

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL CICATA-LEGARIA



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

POSGRADO EN TECNOLOGIA AVANZADA

Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto
Politécnico Nacional

Unidad Legaria

Monitoreo del comportamiento de *Escherichia coli* genérica y *Escherichia coli*
O157:H7 en caldo de cultivo mediante parámetros fisicoquímicos y de cultivo

Tesis que para obtener el grado de

Doctor en Tecnología Avanzada

Presenta:

Haydeé Bautista de León

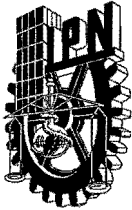
Director(es) de Tesis:

Dr. Javier Castro Rosas

Dr. José Luis Fernández Muñoz



México D.F Enero de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F., siendo las 12:00 horas del día 18 del mes de enero del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-LEG para examinar la tesis titulada: Monitoreo del comportamiento de Escherichia coli genérica y Escherichia coli O157:H7 en caldo de cultivo mediante parámetros fisicoquímicos y de cultivo

Presentada por el alumno:

BAUTISTA
Apellido paterno

DE LEÓN
Apellido materno

HAYDEÉ
Nombre(s)

Con registro:

A	0	6	0	2	1	7
---	---	---	---	---	---	---

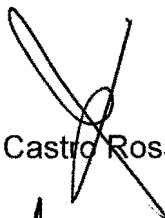
aspirante de:

DOCTOR EN TECNOLOGIA AVANZADA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. Javier Castro Rosas


Dr. José Luis Fernández Muñoz


Dr. Martín Guadalupe Zapata
Torres

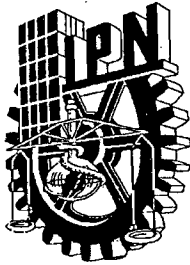

Dr. Eduardo San Martín Martínez


Dr. Miguel A. Aguilar Méndez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES




CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGIA AVANZADA
Dr. José Antonio Irán Díaz González



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, Distrito Federal el día 17 del mes de Enero del año 2011, el (la) que suscribe Haydeé Bautista de León alumno (a) del Programa de Doctorado en Tecnología Avanzada con número de registro A060217, adscrito a CICATA-LEGARIA DEL IPN, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Javier Castro Rosas y Dr. José Luis Fernández Muñoz y cede los derechos del trabajo intitulado Monitoreo del comportamiento de *Escherichia coli* genérica y *Escherichia coli* O157:H7 en caldo de cultivo mediante parámetros fisicoquímicos y de cultivo, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección haydee_bautista@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Haydeé Bautista de León

Nombre y firma

RESUMÉN

En México existen pocos estudios sobre el comportamiento de la cantidad de inóculo depositado de *Escherichia coli* O157:H7 y la interacción de factores del medio (pH, actividad de agua) donde se desarrolla el patógeno y ambientales (como la temperatura). Del entendimiento de la interacción de los diferentes factores que condicionan el desarrollo de un patógeno sobre un medio de cultivo se puede predecir el inicio de la fase lag, la tasa de crecimiento del mismo y de esta manera proponer medios de control o monitoreo de posibles contaminaciones. La información obtenida nos dará idea de las condiciones más adecuadas que dirijan a la inocuidad del alimento. Además al inicio de este estudio se trabajó con un indicador de contaminación fecal como *E. coli* ATCC 25922 (genérica o no patógena) para conocer su comportamiento y la interacción del microorganismo con factores como pH, actividad de agua (a_w), temperatura y concentración del inóculo microbiano. Es por ello que se planteó el presente estudio cuyo objetivo fue determinar el comportamiento de *Escherichia coli* patógena y no patógena en caldo de cultivo mediante diferentes métodos y parámetros fisiológicos ajustando su comportamiento con modelos matemáticos. En el trabajo experimental se evaluó la dinámica de crecimiento de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* genérica influenciada por la temperatura (T°) (15, 25, 35 °C), pH (4, 5.5, 7.0), actividad de agua (a_w) (0.965, 0.981, 0.998) y concentración del microorganismo (4, 400, 40000 UFC). Para evaluar el comportamiento del crecimiento microbiano se utilizaron cuatro técnicas, tres de ellas (Bioscreen, Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) e Impedancia), como alternativas al Conteo en Placa (CP). Se evaluó como respuestas de crecimiento para *E. coli* O157:H7 el inicio de la fase lag (λ), la tasa de crecimiento específico (μ_{max}), el tiempo de generación (t_g) y el valor máximo alcanzado (A). Los resultados obtenidos con Bioscreen y CP se usaron para ajustarse a los modelos de Gompertz, Logístico y Richards. Se encontró que usando la técnica de CP para *E. coli* no patógena fueron factores altamente significativos ($p=0.000000$) el pH y la concentración del microorganismo, la temperatura ($p=0.000032$), excepto la a_w ($p=0.641835$). La interacción de la a_w con el inóculo inicial ($p=0.000000$) y la temperatura ($p=0.035351$) fueron significativos.

La a_w es un factor que no debe ignorarse al evaluar el comportamiento de *E. coli* no patógena. Para la *E. coli* O157:H7 usando CP, los factores estudiados mostrando efectos altamente significativos ($p=0.000$) para los términos lineales (L) y cuadráticos (Q) para el pH, y la temperatura (L). La concentración inicial de *E. coli* patógena mostró significancia en los términos L (0.033) y Q (0.003). Usando el Bioscreen, se mostró que fueron altamente significativos ($p=0.000000$) el pH y la temperatura, ambos en sus términos (L) y (Q), así como el inóculo inicial (L). De esta información se concluye la importancia que muestra el pH, la temperatura, la concentración del microorganismo al evaluar el comportamiento del *E. coli* O157:H7. Sin embargo las gráficas del efecto de la a_w muestran diferencias significativas que coinciden con el análisis de *E. coli* no patógena.

El inicio de la fase λ mostró valores variables para las técnicas de Bioscreen (5.9 a 67.44 h), Calorimetría Diferencial de Barrido (0.23 a 4.83 h) e Impedancia (4.55 a 56.95 h), excepto para Vaciado en Placa (donde no se detectó fase λ). La fase λ se prolongó cuando la combinación de las condiciones evaluadas fueron críticas (pH 5.5, 15 °C, 0.965 a_w e inóculos de 4 UFC). Las condiciones óptimas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 fueron a pH 7, 0.998 a_w a 35 °C, independientemente de la concentración de inóculo evaluado. Así mismo independientemente de la temperatura, pH, a_w y concentración del microorganismo, a pH 4.0 no se observó crecimiento de *E. coli* patógena y no patógena en el caldo de cultivo en las cuatro técnicas evaluadas. A pH 4.0 las cinéticas de sobrevivencia fueron detectadas a 15 y 25 °C, y las cinéticas de muerte a 35 °C. En general el t_g fue más corto al incrementar la temperatura, evidenciando que mientras se acerque al óptimo de crecimiento, *E. coli* se multiplicará a mayor velocidad. Al incrementar la temperatura el t_g disminuye y μ_{max} incrementa. El crecimiento máximo (A) por *E. coli* O157:H7 varió de 9.99 a 8.55 \log_{10} UFC/mL usando CP y en el Bioscreen fue de 1.2 a 0.57 DO. El modelo que permitió el mejor ajuste de los datos experimentales usando las técnicas de CP y del Bioscreen fue el modelo de Richards ($R^2=0.999$ a 0.992) y el modelo Logístico ($R^2=1.0$ a 0.993), respectivamente. La Calorimetría Diferencial de Barrido mostró ser la técnica alternativa al recuento tradicional para evaluar el comportamiento de *E. coli*. Esta técnica es rápida, no laboriosa, requiere de pequeños volúmenes de muestra.

SUMMARY

In Mexico doesn't have been studied the behavior about the quantity of inoculation deposited of *Escherichia coli* O157:H7 and the interaction of environment, the culture (pH, water activity) and their factors where is developed the pathogen and its environment (like the temperature). The interaction among factors can condition the development of a pathogen in its environment and it predicts when the phase lag begins, the rate of growth, so we can control it or monitor it another ways of contamination, all of this help to us to be careful and the food can be inocuity .Also when this investigation began, it was used a indicator of fecal contamination (*E. coli* ATCC 25922) to know its behavior and the interaction of microorganism with factors like pH, water activity, (a_w), temperature and concentration of inoculums microbial. That's why this investigation was planned to know the behavior de *Escherichia coli* of pathogenic and non pathogenic in broth of culture with different methods and physiological parameters fitting its behavior with mathematics models. In the investigation it was evaluated the dynamic of growth of *E. coli* O157:H7 influenced by the temperature (T) (15, 25, 35 °C), pH (4, 5,5, 7,0), water activity (a_w) (0,965, 0,981, 0,998) and concentration of the microorganism (4, 400, 40000 UFC). In order to evaluate the behavior of the microbial growth four techniques were used, three of them (Bioscreen, Differential Scanning Calorimetric (DSC) and Impedance), like alternatives to Count in dishes (CP). It was evaluated as answers of growth for *E. coli* O157:H7 beginning of phase lag (λ), the rate of specific (μ_{max}), the time of generation (t_g) and the reached maximum value (A). The results obtained with Bioscreen and CP was used to adjust the models of Gompertz's, Logistic and Richards. It was used the technique of CP for *E. coli* non pathogen were factors highly significant ($p=0.000000$) pH and the concentration of the microorganism, the temperature ($p=0.000032$), except a_w ($p=0.6418335$). The interaction of a_w with inoculum initial ($p=0.000000$) and the temperature ($p=0.035351$) were significant. a_w is a factor that must not ignore it when the *E. coli*'s behavior non pathogen is evaluated. For the investigation de *E. coli* O157:H7 using CP, factors show highly significant effects ($p=0.000$) for the lineal (L) and quadratic (Q) terminus for pH, and the temperature (L). The first pathogen concentration of *E. coli* showed great significance in the terminus L (0.033) and Q the temperature, both of them in their terminus (L) and (Q), and the inoculums initial (L).

This information shows the important of the pH, the temperature, and the concentration of microorganism when the behavior of *E. coli* 0157:H7 is evaluated, although the graphics of effect of a_w show significant differences that they coincide with the analysis of *E. coli* non pathogen.

The beginning of the phase λ showed variable values for the techniques of Bioscreen (5,9 to 67,44 h), Differential Scanning Calorimetric (0,23 to 4,83 h) and impedance (4,55 to 56,95 h), except for drained in plate (where it did not detect phase λ). The phase λ was prolonged when the combination of the conditions were evaluated and critical (pH 5.5, 15 °C, 0.965 a_w and inoculums of 4 UFC). The optimal conditions of growth of *E. coli* 0157:H7 went to pH 7, 0.998 a_w to 35 °C, it was independently of the concentration of inoculums evaluated, also independently of the temperature, pH, a_w and concentration of the microorganism, pH 4,0 were not observed growth of *E. coli* pathogen and non pathogen in the broth of culture in the four techniques evaluated. About pH 4.0 the kinetics of survivor were detected to 15 and 25 °C and the kinetics of death to 35 °C. In general t_g was shorter when the temperature was increasing, it approached the optimal one of growth, and *E. coli* was multiplied itself speedier. When the temperature increases, t_g diminishes and μ_{max} increases. The maximum growth (A) by *E. coli* 0157:H7 changed from 9.99 to 8.55 Log₁₀ UFC/mL using CP and in the Bioscreen was 1.2 to 0.57 DO. The Richard ($R^2=0,999$ to 0,992) model and the Logistic ($R^2=1,0$ to 0,993) model respectively were the best model that let the best adjust of the experimental dates, when it uses the techniques of CP and Bioscreen. Differential Scanning Calorimetric showed to be the best alternative to evaluate the behavior of *E. coli*, this technique is easy to use, and it requires a little bit of sample to work.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al CONACYT, que como instituciones me dieron el apoyo económico para prepararme como Doctor y concluir esta tesis.

A mis asesores el Dr. Javier Castro Rosas, el Dr. José Luis Fernández Muñoz, Dr. Eduardo San Martín Martínez, Dr. Martín Zapata y el Dr. Miguel Ángel Aguilar Méndez por el tiempo prestado y el apoyo brindado para mejorar éste trabajo. Les agradezco sus consejos, sus comentarios pertinentes y el ánimo constante.

Al Dr. Díaz Góngora por haber hecho posible el apoyo para realizar la estancia en la Argentina. Mil gracias!

Al Dr. Carmelo Felicce y la Dra. Rossana Madrid, por motivarme y enseñarme durante la estancia en su universidad la importancia del trabajo en equipo.

Al Dr. Eduardo Campos Rojas, le externo mi total agradecimiento por enseñarme y guiarme con tus consejos atinados para la conclusión de esta tesis. Realmente te admiró, eres el mejor ejemplo de constancia, dedicación, compromiso y amor a lo que haces. Agradezco infinitamente el tiempo que dedicaste para prepararme y orientarme en todo momento, malo y bueno. Eres un investigador brillante. Mil gracias!!.

A mis amigos:

Los de Pachuca: a Carlos Gómez, que me ha apoyado y aconsejado en momentos difíciles y que ha sabido enseñarme a ejemplo vivo la importancia y responsabilidad de la amistad.

Quiero externar una mención muy especial a mi amiga Maribel Huitrón García que me apoyo en la parte experimental de este trabajo. Gracias por acompañarme en mis desvelos y esas largas y exhaustivas jornadas, después de que sufrí ese robo que altero un poco mis proyectos, pero me dejó muy claro el gran apoyo de todos mis amigos. Gracias!!

A, Faby, Gaby, Letts, Obdu, el Coby, Tina, por todos los momentos compartidos en el laboratorio, nuestra primer casa. Además de las grandes platicas y apoyo brindado junto con dos amigas especiales para mí: Enna y Esme.

Los del Distrito Federal: a Ernesto Velásquez Bautista, Manuel Ávila, Dr. Miguel Ángel Aguilar Frutis, Daniel Urbina, Jorge Cerna, Juan Aguilar, Gustavo Díaz Uribe, Arely Ireta y Julia Colín. A cada uno de uds mi mayor agradecimiento por ser una luz en mi vida, muchas gracias porque he aprendido lo emocionante que es estar aquí y ahora, en su grandiosa compañía.

Al maestro Germán Köhler Fuentes apoyo incondicional y gran amigo con quien he pasado largas horas en buena compañía y sabios consejos de vida. Le agradezco todas las enseñanzas, consejos y guías, valiosas para la vida.

Los de Puebla: el maestro Eduardo Sandoval, a Licha Cardona Hdz, Lucy Hernández G , Jenny-Heidi Pérez B, Javier Figueroa Cid, mi tío Manuel Bautista Guerrero, mi tía Vicky y mi madrina Angélica Ramírez (familias de Xico), por sus porras y apoyo incondicional.

A Carmen Mayorga, mi amiga Peruana., con quien conviví un pequeño periodo y aprendí de sus consejos.

A las familias de Brenda Herrera Moran, Isabel Sampayo López y Lupita Linares Takaki mis amigas de la adolescencia, infancia y universidad. Gracias por su amistad!!.

A todas las personas que me recibieron en sus casas durante éste periodo, y que me permitieron convivir y disfrutar de la calidez de un hogar, de la buena comida, la compañía y sobretodo de una buena amistad: la sra Raquel Takaki y sus hijas Carmi, Chayo y Lupita, la sra Martha Gallegos (del DF), la sra Laura Rojas y fam (del Edo de México), la sra Zulema y fam (de Tucumán, Argentina), y el sr. Malaquías (de Pachuca).

A Pablo, Laurita y Lety Cardona, que siempre ayudan y orientan a cada estudiante a salir de todos los problemas académicos.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis al máximo creador de todo lo existente: a Dios; por permitirme conocer a tanta gente valiosa que me ha enseñado, guiado y me ha permitido entrar en sus vidas para formar buenas amistades. Gracias por haberme puesto en esta vida en el momento justo y el lugar indicado para enriquecerme, alegrarme, ilusionarme y sobre todo dejarme vivir junto a toda esta gente maravillosa.

A mis padres: Ángel Bautista y Katty de León, por tenerme presente en sus oraciones y por saberme apoyar en todas las circunstancias difíciles de la vida. Gracias por la ternura, la paciencia, la calidez, la protección y los consejos que me dan. Les agradezco infinitamente por haberme dado la vida, comprenderme y amarme. Los amo!!.

A mis hermanos Bautista: Miguel Ángel, Bethy y Marú por tenerme presente en sus vidas. Les agradezco todos los bellos momentos que hemos estado juntos, como mi operación, se acuerdan? fue fenomenal el haber estado en una recuperación así, bajo su calidez y amor. Los amo a todos!!.

A mis abuelitas: María Martínez y Panchita Coayuca (†) por la calidez y el afecto mostrado a cada instante.

A cada uno de mis amigos que están mencionados en ésta tesis y aquellos que por motivos de mi memoria volátil no están mencionados, gracias a cada uno de ustedes porque han construido grandes momentos en mi vida, difíciles y alegres. Gracias por haberme dejado disfrutar la vida bajo su valiosa presencia y calidez personal.

ÍNDICE

Pág.

Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Cuadros.....	xvi
RESUMÉN.....	iv
SUMMARY.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 <i>Escherichia coli</i> genérica.....	4
2.1.1 Características de <i>E. coli</i>	5
2.2 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	6
2.2.1 Características de <i>E. coli</i> O157:H7.....	8
2.3 Curva de crecimiento microbiano	9
2.3.1 Fase de latencia, adaptación o lag (λ).....	10
2.3.2 Fase de multiplicación, logarítmica o log.....	11
2.3.3 Fase estacionaria.....	13
2.4 Factores que afectan el comportamiento de <i>E. coli</i>	14
2.4.1 Factores extrínsecos	14
2.4.1.1 Temperatura.....	14
2.4.1.2 pH.....	16
2.4.1.3 Actividad de agua (a_w).....	18
2.4.1.4 Disponibilidad de nutrientes.....	20
2.4.1.4.1 Caldo de cultivo.....	22
2.4.2 Factores intrínsecos	22
2.4.2.1 Concentración del microorganismo.....	22
2.4.2.2 Estado fisiológico de las células.....	24
2.5 Técnicas de Recuento microbiano	25
2.5.1 Cuenta Viable en Placa.....	25
2.5.2 Turbidimetría.....	26
2.5.3 Calorimetría Diferencial de Barrido.....	28
2.5.4 Espectroscopia de Impedancia.....	28
2.6 Microbiología predictiva	30
2.6.1 Modelos matemáticos aplicados al crecimiento microbiano.....	31
2.6.1.1 Modelo Logístico.....	32

2.6.1.2	Modelo de Gompertz.....	32
2.6.1.3	Modelo de Richards.....	33
3.	OBJETIVOS	34
3.1	General.....	34
3.2	Específicos.....	34
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1	Técnica de Cuenta en Placa	35
4.1.1	Preparación de muestras.....	35
4.1.1.1	Caldo de cultivo.....	35
4.1.1.2	Ajuste de la actividad de agua en CST.....	35
4.1.1.3	Conteo en Placa: <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	37
4.1.1.4	Conteo en Placa: <i>E. coli</i> O157:H7.....	37
4.1.1.5	Diseño experimental.....	38
4.1.1.5.1	Conteo en Placa en caldo de cultivo con <i>E. coli</i> O157:H7.....	38
4.1.1.6	Ajuste de datos experimentales a modelos matemáticos.....	38
4.1.1.7	Variables evaluadas.....	39
4.2.	Técnica con Turbidimetría	39
4.2.1	Caldo de cultivo.....	39
4.2.2	Diseño experimental.....	40
4.2.3	Ajuste de datos experimentales a modelos matemáticos.....	40
4.2.4	Variables evaluadas.....	40
4.3.	Técnica con Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	41
4.3.1	Caldo de cultivo.....	41
4.3.2	Diseño experimental.....	41
4.3.3	Variables evaluadas.....	42
4.4	Técnica de Espectroscopia de Impedancia	42
4.4.1	Caldo de cultivo.....	42
4.4.2	Diseño experimental.....	43
4.4.3.	Variables evaluadas.....	43
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
5.1	Conteo en Placa: <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	44
5.2	Conteo en Placa: <i>E. coli</i> O157:H7.....	48
5.3	Bioscreen C.....	58
5.4	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	66
5.5	Espectroscopia de Impedancia: Evaluación del Bactometer.....	72
5.6	Comparación de la fase lag (λ) en las técnicas de Cuenta en Placa, Bioscreen y Calorimetría Diferencial de Barrido.....	78

6.	CONCLUSIONES	80
7	TRABAJO A FUTURO	82
8.	LITERATURA CITADA	83
	Apéndice A. Diseño experimental Box-Behnken	94
	Apéndice B. Cuenta en placa	97
	Apéndice C. Bioscreen C	100

