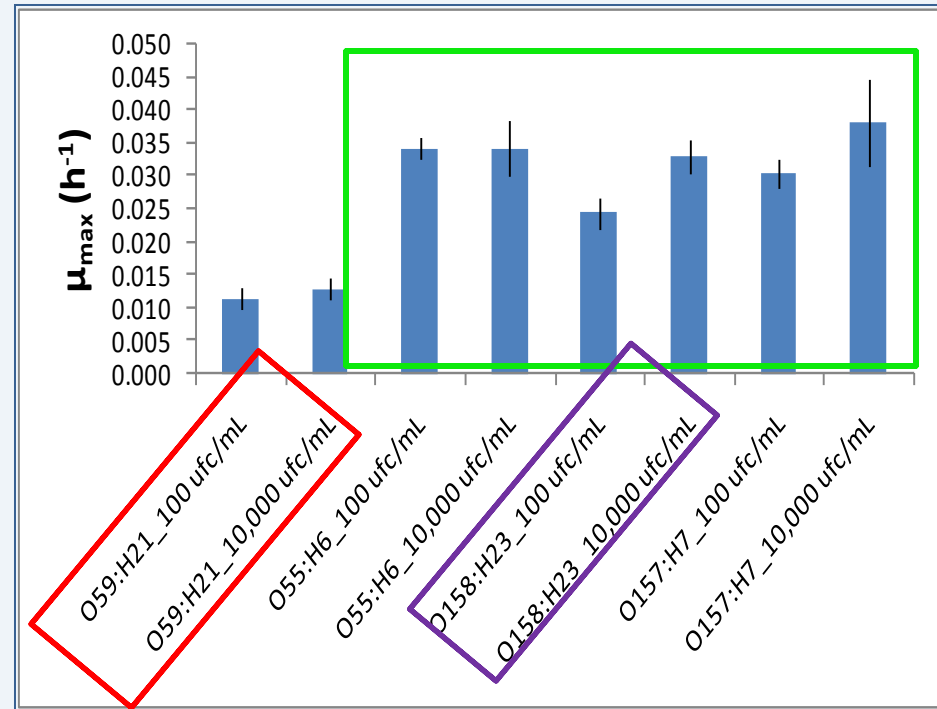
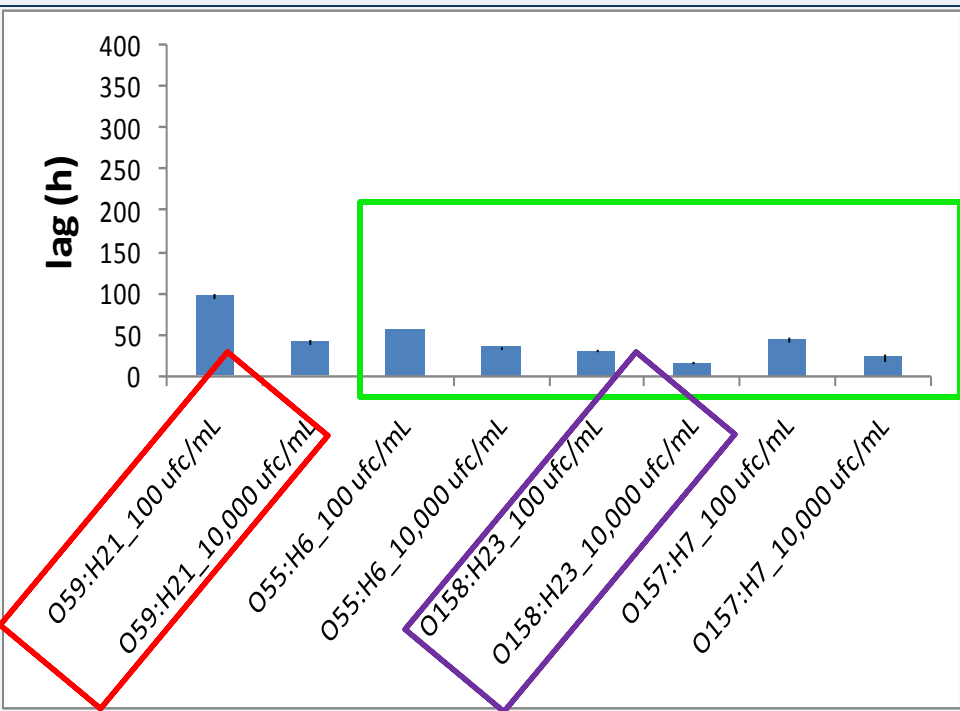
Condiciones: 8°C\_pH 5.50



# Resultados y Discusión

## Estudio de la cinética de crecimiento de las cepas de *E. coli*

Condiciones: 16°C\_pH 7.00





# Resultados y Discusión

## Modelos de Crecimiento / no Crecimiento

Estos modelos han sido ampliamente utilizados en el campo de la microbiología predictiva para determinar los límites de crecimiento de microorganismos (Koutsoumanis y col., 2005; Vermeulen y col., 2007; Skandamis y col., 2007).