Índice de Figuras

Figura		Pág.
1	Efecto de la temperatura, pH, tamaño de inóculo y a_w en el comportamiento de <i>E. coli</i> no patógena en CST.....	44
2	Efecto (A) del pH y (B) de la a_w en el comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en CST usando datos de Cuenta en Placa.....	55
	Efecto de (C) la temperatura, (D) el tamaño de inóculo en el comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en CST usando datos de Cuenta en Placa.....	56
3	Efecto (A) del pH y (B) la a_w en el parámetro λ para evaluar el comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7, usando datos del Bioscreen.....	64
	Efecto de (C) la temperatura y (D) el tamaño del inóculo, en el parámetro λ para evaluar el comportamiento de <i>E. coli</i> O157:H7, usando datos del Bioscreen.....	65
4	Termogramas del desarrollo de <i>E. coli</i> en CST a 35 °C y pH 7.0.....	66
5	Curvas de desarrollo de <i>E. coli</i> a 35 °C usando la técnica de CP a partir de 4 inóculos iniciales diferentes.....	69
6	Efecto de (A) la temperatura, en el TDD de <i>E. coli</i> no patógena usando datos de Impedancia.....	75
	Efecto (B) del pH, y (C) el tamaño de inóculo en el TDD de <i>E. coli</i> no patógena usando datos de Impedancia.....	76

Índice de Cuadros

Cuadro		Pág.
1	Clasificación de <i>Escherichia coli</i>	4
2	Evaluaciones de la a_w en 10 mL de CST a 35, 25 y 15 °C.....	36
3	Evaluación de <i>E. coli</i> usando el diseño Factorial Fraccionado $\frac{1}{2} 2^k$	37
4	Solución de la ecuación de Gompertz, Logístico y de Richards expresada en términos de A, μ_m y λ	38
5	Evaluación del caldo de cultivo usando un diseño experimental fraccionado Box-Behnken 3^{4-1}	43
6	Efectos principales e interacciones en el comportamiento de <i>E. coli</i> en CST a 15 y 35 °C usando diseño Factorial Fraccionado $\frac{1}{2} 2^k$	45
7	Análisis de varianza de la influencia de temperatura, pH, a_w , e inóculo inicial en el comportamiento de <i>E. coli</i> usando el diseño Factorial Fraccionado $\frac{1}{2} 2^k$	46
8	Cálculo de los parámetros de crecimiento (μ_{max} , λ , t_g) ¹ de <i>E. coli</i> O157:H7 usando Conteo en Placa con el modelo de Richards.....	50
9	Cálculo de los parámetros de crecimiento (μ_{max} , λ , t_g) ¹ de <i>E. coli</i> O157:H7 usando Conteo en Placa con el modelo de Gompertz.....	51
10	Cálculo de los parámetros de crecimiento (μ_{max} , λ , t_g) ¹ de <i>E. coli</i> O157:H7 usando Conteo en Placa con el modelo Logístico.....	52
11	Efectos estimados para la μ_{max} a partir de datos de Conteo en Placa usando diseño Box-Behnken 3^{4-1}	53
12	Análisis de varianza de μ_{max} con datos de Conteo en Placa en un diseño Box-Behnken 3^{4-1}	54

Índice de Cuadros

Cuadro		Pág.
13	Cálculo de los parámetros de crecimiento (λ , t_g , μ_{max}) ¹ de <i>E. coli</i> O157:H7 usando el Bioscreen con el modelo de Richards.....	59
14	Cálculo de los parámetros de crecimiento (λ , t_g , μ_{max}) ¹ de <i>E. coli</i> O157:H7 usando el Bioscreen y el modelo de Gompertz.....	60
15	Cálculo de los parámetros de crecimiento (λ , t_g , μ_{max}) ¹ de <i>E. coli</i> O157:H7 usando el Bioscreen y el modelo Logístico.....	61
16	Efectos estimados de λ ; con datos del Bioscreen y un diseño Box-Behnken 3 ⁴⁻¹	62
17	Análisis de varianza de λ con datos del Bioscreen en un diseño Box-Behnken 3 ⁴⁻¹	63
18	Tiempo transcurrido al inicio, en el pico y al final de los termogramas del desarrollo de <i>E. coli</i> a 35 °C y calor total generado.....	68
19	Concentración de células alcanzada al inicio, en el pico y al final de los termogramas del desarrollo de <i>E. coli</i>	70
20	Evaluación del comportamiento de <i>E. coli</i> no patógena en CST usando un diseño factorial Box-Behnken 3 ⁴⁻¹	72
21	Efectos estimados en el Tiempo de Detección del Desarrollo usando Impedancia en un diseño Box-Behnken 3 ³⁻¹	74
22	Comparación de la fase lag (h) de <i>E. coli</i> no patógena en CST a 35 °C pH 7 y a _w 0.998 usando CP, DSC y Bioscreen.....	78

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la información de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) es escasa, ya que depende de los sistemas de monitoreo, detección y vigilancia de cada país. Por lo cual una mayor incidencia de ETA's no significa necesariamente que el problema sea mayor sino que refleja la eficiencia de los sistemas de detección (CDC, 2005). En Estados Unidos anualmente ocurren 76 millones de casos de ETA's, de las cuales 73,000 son por *Escherichia coli* O157:H7 (Tsui-Chu et al., 2007).

Se conoce hasta la fecha que la importancia de *E. coli* O157:H7 reside en la baja dosis infectante, menor o igual a 50 células (Tsui-Chu et al., 2007) y a su carácter cosmopolita. Éste patógeno ha causado brotes por todo el mundo principalmente en Canadá, Estados Unidos, Japón y Reino Unido (Aidar-Ugrinovich et al., 2007; Varela-Hernández et al., 2007). En el continente Europeo, Australia y América Latina, las infecciones por *E. coli* no-O157:H7 son más comunes que las ocasionadas por *E. coli* O157:H7 (Montville y Matthews, 2005). En América Latina se reportan cuadros esporádicos de Síndrome Urémico Hemolítico causados por *E. coli* O157:H7 (Rivero et al., 2004; Gomes et al., 2008). En México aparentemente solo existe un reporte por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica en 2001 de casos clínicos aislados de *E. coli* patógena donde el 2% pertenecen a *E. coli* no-O157:H7 (INDRE, 2001).

Los principales alimentos asociados en brotes por *E. coli* O157:H7 son a menudo productos crudos y procesados de origen animal (cárnicos y lácteos), vegetal y alimentos ácidos tradicionalmente considerados de bajo riesgo (jugo de manzana, sidra y mayonesa) (Tsui-Chu et al., 2007; Gomes et al., 2008).

El monitoreo y la detección de microorganismos ha permitido el estudio, identificación, y vigilancia de ETA's. Esta información puede aplicarse con la microbiología predictiva, herramienta que aplica modelos matemáticos para prevenir y controlar las ETA's. Las técnicas de análisis más utilizadas para el monitoreo microbiano han sido las técnicas de cultivo (conocida como Recuento en Placa y empleada como técnica de referencia) y las turbidimétricas (como el equipo Bioscreen C) (Huchet et al., 1995).

Existen otras técnicas que pueden ser alternativas al Recuento en Placa como la Impedancia (Madrid y Felice, 2005) y la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). El Bioscreen, la Impedancia y la DSC son métodos rápidos, automatizados que requieren volúmenes pequeños de muestra para trabajar. El Bioscreen se basa en cambios producidos en la densidad óptica del medio de cultivo debidas al crecimiento microbiano usando mediciones turbidimétricas (McKellar y Knight, 2000), mientras que la Impedancia en los cambios eléctricos (Gerolimatou et al., 2004). La DSC, ha sido empleada para estudiar cinéticas de muerte térmica microbiana (Honglin et al., 1993; Lee y Kaletunc, 2002a, 2002b). Esta técnica no ha sido utilizada para evaluar las cinéticas de crecimiento bacteriano de *E. coli*. No obstante la DSC representa una alternativa cuando los alimentos donde se encuentran los microorganismos son opacos o turbios, lo cual imposibilita su evaluación en el Bioscreen.

La industria y las agencias regulatorias de alimentos requieren de información, incluyendo modelos matemáticos que permitan la predicción del comportamiento de *E. coli* O157:H7 bajo diferentes escenarios de procesamiento y comercialización para intervenir mediante un mecanismo adecuado y reducir el impacto de las enfermedades en la salud pública (Tamplin, 2002). Los modelos matemáticos son usados en la industria de alimentos para monitorear el comportamiento de los patógenos en diferentes etapas de preparación, procesado y almacenamiento del producto (Tamplin, 2002).

El conocer como un microorganismo es afectado por factores como temperatura, pH, actividad de agua y concentración del microorganismo ayudaría a entender su comportamiento. El entendimiento de las interacciones (sinérgicas o antagónicas) entre estos factores podría ayudar en la toma de medidas adecuadas para el control de *E. coli* O157:H7 (cepa patógena) y correlacionar los datos con *E. coli* genérica (cepa no patógena), ya que con base en ello será posible elaborar medidas eficaces para prevenir y controlar la enfermedad que provoca. Una herramienta que se puede emplear para conocer el comportamiento microbiano es la predicción, que se emplea para pronosticar el comportamiento de microorganismos patógenos y no patógenos (Ross, 1996).

En esta investigación se evaluó el comportamiento de *E. coli* patógena y no patógena influenciada por cuatro factores (temperatura, pH, a_w y concentración del microorganismo). La evaluación se realizó usando la técnica de Cuenta en Placa (CP), Bioscreen, Espectroscopia de Impedancia y Calorimetría Diferencial de Barrido. Finalmente, los datos de CP y Bioscreen se ajustaron a tres modelos matemáticos predictivos para conocer el comportamiento de *E. coli* patógena en caldo de cultivo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Escherichia coli* genérica

Escherichia coli (*E. coli*) es el microorganismo procarionte más estudiado en el área biológica, debido a sus características genéticas, metabólicas y de cultivo que han sido la base para la ingeniería genética y la biotecnología moderna (Lederberg, 2004). Esta bacteria fue identificada en 1885 por Theodore von Escherich quien la denominó *Bacterium coli commune*. En 1895, el nombre de *B. coli commune* cambió por *E. coli* en honor a su descubridor. En el cuadro 1, se resume la clasificación de este microorganismo según el manual de Bergey's (1994).

Cuadro 1. Clasificación de *Escherichia coli*.

Familia	Enterobacteriaceae
Tribu	Escherichieae
Género	<i>Escherichia</i>
Especies	<i>E. coli</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>E. blattae</i> , <i>E. vulneris</i> <i>E. fergusonii</i>

Fuente: Manual de Bergey's, 1994.

E. coli es el miembro principal de la flora intestinal del colon de animales de sangre caliente, incluyendo al ser humano. Coloniza el tracto gastrointestinal del recién nacido y permanece toda la vida en simbiosis. Las funciones de *E. coli* en el humano son mantener saludable la fisiología intestinal y la síntesis de vitaminas B y K (BAM, 1998; Vidal, 2003).

Su presencia en los alimentos indica contaminación fecal reciente, ya que tiene el inconveniente de vivir poco tiempo en el ambiente extraentérico. Es por ello que está considerada como un buen indicador de contaminación fecal (Pascual y Calderón, 2000).

2.1.1. Características de *E. coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo (-), anaerobio facultativo, no esporulado, de dimensiones 1.1 a 1.5 μm (largo) x 2 a 6 μm (ancho), generalmente con flagelos peritricos y fimbrias (Bergey's Manual., 2005). Frecuentemente presenta una microcápsula, por lo que algunas cepas producen colonias mucoides; la mayoría son fermentadoras de lactosa y producen gas a partir de glucosa (Bergey's Manual., 2005). Este microorganismo tiene ambos tipos de metabolismo, respiratorio y fermentativo (BAM, 1998). Su crecimiento es exponencial a temperaturas entre 7 y 45 °C (Jones et al., 2006) y puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración (6 a 4 °C). El tiempo de generación de esta bacteria es cada 20 minutos, en medios de enriquecimiento (Lederberg, 2004). El pH óptimo para su crecimiento es de 7 con intervalos de 4.4 a 9.0, sin embargo; se ha aislado a pH de 3.7 (Cerna, 2003). Algunos reportes indican que la bacteria puede crecer a pH cercanos al neutro (6 a 8) pero no a 4 ó 5 (ajustando el caldo con ácido acético) (Schilling, 2008). Esta bacteria crece en medios de cultivo simple y sintético, donde utiliza glicerol o glucosa como única fuente de carbono y energía. Cataboliza la D-Glucosa y otros carbohidratos con formación de ácido y gas (BAM, 1998).

La mayoría de las cepas de *E. coli* son consideradas no patógenas, aunque existen algunas que son patógenas (Pascual y Calderon, 2000). Las cepas no patógenas pueden ser oportunistas y causar infecciones en humanos inmunocomprometidos. Mientras que las cepas patógenas pueden causar enfermedades gastrointestinales y diarrea en humanos saludables (Montville y Matthews, 2005).

Las cepas de *E. coli* son clasificadas dentro de grupos específicos basados en sus factores de virulencia, mecanismos de patogenicidad, cuadros clínicos y antígenos de superficie (Bergey's Manual, 1994; Montville y Matthews, 2005).

Se ha subdividido serológicamente a la *E. coli* patógena por la presencia de factores de virulencia para identificarlas o caracterizarlas epidemiológicamente.

La caracterización serológica de *E. coli* se realiza mediante el análisis de tres antígenos de superficie: 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 74 capsulares (K) (Rodríguez-Ángeles, 2002; Montville y Matthews, 2005).

Es necesario determinar los antígenos O y H para los serotipos asociados con diarrea. El antígeno O identifica al serogrupo de una cepa, y el antígeno H identifica al serotipo (Bergey's Manual, 1994).

Se han descrito al menos seis grupos patógenos de *Escherichia coli*: enteropatógena, enteroinvasiva, enterotoxigénica, enterohemorrágica, enteroadherente y enteroagregativa (Kasper et al., 2004).

2.2. *Escherichia coli* O157:H7

Desde 1982 *Escherichia coli* O157:H7 conocida como *E. coli* enterohemorrágica, o productora de la toxina Shiga o Verotoxina ha emergido con gran interés en alimentos (Aidar-Ugrinovich et al., 2007). Ya que es una de las principales causas de brotes de diarrea, ocurridos por todo el mundo. Por lo menos 30 países han reportado infecciones al humano por *E. coli* O157:H7. La mayor incidencia se reporta en países desarrollados como Canadá, Estados Unidos, Japón y Reino Unido (Aidar-Ugrinovich et al., 2007; Varela-Hernández et al., 2007). En el continente Europeo, Australia y América Latina, las infecciones por *E. coli* no-O157:H7 son más comunes que las ocasionadas por la *E. coli* O157:H7 (Montville y Matthews, 2005).

Después de la contaminación de los alimentos, *E. coli* O157:H7 ingresa al tracto intestinal del hombre, ocasionando enfermedades como: diarrea con y sin sangre, colitis hemorrágica, daño renal [Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)] y la forma grave del SUH que involucra infección al Sistema Nervioso Central [Purpura Trombocitopenica Trombotica (PPT)], coma y muerte (Varela-Hernández et al., 2007; Younghoon et al., 2009).

Algunas personas pueden infectarse pero no exhibir signos o síntomas de la enfermedad (conocido como infección asintomática). Las mayores complicaciones y frecuencia de la enfermedad se presentan en los niños y ancianos. El SUH usualmente se presenta en niños, ocasionado daño renal agudo, mientras que en adultos se presenta la PPT (Montville y Matthews, 2005; Aidar-Ugrinovich et al., 2007).

Se tienen reportes de que este microorganismo ha generado muertes principalmente en niños debido al consumo de jugo de manzana no pasteurizado (CDC, 1996; Dingman., 2000). La alta probabilidad de infección en niños con edades de 2 a 10 años es debida a un sistema inmunológico bajo, poca higiene y la exposición a alimentos contaminados, animales infectados y la transmisión persona-persona. El porcentaje de pacientes que mueren es aproximadamente del 1% (Montville y Matthews, 2005).

La virulencia de *E. coli* O157:H7 ha sido asociada a la habilidad de la bacteria para sujetarse y destruir la mucosa intestinal y para producir las citotoxinas verotoxigenicas I y II. Estas toxinas se secretan por medio de vesículas, las cuales son fragmentos esféricos de la membrana externa de la bacteria (Hyun-Gyun y Marshall, 2004). La dosis infectante de *E. coli* O157:H7 es extremadamente baja va de 0.3 a 15 UFC/g (Tsui-Chu et al., 2007). Payton-Pruett et al. (2002), reportan dosis infectantes para el patógeno de 0.9 a 4.3 UFC/g. Esto sugiere que la dosis mínima infectante de *E. coli* O157:H7 puede ser menor o igual a 50 células para generar la enfermedad (Montville y Matthews, 2005; Tsui-Chu et al., 2007).

El 75% del ganado lechero y el 63% del ganado vacuno de engorda son positivos para *E. coli* O157:H7 (Grauke et al., 2002), ya que son el principal reservorio del patógeno (Aidar-Ugrinovich et al., 2007).

La transmisión de este patógeno es por contacto directo con animales y se disemina por contacto de persona a persona (Gomes et al., 2008). Los alimentos implicados en brotes por *E. coli* O157:H7 son a menudo de origen animal (carne de res mal cocida), vegetal (crudas), lácteos (leche cruda, yogurt), agua (Tsui-Chu et al., 2007); así como alimentos ácidos ($\text{pH} \leq 4.5$) tradicionalmente considerados de bajo riesgo, tal como el jugo de manzana (McCarthy, 1996; Cody et al., 1999; Gomes et al., 2008).

2.2.1. Características de *E. coli* O157:H7

Escherichia coli O157:H7 es un patógeno Gram (-), anaerobio facultativo, que es similar a *E. coli* típica por fermentar la lactosa, pero no el sorbitol dentro de 48 h, y que no produce β -D- glucoronidasa [base para la reacción del sustrato 4-metil-umbeliferil β -D- glucorónico (MUG) ampliamente utilizada para identificarla] (Pascual y Calderon, 2000). Este microorganismo muestra un desarrollo activo entre 30 a 41 °C, con un óptimo de crecimiento a 37 °C, aunque se ha observado crecimiento a temperaturas de 7 a 44.5 °C (Doyle y Shoeni, 1984; Pearce et al., 2004). Montville y Matthews (2005), reportaron que es muy escaso su desarrollo de 44 a 45 °C (dependiente en parte del medio de cultivo) y nulo a 45.5 °C. El organismo almacenado a 6 °C crece lentamente tanto en carne como en leche cruda. Por otra parte Pearce et al. (2004), reportaron que la población bacteriana almacenada por una semana entre 4 y 5 °C no afecta significativamente el crecimiento. Los tiempos de generación reportados para *E. coli* O157:H7 son de 0.49 h a 37 °C y 0.64 h a 42 °C en Caldo Soya Triptica (Doyle y Shoeni, 1984). El pH mínimo de desarrollo es 4.0 y 4.5, aunque depende de la interacción con otros factores (temperatura, actividad de agua, etc) (Montville y Matthews, 2005). Se ha encontrado que el tipo de ácido usado para regular el pH influye en el desarrollo del patógeno (Hyun-Gyun y Marshall, 2004).

Miller et al. (1994), observaron una tolerancia excepcional de cepas de *E. coli* O157:H7 a valores de pH extremos (2 y 12), comportamiento más notable a 4 °C que a 25 °C.

A valores bajos de pH, aparentemente no se afecta la virulencia de *E. coli* O157:H7 y es un dato de interés primario en el análisis de riesgos para controlar etapas críticas en el procesamiento de los alimentos. Esta observación se apoya en el conocimiento de brotes de infección ocasionados por el consumo de alimentos que involucran jugo de manzana no pasteurizado y productos fermentados como yogurt, salami y sidra (pH \leq 4.5) (Tosun y Aktuğ-Gönül, 2005).

Se ha documentado la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en diferentes etapas del procesamiento de alimentos tales como la fermentación, el secado y el almacenamiento (refrigeración, 8 °C y entre 20 a 25 °C).

Zhao et al. (1993), reportaron que en sidra de manzana el microorganismo sobrevivió menos de 3 días a 25 °C, y hasta 31 días a 8 °C.