## Cepa *E. coli* O158:H23

### Condiciones:

pH(7.00 – 5.00) : nueve niveles

$a_w$ (0.999 – 0.960) : 5 niveles

Concentración de inóculo: 100, 1.000, 10.000

Temperaturas: 8,12 y 16°C

$$\text{Logit } P = \text{Ln} \left( \frac{P}{1 - P} \right) = a_0 + a_1 * \text{pH}^* + a_2 * a_w^* + a_3 * (\text{pH}^* * a_w^*) + a_4 * \text{pH}^{*2} + a_5 * a_w^{*2}$$

Variables	Coeficientes estimados								
	8°C			12°C			16°C		
	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL
<b>a<sub>0</sub></b>	-4.742x10 <sup>2</sup> (0.035)	-4.879x10 <sup>1</sup> (0.023)	-7.217x10 <sup>1</sup> (0.033)	-4.996x10 <sup>2</sup> (0.007)	-2.452x10 <sup>2</sup> (0.014)	-4.317x10 <sup>2</sup> (0.031)	-2.439x10 <sup>2</sup> (0.049)	-2.392x10 <sup>2</sup> (0.036)	-2.392x10 <sup>2</sup> (0.036)
<b>a<sub>1</sub> (pH*)</b>	NS	-4.023x10 <sup>2</sup> (0.028)	-5.023x10 <sup>2</sup> (0.033)	NS	NS	6.253x10 <sup>2</sup> (0.031)	NS	1.695x10 <sup>2</sup> (0.024)	1.695x10 <sup>2</sup> (0.024)
<b>a<sub>2</sub> (a<sub>w</sub>*)</b>	1.002x10 <sup>3</sup> (0.034)	NS <sup>a</sup>	NS	4.57872x10 <sup>2</sup> (0.007)	1.968x10 <sup>2</sup> (0.015)	4.521x10 <sup>2</sup> (0.031)	3.032x10 <sup>2</sup> (0.049)	3.584x10 <sup>2</sup> (0.029)	3.584x10 <sup>2</sup> (0.029)
<b>a<sub>3</sub> (pH* x a<sub>w</sub>*)</b>	2.119x10 <sup>2</sup> (0.032)	7.996x10 <sup>2</sup> (0.030)	1.106x10 <sup>3</sup> (0.035)	1.541x10 <sup>3</sup> (0.007)	-7.998x10 <sup>2</sup> (0.015)	NS	8.932x10 <sup>2</sup> (0.049)	3.773x10 <sup>2</sup> (0.018)	3.773x10 <sup>2</sup> (0.018)
<b>a<sub>4</sub> (pH<sup>2</sup>)</b>	NS	NS	NS	-5.242x10 <sup>2</sup> (0.007)	-2.721x10 <sup>2</sup> (0.033)	-4.441x10 <sup>2</sup> (0.031)	NS	NS	NS
<b>a<sub>5</sub> (a<sub>w</sub><sup>2</sup>)</b>	-5.772x10 <sup>2</sup> (0.033)	NS	NS	-5.816x10 <sup>1</sup> (0.006)	NS	NS	NS	NS	NS

## Resultados y Discusión

### Modelos de Crecimiento / no Crecimiento

Los índices de bondad de ajuste de los modelos calculados se muestran en la *Tabla*. Se comprobó el ajuste de los datos estimados por el modelo a los datos observados, a través de la prueba estadística de Hosmer-Lemeshow (*HL*), el Coeficiente de Determinación ( $R^2$ ) y el % de casos correctamente clasificados (% *c*).

	8°C			12°C			16°C		
	100 ufc/mL	1000 ufc/mL	10000 ufc/mL	100 ufc/mL	1000 ufc/mL	10000 ufc/mL	100 ufc/mL	1000 ufc/mL	10000 ufc/mL
<sup>1</sup> Est. HL	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<sup>2</sup> c (%)	96.7	99.7	100	96.7	98.3	98.3	99.7	100	100
<sup>3</sup> FP (%)	3.3	0.3	0	3.3	1.7	1.7	0.3	0	0
<sup>4</sup> FN (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<sup>5</sup> R <sup>2</sup>	0.979	0.993	0.999	0.968	0.978	0.975	0.993	1.000	1.000

<sup>1</sup>Estadísticos de Hosmer-Lemeshow.

<sup>2</sup> Porcentaje de casos correctamente clasificados.

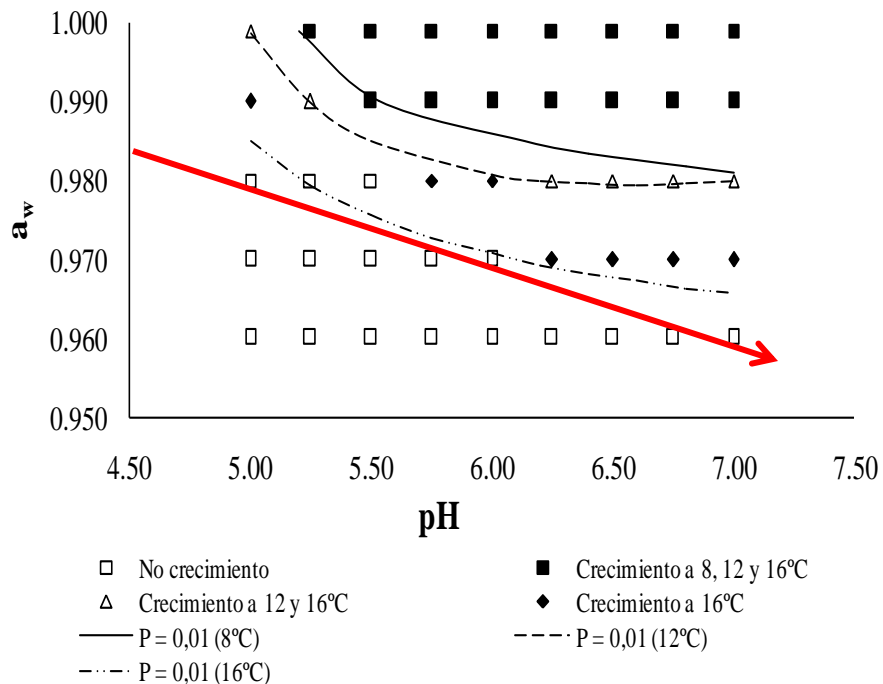
<sup>3</sup> Porcentaje de Falsos Positivos.

<sup>4</sup>Porcentaje de Falsos Negativos.

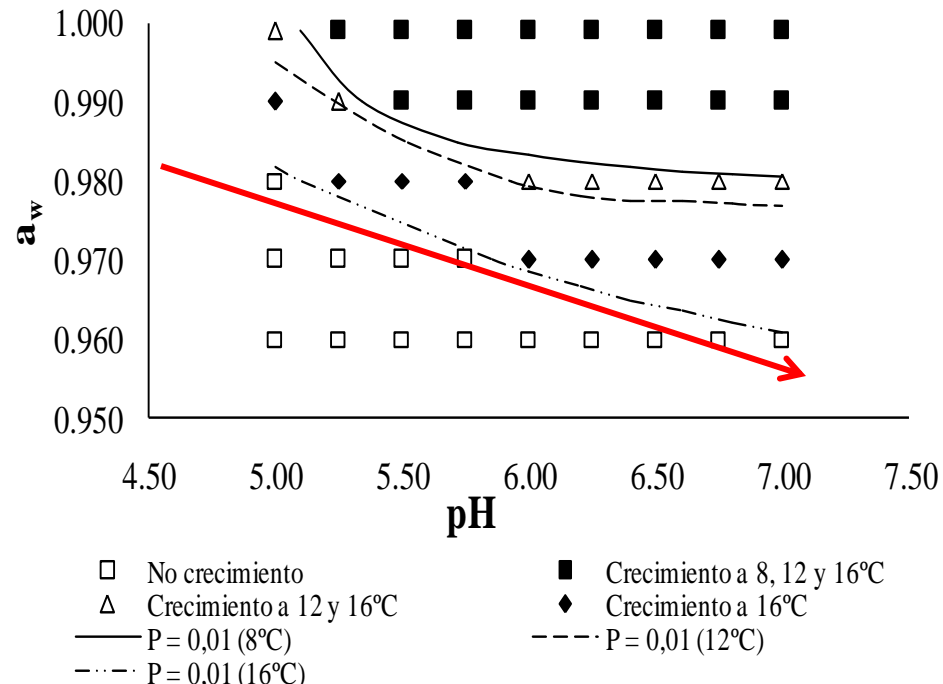
<sup>5</sup> Coeficiente de Determinación.

## Resultados y Discusión

### Efectos del pH, $a_w$ , Temperatura y Concentraciones de inóculo sobre los Límites de Crecimiento de *E. coli* O158:H23