En salchichas fermentadas con pH 4.5 y almacenadas a 4 °C, *E. coli* O157:H7 mostró mayor ácido tolerancia y una sobrevivencia de dos meses (Montville y Matthews, 2005). Comparativamente en mayonesa con pH de 3.6 a 3.9 y refrigeración a 5 °C, la sobrevivencia del patógeno fue de 5 a 7 semanas. Mientras que almacenado a 20 °C mostró una sobrevivencia de una a tres semanas con pH de 3.6 a 4.0 y cuando se almacenó a 8 y 25 °C la sobrevivencia fue de 31 a 10 días, respectivamente (Montville y Matthews, 2005).

El mecanismo de tolerancia a la acidez parece asociarse con una proteína que se sintetiza por exposición del microorganismo a un medio ácido (Fernández, 2000). Tosun y Aktuğ-Gönül (2005), mencionan tres sistemas en *E. coli* que involucran la tolerancia a la acidez: a) un sistema oxidativo, inductor de ácido; b) un sistema dependiente de Arginina y c) un sistema dependiente de Glutamato. El sistema oxidativo es menos efectivo en la protección del microorganismo al estrés ácido que los sistemas Arginina y Glutamato descarboxilasa (Tucker et al., 2002). El factor sigma alternado (RpoS) se requiere para la tolerancia a la acidez oxidativa y también es involucrado con los sistemas Arginina y Glutamato descarboxilasa (Hyun-Gyun y Marshall, 2006). El estado de tolerancia a la acidez inducido, puede prolongarse a temperaturas de refrigeración por 28 días o más. La inducción de la ácido tolerancia en *E. coli* O157:H7 puede incrementar la tolerancia a ambientes como el calentamiento, la radiación y el uso de antimicrobianos (Montville y Matthews, 2005).

2.3. Curva de crecimiento microbiano

En microbiología alimentaria la curva de crecimiento microbiano puede dividirse en cuatro etapas distintas, denominadas: fase lag o de adaptación, fase log o exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Vadasz y Vadasz, 2005; Huang, 2008).

Cada una de las fases es importante, ya que genera información diversa del comportamiento de un microorganismo. Normalmente se gráfica el número de células en escala logarítmica, o número de células en \log_{10} contra el tiempo. La curva de crecimiento microbiano representa el comportamiento general de la población microbiana y no el comportamiento individual de la célula (Montville y Matthews, 2005).

Así, la fase lag y la fase estacionaria representan periodos cuando la tasa de crecimiento es igual a la tasa de muerte, lo que produce que no haya cambios en el número de células presentes en el medio de cultivo.

2.3.1. Fase de latencia, adaptación o lag (λ)

Se define comúnmente como fase lag (λ) a la fase transitoria que sigue a la inoculación del medio de cultivo (generalmente con células en fase estacionaria) y bajo condiciones óptimas de laboratorio (temperatura, oxígeno y composición del medio de cultivo) (Dens et al., 2005). Penfold en 1914 definió λ como un intervalo entre la inoculación del cultivo bacteriano y el tiempo en que inicia la tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}) (Robinson et al., 1998). Estudios realizados con *E. coli* indican que en los primeros minutos posteriores a la inoculación del cultivo, se recupera el nivel normal de tensión helicoidal del DNA e incrementa la expresión de los genes importantes para el crecimiento. Posteriormente, (entre los 30 y 40 min) se reinicia la replicación del cromosoma y (a los 80 a 120 min) se presenta la primera división de la mayoría de las células (Ramírez et al., 2005).

Típicamente esta fase puede observarse como una respuesta retrasada de la población microbiana a un cambio (repentino) del ambiente (Swinnen et al., 2004). En la fase λ pueden ocurrir los procesos de crecimiento e inactivación microbiana. Durante este tiempo, la población no cambia en número y las células asimilan los nutrientes del medio e incrementan en tamaño (Ray, 2004).

La duración de ésta fase depende de la temperatura, la concentración del inóculo (concentraciones grandes usualmente tienen fase λ corta), la historia fisiológica del microorganismo (Montville y Matthews, 2005), los cambios fisicoquímicos del medio como: la disponibilidad de nutrientes, el pH y la actividad de agua (Ray, 2004; Dens et al., 2005).

Al evaluar la Densidad Óptica en caldo de cultivo Francois et al. (2006), determinaron que la fase λ para *Listeria monocytogenes* bajo las siguientes condiciones ambientales: a_w de 0.995, pH 7.4, y temperaturas de 7, 10 y 30 °C fue de 27.9, 6.57 y 0.64 h, respectivamente; mientras que a pH 5.5 la fase λ fue de 133.3, 56.6 y 2.64 h, respectivamente.

Por otra parte la fase λ para *E. coli* O157:H7 en carne de res (estéril) y usando cuenta en placa (CP) a temperaturas de 15, 25 y 35 °C fueron, respectivamente de 10.6, 3.2 y 1.56 h (Tamplin et al., 2005).

2.3.2. Fase de multiplicación, logarítmica o log

Durante este tiempo, se inicia la multiplicación en el número de células. El crecimiento en esta fase es sinónimo de división celular y por tanto al incremento en el número celular y la masa (Srivastava y Srivastava, 2003). Por lo que la población microbiana se divide exponencialmente por fisión binaria (Montville y Matthews, 2005). La fase logarítmica, o de crecimiento balanceado, representa el periodo en el que hay suficientes nutrientes; las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número (Ramírez et al., 2005). Cuando se grafica el número de células contra el tiempo, se observa el incremento aritmético, sin embargo; para una evaluación conveniente, los datos se convierten a \log_{10} UFC (Ray, 2004).

El crecimiento exponencial no puede prolongarse indefinidamente, ya que se ve detenido por el agotamiento de los nutrientes o por la síntesis de sustancias tóxicas desechadas por la propia bacteria (Srivastava y Srivastava, 2003). La generación de estos desechos tiene importantes implicaciones sobre el control de la población.

En microbiología, existen dos parámetros para evaluar el crecimiento microbiano: la tasa de crecimiento (μ_{\max}) y el tiempo de generación (t_g). La tasa de crecimiento define el cambio en el número de células o masa por unidad de tiempo. El crecimiento exponencial, se puede determinar matemáticamente, midiendo el cambio en: el número de células, la densidad óptica, la masa celular (materia seca o húmeda), o constituyentes celulares (como proteínas, ARN o ADN).

En muchas bacterias, estos valores se modifican al cambiarse las condiciones de crecimiento como temperatura, pH, actividad de agua y disponibilidad de nutrientes (Ray, 2004). Durante la fase exponencial; la tasa de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo.

El tiempo de generación o de duplicación, se entiende como el tiempo requerido para incrementar al doble el número de células. El tiempo de generación es muy variable porque el crecimiento depende de una gran cantidad de factores nutricionales y genéticos (Srivastava y Srivastava, 2003; Ray, 2004), variando desde pocos minutos hasta días de un microorganismo a otro. Por ejemplo., Lederberg (2004), concluyó que *E. coli* a 37 °C en un medio enriquecido presenta un tiempo de generación de 20 min.

En CP Tamplin et al. (2005), concluyeron que la tasa de crecimiento (μ_{\max}) de *E. coli* O157:H7 en carne de res estéril fue de 0.245, 0.878 y 1.79 ($\ln h^{-1}$) a 15, 25 y 35 °C, respectivamente. Los autores concluyeron que el comportamiento de *E. coli* O157:H7, tiene límites de crecimiento (λ , μ_{\max} y el valor máximo alcanzado), influenciados por la temperatura.

Francois et al. (2006), determinaron que el tiempo de generación (t_g) para *L. monocytogenes* a 0.995 a_w y pH 7.4, a temperaturas de 7, 10 y 30 °C fue de 7.33, 4.78 y 0.71 h. Efecto similar fue observado a pH 5.5 con tiempos de generación de 7.33, 4.88 y 0.86 h, respectivamente. Estos resultados podrían aplicarse a pruebas de desafío (son evaluaciones que se realizan en escenarios bastante drásticos para evaluar el comportamiento microbiano) para *L. monocytogenes* cuantificando niveles de inóculo para obtener resultados reales.

2.3.3. Fase estacionaria

Esta fase se alcanza porque no hay incrementos netos en el número de células, es decir, el crecimiento poblacional exponencial es igual a la tasa de muerte (Ray, 2004). Las bacterias que no esporulan, como *E. coli*, entran a una fase de crecimiento nulo, o fase estacionaria, al agotarse los nutrimentos en el medio.

En esta fase disminuye el volumen celular y la forma se redondea, se engrosa la pared, disminuye el número de flagelos y se incrementa la resistencia celular a condiciones adversas. El metabolismo se reorganiza, acumulándose compuestos de reserva y de osmoprotección y aumentando la degradación de macromoléculas. El DNA en el nucleóide se compacta y disminuye su metabolismo. La expresión de los genes necesarios para el crecimiento disminuye y aumenta la de aquéllos relacionados con la viabilidad celular durante el ayuno.

Las células en fase estacionaria muestran además una gran heterogeneidad en propiedades como viabilidad, genotipo y mutabilidad (Ramírez et al., 2005). En esta fase la velocidad metabólica global decrece, las células muestran resistencia a varios ambientes estresantes, tales como temperaturas elevadas y presión osmótica (Ray, 2004).

Tamplin et al. (2005), reportaron que la densidad máxima alcanzada por *E. coli* O157:H7 en carne de res estéril, incubada a 15, 25 y 35 °C fue de 9.47, 9.2 y 8.86 log UFC, respectivamente.

Finalmente el crecimiento es terminado por el inicio de la fase de muerte, durante la cual el número de células viables inicia el declive rápidamente. En esta fase, la tasa de muerte es más grande que la tasa de multiplicación. Aunque algunas células pueden permanecer viables, dependiendo de la cepa y las condiciones ambientales, después de un largo periodo de tiempo (Ray, 2004).

Es importante notar que cambiando algunos parámetros ambientales (por ejemplo, la refrigeración), μ_{\max} en algunas especies microbianas puede disminuir, pero después de un largo periodo de tiempo, la población puede alcanzar un número de células que causen problemas en un alimento (Ray, 2004).

2.4. Factores que afectan el comportamiento de *E. coli*

La habilidad de las bacterias, levaduras y hongos para crecer o multiplicarse en los alimentos está determinada por su ambiente intrínseco y extrínseco, así como del lugar de su almacenamiento (Ray, 2004). Para su crecimiento, los microorganismos necesitan condiciones propicias de pH, nutrientes, oxígeno, presión, temperatura y de actividad de agua (a_w). Así como cantidad y tipo de microorganismos presentes, su estado fisiológico y relaciones entre las especies y grupos prevalentes en un alimento (Fernández, 2000).

2.4.1. Factores extrínsecos

2.4.1.1. Temperatura

Todas las relaciones biológicas fundamentalmente son dependientes de la temperatura, e influyen de manera decisiva en el desarrollo y la viabilidad de los microorganismos (Montville y Matthews, 2005; Jones et al., 2006). Los efectos de la temperatura se manifiestan en la duración de la fase λ , μ_{\max} y el número final o concentración de microorganismos alcanzada (Jones et al., 2006).

Es por ello que la temperatura es usada para controlar el crecimiento de los microorganismos en alimentos. Es conocido que con cada aumento de 10 °C, la velocidad catalítica de las enzimas se duplica (Ray, 2004). Similarmente al reducirla 10 °C la velocidad de las reacciones disminuye a la mitad (Montville y Matthews, 2005).

Los microorganismos importantes en alimentos se han clasificado en tres grupos basándose en la temperatura de crecimiento (Lengeler et al., 1999; Ray, 2004). Cada grupo tiene una temperatura óptima y un intervalo de crecimiento como:

- a) termófilos, que crecen a temperaturas relativamente altas (intervalo de 45 a 70 °C y óptimo de 55 °C);
- b) mesófilos, estos microorganismos crecen a temperatura ambiente (intervalo de 10 a 45 °C y óptimo de 35 °C);
- c) los psicrófilos, que crecen a bajas temperaturas (intervalo de -5 a 20 °C y óptimo de 15 °C).

Existen otros grupos que se agregan a esta lista como los psicrotrofos y termoduricos, cuyas divisiones se traslapan con los grupos arriba mencionados, los psicrotrofos son microorganismos que crecen a temperaturas de refrigeración (0 a 5 °C) y crecen usualmente entre 10 y 30 °C. Los microorganismos que sobreviven a la pasteurización son designados como termoduricos, este grupo tiene diferentes temperaturas de crecimiento, algunos pueden crecer en refrigeración o como los termofílicos (Ray, 2004; Montville y Matthews, 2005).

Escherichia coli se encuentra clasificado como mesófilo (con intervalo de crecimiento de 10 a 45 °C y óptimo de 37 °C). Aunque se han reportado temperaturas mínimas de crecimiento de 7.5 a 7.8 °C (Bergey's Manual, 2005).

Ridell y Korkeala (1997), reportaron que para *E. vulneris* el mínimo de crecimiento fue a 1.6 °C (con intervalo de 0.8 a 2.6 °C), esta cepa fue aislada en carne congelada (Bergey's Manual, 2005).

Tamplin et al. (2005), determinaron que en carne de res estéril, los límites de crecimiento para *E. coli* O157:H7 fueron de 6 a 45 °C. Además concluyeron que la temperatura afecta la λ , el tiempo de generación y el valor máximo alcanzado.

En la microbiología sanitaria es interesante conocer el potencial de un microorganismo para desarrollar a temperaturas de refrigeración (0 a 5 °C), independientemente del valor óptimo para su desarrollo. Por arriba de la temperatura óptima, la μ_{\max} decrece rápidamente, mientras que por debajo de esta decrece gradualmente (Lengeler et al., 1999). Las bajas temperaturas prolongan la fase λ y log de las bacterias; así como la biomasa final alcanzada en el cultivo.

El valor máximo en la curva de crecimiento (fase log), también se ve afectado después de la multiplicación del microorganismo. Y extingue su desarrollo cuando llega a su límite, esta respuesta se configura por la funcionalidad inherente de las enzimas que le son propias y de la disminución de la funcionalidad de la membrana celular (Srivastava y Srivastava, 2003).

A temperaturas menores de 20 °C y cuando *E. coli* crece exponencialmente, esta expresa mayor número de proteínas basales que al crecer a temperaturas superiores (Jones et al., 2006).

Jones et al. (2003), concluyeron que *E. coli* a temperaturas de 13 a 8 °C crece exponencialmente, formando filamentos prolongados en algunas células. Esta fracción de células filamentosas se incrementa con el tiempo. Estas observaciones fueron confirmadas por Jones et al. (2006), en un estudio con *E. coli* y *Salmonella* al refrigerarse y congelarse como respuesta fisiológica al estrés por frío.

Existen algunos trabajos donde se ha mostrado el efecto que tiene la interacción de factores ambientales, como el realizado por Francois et al. (2005a), quienes determinaron que el pH tiene una influencia muy grande en el comportamiento del microorganismo, debido a que la temperatura y la actividad de agua muestran un efecto sinérgico con el pH.

2.4.1.2. pH

El pH tiene un efecto importante en la viabilidad o multiplicación de los microorganismos en los alimentos y medios de cultivo (Ray, 2004). Este incide fundamentalmente en los procesos de nutrición, respiración y multiplicación, es decir, donde se requiere del funcionamiento de la actividad enzimática (Fernández, 2000). En general, hongos y levaduras son capaces de crecer a pH más bajos que las bacterias. La mayoría de las bacterias crecen mejor a pH 7 (las Gram (-) tienen intervalos de 4.5 a 9 y las Gram (+) de 4.0 a 8.5).

Cada especie microbiana tiene un intervalo de crecimiento y un pH óptimo (Ray, 2004). La regla no es absoluta; porque bacterias patógenas como *E. coli* O157:H7 es capaz de sobrevivir en sidra a pH 4.0; lo que permite identificarla como ácido tolerante, ya que sobrevive en alimentos y caldos de cultivo ácidos (Tosun y Aktuğ-Gönül, 2005).

El pH del medio puede influir específicamente sobre la expresión de genes, quienes regulan el transporte de protones, la degradación de aminoácidos, la adaptación a condiciones ácidas o básicas y en algunas ocasiones la virulencia (Montville y Matthews, 2005). La adaptación ácida o tolerancia a la acidez es un fenómeno en el cual el microorganismo muestra un incremento en la resistencia a ambientes estresantes después de la exposición moderada a medios ácidos (Tosun y Aktuğ-Gönül, 2005).

Lin et al. (1996), encontraron tres sistemas que inducían la ácido resistencia de *E. coli*. Un sistema representado por el catabolismo de la glucosa (llamado sistema oxidativo inductor de ácido) y dos sistemas de aminoácidos dependientes de la descarboxilasa (llamados glutamato y arginina descarboxilasa, respectivamente) (Tosun y Aktuğ-Gönül, 2005). El más efectivo de los tres sistemas de resistencia a la acidez es el dependiente de glutamato (Tucker et al., 2002).

La tolerancia a la acidez en las bacterias deterioradoras y patógenas puede generar problemas para su control en alimentos de bajo pH (Ray, 2004), por ello es importante conocer el comportamiento de los microorganismos en estos ambientes.

Los mecanismos de sobrevivencia e inducción a la acidez han sido ampliamente estudiados en enterobacterias como *Salmonella*, *Listeria* y *E. coli*. Estos juegan un papel muy importante en el citoplasma, que muestra la capacidad buffer y la permeabilidad a través de la bomba de protones.

Estos sistemas funcionan normalmente cuando la síntesis proteica esta inhibida (Tosun y Aktuğ-Gönül, 2005). Los tres sistemas protegen el crecimiento o sobrevivencia del microorganismo en un intervalo amplio de condiciones ambientales ácidas. El mecanismo de acción de la glucosa se desconoce.

Mientras que los sistemas de aminoácidos dependientes de descarboxilasa funcionan durante el estrés ácido, a través del consumo de protones que se pierden dentro de la célula por descarboxilación de la arginina o glutamato. En estos sistemas son transportados los aminoácidos dentro de la célula por intercambio de sus respectivos productos descarboxilados (Tucker et al., 2002).

Tosun y Aktuğ-Gönül (2005), encontraron que las células en fase estacionaria son más resistentes a la acidez que las células en fase logarítmica. Un mecanismo alternativo para la protección contra el estrés ácido es el sistema homeostático inducible de pH (respuesta ácido tolerante ATR). El sistema ATR requiere de la síntesis proteica y representa una nueva respuesta genética al estrés ambiental.

La síntesis de proteínas de “shock” ácido es la tercera vía por la que la célula regula el pH interno. Esta síntesis es generada por un pH ambiental de 3.0 a 5.0, proporcionando un conjunto de proteínas reguladoras distintas de las proteínas de la respuesta de tolerancia al ácido (Carrillo, 2003). Heyde y Portalier (1990), concluyeron que el cambio de pH de 6.9 a 4.3 induce la producción de al menos 16 polipéptidos en *E. coli*. Siete de estos péptidos fueron identificados como proteínas de shock ácido (Tosun y Aktuğ-Gönül, 2005).

2.4.1.3. Actividad de agua (a_w)

Las propiedades coligativas, reológicas y de textura de un alimento dependen de su contenido de agua. El agua puede existir en forma libre, ligada o como agua de hidratación. Para ser aprovechada por los microorganismos debe encontrarse en forma disponible, es decir libre (Ray, 2004). Sólo la fracción libre del agua, llamada actividad del agua, es capaz de tener movilidad y por tanto propiciar cambios que influyan definitivamente en las reacciones físicas, químicas, enzimáticas y microbiológicas del alimento (Fernández, 2000; Ray, 2004).

El valor de a_w se emplea por sus beneficios prácticos para predecir: reacciones de deterioro, la seguridad de un alimento respecto al crecimiento microbiano; y por tanto la estabilidad y la vida útil de un producto (CSIRO, 2005). Por tal motivo, la secretaría de Salud de México (SSA), la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos y la Comunidad Económica Europea, la usan para categorizar la seguridad de los alimentos.

En los estudios de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (por sus siglas en inglés, Hazard Analysis and Critical Control Points: HACCP), generalmente se le considera como un punto crítico (Decagon®).

Su valor varía de 1.0 para el agua pura, hasta 0.1 para un producto totalmente seco. A muchos alimentos se les proporciona estabilidad mediante la adición de solutos para reducir a_w . La mayoría de los medios de cultivo utilizados en el laboratorio tienen a_w de 0.999 a 0.990 (ICMSF, 1983). La actividad de agua puede reducirse por diferentes medios como la adición de solutos, secado y congelado (Ray, 2004).

La prolina, el glicerol, el ácido gama butírico son solutos compatibles entre las bacterias. Por ejemplo: el glicerol penetra libremente a la célula sin provocar estrés osmótico como ocurre con el NaCl, el KCl y la glucosa (Sperber, 1983).