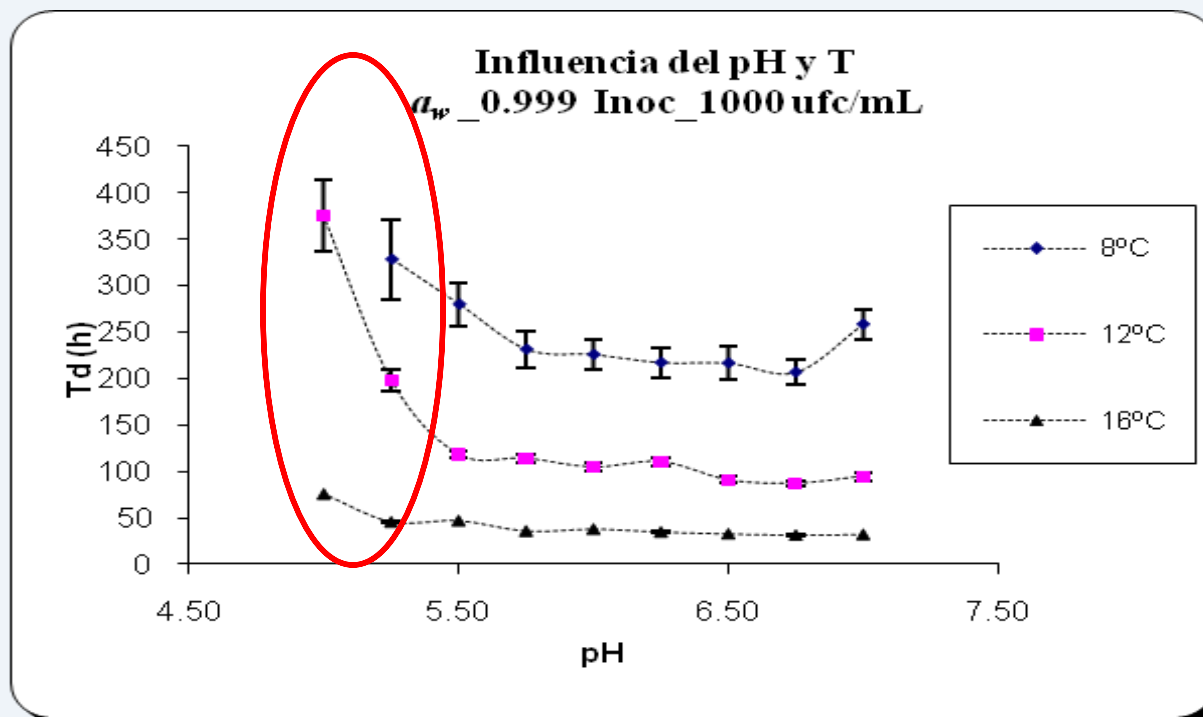


**Interfaz de crecimiento/no crecimiento de *E. coli* O158:H23 a 8, 12 y 16°C (concentración de inóculo = 100 ufc/mL).**



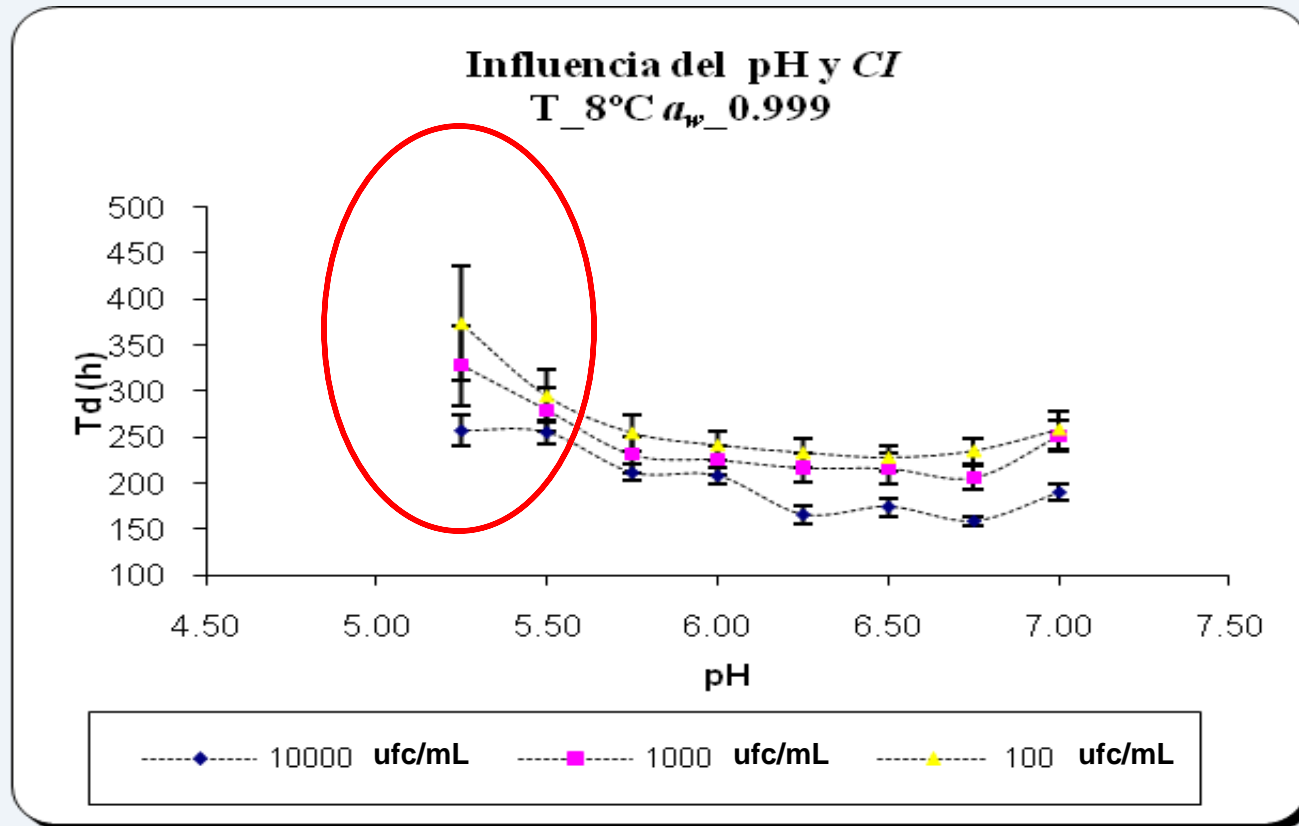
**Interfaz de crecimiento/no crecimiento de *E. coli* O158:H23 a 8, 12 y 16°C (concentración de inóculo = 10.000 ufc/mL).**

### DESCRIPCIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO



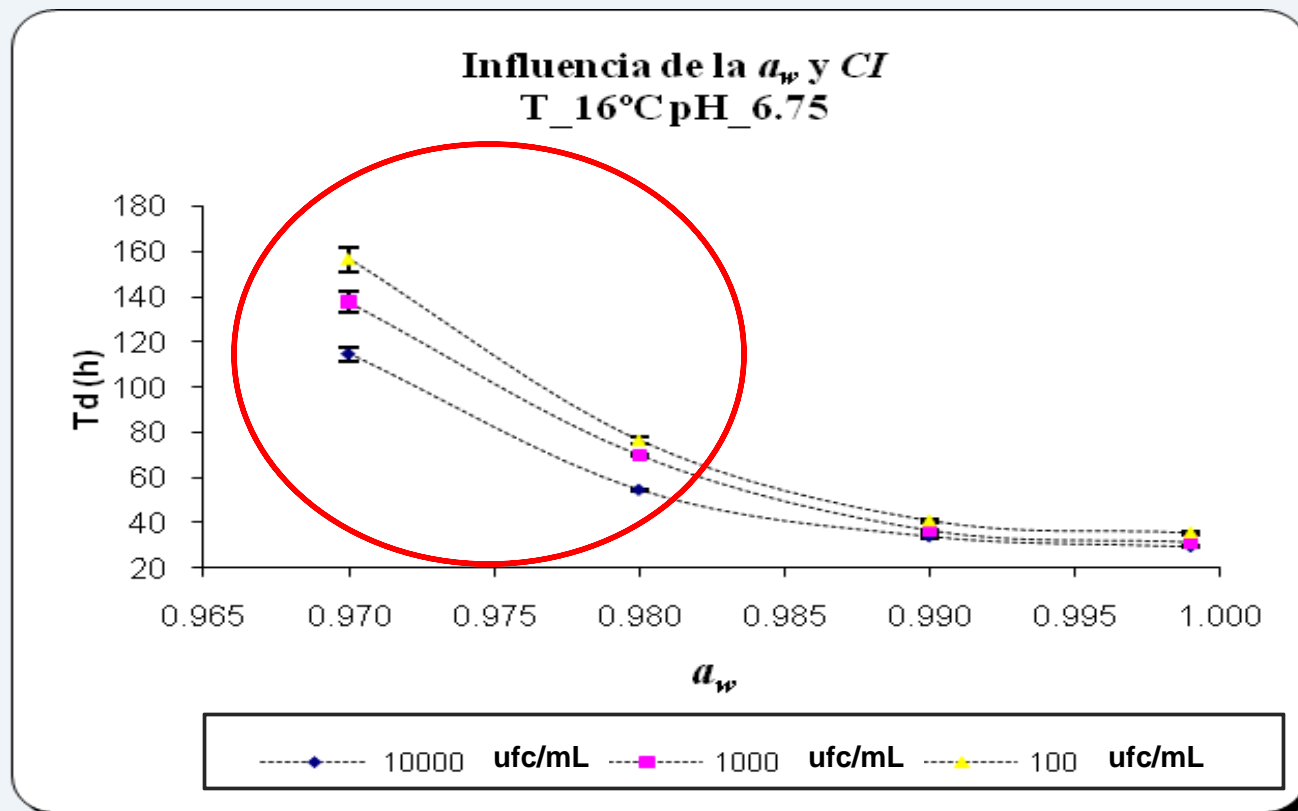
**Influencia del pH y la temperatura sobre el  $T_D$  a concentración de inóculo 1.000 ufc/mL y  $a_w$  0.999.**