Se ha estimado que, mientras más alta sea la a_w en un alimento y más se acerque a 1.0 (referencia del agua pura), mayor será la estabilidad del microorganismo para multiplicarse o deteriorar el alimento, por ejemplo, carne, fruta, jamón, quesos y vegetales frescos requieren de refrigeración por su alta a_w (> 0.92).

Mientras que en los alimentos de humedad intermedia como cereales, pasas, almíbar (0.62 a $0.92 a_w$), se observa que el crecimiento microbiano es retardado. Los alimentos estables a temperatura ambiente son aquellos con baja a_w (< 0.6) (Bell y Labuza, 2000). Entre los microorganismos se encuentra un valor óptimo y mínimo de a_w . En términos generales, las bacterias Gram (-) requieren de mayores niveles de a_w que las Gram (+). Las levaduras y los hongos, crecen a niveles inferiores. Con el fin de restringir o facilitar su desarrollo, el conocimiento del valor mínimo de a_w es importante (Fernández, 2000).

El límite inferior de a_w para el crecimiento microbiano es 0.90 para la mayoría de las bacterias, 0.87 para la mayoría de levaduras y 0.80 para la mayoría de hongos (Martínez et al., 1999). La limitada disponibilidad de agua lleva a la célula a la condición de metabólicamente inerte, y se detiene su desarrollo (Fernández, 2000). El valor mínimo de a_w reportado para que *E. coli* O157:H7 es 0.95 (Jay, 2000; World Health Organization, 2005), con una a_w máxima de 0.995 (Jay, 2000).

Los diversos métodos de conservación de alimentos se basan en el control de una o más de las variables que influyen en la estabilidad de un alimento, es decir, a_w , temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, potencial de óxido-reducción, presión y presencia de conservadores.

En este sentido, el conocimiento de los valores de a_w de un alimento o medio de cultivo son de fundamental importancia, para conocer el comportamiento y seguridad de un producto. Tenemos como regla general que la a_w tendrá que ser mayor a medida que los otros parámetros de estudio se vuelvan menos favorables (Fernández, 2000).

2.4.1.4. Disponibilidad de nutrientes

Normalmente los microorganismos requieren nutrientes, las bacterias Gram (+) son más exigentes que las Gram (-), seguido de levaduras y hongos. Cada microorganismo, difiere enormemente en su habilidad para utilizar carbohidratos, proteínas y lípidos (Ray, 2004).

El tipo de nutriente y su concentración relativa, favorecerá la actividad de cierto(s) grupo(s) microbiano(s), mientras podrían resultar inconveniente(s) para otro(s) microorganismo(s). Las grasas por ejemplo exhiben efectos inhibitorios o protectores de la viabilidad de algunos microorganismos.

Los microorganismos actúan primero sobre compuestos simples, y que constituyen una fuente de energía aprovechable como monosacáridos, aminoácidos y compuestos nitrogenados sencillos (Fernández, 2000).

Los más complejos son degradados posteriormente en función de la capacidad del microorganismo para elaborar enzimas que lo degraden (lactasas, sacarasa, amilasa).

En *E. coli* funciona un mecanismo distinguido para metabolizar carbohidratos. De la fermentación de la glucosa obtiene energía con facilidad; mientras que la degradación de la lactosa le exige una mayor carga energética. Si ambos azúcares se encuentran en el mismo medio, el gen que controla la síntesis de la enzima β -galactosidasa (requerida para metabolizar la lactosa) se ve reprimida en presencia de glucosa. Esta estrategia, de los microorganismos suele ser la regla (Yada y Skura, 1982).

Los aminoácidos dentro de la célula son metabolizados, muchos de esos productos pueden ser no deseables (por ejemplo, NH_3 y H_2S producidos por bacterias deterioradoras, y toxinas que causan un peligro a la salud) o deseables (como algunos compuestos sulfúricos que dan el sabor al queso cheddar) (Ray, 2004).

En el pescado o la carne, *Pseudomonas* desarrolla a expensas de la fracción soluble de compuestos nitrogenados que incluye óxido de trimetilamina, nucleótidos y algunos aminoácidos libres. Sólo cuando estos compuestos han desaparecido, se inicia la degradación de proteínas, cuyos productos sostienen el crecimiento posterior del microorganismo (Fernández, 2000).

Los lípidos son en general, sustratos menos preferidos por los microorganismos para sintetizar energía y materiales celulares. Algunos microorganismos pueden producir lipasas extracelulares como *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Alcaligenes*, las cuales pueden hidrolizar glicéridos a ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos pueden ser transportados en la célula y usados para la síntesis de energía, así el glicerol puede ser metabolizado separadamente (Ray, 2004).

El crecimiento microbiano en los alimentos es complejo, ya que está gobernado por factores genéticos, bioquímicos y ambientales (Montville y Matthews, 2005). Cada grupo microbiano, y más específicamente cada especie microbiana, posee potenciales diferentes para degradar un determinado sustrato (Yada y Skura, 1982).

El metabolismo de carbohidratos y proteínas es ampliamente usado en el laboratorio, el primero para la identificación bioquímica de microorganismos desconocidos y aislados de los alimentos. El segundo para la identificación microbiana. Por ejemplo, la habilidad de *E. coli* para producir indol a partir del triptófano, la cual es usada para diferenciar esta especie de las que no producen indol (como *Enterobacter* spp) (Ray, 2004).

2.4.1.4.1. Caldo de cultivo

El crecimiento en medios de laboratorio es importante para la detección cualitativa y cuantitativa de la calidad microbiológica de los alimentos (Ray, 2004). Algunos estudios donde se trabajó la influencia de algunos factores intrínsecos o extrínsecos para evaluar el comportamiento microbiano en medios de cultivo y alimentos, se detallan a continuación.

Schilling (2008), determinó en caldo de cultivo el efecto del pH (4 a 8) en *E. coli* usando buffers básicos y ácido acético. Concluyó que el microorganismo crece mejor a pH cercanos al neutro (pH 6 a 8). Y no crece a pH más ácidos (4 y 5). El autor propone la adición de ácidos (específicamente el acético) a los alimentos, ya que podrían prevenir el crecimiento de *E. coli*, por ser tóxico para la bacteria.

Tosun y Aktuğ-Gönül (2005), determinaron que en Caldo Soya Triptricaseina (CST) *E. coli* O157:H7 no mostró tolerancia a la acidez a pH 5.0 y 5.5 a 37 °C. No obstante al exponer a las células a "shock ácido" (pH 4.5/2 h) se incrementó la acido tolerancia, condición que puede considerarse para alimentos fermentados, jugos de frutas y procesos de aspersion en la industria de la carne.

2.4.2. Factores intrínsecos

2.4.2.1. Concentración del microorganismo

Con base en la revisión de literatura, varios autores mencionan que el efecto de la concentración del microorganismo en la fase λ , puede explicarse si las células se someten a estrés.

Augustin et al. (2000), determinaron que la fase λ no mostró efecto significativo en la concentración del inóculo (10^{-2} a 10^4) para *L. monocytogenes* a pH 6 y temperatura de 6.5 °C, (cuando las células hambrientas fueron sometidas a estrés por 14 y 160 h a 30 °C). En células almacenadas por 14 h, e independientemente del inóculo probado el promedio de la fase λ fue de 40.6 ± 13.4 h, y μ_{\max} duró 0.043/h. En células almacenadas por 160 h e inóculos de 10^2 y 10^0 UFC/mL, la fase λ fue de 85.1 ± 16.2 h, y para 10^1 y 10^{-1} UFC/mL la fase λ fue de 97.4 h; con una μ_{\max} de 0.036/h. Ellos concluyeron que la fase λ se extiende en inóculos pequeños cuando las células están severamente estresadas, ya que se han privado de nutrientes. Estas condiciones permiten observar una gran variabilidad de la fase λ en los datos experimentales.

Muchos investigadores, han realizado evaluaciones con diferentes microorganismos para calcular la fase λ pero trabajando con niveles altos de inóculo (10^6 a 10^7 UFC/mL) (Krist et al., 1998; Francois et al., 2005a; Carrasco et al., 2006). Sin embargo la mayoría de los alimentos son contaminados con patógenos en bajos niveles, por ejemplo, los niveles de contaminación inicial de *L. monocytogenes* en productos cárnicos y carne de aves cocinados son entre 0.1 y 10 bacterias/g (Francois et al., 2005b). Mientras que la dosis infectante para el humano es desconocida, se estima que podría situarse entre varios cientos y unos cuantos miles de células (Fernández, 2000). Para *Campylobacter jejuni* la dosis infectante se calcula ~500 células, mientras que para *E. coli* O157:H7 se estima de 0.3 a 15 UFC/g (Tsui-Chu et al., 2007).

Al evaluar el efecto de la temperatura en la fase λ en *L. monocytogenes*, a 37 °C y CST, Robinson et al. (2001), encontraron que el número de células requerido para iniciar el crecimiento se incrementa de 1 a 10^5 células bajo condiciones óptimas y con 1.8 M de NaCl. Por lo que no hay efecto en el tamaño de inóculo.

Estos resultados, concuerdan con el trabajo de Jason (1983), quien encontró que la fase λ y la μ_{\max} de *E. coli* son independientes del tamaño de inóculo.

Los resultados obtenidos por Koutsoumanis y Sofos (2005), trabajando con niveles de inóculo altos (6.81 Log₁₀ UFC) de *L. monocytogenes* sugieren la hipótesis de que los factores ambientales en condiciones mínimas de crecimiento celular (e individual) siguen una distribución que llega a ser dispersa conforme se incrementa el número de células (Koutsoumanis y Sofos, 2005). Por lo tanto, en una población grande, es más probable que una sola célula sea capaz de iniciar el crecimiento que cuando se trabaja con poblaciones pequeñas.

2.4.2.2. Estado fisiológico de las células

Fisiológicamente las células que contaminan los productos alimenticios se clasifican en células que se dividen activamente, en aquellas que presentan fisiológicamente una fase λ , en células dañadas y requieren repararse antes de iniciar la fase λ y en células muertas (McMeekin et al., 2002). La duración de la fase λ en células de *L. monocytogenes* en diferentes estados fenológicos y transferidos a diferentes temperaturas: células crecidas exponencialmente con fase λ cortas, células privadas de nutrientes y en fase estacionaria con larga fase λ , células congeladas y con fase λ ligeramente larga y células deshidratadas que exhiben la fase λ más larga de todas (Whiting y Bagy, 2002). Para *E. coli*, las células crecidas activamente se ajustan más rápidamente a los cambios del medio durante la fase λ comparadas con las células que se encuentran en fase estacionaria (Mellefont et al., 2000).

Los efectos de la aplicación de agentes físicos (temperatura, desecación) o químicos (compuestos germicidas) a una población microbiana dependen de la dosis, condiciones de aplicación, y/o duración del tratamiento. Previo a la muerte celular ocurre un daño reversible, calificado como subletal, del cual la célula puede recuperarse si cesa el efecto (Fernández, 2000).

2.5. Técnicas de Recuento microbiano

2.5.1. Cuenta Viable en Placa

La Cuenta Viable en Placa o Vaciado en Placa, es considerada en microbiología la técnica tradicional de conteo viable. Se utiliza para el recuento de la mayoría de los grupos microbianos (géneros y especies) de interés en los alimentos (Hugo y Russell's, 2004). Esta técnica permite estimar el número de microorganismos viables por g o mL en una muestra (Pascual y Calderon, 2000). Montville y Matthews (2005). Reportan que ésta técnica cuantifica poblaciones mayores de 250 UFC/mL (en líquidos) y mayores a 2,500 UFC/mL (en sólidos). Se basa en diluciones decimales y seriadas realizadas a una muestra objeto de evaluación, que emplea la técnica en placas con agar. Ya que deposita una alícuota de la muestra diluida en una caja petri estéril, y se adiciona el medio de cultivo fundido y atemperado y se mezcla con el inóculo depositado (NOM-110-SSA1-1994; Madrid y Felice, 2005). Después de la incubación (generalmente, a 35 °C) se cuentan las colonias desarrolladas (usualmente entre 30 a 300 colonias), las que multiplicadas por la inversa de la dilución correspondan a la placa contada (Hugo y Russell's, 2004). Si las UFC se evalúan a diferentes tiempos en la muestra, la curva es graficada usando \log_{10} UFC contra el tiempo (Ray, 2004).

El apego a las normas de esta técnica que se han establecido para su ejecución, larga y ampliamente experimentadas en todos sus detalles, permite utilizarla de manera sistemática para múltiples propósitos con un grado de confiabilidad satisfactorio.

El principio de la Cuenta Viable se basa en una presunción, cuya validez no es absoluta: cada colonia proviene de una célula viable (Fernández, 1981). Durante la homogenización de la muestra, las células viables se separan espacialmente unas de otras por dispersión del agar, que al incubarse crecen en forma de colonias independientes y macroscópicamente visibles, denominándose "recuento de unidades formadoras de colonias", UFC, que refleja mejor el trasfondo del proceso escenificado en las placas porque la colonia observada puede provenir de una sola célula o de un grupo de células (Fernández, 1981; Pascual y Calderon, 2000).

La desventaja de esta técnica es que no se realiza de forma automatizada, se requieren de volúmenes grandes de medios de cultivo y cajas petri, así como de una intensa labor para completarse y los resultados se obtienen en tiempos largos de 24 a 48 h o más por el tiempo requerido para la revitalización, para el enriquecimiento y para la incubación de las muestras (Hugo y Russell's, 2004). Además para identificar un determinado microorganismo, con frecuencia se necesita utilizar medios selectivos y pruebas bioquímicas complementarias, lo que puede demorar el resultado días e incluso semanas. Tales limitaciones han impulsado el desarrollo de métodos rápidos que permitan disponer de los resultados en horas (Francois et al., 2005a).

A pesar de que existen métodos alternativos, esta técnica, sigue siendo el método de referencia y se utiliza para cuantificar el comportamiento microbiano así como la contaminación de medicamentos y alimentos (Pascual y Calderon, 2000; Baty et al., 2002). Por lo tanto, si se preparan diluciones apropiadas de una población bacteriana y se siembra en un medio conveniente, puede calcularse el número de células viables (Hugo y Russell's, 2004).

2.5.2. Turbidimetría

La Turbidimetría es un método común para estimar el crecimiento celular mediante la determinación de la masa, usando equipos como el Espectrofotómetro, el Colorímetro y el Bioscreen C a una longitud de onda específica (Hugo y Russell's, 2004). La llegada de instrumentos turbidimétricos automatizados (como el Bioscreen C[®]) ha permitido eficacia en las mediciones (User's Manual Bioscreen C, 2003). Esta técnica se basa en la turbidez que presenta un medio de cultivo debido al crecimiento microbiano, esta información es detectada por mediciones de absorbancia o densidad óptica (DO) (Srivastava y Srivastava, 2003). Las bacterias dispersan la luz de manera proporcional a su concentración, tamaño y forma de la célula, y puede ser afectada por las condiciones ambientales (Métris et al., 2003). Cuando un haz luminoso pasa a través de una suspensión bacteriana, se reduce la cantidad de luz transmitida como consecuencia de la difracción de la luz, midiendo de manera indirecta la masa celular (User's Manual Bioscreen C, 2003).

La importancia de esta técnica se debe a la producción de una gran cantidad de datos (repeticiones), los cuales son importantes para el análisis de varianza (Métris et al., 2003).

Las aplicaciones del Bioscreen C por citar algunas, son en el desarrollo de nuevos antibióticos y conservadores, optimización de procesos fermentativos, bioensayos, curvas de crecimiento microbiano (User's Manual Bioscreen C, 2003). Las curvas de crecimiento microbiano son utilizadas para la evaluación de riesgos microbianos (Métris et al., 2003).

Esta técnica es popular, rápida, de bajo costo y fácil por ser automatizada. Las desventajas del Bioscreen C son que no todas las pruebas microbiológicas pueden ser leídas, ya que el medio de cultivo siempre debe ser líquido y transparente (no se pueden analizar muestras turbias o solidas). El conteo de una muestra puede medirse para concentraciones de microorganismos mayores o iguales a 10^2 bacterias/g (User's Manual Bioscreen C, 2003).

Swinnen et al. (2004), mencionaron que los métodos basados en turbidez o DO tienen un intervalo de validación entre 10^6 a 10^7 bacterias/mL. Además, Dalgaard y Koutsoumanis (2001), reportan que este método es menos sensible, ya que no permite diferenciar entre células vivas y muertas, lo cual puede llevar a la sobreestimación de la concentración celular.

Un gran número de estudios han sido realizados en el Bioscreen C, ya que pueden obtenerse una gran cantidad de curvas durante el periodo de crecimiento de bacterias, levaduras, amebas (McKellar y Knight, 2000). Esta técnica ha sido utilizada por varios grupos de investigación en el área de microbiología predictiva para coleccionar datos para el modelamiento (Francois et al., 2005b). Mediciones de turbidez son usadas para estimar parámetros de crecimiento de las bacterias como alternativa al Conteo en Placa. Su uso se ha incrementado como una nueva tendencia de la microbiología predictiva que se enfoca en la cuantificación de la variabilidad de las respuestas bacterianas al ambiente (Métris et al., 2003).

2.5.3. Calorimetría Diferencial de Barrido

La Microcalorimetría y la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) son técnicas de análisis térmico que han sido empleadas para evaluar eventos microbianos diferentes. La Microcalorimetría se ha empleado en evaluaciones que implican al metabolismo bacteriano, mientras que la DSC para evaluar la muerte térmica microbiana (Honglin et al., 1993; Lee y Kaletunç, 2002a). Estas técnicas se clasifican de acuerdo al tamaño de la celda de medición y ambas utilizan calorímetros con características específicas (Stockar y Marison, 1989). La Microcalorimetría utiliza celdas de capacidad mayor (14L a 15mL) que la DSC (0.5mL a 1 μ L), por lo que la primera ha sido objeto de estudio en diversos procesos microbiológicos. La DSC es una técnica que mide la diferencia entre el flujo de calor suministrado a una muestra objeto de estudio y una referencia, expuestas ambas al mismo programa de temperatura. El flujo de calor corresponde a una potencia transmitida y por tanto se mide en Watios o mW. Con integración de la potencia respecto al tiempo se obtiene una cantidad de energía expresada en mWs=mJ. La energía transmitida corresponde a un cambio exactamente igual de la entalpía de la muestra (Balart et al., 2004). Cuando la muestra absorbe energía el cambio de entalpía se denomina endotérmico. Cuando la muestra desprende energía, el proceso es exotérmico. Los métodos Microcalorimétricos, como su nombre lo indica, miden diminutos cambios en la producción de calor que se asocian al desarrollo bacteriano durante su metabolismo (Balart et al., 2004). Los patrones de producción de calor pueden ser característicos de algunas especies, motivo por el cual este método podría ser usado para su posible identificación (Boiling et al., 1973; Goldschmidt y Fung, 1978, 1979).

2.5.4. Espectroscopia de Impedancia

La Espectroscopia Dieléctrica o Espectroscopia de Impedancia Electroquímica es empleada tradicionalmente en el registro y estudio de los procesos de corrosión y electrodeposición, en la evaluación de recubrimientos y en la caracterización de muchos tipos de sensores y semiconductores.

En la última década se han ampliado notablemente sus aplicaciones en la Biotecnología para la caracterización de células, el diagnóstico de enfermedades y la caracterización del cultivo de células (Ramírez et al., 2009). La Impedancia es un técnica automatizada que permite evaluar cinéticas de crecimiento de los microorganismos en alimentos, detectando los cambios eléctricos producidos en un medio de cultivo (Gerolimatou et al., 2004). En términos eléctricos la Impedancia está definida como la resistencia al flujo de una corriente alterna a través de un material conductor (Silley y Forsythe, 1996). Los equipos como el Malthus, el Bactometer y el Quantibac, miden la Impedancia por medio de los valores de conductividad, resistencia o capacitancia (Felice et al., 1998). El equipo de microbiología de Impedancia mide el metabolismo microbiano en un medio por el movimiento de iones entre dos electrodos (conductancia), o la carga almacenada en la interfase electrodo-medio (capacitancia) (Ramírez et al., 2009). El principio del equipo de Impedancia se basa que, cuando los electrodos son sumergidos en un medio conductivo, un campo dieléctrico puede construirse en la interfase electrodo-solución. Los cambios eléctricos en una muestra indican la presencia de un microorganismo y son proporcionales a la concentración de microorganismos viables (Madrid et al., 1999; Hugo y Russell's, 2004). Cabe mencionar que el medio de cultivo es eléctricamente un sustrato no cargado o débilmente cargado que es transformado por los microorganismos en productos cargados (Felice et al., 1998). Esta producción de moléculas cargadas es debida, a la conversión de proteínas a aminoácidos, carbohidratos a lactato y lípidos a acetato, las cuales incrementan la conductividad (G) del medio de crecimiento (Firstenberg-Eden et al., 1984).

Durante el crecimiento bacteriano, la conductividad del medio de crecimiento aumenta con el número de bacterias por la producción de moléculas orgánicas débilmente cargadas (McMeekin et al., 1993).

Esta técnica tiene la ventaja de ser rápida, no destructiva ni laboriosa, requiere de pequeños volúmenes de muestra, y puede monitorear el crecimiento en muestras opacas o turbias. Esta técnica proporciona mediciones robustas (Ramírez et al., 2009). La desventaja es que solo permite monitorear células viables. El tiempo de detección es de 10^6 a 10^7 UFC/mL.

El valor de Impedancia alcanza su límite cuando las bacterias han alcanzado aproximadamente 10^8 UFC/mL o más, y todos los recursos del medio han sido metabolizados y convertidos en productos finales (Ramírez et al., 2009).

Los cambios en la conductividad, resistencia y capacitancia, permiten indirectamente estimar el contenido bacteriano de algunos elementos como la leche, verduras congeladas y cerveza (Cady, 1978; Goldschmidt y Fung, 1978; 1979).

2.6. Microbiología predictiva

La microbiología predictiva es un área importante en alimentos donde el comportamiento de los microorganismos es descrito cuantitativamente con el uso de modelos matemáticos a nivel de inactivación, crecimiento y muerte celular (Brul et al., 2008). Estos modelos se construyen como respuesta al estudio del comportamiento microbiano a varios factores como temperatura, pH y a_w (Membre et al., 2005).

La estimación exacta de los parámetros de crecimiento, se realiza particularmente con μ_{max} y la fase λ . Estos parámetros son esenciales para estimar el comportamiento microbiano en los alimentos (Bovil et al., 2001), caracterizar efectos anti-microbianos, optimizar medios de cultivo y para desarrollar modelos cinéticos usados en diversas áreas de la microbiología como tecnología de fermentaciones, procesamiento y almacenaje (Bovil et al., 2001; Dalgaard y Koutsoumanis, 2001). El uso de modelos matemáticos tiene el objetivo de estimar μ_{max} y λ (Baty et al., 2002).

Debido a que el crecimiento de los patógenos en los alimentos es inaceptable, es necesario entender y predecir la fase lag con exactitud (McMeekin et al., 1997), así como los factores fisiológicos que la afectan (McDonald y Sun, 1999).

Para los patógenos con baja dosis infectante es muy importante el control del crecimiento, más que su tasa de crecimiento (μ_{max}), porque ellos son peligrosos a bajas concentraciones. El avance de la tecnología hace posible la combinación de factores de estrés.

Cada factor de estrés (temperatura, pH, actividad de agua, por ejemplo) sobre sí mismo tiene una influencia limitada, pero juntos pueden inhibir el crecimiento microbiano o bien inactivarlos (Gysemans et al., 2007).

El desarrollo de modelos predictivos requiere de una gran cantidad de datos. El consumo de tiempo de la técnica tradicional ha provocado la necesidad de nuevos métodos rápidos que permitan la colección de los datos, que representen ahorros de recursos y esfuerzo (Membre et al., 2005). Una alternativa propuesta son las mediciones de absorbancia.

Los modelos predictivos derivados de densidad óptica (DO) son confiables y validados proporcionan una estimación favorable de la respuesta microbiana comparados con el método tradicional (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Carrasco et al., 2006).

Algunos métodos indirectos para medir el crecimiento bacteriano y que acumulan datos suficientes del comportamiento bacteriano son métodos microscópicos o mediciones de Impedancia (Rasch, 2004). Estos métodos podrían reemplazar al método tradicional por ser exactos, requerir de poco tiempo para su realización y proporcionar datos de alta calidad (Batrinou et al., 2005; Métris et al., 2005).

El mayor problema del desarrollo y uso de un modelo predictivo es demostrar que este puede capturar todas las características cualitativas que son reveladas en los datos experimentales (Vadasz y Vadasz., 2005).

2.6.1. Modelos matemáticos aplicados al crecimiento microbiano

La variabilidad en la estimación de los parámetros de crecimiento, especialmente la fase λ , se debe a la técnica y al modelo usado para monitorear y ajustar el crecimiento (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Baty et al., 2002). Esta comparación ha sido realizada usando diferentes modelos para estimar la fase λ a partir de datos de densidad óptica y Vaciado en Placa (Swinnen et al., 2004).

2.6.1.1. Modelo Logístico

Las funciones sigmoidales que han sido más populares para ajustar datos del crecimiento microbiano son los modelos Logístico y de Gompertz (McKellar y Xuewen, 2004a).

La función logística fue desarrollada por Pearl y Reed (1920), basada en el entendimiento de Verhulst (1838). Estos autores reconocieron que para varios microorganismos, la gráfica de la población contra el tiempo tiene una forma sigmoidal (Wachenheim et al., 2003).

Este modelo está basado en la suposición de que μ_{\max} , debe ocurrir cuando en el medio permanece la máxima cantidad de nutrientes y cuando se ha acumulado la menor cantidad de productos de desecho (Skinner y Larkin, 1994).

El uso de la función logística para describir el crecimiento en estos casos ha sido empírica, sin embargo puede derivarse que sus coeficientes tengan un significado biológico (Wachenheim et al., 2003).

Agustin et al. (1999), compararon varios métodos y concluyeron que el modelo logístico estima la fase lag con retrasos al combinar los datos de Vaciado en Placa y absorbancia (Swinnen et al., 2004).

2.6.1.2. Modelo de Gompertz

La ecuación de Gompertz ha sido ampliamente utilizada por los investigadores para ajustar una amplia variedad de curvas de crecimiento provenientes de diferentes microorganismos. Algunos de los modelos específicos recientemente desarrollados incluyen los de *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, y *Bacillus cereus*.

La aplicación de esta función se ha realizado en curvas de crecimiento basado en datos de Turbidimetría, mezcla de cultivos de *Pseudomonas* spp y *Listeria* spp., *Lactobacillus curvatus*, deterioro de vegetales, cerveza, carne, germinación y en el crecimiento de *Clostridium botulinum* (McKellar y Xuewen, 2004a).

Existen algunas limitaciones asociadas al uso de esta función como: La curva de Gompertz modificada que está definida alrededor del punto de inflexión del crecimiento sigmoideal, la cual causa altas estimaciones de la tasa de crecimiento específica (μ_{max}) y el tiempo lag (λ) (Swinnen et al., 2004). Así el tiempo de generación (t_g) puede sobreestimarse por más del 13%. Por lo tanto, la pendiente de la función no puede ser cero, y la asíntota más baja podría ser más baja que el nivel de inóculo evaluado, obteniendo valores negativos del inicio de desarrollo (fase λ) para algunos grupos de datos (Swinnen et al., 2004).

Algunos autores mencionan como desventaja que la función de Gompertz está basada en consideraciones ecológicas en lugar de microbiológicas (Swinnen et al., 2004).

2.6.1.3. Modelo de Richards

Otro modelo sigmoideal que se encuentra en la literatura, no solo aplicado al crecimiento microbiano, es el modelo de Richards (McKellar y Xuewen, 2004a), el cual ha sido considerado un modelo flexible, ya que posee un parámetro de forma que le permite modelar las curvas con mayor precisión (Castro et al., 2008). Sin embargo, ha sido también criticado, ya que dicho parámetro no tiene significado biológico y en ciertas ocasiones genera problemas para ajustar los datos experimentales (McMeekin y Ross, 1996). Dalgaard y Koutsomanis (2001), muestran que la tasa máxima de crecimiento específico y por tanto el tiempo lag, puede ser estimado exactamente con precisión a partir de curvas de crecimiento obtenidos con absorbancia y usando el modelo de Richards (Swinnen et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. General

Determinar el comportamiento de *Escherichia coli* patógena y no patógena en caldo de cultivo mediante diferentes métodos y parámetros fisiológicos ajustando su comportamiento con modelos matemáticos.

3.2. Específicos

- i. Determinar el comportamiento de *E. coli* no patógena en caldo de cultivo mediante la influencia de temperatura, pH, a_w y concentración del microorganismo.
- ii. Evaluar el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en caldo de cultivo mediante la influencia de temperatura, pH, a_w y concentración del microorganismo por medio de densidad óptica (DO) y Cuenta en Placa (CP).
- iii. Determinar el comportamiento de *E. coli* no patógena en caldo de cultivo mediante la influencia de la concentración del microorganismo por medio de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Espectroscopia de Impedancia.
- iv. Ajustar el comportamiento de *E. coli* O157:H7 con modelos matemáticos en caldo de cultivo mediante la influencia de temperatura, pH, a_w y concentración del microorganismo usando el Bioscreen y CP.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Técnica de Cuenta en Placa

4.1.1. Preparación de muestras

Se trabajó con las cepas de *E. coli* ATCC 25922 (no patógena) y *E. coli* O157:H7 (patógena). La cepa no patógena se obtuvo de la colección de E.U.A (The Global Bioresource Center: American Type Culture Collection), mientras que la *E. coli* O157:H7 fue donada por el departamento de Biomedicina molecular del CINVESTAV- Unidad Zacatenco por el Dr. Francisco Cerna Cortez. Las cepas se conservaron en refrigeración (5 °C) en Agar Base Sangre en tubo inclinado y resebradas mensualmente hasta su uso. Para cada evaluación se emplearon cultivos de 18 h/37 °C (Tosun y Aktuğ-Gönül, 2005). Al momento del uso, cada cepa se lavó dos veces con solución salina isotónica y se resuspendió en Caldo Soya Trypticaseína (CST) al cual se le ajustó previamente el pH y la a_w como se describe a continuación en el apartado de caldo de cultivo. Las dinámicas de crecimiento se realizaron con las diluciones decimales de *E. coli* en CST (BAM, 1998).

4.1.1.1. Caldo de cultivo

4.1.1.2. Ajuste de la actividad de agua en CST

Se ajustó el valor de actividad de agua (a_w) del CST (0.965, 0.981, 0.998) usando glicerol y el valor del pH (4.0, 5.5 y 7) a 15, 25 y 35 °C. La modificación del pH se realizó empleando soluciones valoradas de NaOH y HCl, ambas a 0.5 N. La confirmación de los valores de a_w ajustados en el CST se realizó con el equipo Aqualab (Decagon®), previamente calibrado. En el Cuadro 2 se presenta la cantidad de glicerol utilizado en cada caso (Bell y Labuza, 2000).

Cuadro 2. Evaluaciones de la a_w en 10 mL de CST a 35, 25 y 15 °C.

pH	mL de Glicerol	a_w	Temperatura (°C)
7.0	0.0	0.998	35
7.0	0.6	0.981	35
7.0	1.5	0.965	35
5.5	0.0	0.998	35
5.5	0.7	0.981	35
5.5	1.35	0.965	35
4.0	0.0	0.998	35
4.0	0.7	0.981	35
4.0	1.4	0.965	35
7.0	0.0	0.998	25
7.0	0.67	0.981	25
7.0	1.6	0.965	25
5.5	0.0	0.998	25
5.5	0.9	0.981	25
5.5	1.5	0.965	25
4.0	0.0	0.998	25
4.0	0.9	0.981	25
4.0	1.5	0.965	25
7.0	0.0	0.998	15
7.0	0.7	0.981	15
7.0	1.7	0.965	15
5.5	0.0	0.998	15
5.5	0.7	0.981	15
5.5	1.4	0.965	15
4.0	0.0	0.998	15
4.0	0.6	0.981	15
4.0	1.6	0.965	15

4.1.1.3. Conteo en Placa: *E. coli* ATCC 25922

Para determinar la influencia de los cuatro factores propuestos (pH, temperatura, a_w , y concentración de inóculo) y sus interacciones, se usó un diseño Factorial Fraccionado $\frac{1}{2} 2^k$ (Cuadro 3).

Cuadro 3. Evaluación de *E. coli* usando el diseño Factorial Fraccionado $\frac{1}{2} 2^k$.

No. de tratamiento	Diseño básico			Inóculo inicial en UFC/mL (D=ABC)	Combinación de tratamientos
	Temperatura (A)	pH (B)	a_w (C)		
1	(-) 15 °C	(-) 4	(-) 0.965	(-) 4	(1)
2	(+) 35 °C	(-) 4	(-) 0.965	(+) 40000	(ad)
3	(-) 15 °C	(+) 7	(-) 0.965	(+) 40000	(bd)
4	(+) 35 °C	(+) 7	(-) 0.965	(-) 4	(ab)
5	(-) 15 °C	(-) 4	(+) 0.998	(+) 40000	(cd)
6	(+) 35 °C	(-) 4	(+) 0.998	(-) 4	(ac)
7	(-) 15 °C	(+) 7	(+) 0.998	(-) 4	(bc)
8	(+) 35 °C	(+) 7	(+) 0.998	(+) 40000	(abad)

Datos entre paréntesis indican el diseño del experimento; A,B,C,D factores bajo estudio.

Se evaluó el efecto de dos concentraciones iniciales del microorganismo (4 y 40000 UFC/mL); dos niveles de a_w (0.998, 0.965); dos valores de pH (7 y 4) y dos temperaturas (15 y 35 °C). Para el Conteo en Placa, se utilizaron 100 mL de CST estéril, el cual fue inoculado con *E. coli* a las concentraciones señaladas y se incubó a 35 y 15 °C.

El recuento de *E. coli* se realizó de 0 a 60 h (tomando ocho muestras durante este intervalo: 0, 6, 12, 24, 36, 42, 54, 60 h) tomándose alícuotas de 1 mL del CST inoculado por cada tratamiento, y diluyendo decimalmente en diluyente de peptona. Se determinó el número de UFC/mL y se transformaron a Log_{10} (Ray, 2004).

4.1.1.4. Conteo en Placa: *E. coli* O157:H7

La evaluación de *E. coli* O157:H7 se realizó de forma similar que *E. coli* no patógena, adicionando la condición intermedia de 400 UFC/mL, pH 5.5 y temperatura de 25 °C.

El recuento de *E. coli* O157:H7 se realizó tomando 12 tiempos en un intervalo de 0 hasta 15 días (tomándose muestras en el intervalo de: 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 168 y 384 h). Se determinó el número de UFC y la transformación de los datos se realizó según la técnica tradicional de Conteo en Placa.

4.1.1.5. Diseño experimental

4.1.1.5.1. Conteo en Placa en caldo de cultivo con *E. coli* O157:H7

El experimento de *E. coli* O157:H7 en CST se condujo con un diseño Box-Behnken 3^{4-1} , con un total de 81 evaluaciones (Ver Apéndice A). El análisis estadístico consistió en el análisis de varianza ($p \leq 0.05$.) usando la diferencia mínima significativa (STATISTICA®, Data Analysis Software System Versión 7, StatSoft, Inc., 2007. www.statsoft.com). El experimento se llevó a cabo con dos repeticiones.

4.1.1.6. Ajuste de datos experimentales a modelos matemáticos

Los datos experimentales obtenidos de Cuenta en Placa se ajustaron de manera independiente en las ecuaciones matemáticas de Gompertz, Logística y Richards, por regresión no lineal con el algoritmo de Marquardt., de acuerdo a Zwietering et al. (1990) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Solución de la ecuación de Gompertz, Logístico y de Richards expresada en términos de A, μ_m y λ .

Modelos	Ecuación	Solución de la ecuación en función de A, μ_m y λ
Gompertz	$y = a \cdot \exp[-\exp(b - ct)]$	$y = A \exp\left[-\exp\left[\frac{\mu_m \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right]$
Logístico	$y = \frac{a}{[1 + \exp(b - cx)]}$	$y = \frac{A}{[1 + \exp\left[\frac{4\mu_m}{A}(\lambda - t) + 2\right]]}$
Richards	$y = a\{1 + v \cdot \exp[k(\tau - x)]\}^{(-1/v)}$	$y = A\left\{1 + v \cdot \exp(1 + v) \cdot \exp\left[\frac{\mu_m}{A} \cdot (1 + v)^{\left(1 + \frac{1}{v}\right)} \cdot (\lambda - t)\right]\right\}^{\left(\frac{-1}{v}\right)}$

a, b y c son parámetros matemáticos que describen la curva sigmoideal y $e = 2.718$.

Una vez realizados los ajustes correspondientes de los datos experimentales con cada modelo, el software calcula los parámetros a , x_c y k como solución al modelo aplicado, con estos valores se realizó una comparación de la ecuación correspondiente con su solución (Cuadro 4) para obtener los valores de A , μ_m y λ . La resolución de las ecuaciones y la obtención de los valores a , x_c y k , se realizó con ayuda del programa OriginPro versión 6.1, usando el método de mínimos cuadrados. El algoritmo calcula el grupo de parámetros con el valor de R^2 con un intervalo de confianza de 95%.

A partir del ajuste de las curvas de Cuenta en Placa se estimaron la tasa de crecimiento específico (μ_{max}), el tiempo lag (λ), el tiempo de generación (t_g) y el valor máximo alcanzado (A) por *E. coli*, apoyándonos en algunos reportes (Dalgaard et al., 1994; Hudson y Mott, 1994). El valor de t_g fue calculado de la siguiente manera: $t_g = \text{Log}_{10}(2)/\mu_{max}$.

4.1.1.7. Variables evaluadas

Se evaluó el efecto de la temperatura, pH, a_w y concentración del microorganismo para *E. coli* no patógena y patógena.

Las variables respuestas fueron: λ , t_g , μ_{max} , y A . Se realizó un análisis de los efectos estimados de μ_{max} , así como graficas del efecto del pH, la temperatura, la a_w y la concentración inicial de microorganismo vs μ_{max} , para comprender mejor el efecto de los factores evaluados en el comportamiento de *E. coli*.

4.2. Técnica con Tubidimetría

4.2.1. Caldo de cultivo

Se evaluó el comportamiento de las cepas de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25922. La preparación de la muestra se realizó como se indicó en la sección de Cuenta en Placa. Se tomaron 400 μL del CST inoculado con la cepa y fueron depositados en cada pozo de la placa estéril del equipo. Posteriormente, se colocó la placa en el compartimiento del Bioscreen C y se programó la computadora a 15, 25 y 35 °C.

Las mediciones de DO fueron tomadas automáticamente por el equipo cada 30 min durante 3 a 7 días, hasta que apareciera la fase exponencial del microorganismo. Todas las evaluaciones fueron realizadas a una longitud de onda de 580 nm. La placa se homogeneizó mecánicamente por el equipo antes de cada medición. Concluido el tiempo programado, en la pantalla del monitor se mostraron las gráficas de la cinética del microorganismo relacionando la DO contra el tiempo.

4.2.2. Diseño experimental

El experimento con *E. coli* O157:H7 en CST se condujo empleando un diseño Box-Behnken 3^{4-1} (McKellar et al., 2004b), con un total de 81 evaluaciones (ver Anexo A). El análisis estadístico consistió en el análisis de varianza ($p \leq 0.05$), se realizaron dos repeticiones (factor con su respectivo nivel), y los datos se analizaron con el programa Statistic versión 7 (StatSoft, Inc., 2007).

4.2.3. Ajuste de datos experimentales a modelos matemáticos

Los datos experimentales obtenidos de Turbidimetría, se ajustaron de la misma manera que en el Conteo en Placa con los modelos matemáticos de Gompertz, de Richards, así como el modelo Logístico.

A partir de los ajustes de las curvas de Turbidimetría se estimaron la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}), el tiempo lag (λ), el tiempo de generación (t_g) y el valor máximo alcanzado (A) en *E. coli* de acuerdo a lo reportado en la literatura (Dalgaard et al., 1994; Hudson y Mott, 1994).

4.2.4. Variables evaluadas

Se evaluó el efecto de la temperatura, el pH, la a_w y la concentración del microorganismo para *E. coli* no patógena y patógena, usando el ajuste de los datos experimentales a modelos matemáticos según el diseño experimental (Anexo A. Cuadro 4).

Las mediciones del Bioscreen C (Densidad Óptica) fueron corregidas por el blanco (CST estéril).

Las variables respuestas fueron: λ , t_g , μ_{max} , y A . Se realizó un análisis de los efectos estimados de λ , así como graficas del efecto del pH, la temperatura, la a_w y la concentración inicial de microorganismo depositado vs λ para comprender mejor el efecto de los factores evaluados en el comportamiento de *E. coli*.