### DESCRIPCIÓN DE LA CINÉTICA CRECIMIENTO

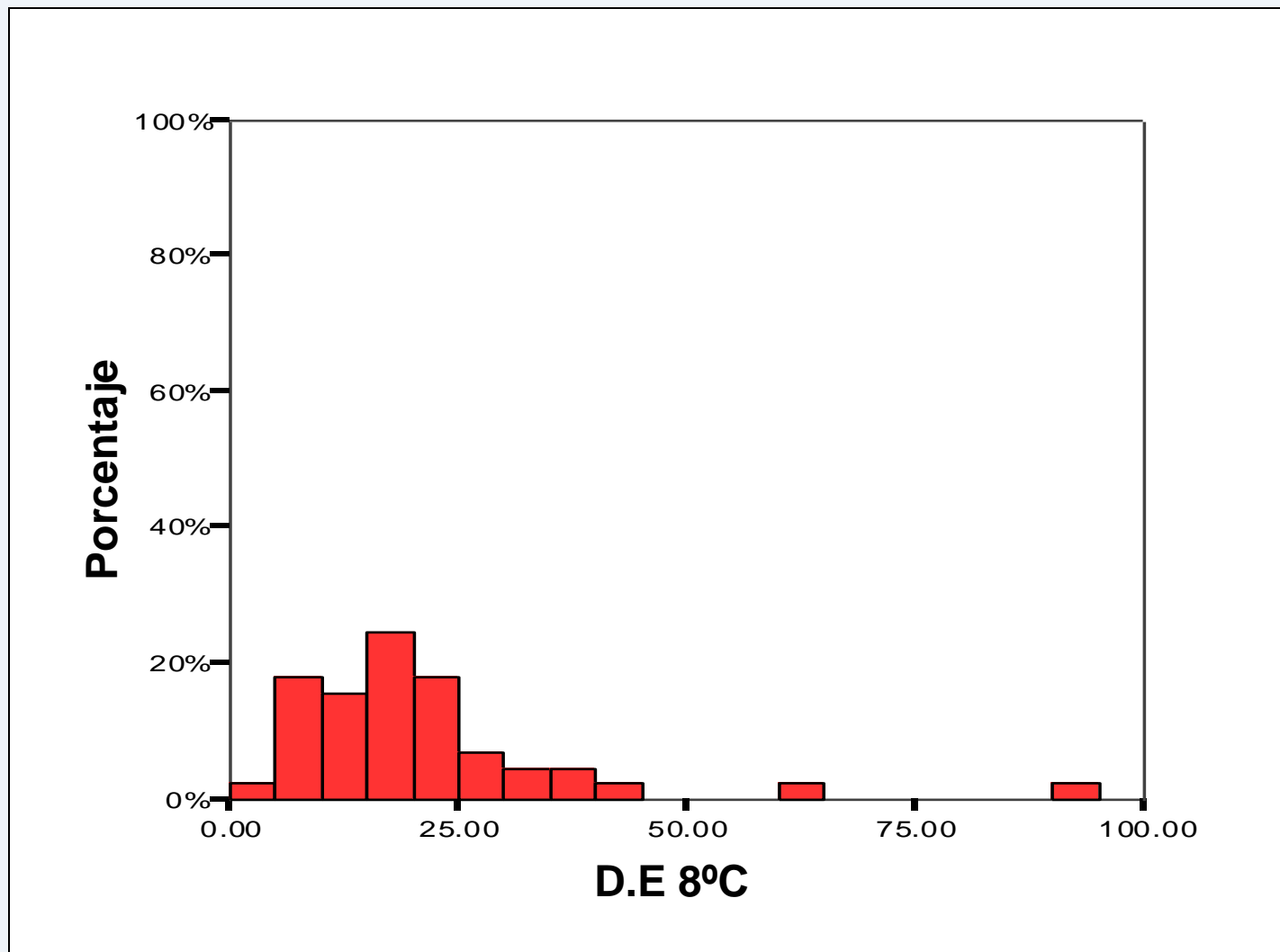


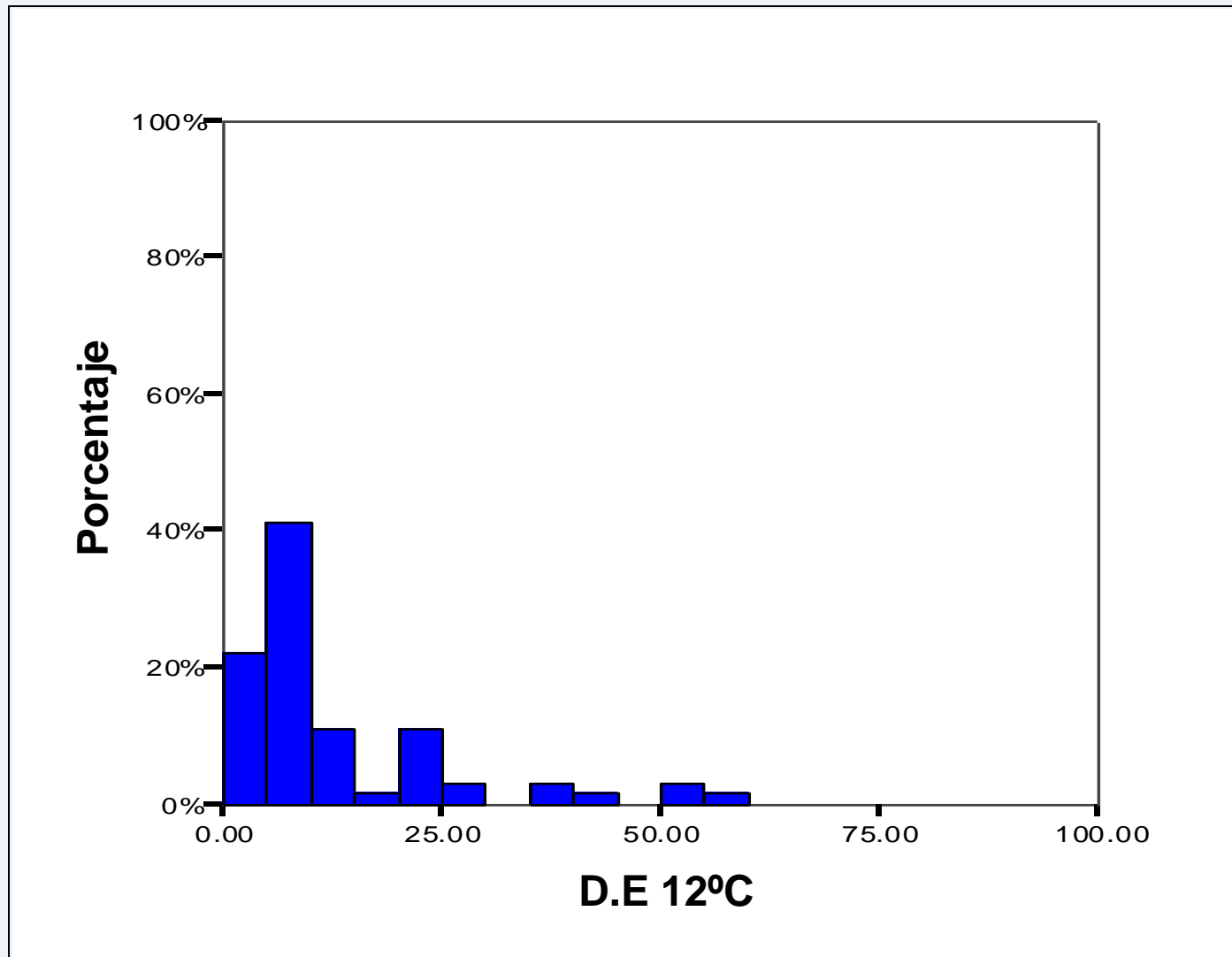
**Influencia del nivel de pH y la concentración de inóculo sobre el  $T_D$  a  $8^{\circ}\text{C}$  y  $a_w$  0.999.**