4.3. Técnica con Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

4.3.1. Caldo de cultivo

La evaluación Calorimétrica se realizó con cultivos de *E. coli* ATCC 25922 que fueron incubados en CST a pH 7 por 18 h/35 °C para tener células en fase estacionaria temprana. El microorganismo fue lavado dos veces en solución salina isotónica y resuspendido en CST a pH7 y a_w 0.998. Se realizaron diluciones decimales del cultivo en el CST para obtener concentraciones finales del microorganismo de 4, 40, 4000 y 4×10^4 UFC. Las evaluaciones se realizaron en un equipo DSC 822^e/400 (Mettler-Toledo) y en portamuestras de aluminio previamente esterilizados. Se depositaron 40 μ L de la suspensión celular por concentración evaluada. Se realizó un Conteo en Placa de manera simultánea a estas mediciones como se describió en el Recuento en Placa. La dinámica de crecimiento con Conteo en Placa se realizó desde el tiempo 0 hasta las 24 h (tomando 21 muestras en este intervalo: 0, 0.33, 0.67, 1, 1.33, 1.67, 2, 2.3, 2.66, 3, 3.33, 3.6, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 10, 12, 24 h), siguiendo la técnica tradicional (Hugo y Russell's, 2004). Se trabajaron los datos como se describió en la sección de Recuento en Placa. En cada corrida con el DSC se corroboró la cantidad de UFC depositadas en las celdas del calorímetro. El equipo fue calibrado rutinariamente con Indio y se evaluó el CST estéril para verificar la línea base. Todas las dinámicas de *E. coli* se realizaron a 35 °C.

4.3.2. Diseño experimental

El experimento se condujo como un Diseño Completamente al azar, el análisis estadístico consistió en el análisis de varianza y pruebas de comparación de medias

(Duncan $p \leq 0.05$) con tres repeticiones, por concentración evaluada y los datos se analizaron con el programa Statistic[®] versión 7 (StatSoft, Inc., 2007).

4.3.3. Variables evaluadas

Se evaluó la influencia de diferentes concentraciones de *E. coli* no patógena en caldo de cultivo a pH 7, a_w 0.998 y 35 °C.

Las variables respuesta obtenidos de los termogramas fueron: tiempo inicial, final y el punto máximo del pico observado, así como el calor generado (área bajo la curva).

4.4. Técnica de Espectroscopia de Impedancia

Antes de iniciar con los experimentos, se lavó el material de vidrio con jabón y agua desionizada, para evitar interferencias en las lecturas. Una vez seco el material de vidrio, se preparó el caldo de cultivo y se inóculo con *E. coli* como se describe en la técnica de Cuenta en Placa en la preparación de muestras en caldo de cultivo del capítulo 4. Una vez diluida la cepa en diferentes concentraciones de CST, se colocó inmediatamente en las celdas del Bactometer. Se tomó 1 mL de la muestra correspondiente (caldo de cultivo y la bacteria) bajo condiciones estériles y fue tapada la placa del equipo.

4.4.1. Caldo de cultivo

Se monitoreó *in situ* y de manera continua el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 en CST mediante cambios en la conductancia. Los caldos fueron monitoreados usando un Bactometer Microbial System (BioMerieux, 69280 Marcy-l'Etoile, France). Las mediciones del equipo son expresadas en micro Siemens (μS). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Cambios en la conductancia fueron monitoreados gráficamente por el Bactometer. Se realizaron gráficos con los valores obtenidos de la conductancia con respecto al tiempo.

4.4.2. Diseño experimental

Se realizó un total de 15 evaluaciones en el caldo de cultivo según el Diseño fraccionado Box-Behnken 3^{4-1} (Cuadro 5).

Cuadro 5. Evaluación del caldo de cultivo usando un diseño experimental fraccionado Box-Behnken 3^{4-1}

No. de experimento	Temperatura (°C) (A)		pH (B)		Co. inóculo en UFC (C)	
1	(-1)	15	(-1)	4	(0)	400
2	(-1)	15	(1)	7	(0)	400
3	(1)	35	(-1)	4	(0)	400
4	(1)	35	(1)	7	(0)	400
5	(-1)	15	(0)	5.5	(-1)	4
6	(-1)	15	(0)	5.5	(1)	40000
7	(1)	35	(0)	5.5	(-1)	4
8	(1)	35	(0)	5.5	(1)	40000
9	(0)	25	(-1)	4	(-1)	4
10	(0)	25	(-1)	4	(1)	40000
11	(0)	25	(1)	7	(-1)	4
12	(0)	25	(1)	7	(1)	40000
13	(0)	25	(0)	5.5	(0)	400
14	(0)	25	(0)	5.5	(0)	400
15	(0)	25	(0)	5.5	(0)	400

El análisis estadístico consistió en el análisis de varianza usando diferencia mínima significativa con dos repeticiones, por concentración evaluada. Los datos se analizaron con el programa Statistic[®] versión 7 (StatSoft, Inc., 2007).

4.4.3. Variables evaluadas

Se evaluó la influencia de pH, temperatura y concentraciones de *E. coli* no patógena en CST. La variable respuesta evaluada fue: el tiempo de detección de desarrollo (TDD) de la bacteria expresado en horas (Garro et al., 2001). El TDD se define como el punto en el cual hay un cambio en la medición eléctrica debida a la actividad microbiana (Felice et al., 1998). Por lo que esta medición fue determinada extrapolando la pendiente a la curva tangente con el eje de las equis. Se realizó un análisis de variancia y de los efectos estimados del TDD, así como graficas del efecto de pH, temperatura, a_w y concentración inicial de microorganismo depositado vs TDD para comprender mejor el efecto de los factores evaluados en el comportamiento de *E. coli*.

5. Resultados y discusión

5.1. Conteo en Placa: *E. coli* ATCC 25922

En las ocho cinéticas realizadas mediante Cuenta en Placa (CP), se observó la influencia del pH, la temperatura y la concentración de inóculo en el comportamiento de *E. coli* no patógena (Figura 1). Con base en la dinámica de crecimiento transformada a Log_{10} (donde 4 y 40000 UFC corresponden a 0.6 y 4.6 Log_{10} UFC/mL) se determinó que a pH 4 no hubo crecimiento; por ejemplo: en la condición pH 4 con 4 y 40000 UFC, 0.965 y 0.998 a_w a 15 °C., observándose la muerte del microorganismo cuando la temperatura se incrementó a 35 °C, independientemente de la a_w y la concentración inicial de inóculo depositada. Por otra parte, condiciones de pH 7 permitieron el desarrollo de *E. coli*, observando incrementos en la fase lag (λ) de 3 y 2 h para 35 y 15 °C, a pH 7, con 4 y 40000 UFC/mL y 0.965 a_w ; respectivamente.

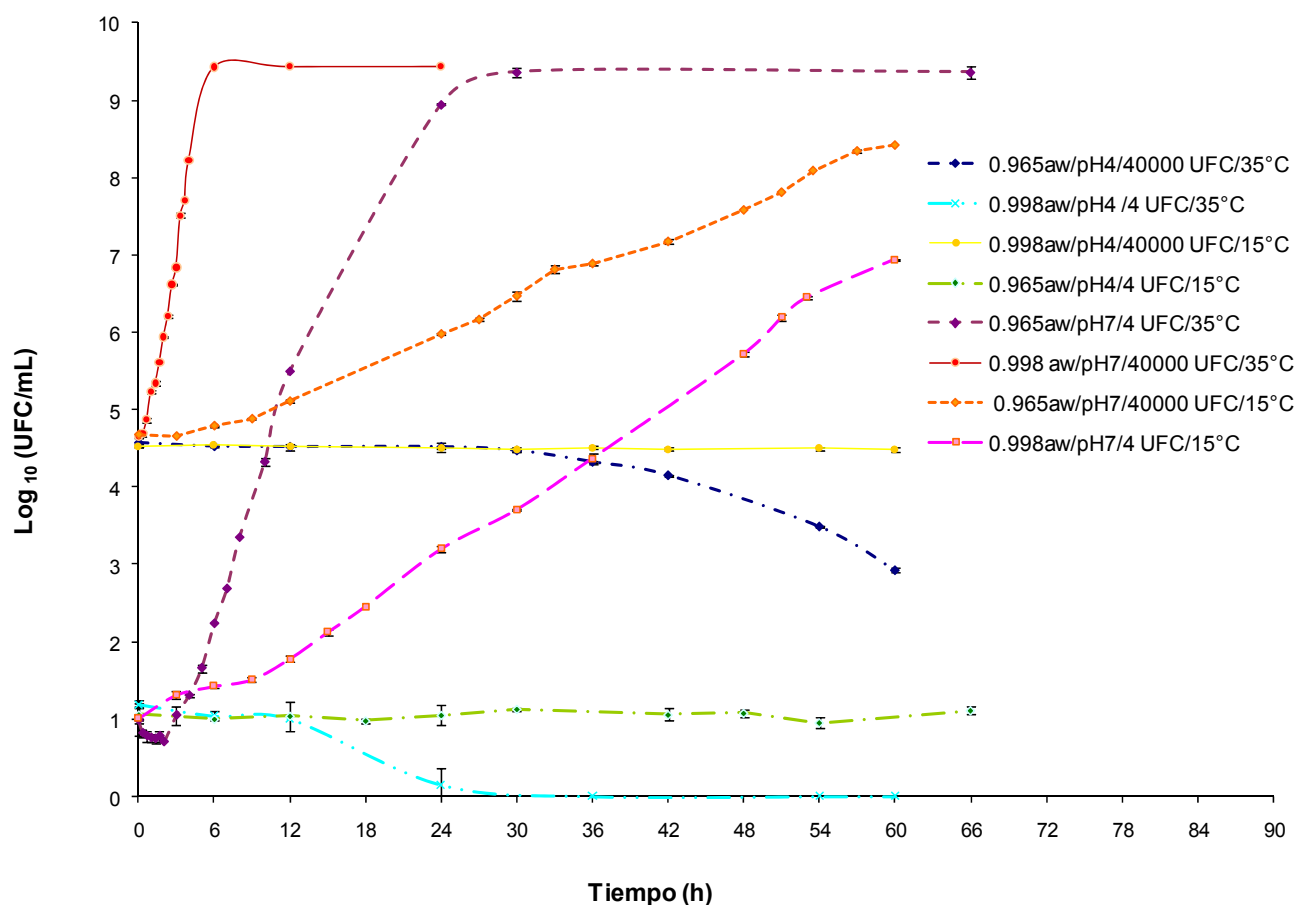


Figura 1. Efecto de la temperatura, pH, tamaño de inóculo y a_w en el comportamiento de *E. coli* no patógena en CST.

La tasa de desarrollo (μ_{\max}) de *E. coli* para dichas condiciones (pH 7, a_w 0.965 con 4 y 40000 UFC/mL a 35 y 15 °C) fue de 0.58 y 0.071 h y tiempos de generación (t_g) de 1.19 y 9.80 h⁻¹, respectivamente. *Escherichia coli* presentó el mayor crecimiento a pH 7 con 4 y 40000 UFC/mL, a_w de 0.998 y a temperaturas de 15 y 35 °C (no se observó la fase λ), debido a que son condiciones óptimas de desarrollo del microorganismo. Esto es debido a que el pH tiene un efecto determinante en la multiplicación, sobrevivencia o muerte del microorganismo, debido a que la temperatura y la actividad de agua (a_w) muestran un efecto sinérgico con el pH (Francois et al., 2005b). La μ_{\max} a pH 7, a_w 0.998 con 40000 y 4 UFC/mL a 35 y 15 °C fue de 2.38 y 0.13 y t_g de 0.29 y 5.54 h⁻¹, respectivamente. Se puede notar que el valor de μ_{\max} depende de la a_w , la T, el pH y la concentración inicial del microorganismo.

Cuadro 6. Efectos principales e interacciones en el comportamiento de *E. coli* en CST a 15 y 35 °C usando diseño Factorial Fraccionado $\frac{1}{2} 2^k$.

Condición (pH/ a_w /T °C)	Inóculo inicial UFC/mL	0h	6h	12h	24h	36h	42h	54h	60h
pH4/ 0.965/ 15	4	1.06	1	1.04	1.05	1.06	1.06	0.95	1.07
pH4/ 0.965/ 35	40000	4.57	4.52	4.52	4.52	4.32	4.15	3.49	2.93
pH7/ 0.965/ 15	40000	4.68	4.79	5.11	5.98	6.89	7.17	8.09	8.41
pH7/ 0.965/ 35	4	0.98	2.23	5.5	8.95	9.37	9.37	9.37	9.37
pH4/ 0.998/ 15	40000	4.53	4.55	4.53	4.50	4.51	4.49	4.50	4.49
pH4/ 0.998/ 35	4	1.19	1.04	1.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00
pH7/ 0.998/ 15	4	1.01	1.42	1.78	3.20	4.37	5.00	6.45	6.95
pH7/ 0.998/ 35	40000	4.65	9.43	9.44	9.44	9.44	9.44	9.44	9.44
Media [β_0]:		2.83	3.62	4.11	4.72	4.99	5.14	5.29	5.33
Temperatura		0.11	5.46	7.99	8.32	6.30	4.76	2.31	0.81
pH		-0.03	6.76	10.73	17.35	20.17	21.74	24.40	25.68
a_w		0.10	3.90	0.59	-3.20	-3.31	-2.34	-1.50	-0.91
Inóculo inicial		14.20	17.61	14.28	11.09	10.37	9.36	8.75	7.89
T/pH;(AB)		-0.23	5.43	8.09	10.09	8.79	7.56	6.23	6.08
T/ a_w ;(AC)		0.49	3.54	0.26	-4.55	-5.19	-5.81	-5.33	-4.80
pH/ a_w ;(BC)		-0.09	3.77	0.64	-1.37	-1.57	-0.91	-1.62	-1.88

T: temperatura (°C); a_w : actividad de agua.

Con base al análisis de efectos principales, el pH mostró ser el factor principal que afecta el comportamiento microbiano (Cuadro 6), seguido del inóculo inicial depositado y la temperatura.

Al tiempo cero se observó que la concentración del microorganismo fue el factor con mayor importancia que afecta el comportamiento de *E. coli* con valor estimado de 14.20. A las 6 h, observamos que cada uno de los factores evaluados va alcanzando valores estimados que evidencian su importancia. Después de las 12 h, el pH manifiesta un efecto en el crecimiento hasta las 36 h (con valor estimado de 10.73 a 20.17); manteniéndose casi constante al término del experimento (a las 60 h su valor estimado fue de 25.68). La mayor interacción de los factores evaluados fue pH-temperatura con un valor estimado de 6.08 a las 60 h. Concluimos que el pH, la concentración de inóculo y la temperatura mostraron efecto significativo en la evaluación del comportamiento de *E. coli* ($p \geq 0.05$), lo cual indica que el comportamiento de *E. coli* está influenciado por el pH, la concentración del microorganismo y la temperatura, así como sus interacciones (Cuadro 6 y 7). Algunos estudios, mencionan que el efecto de la temperatura se manifiesta en la duración de la fase λ , μ_{max} , t_g y la concentración final de microorganismos alcanzada (A) (Fernández, 2000; Jones et al., 2006).

Se aprecia en el Cuadro 7 que el pH y la concentración de inóculo inicial fueron altamente significativos ($p \leq 0.001$); como factores que determinan el comportamiento de *E. coli*, así como la interacción a_w -concentración del inóculo inicial depositado. Lo que significa que aunque la a_w no fue un factor principal, se determina que tiene un efecto importante.

Cuadro 7. Análisis de varianza de la influencia de temperatura, pH, a_w , e inóculo inicial en el comportamiento de *E. coli* usando el diseño Factorial Fraccionado $\frac{1}{2} 2^k$.

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Bloques	84.89	7	12.13	4.97	0.000063
(1) a_w	0.53	1	0.53	0.22	0.641835
(2) pH	482.24	1	482.24	197.61	0.000000
(3) Temperatura	45.78	1	45.78	18.76	0.000032
(4) Inóculo inicial	259.24	1	259.24	106.23	0.000000
a_w -pH	0.93	1	0.93	0.38	0.538212
a_w -Temperatura	11.07	1	11.07	4.54	0.035351
a_w -Inóculo inicial	76.23	1	76.23	31.24	0.000000
Error	275.76	113	2.44		
SC Total	1236.67	127			

Números en negrita indican diferencias significativas con probabilidad de ($p \leq 0.05$). SC: suma de cuadrados. $R^2=0.78$; R Adj=0.75.

El análisis de varianza que se presenta en el Cuadro 7, muestra que la temperatura y la interacción a_w -temperatura tienen un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) para evaluar el comportamiento de *E. coli* en CST.

Finalmente con base al análisis realizado, los factores propuestos resultaron determinantes para evaluar el comportamiento de *E. coli*. El pH fue el factor que mayor efecto tuvo en el comportamiento de *E. coli*, por tratarse de una escala logarítmica, es evidente que una solución o alimento con pH 5.5 es 15 veces más ácida que un alimento con pH 7.0 (Fernández, 2000). Slonczewski et al. (1987), determinaron que la permeabilidad de los ácidos a la membrana celular pueden inducir genes que regulan el pH; el cual decrece en el citoplasma desencadenando la ácido resistencia de *E. coli*, debido al consumo de protones del sistema de descarboxilación del glutamato (Lin et al., 1996). Este es uno de los sistemas inductores más efectivos de la ácido resistencia y que protegen el crecimiento o sobrevivencia de *E. coli* (en un intervalo amplio de condiciones ambientales ácidas) (Tucker et al., 2002; Tosun y Aktuğ-Gönül, 2005).

La temperatura es otro factor que influye de manera decisiva en el desarrollo y la viabilidad de los microorganismos; ya que es usada para controlar el crecimiento de los microorganismos en alimentos (Montville y Matthews, 2005; Jones et al., 2006). Es conocido que con cada aumento de 10 °C, la velocidad catalítica de las enzimas se duplica, similarmente al reducirla 10 °C la velocidad de las reacciones disminuye a la mitad (Ray, 2004; Montville y Matthews, 2005). *E. coli* se encuentra clasificado como mesófilo (con intervalo de crecimiento de 10 a 45 °C y un óptimo de 37 °C).

El valor de a_w se emplea para predecir reacciones de deterioro, la seguridad de un alimento respecto al crecimiento microbiano; y por tanto la estabilidad y la vida útil de un producto (CSIRO, 2005). La a_w es capaz de tener movilidad y por tanto propiciar cambios que influyan definitivamente en las reacciones físicas, químicas, enzimáticas y microbiológicas del alimento (Fernández, 2000; Ray, 2004).

La limitada disponibilidad de agua lleva a la célula a la condición de metabólicamente inerte, deteniéndose su desarrollo (Fernández, 2000). Por ejemplo, el valor mínimo de a_w reportado para que *E. coli* O157:H7 desarrolle es 0.95, teniendo un mayor desarrollo a una a_w máxima de 0.995 (Jay, 2000).

El efecto de la concentración del microorganismo, en la fase λ puede explicarse si las células se someten a estrés. Augustin et al. (2000), determinaron que la fase λ no mostró efecto significativo en la concentración de inóculo (10^{-2} a 10^4) para *L. monocytogenes* a pH 6.0 y temperatura de 6.5 °C y que la fase λ se extiende en inóculos pequeños, cuando las células están severamente estresadas, ya que se han privado de nutrientes. En el presente estudio observamos la variabilidad en la fase λ de 2 y 3 h a pH 7, a_w 0.965 a temperaturas de 15 y 35 °C.

5.2. Conteo en Placa: *E. coli* O157:H7

El comportamiento de *E. coli* O157:H7 en CST influenciado por la temperatura, pH, a_w y concentración del inóculo depositado se observa en el Apéndice B (Figura 1 a 3). Con base en la dinámica de crecimiento transformada a Log_{10} (4 y 40000 UFC correspondieron a 0.6 y 4.6 Log_{10}). Las cinéticas de sobrevivencia (15 y 25 °C) y muerte (35 °C) de *E. coli* fueron detectadas a pH 4. Las cinéticas donde *E. coli* mantuvo su número de células al inicio y final del experimento (16 días), se observó a 15 °C con pH 4, 0.981 a_w (con 400 UFC); así como a 25 °C a pH 4, 0.998 a_w (con 400 y 40000 UFC), 0.981 a_w (con 4 y 40000 UFC) y 0.965 a_w (400 UFC) (datos no mostrados).

A 35 °C con pH 4 y 0.981 a_w (con 400 UFC), se observó la muerte del microorganismo después de 49.7 h, alcanzando valores de 0 UFC/mL. Esto nos sugiere el efecto sinérgico del pH y la temperatura para inactivar al microorganismo en aproximadamente 2 días.

Las cinéticas de crecimiento de *E. coli* fueron registradas a pH 5.5 y 7.0 a 15, 25 y 35 °C con 0.998, 0.981 y 0.965 de a_w empleando 4, 400 y 40000 UFC (Figura 1 a 3 A-F; Apéndice B).