## DESCRIPCIÓN DEL CINÉTICA DE CRECIMIENTO

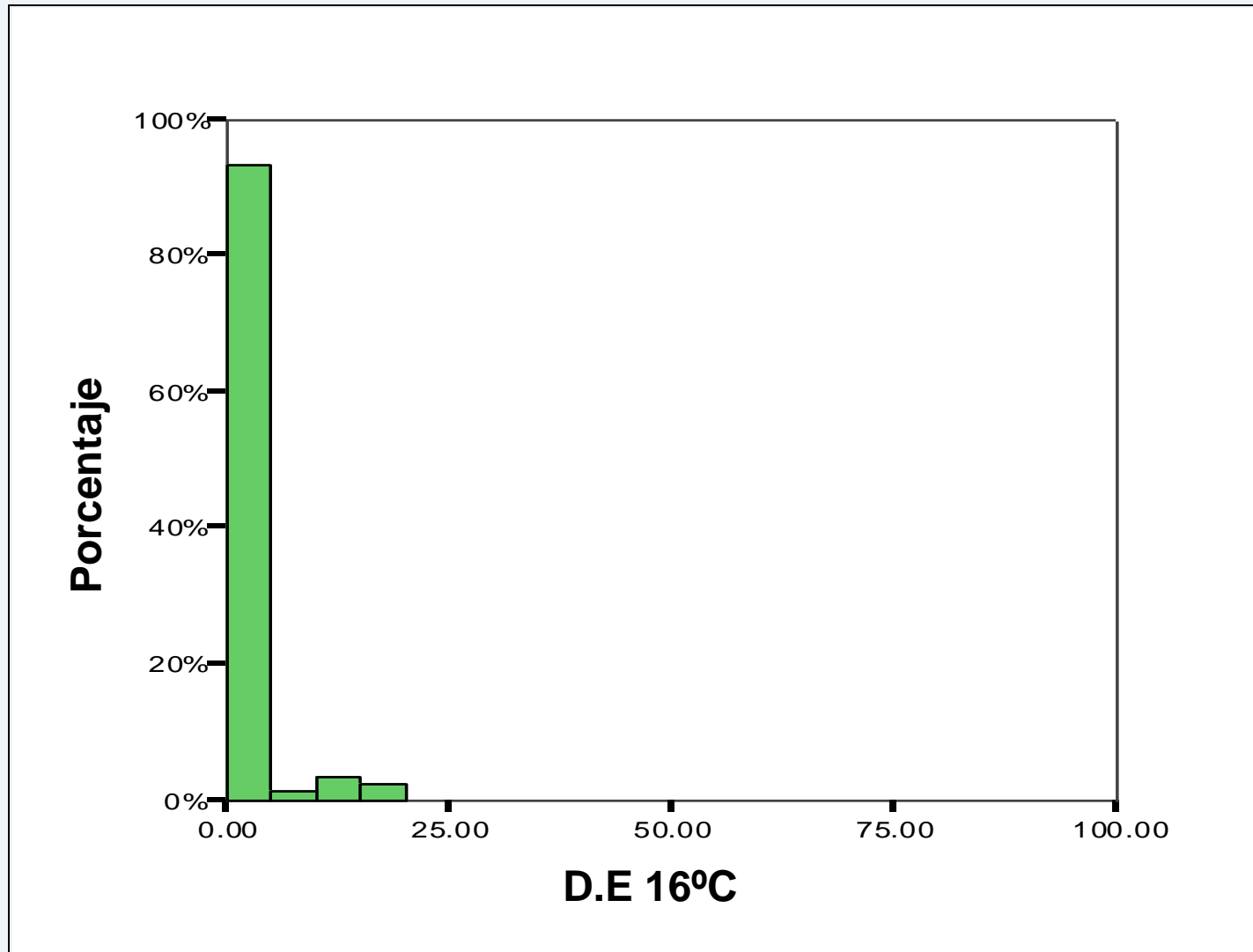


**Influencia de la  $a_w$  y la concentración de inóculo sobre el  $T_D$  a 16 °C y pH 6.75.**









# Resultados y Discusión

## DESCRIPCIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL GRADO DE SIGNIFICACIÓN DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL $T_D$ DE *E. COLI*