El cálculo de los parámetros de crecimiento λ , t_g , μ_{max} y (A) o valor máximo de crecimiento alcanzado por *E. coli* O157:H7 usando los modelos de Richards, Gompertz y Logístico se muestran en el Apéndice B. En las condiciones experimentales donde se observó sobrevivencia y muerte microbiana no se calcularon los parámetros de crecimiento.

El valor de la fase λ no fue calculado por la técnica de Cuenta en Placa (CP) en los tres modelos, debido a que el inicio del crecimiento fue inmediato, por lo que fue registrado como NC (no calculado). Solamente en condiciones de 15 °C a pH 5.5 y 400 UFC con 0.965 y 0.998 de a_w se mostró una fase λ de 5.7 y 4.75 h, respectivamente. Los tres modelos mostraron tendencias similares en los parámetros de crecimiento: t_g , μ_{max} y A. De manera general, se observó que la tasa de crecimiento (μ_{max} cambio en el número de células o masa por unidad de tiempo) disminuyó con la disminución de la a_w y la temperatura. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Robinson et al. (1998), donde mencionan una disminución de la tasa de crecimiento con el aumento de la osmolaridad.

Para los patógenos con baja dosis infectante como *E. coli* es importante el control del crecimiento, más que su tasa de crecimiento (μ_{max}) (McMeekin et al., 1997), por lo que es necesario entender y predecir la fase lag con exactitud, así como los factores fisiológicos que la afectan (McDonald y Sun, 1999).

Para el modelo de Richards (Cuadro 8) el valor de t_g varió de 0.58 a 1.34 h a 35 °C, de 1.27 a 4.26 h a 25 °C y de 5.36 a 10.58 h a 15 °C. Cabe recordar que t_g , es el tiempo requerido para incrementar al doble el número de células. La μ_{max} fue de 0.71 a 1.71 a 35 °C, a 25 °C fue de 0.17 a 0.59 y a 15 °C, 0.07 a 0.13 h., con tendencia parecida al modelo Gompertz.

En muchas bacterias la fase λ , t_g , μ_{max} y A se modifican al cambiarse las condiciones de crecimiento como temperatura, pH, a_w y disponibilidad de nutrientes (Ray, 2004).

Cuadro 8. Cálculo de los parámetros de crecimiento (μ_{\max} , λ , t_g)¹ de *E. coli* O157:H7 usando Conteo en Placa con el modelo de Richards.

CONDICIONES (a_w / pH / UFC)	T (°C)	λ_{observ}	R ²	λ	t_g	μ_{\max}	A
0.998 / pH5.5 / 400	35	0	0.977	NC	0.80	0.88	8.90
0.981 / pH5.5 / 4	35	0	0.984	NC	0.58	1.71	8.92
0.981 / pH5.5 / 40000	35	0	0.988	NC	1.01	0.70	8.88
0.965 / pH5.5 / 400	35	0	0.941	NC	1.34	0.53	8.55
0.981 / pH7 / 400	35	0	0.996	NC	0.71	0.98	9.19
0.998 / pH5.5 / 4	25	0	0.998	NC	1.37	0.59	9.04
0.998 / pH5.5 / 40000	25	0	0.995	NC	1.84	0.38	9.01
0.981 / pH5.5 / 400	25	0	0.992	NC	2.12	0.36	8.80
0.981 / pH5.5 / 400	25	0	0.996	NC	2.32	0.30	8.94
0.965 / pH5.5 / 4	25	0	0.999	NC	2.57	0.27	8.81
0.965 / pH5.5 / 40000	25	0	0.996	NC	3.12	0.23	8.71
0.998 / pH7 / 400	25	0	0.999	NC	1.20	0.58	9.25
0.981 / pH7 / 4	25	0	0.995	NC	1.27	0.56	9.15
0.981 / pH7 / 40000	25	0	0.996	NC	2.13	0.33	9.12
0.965 / pH7 / 400	25	0	0.998	NC	4.26	0.17	8.65
0.998 / pH5.5 / 400	15	4.75	0.996	NC	6.53	0.11	8.89
0.981 / pH5.5 / 4	15	0	0.996	NC	7.01	0.10	8.90
0.965 / pH5.5 / 400	15	5.70	0.996	NC	10.58	0.07	8.74
0.981 / pH5.5 / 40000	15	0	0.990	NC	7.31	0.10	8.68
0.981 / pH7 / 400	15	0	0.994	NC	5.36	0.13	8.96

¹Promedio de tres repeticiones. λ_{observ} : Fase lag observada en cada una de las condiciones del diseño experimental. μ_{\max} y λ están calculadas en h, t_g en h⁻¹, A en log₁₀ UFC/mL; NC: parámetro no calculado.

Por arriba de la temperatura óptima, μ_{\max} decrece rápidamente, mientras que por debajo de la temperatura óptima, μ_{\max} decrece gradualmente (Lengeler et al., 2004). Los tiempos de generación reportados para *E. coli* O157:H7 son de 0.49 h a 37 °C y 0.64 h a 42 °C en CST (Doyle y Shoeni, 1984). Lederberg (2004), concluyó que *E. coli* a 37 °C en un medio enriquecido presenta un t_g de 20 min. Lo cual concuerda con nuestros resultados a 35 °C, excepto para las condiciones de pH 5.5 con 0.981 a_w , 40000 UFC y 0.965 a_w con 400 UFC con t_g de 1.01 y 1.34 h⁻¹, respectivamente, que presentaron valores de R² de 0.988 y 0.941.

Para el modelo de Gompertz (Cuadro 9), t_g varió en las tres temperaturas estudiadas, a 35 °C varió de 0.59 a 1.26, a 25 °C de 1.34 a 4.05 y a 15 °C de 5.17 a 11.3 h. En general el t_g de *E. coli* es más corto al incrementar la temperatura, evidenciado que mientras se acerca a la temperatura óptima de crecimiento, *E. coli* se multiplica a mayor velocidad.

Cuadro 9. Cálculo de los parámetros de crecimiento (μ_{\max} , λ , t_g)¹ de *E. coli* O157:H7 usando Conteo en Placa con el modelo de Gompertz.

CONDICIONES (a_w / pH / UFC)	T (°C)	λ_{observ}	R^2	λ	t_g	μ_{\max}	A
0.998 / pH5.5 / 400	35	0	0.990	NC	0.64	1.09	8.92
0.981 / pH5.5 / 4	35	0	0.990	NC	0.76	0.97	8.96
0.981 / pH5.5 / 40000	35	0	0.988	NC	0.59	1.22	8.90
0.981 / pH7 / 400	35	0	0.990	NC	0.72	0.97	9.22
0.965 / pH5.5 / 400	35	0	0.923	NC	1.26	0.55	8.67
0.998 / pH5.5 / 4	25	0	0.991	NC	1.59	0.44	9.11
0.998 / pH5.5 / 40000	25	0	0.976	NC	1.49	0.49	9.07
0.998 / pH7 / 400	25	0	0.984	NC	1.34	0.52	9.31
0.981 / pH5.5 / 400	25	0	0.982	NC	2.18	0.33	8.95
0.981 / pH5.5 / 400	25	0	0.986	NC	2.20	0.32	9.03
0.981 / pH7 / 4	25	0	0.988	NC	1.50	0.46	9.22
0.981 / pH7 / 40000	25	0	0.983	NC	1.70	0.41	9.19
0.965 / pH5.5 / 4	25	0	0.990	NC	2.74	0.25	8.96
0.965 / pH5.5 / 40000	25	0	0.971	NC	2.46	0.28	8.82
0.965 / pH7 / 400	25	0	0.984	NC	4.05	0.18	8.82
0.998 / pH5.5 / 400	15	4.75	0.977	NC	6.16	0.11	9.21
0.981 / pH5.5 / 4	15	0	0.991	NC	7.36	0.10	9.35
0.981 / pH5.5 / 40000	15	0	0.972	NC	5.30	0.13	8.91
0.981 / pH7 / 400	15	0	0.978	NC	5.17	0.13	9.29
0.965 / pH5.5 / 400	15	5.70	0.981	NC	11.3	0.06	9.99

¹Promedio de tres repeticiones. λ_{observ} : Fase lag observada en cada una de las condiciones del diseño experimental. μ_{\max} y λ están calculadas en h, t_g en h⁻¹, A en log₁₀ UFC/mL; NC: parámetro no calculado.

Para μ_{\max} , el valor varió de 0.97 a 1.22 h a 35 °C, a 25 °C de 0.18 a 0.52 h y a 15 °C de 0.06 a 0.11 h, respectivamente. Esto demuestra que al incrementar la temperatura la μ_{\max} se incrementa para *E. coli* patógena.

Para el caso del modelo Logístico (Cuadro 10), se encontraron valores de t_g a 35 °C de 0.77 a 1.41 h, a 25 °C de 1.43 a 4.46 h y a 15 °C de 5.54 a 11.34 h. Con una μ_{\max} de 0.49 h a 3.03 h a 35 °C, de 0.16 h a 0.48 h a 25 °C y de 0.6 a 0.13 h a 15 °C, observando el mismo efecto que en el resto de los modelos. Al incrementar la temperatura t_g , disminuye y la μ_{\max} se incrementa. El mejor ajuste de los datos experimentales se presentó con el modelo de Richards y el modelo Logístico ($R^2 = 0.990$), en la mayoría de los tratamientos evaluados.

El t_g es muy variable porque el crecimiento depende de una gran cantidad de factores nutricionales y genéticos (Srivastava y Srivastava, 2003; Ray, 2004).

Cuadro 10. Cálculo de los parámetros de crecimiento (μ_{\max} , λ , t_g)¹ de *E. coli* O157:H7 usando Conteo en Placa con el modelo Logístico.

CONDICIONES (a_w / pH / UFC)	T (°C)	λ_{observ}	R ²	λ	t_g	μ_{\max}	A
0.998 / pH5.5 / 400	35	0	0.990	NC	0.75	0.93	8.91
0.981 / pH5.5 / 40000	35	0	0.988	NC	0.77	0.93	8.90
0.981 / pH5.5 / 4	35	0	0.992	NC	0.59	3.03	8.93
0.965 / pH5.5 / 400	35	0	0.929	NC	1.41	0.49	8.65
0.981 / pH7 / 400	35	0	0.993	NC	0.82	0.85	9.21
0.998 / pH5.5 / 4	25	0	0.996	NC	1.56	0.46	9.06
0.998 / pH5.5 / 40000	25	0	0.981	NC	1.80	0.40	9.06
0.981 / pH5.5 / 400	25	0	0.991	NC	2.37	0.30	8.91
0.981 / pH5.5 / 400	25	0	0.992	NC	2.41	0.29	8.99
0.965 / pH5.5 / 4	25	0	0.997	NC	2.77	0.25	8.88
0.965 / pH5.5 / 40000	25	0	0.980	NC	2.95	0.24	8.79
0.998 / pH7 / 400	25	0	0.991	NC	1.43	0.48	9.29
0.981 / pH7 / 4	25	0	0.993	NC	1.49	0.47	9.18
0.981 / pH7 / 40000	25	0	0.988	NC	2.06	0.34	9.17
0.965 / pH7 / 400	25	0	0.991	NC	4.46	0.16	8.75
0.998 / pH5.5 / 400	15	4.75	0.987	NC	6.73	0.10	9.10
0.981 / pH5.5 / 4	15	5.70	0.996	NC	7.15	0.10	8.98
0.981 / pH7 / 400	15	0	0.987	NC	5.54	0.13	9.15
0.981 / pH5.5 / 40000	15	0	0.951	NC	5.99	0.12	8.80
0.965 / pH5.5 / 400	15	0	0.989	NC	11.34	0.06	9.28

¹ Promedio de tres repeticiones. λ_{observ} : Fase lag observada en cada una de las condiciones del diseño experimental. μ_{\max} y λ están calculadas en h, t_g en h⁻¹, A en log₁₀ UFC/mL; NC: parámetro no calculado.

Escherichia coli O157:H7 alcanzó una concentración final (A) entre 8.82 a 9.99 log₁₀ UFC/mL. Lo cual concuerda con lo reportado por Tamplin et al. (2005), para *E. coli* O157:H7 en carne de res estéril, incubada a 15, 25 y 35 °C con valores de 9.47, 9.2 y 8.86 Log₁₀ UFC, respectivamente.

Los efectos estimados para cada uno de los parámetros de crecimiento, muestran la significancia que existe en cada uno de los términos lineales y cuadráticos de los factores estudiados: temperatura, pH, a_w y concentración de inóculo (Cuadro 11).

En general el t_g de *E. coli* es más corto al incrementar la temperatura, evidenciado que mientras estemos cercanos al óptimo de crecimiento, *E. coli* se multiplicará a mayor velocidad. Para μ_{max} ésta varió de 0.97 a 1.22 h a 35 °C, a 25 °C de 0.18 a 0.52 h y a 15 °C de 0.06 a 0.11 h, respectivamente.

Cuadro 11. Efectos estimados para la μ_{max} a partir de datos de Conteo en Placa usando diseño Box-Behnken 3^{4-1} .

Media/Interc	Efecto	Std.Err	t(232)	p	Coef.	Std.Err
Bloque (1)	34.32	0.087	394.64	0.00	34.32	0.09
Bloque (2)	-0.09	0.085	-1.04	0.30	-0.04	0.04
(1) pH (L)	-0.10	0.085	-1.18	0.24	-0.05	0.04
pH (Q)	-101.56	0.090	-1126.99	0.00	-50.78	0.05
(2) a_w (L)	-50.81	0.068	-751.67	0.00	-25.40	0.03
a_w (Q)	0.11	0.158	0.69	0.49	0.06	0.08
(3) Temperatura (L)	0.10	0.131	0.76	0.45	0.05	0.07
Temperatura (Q)	0.79	0.090	8.81	0.00	0.40	0.05
(4) Inóculo inicial(L)	-0.20	0.068	-3.00	0.003	-0.10	0.03
Inóculo inicial(Q)	-0.19	0.090	-2.15	0.033	-0.10	0.05
Media/Interc	-0.24	0.081	-2.99	0.003	-0.12	0.04

Números en negrita indican diferencias significativas con probabilidad de ($p \leq 0.05$). $R^2=0.99988$; R Adj: 0.99988; MS Residual=0.219.

En microbiología, la tasa de crecimiento (μ_{max}) es uno de los parámetros usados para evaluar el crecimiento microbiano (Ray, 2004). Se estudió la tasa de crecimiento (μ_{max}) para analizar su influencia sobre los factores evaluados (pH, a_w , temperatura y concentración de inóculo) en el comportamiento de *E. coli*. El pH y la temperatura fueron altamente significativos ($p \leq 0.001$) y el inóculo inicial depositado fue significativo ($p \leq 0.05$) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de varianza de μ_{\max} con datos de Conteo en Placa en un diseño Box-Behnken 3^{4-1} .

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Bloques	1.10	2	0.50	2	0.088
pH (L)	278509.60	1	278509.60	1270105	0.000
pH (Q)	123895.70	1	123895.70	565009	0.000
(2) a_w (L)	0.10	1	0.10	0	0.489
a_w (Q)	0.10	1	0.10	1	0.447
(3)Temperatura (L)	17.00	1	17.00	78	0.000
Temperatura (Q)	2.00	1	2.00	9	0.003
(4) Inóculo inicial (L)	1.00	1	1.00	5	0.033
Inóculo inicial (Q)	2.00	1	2.00	9	0.003
Error	50.90	232	0.20		
Total SC	433087.00	242			

Números en negrita indican diferencias significativas con probabilidad de $p \leq 0.05$. $R^2=0.99988$; R Adj: 0.99988 MS Residual=0.219. SC: suma de cuadrados.

Las Figuras 2A y 2B muestran las diferencias significativas que tienen el pH y la a_w en la μ_{\max} . Se observaron diferencias notables a pH 4 (sin crecimiento), respecto al pH 5.5 (0.50 h) y pH 7 (0.40 h) estas últimas fueron iguales estadísticamente entre ellas. La actividad de agua también mostró diferencias significativas con valores de 0.981 a_w (27.5 h) respecto a 0.965 a_w (17 h) y 0.998 a_w (17.2 h) que no fueron significativas entre sí. La significancia que tiene la temperatura y la concentración del microorganismo depositada se observó en las Figuras 2C y 2D. Los valores reportados a temperatura de 15 (17 h), 25 (27.2 h) y 35 °C (18 h), mostraron diferencias significativas para las tres condiciones.

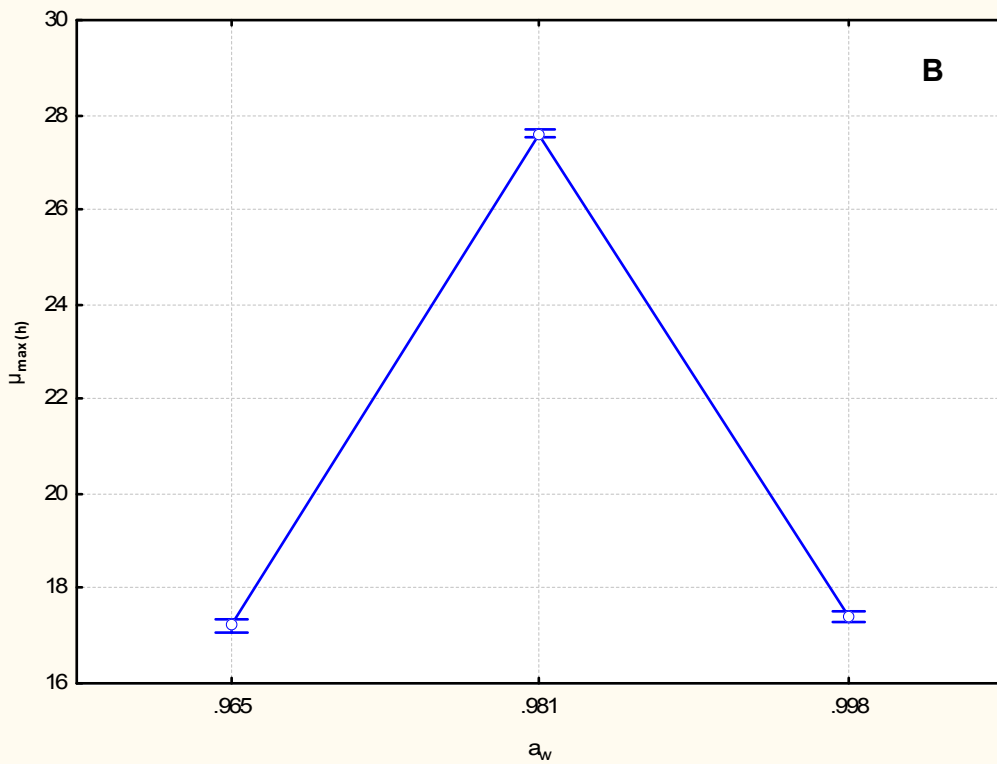
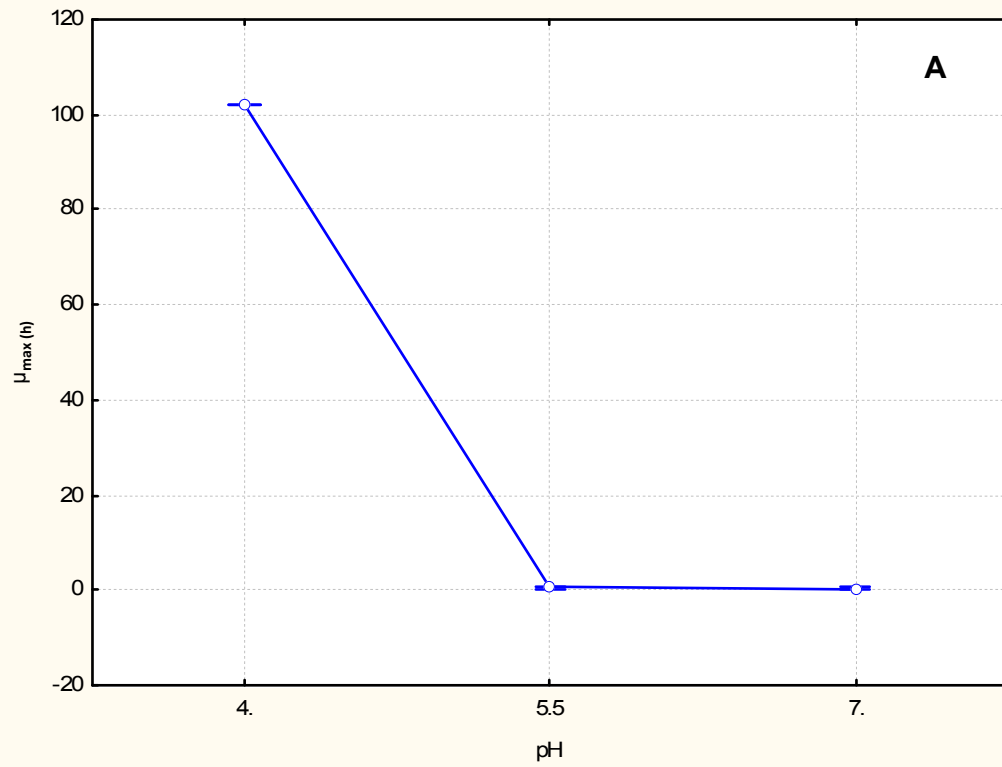


Figura 2. Efecto **(A)** del pH y **(B)** de la a_w en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en CST usando datos de Cuenta en Placa.