#### Prueba T de Student para muestras independientes ( $T_D = 50$ h)

#### Prueba T de Student para muestras independientes ( $T_D = 100$ h)

		Sig.(Bilateral)	Valor T			Sig.(Bilateral)	Valor T
<b>Temperatura</b>	Igualdad de varianzas	<b>&lt; 0.001</b>	-7.832	<b>Temperatura</b>	Igualdad de varianzas	<b>&lt; 0.001</b>	-12.619
	No igualdad de varianzas	<b>&lt; 0.001</b>	-13.285		No igualdad de varianzas	<b>&lt; 0.001</b>	-13.411
<b>Concentración de Inóculo</b>	Igualdad de varianzas	0.088	-1.712	<b>Concentración de Inóculo</b>	Igualdad de varianzas	<b>0.036</b>	-2.106
	No igualdad de varianzas	0.105	-1.644		No igualdad de varianzas	<b>0.039</b>	-2.085
<b>pH</b>	Igualdad de varianzas	0.175	-1.362	<b>pH</b>	Igualdad de varianzas	0.869	-0.165
	No igualdad de varianzas	0.152	-1.449		No igualdad de varianzas	0.869	-0.165
<b><math>a_w</math></b>	Igualdad de varianzas	<b>&lt; 0.001</b>	-3.750	<b><math>a_w</math></b>	Igualdad de varianzas	0.104	-1.633
	No igualdad de varianzas	<b>&lt; 0.001</b>	-5.133		No igualdad de varianzas	0.093	-1.687

## Conclusiones

•Existieron diferencias en el comportamiento cinético de las cepas de *E. coli* estudiadas, dada la disparidad en los valores obtenidos de fase de latencia y tasa máxima de crecimiento. Asimismo, se observó una diferencia entre las dos concentraciones de inóculo estudiadas de forma que a 10.000 ufc/mL, la fase de latencia disminuyó y la tasa de crecimiento aumentó. Bajo condiciones limitantes (8°C, pH 5.50) no hubo crecimiento de las cepas O59:H21 (100 y 10.000 ufc/mL) y O157:H7 (100 ufc/mL), mientras que a 16°C y pH 7.00; la cepa O158:H23 fue la que presentó un crecimiento más rápido, y por tanto, fue seleccionada para la elaboración de los modelos de crecimiento/no crecimiento.

## Conclusiones

**• Los modelos de regresión logística obtenidos explicaron con suficiencia los datos observados, proporcionando un buen ajuste. El desplazamiento del punto de corte de probabilidad a 0.01 originó un modelo a partir del cual se consiguen estimaciones más seguras, fiables y realistas en comparación con otros modelos de probabilidad utilizados por otros autores.**

## Conclusiones

- Las estimaciones generadas por los modelos de regresión logística dieron como resultado que el crecimiento de *E. coli* puede ser inhibido a 8°C, manteniendo unos niveles bajos de pH (< 5.50) y de  $a_w$  (< 0.990). Sin embargo, a temperaturas de 12 o 16°C *E. coli* puede crecer a pH 5.00; necesitándose una reducción del valor de  $a_w$  por debajo de 0.970.

## Conclusiones

- **La influencia de la concentración de inóculo produjo un desplazamiento en la posición de la interfaz de crecimiento/no crecimiento, confirmando los resultados obtenidos en otros estudios. Sin embargo, dicho efecto se vio incrementado por la temperatura, existiendo diferencias notorias entre 8-12°C y 16°C.**

## Conclusiones

- **Los valores del tiempo de detección fueron mayores a medida que la concentración de inóculo fue menor. Asimismo, existió un aumento de la variabilidad asociada a los mismos a niveles bajos de temperatura, pH y  $a_w$ .**

## Conclusiones

**• Los resultados obtenidos del presente trabajo pueden utilizarse dentro de un esquema de Evaluación Cuantitativa de Riesgo Microbiológico teniendo en cuenta la variabilidad aportada por la utilización de distintas cepas y el comportamiento de las mismas en condiciones limitantes y favorables para el crecimiento.**



**Muchas Gracias  
por su atención**

**FIN**

A photograph of the Castillo de San Pedro de Mártir in Havana, Cuba. The image shows a large, historic stone fortification built on a rocky island in the ocean. A prominent lighthouse with a white tower and a dark lantern room is visible on the island. The sky is clear and blue, and the water is a deep blue. In the foreground, a concrete railing is visible, suggesting the photo was taken from a nearby walkway or balcony.