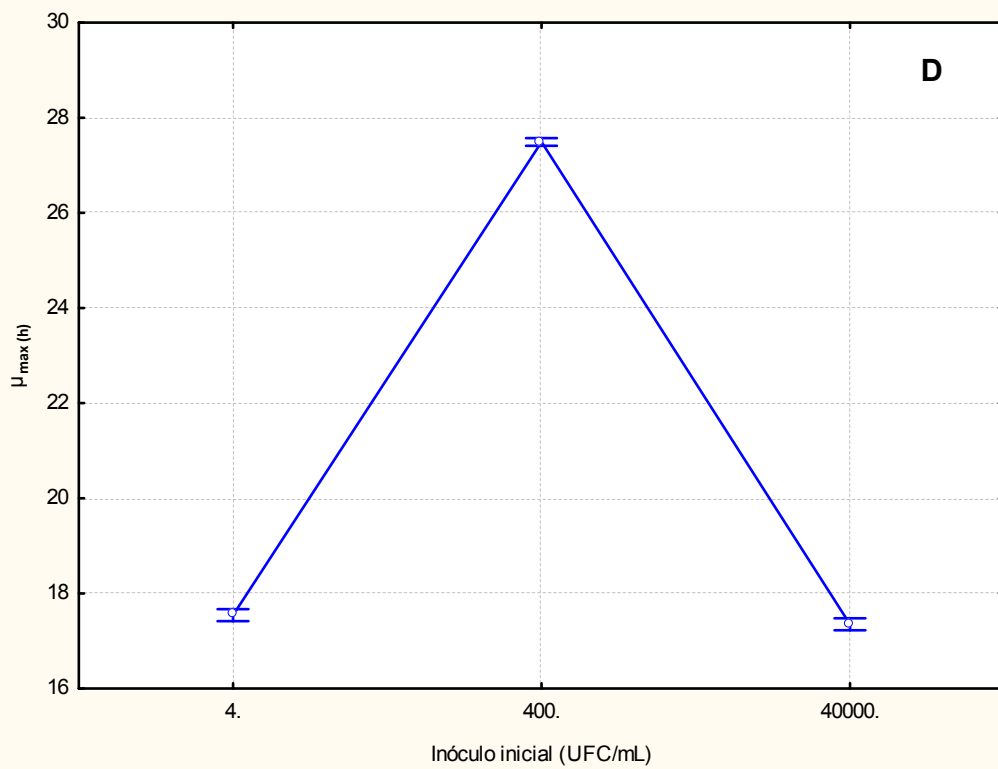
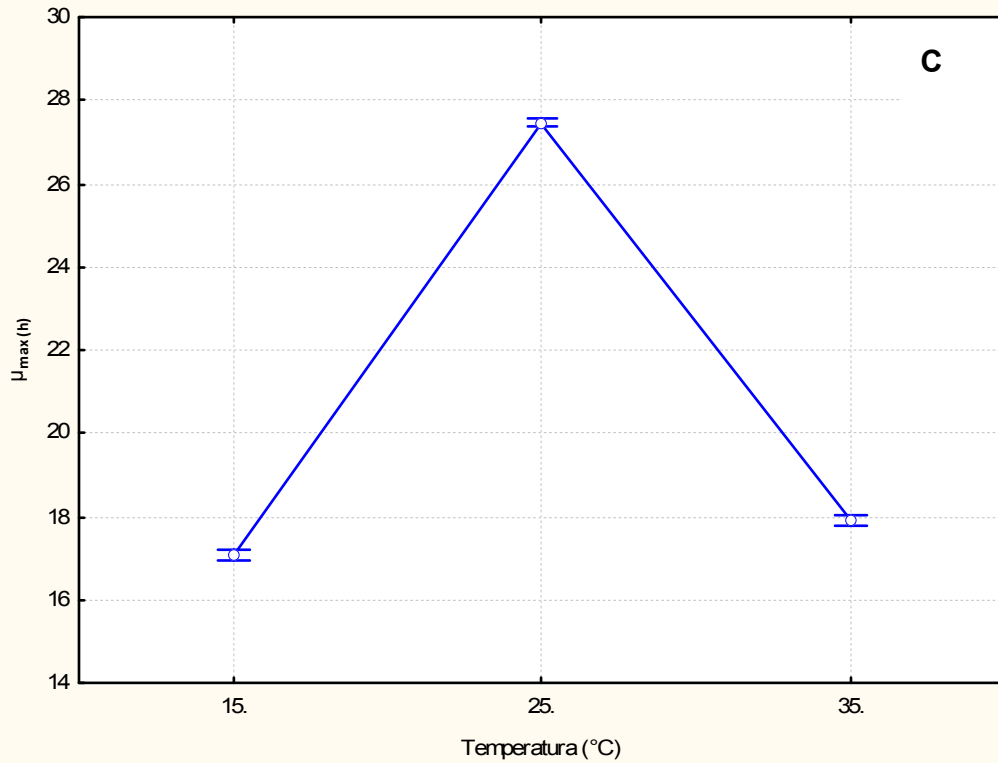


Figura 2. Efecto de **(C)** la temperatura, **(D)** el tamaño de inóculo en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en CST usando datos de Cuenta en Placa.

Para el caso del inóculo inicial (Figura 2D), 400 UFC fue diferente de 4, y 40000 UFC, con valores de μ_{\max} de 27.2 h respecto de 17.5 y 17.2 h. El efecto de estos factores sobre μ_{\max} se confirma en las Figuras 2A, C y D. Además, aunque a_w no fue un factor principal, se está determinando que tiene un efecto importante en el comportamiento de *E. coli* (Figura 2B).

Finalmente con el análisis realizado, se confirma la influencia que tienen el pH, la temperatura y la concentración de inóculo en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 usando datos de Cuenta en Placa, donde se obtuvieron valores de $R^2=0.99988$.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, respecto a la importancia que tiene el pH en la sobrevivencia y el crecimiento de *E. coli* O157:H7 no concuerdan con el realizado por Tosun y Aktuğ-Gönül (2005), quienes determinaron que *E. coli* O157:H7 no mostró tolerancia a la acidez a pH 5.0 y 5.5 (en CST) a 37 °C. Ya que a pH 5.5, en nuestro trabajo fue capaz de multiplicarse a 35 °C usando 4, 400 y 40000 UFC. Estas diferencias encontradas pueden ser debidas a las características genéticas de la cepa, ya que en experimentos previos realizados en el laboratorio, observamos que el comportamiento de las *E. coli*'s depende en gran medida de su genética reflejada en la adaptabilidad y resistencia a ambientes adversos.

5.3. Bioscreen C

La influencia del pH, la temperatura, la concentración de inóculo y la a_w en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en CST se muestra en la Figura 1A a 5I (Apéndice C). Considerando que las dinámicas de crecimiento fueron transformadas a \log_{10} , sus equivalencias en las Figura 1A a 5I (Apéndice C) fueron las siguientes: para 4, 400 y 40000 UFC corresponden a 0.6, 2.6 y 4.6 Log_{10} , respectivamente. El método de Turbidimetría monitorea la proliferación celular por mediciones de densidad óptica (DO) de una suspensión celular. La fase lag (λ) observada a partir de las 81 evaluaciones realizadas a 15, 25 y 35 °C, varió de 5.90 a 67.44 h. La detección de la fase λ fue inversamente proporcional a la temperatura, es decir a mayor temperatura obtuvimos tiempos más cortos para la fase λ . No se observó crecimiento en ninguna de las combinaciones de pH 4, ya que no se mostraron cambios en la DO. De acuerdo a la ley de Beer, la absorbancia es proporcional a la concentración celular y se relaciona con el porcentaje de luz transmitida (%T) usando la siguiente ecuación: $\text{DO} = 2 - \text{Log}_{10} (\%T)$. La DO, está relacionada con el incremento en la turbidez de un cultivo bacteriano en crecimiento.

Partiendo del ajuste de cada modelo, el cálculo de los parámetros de crecimiento usando los modelos de Richards, de Gompertz y el Logístico se presentan en los Cuadros 13, 14 y 15. Al evaluar los datos experimentales usando el modelo de Richards (Cuadro 13) se observó que para la fase λ a 15 °C varió de 33.57 a 81.23 h, a 25 °C fue de 9.36 h a 22.48 h, y a 35 °C fue de 4.61 a 11.47 h. Los resultados obtenidos nos demuestran la influencia de la temperatura en la detección de la fase λ . Las condiciones donde se presenta la fase λ , la célula asimila nutrientes e incrementa de tamaño. Aunque la población permanece sin carga por el cambio de tamaño, aunque la masa celular y la DO muestran algunos incrementos (Ray, 2004).

La comparación de la fase λ observados con los valores calculados por el modelo de Richards fueron similares para la temperatura de 35 °C, pero a temperaturas de 25 y 15 °C mostraron sobreestimaciones de 2.3 h hasta 14 h, mayores que los datos observados (Cuadro 13).

El tiempo de generación (t_g) calculado para 15, 25 y 35 °C varió de 3.08 h a 38.33 h (Cuadro 13). Mientras que la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) varió de 0.23 a 0.02 h. Confirmándose que a medida que disminuimos la temperatura, la tasa de crecimiento también disminuye. Es decir, el cambio en el número de células es más lento a temperaturas de 15 °C que a 25 o 35 °C. Doyle y Shoeni (1984), reportan t_g para *E. coli* O157:H7 de 0.49 h a 37 °C y 0.64 h a 42 °C en Caldo Soya Tripticasa.

Cuadro 13. Cálculo de los parámetros de crecimiento (λ , t_g , μ_{max})¹ de *E. coli* O157:H7 usando el Bioscreen con el modelo de Richards.

CONDICIONES (a_w / pH / UFC)	T (°C)	λ_{observ}	R ²	λ	t_g	μ_{max}	A
0.981 / pH5.5 / 4	35	11.76	0.971	11.47	3.08	0.23	0.99
0.965 / pH5.5 / 400	35	10.83	0.982	11.24	5.87	0.12	0.80
0.981 / pH7 / 400	35	7.78	0.946	7.00	5.67	0.12	1.12
0.981 / pH5.5 / 40000	35	5.90	0.971	4.61	6.86	0.10	1.07
0.998 / pH5.5 / 400	35	7.81	0.945	5.72	5.53	0.14	1.18
0.965 / pH5.5 / 4	25	23.39	0.955	24.77	10.93	0.07	0.67
0.998 / pH5.5 / 4	25	16.98	0.996	19.89	6.56	0.11	0.79
0.981 / pH5.5 / 400	25	16.78	0.999	20.05	6.20	0.11	0.71
0.981 / pH5.5 / 400	25	18.36	0.998	19.96	6.39	0.12	0.71
0.965 / pH7 / 400	25	19.73	1.000	22.48	5.41	0.13	0.74
0.998 / pH7 / 400	25	13.55	0.997	15.19	4.60	0.15	0.94
0.965 / pH5.5 / 40000	25	10.11	0.999	12.80	7.80	0.09	0.70
0.981 / pH7 / 40000	25	9.88	0.998	11.77	4.50	0.15	0.93
0.998 / pH5.5 / 40000	25	7.81	0.992	9.36	6.99	0.10	0.92
0.981 / pH5.5 / 4	15	67.44	0.998	81.23	24.01	0.03	0.70
0.965 / pH5.5 / 400	15	63.3	0.998	75.84	38.33	0.02	0.57
0.981 / pH7 / 400	15	56.90	0.999	61.45	21.38	0.03	0.97
0.981 / pH5.5 / 40000	15	28.93	0.999	33.57	33.69	0.02	0.72
0.998 / pH5.5 / 400	15	48.63	0.998	59.56	26.74	0.03	0.86

¹ Promedio de tres repeticiones. μ_{max} y λ están calculadas en h, t_g en h⁻¹, A en log₁₀ UFC/mL; NC: parámetro no calculado. λ_{observ} : Fase lag observada en cada una de las condiciones del diseño experimental.

El valor de la DO que alcanzó el caldo de cultivo en todas las evaluaciones realizadas de 15 a 35 °C varió de 0.57 a 1.18 DO. Se observó que todas las condiciones evaluadas a 35 °C alcanzaron valores cercanos a 1, debido a que ésta temperatura es la óptima de crecimiento de *E. coli*. Durante la fase exponencial, la tasa de crecimiento es máxima y el tiempo de generación mínimo (Ray, 2004).

Con la densidad celular máxima, el medio de crecimiento se limita a 10^9 UFC/mL. La medición de μ usando DO representaría la velocidad hacia el fin de la fase de crecimiento y ésta podría ser menor que la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{\max}) experimentada durante la fase intermedia del crecimiento exponencial (Dalgaard et al., 1994).

Para el modelo de Gompertz (Cuadro 14), se observó que la fase λ fue de 6.01 a 11.38 h a 35 °C, a 25 °C fue de 9.29 a 25.48 h y a 15 °C, 32.29 a 72.71 h. La μ_{\max} varió de 0.12 a 0.19 a 35 °C, de 0.05 a 0.16 h a 25 °C, y de 0.01 a 0.03 h a 15 °C. Mientras que el t_g varió de 3.62 a 5.98 h a 35 °C, a 25 °C fue de 4.35 a 12.92 h y a 15 °C fue de 21.34 a 34.00 h. Es evidente la influencia de la temperatura para iniciar la fase λ , t_g y μ_{\max} , así como la interacción con el pH, la concentración del microorganismo y la a_w .

Cuadro 14. Cálculo de los parámetros de crecimiento (λ , t_g , μ_{\max})¹ de *E. coli* O157:H7 usando el Bioscreen y el modelo de Gompertz.

CONDICIONES (a_w / pH / UFC)	T (°C)	λ_{observ}	R^2	λ	t_g	μ_{\max}	A
0.981 / pH5.5 / 4	35	11.76	0.996	11.38	3.62	0.19	1.00
0.965 / pH5.5 / 400	35	10.83	0.996	11.35	5.98	0.12	0.80
0.981 / pH7 / 400	35	7.78	0.978	7.40	5.04	0.14	1.25
0.981 / pH5.5 / 40000	35	5.90	0.986	6.01	5.05	0.14	1.02
0.998 / pH5.5 / 400	35	7.81	0.978	7.34	5.36	0.13	1.17
0.965 / pH5.5 / 4	25	23.39	0.998	25.48	12.92	0.05	0.63
0.998 / pH5.5 / 4	25	16.98	0.995	19.93	6.13	0.11	0.80
0.981 / pH5.5 / 400	25	16.78	0.999	19.92	6.04	0.11	0.71
0.981 / pH5.5 / 400	25	18.36	0.998	20.03	6.06	0.12	0.71
0.965 / pH7 / 400	25	19.73	0.998	22.17	5.39	0.13	0.75
0.998 / pH7 / 400	25	13.55	0.997	15.19	4.51	0.15	0.94
0.965 / pH5.5 / 40000	25	10.11	0.997	12.50	7.68	0.09	0.70
0.981 / pH7 / 40000	25	9.88	0.998	11.70	4.35	0.16	0.93
0.998 / pH5.5 / 40000	25	7.81	0.992	9.29	7.03	0.10	0.91
0.981 / pH5.5 / 4	15	67.44	0.995	72.71	33.52	0.02	0.74
0.965 / pH5.5 / 400	15	63.3	0.998	68.23	48.15	0.01	0.60
0.981 / pH 7 / 400	15	56.90	0.999	61.19	21.34	0.03	0.98
0.981 / pH5.5 / 40000	15	28.93	0.997	32.29	34.00	0.02	0.73
0.998 / pH5.5 / 400	15	48.63	0.997	58.62	27.04	0.03	0.87

¹ Promedio de tres repeticiones. μ_{\max} y λ están calculadas en h, t_g en h^{-1} , A en \log_{10} UFC/mL; NC: parámetro no calculado. λ_{observ} : Fase lag observada en cada una de las condiciones del diseño experimental.

La comparación de la fase λ observada y la calculada por el modelo de Gompertz y Logístico fueron similares para la temperatura de 35 °C, pero a temperaturas de 25 y 15 °C mostraron sobreestimaciones de 2 h hasta 6 h y de 2 a 7.5 h, respectivamente.

Para el modelo Logístico (Cuadro 15), los valores calculados de la fase λ fueron de 6.28 a 11.47 h a 35 °C, a 25 °C fue de 9.75 a 25.71 h y a 15 °C de 33.70 a 74.91 h. La μ_{\max} varió de 0.11 a 0.19 h a 35 °C, de 0.05 a 0.15 h a 25 °C, y de 0.02 a 0.03 h a 15 °C. Mientras que el t_g varió de 3.62 a 6.05 h a 35 °C, a 25 °C fue de 4.48 a 13.28 h y a 15 °C fue de 20.56 a 44.71 h. El valor de A para el modelo de Gompertz y el Logístico, variaron de 0.60 a 1.25 DO y de 0.58 a 1.22 DO, respectivamente. Los mejores modelos para estimar de manera adecuada la fase λ fueron el modelo de Gompertz y el Logístico.

Cuadro 15. Cálculo de los parámetros de crecimiento (λ , t_g , μ_{\max})¹ de *E. coli* O157:H7 usando el Bioscreen y el modelo Logístico.

CONDICIONES (a_w / pH / UFC)	T (°C)	λ_{observ}	R ²	λ	t_g	μ_{\max}	A
0.981 / pH5.5 / 4	35	11.76	0.994	11.47	3.67	0.19	1.00
0.965 / pH5.5 / 400	35	10.83	0.993	11.47	6.05	0.11	0.79
0.981 / pH7 / 400	35	7.78	0.970	7.78	4.79	0.14	1.22
0.981 / pH5.5 / 40000	35	5.90	0.977	6.28	4.79	0.14	1.00
0.998 / pH .5 / 400	35	7.81	0.964	7.68	4.98	0.14	1.11
0.965 / pH5.5 / 4	25	23.39	0.997	25.71	13.28	0.05	0.62
0.998 / pH 5.5 / 4	25	16.98	0.996	20.17	6.15	0.11	0.79
0.981 / pH5.5 / 400	25	16.78	0.999	20.06	6.20	0.11	0.71
0.981 / pH5.5 / 400	25	18.36	0.999	20.19	6.24	0.12	0.71
0.965 / pH7 / 400	25	19.73	1.000	22.30	5.56	0.13	0.74
0.998 / pH7 / 400	25	13.55	0.997	15.34	4.64	0.15	0.93
0.965 / pH5.5 / 40000	25	10.11	0.999	12.69	7.89	0.09	0.70
0.981 / pH7 / 40000	25	9.88	0.998	11.81	4.48	0.15	0.93
0.998 / pH5.5 / 40000	25	7.81	0.988	9.75	6.63	0.11	0.91
0.981 / pH5.5 / 4	15	67.44	0.998	74.91	31.73	0.02	0.72
0.965 / pH5.5 / 400	15	63.3	1.000	71.28	44.71	0.02	0.58
0.981 / pH 7 / 400	15	56.90	0.998	62.43	20.56	0.03	0.96
0.981 / pH5.5 / 40000	15	28.93	0.999	33.70	33.62	0.02	0.72
0.998 / pH5.5 / 400	15	48.63	0.998	59.79	26.51	0.03	0.85

¹ Promedio de tres repeticiones. μ_{\max} y λ están calculadas en h, t_g en h⁻¹, A en log₁₀ UFC/mL; NC: parámetro no calculado. λ_{observ} : Fase lag observada en cada una de las condiciones del diseño experimental.

De manera general, se observó que las fases lag (λ) más cortas se registraron con las temperaturas más elevadas (35 °C), asumiendo un aumento proporcional con la disminución de la temperatura. Esto concuerda con Montville y Matthews, (2005) quienes mencionaron que la duración de la fase λ depende de la temperatura, la concentración del inóculo (concentraciones grandes usualmente tienen fase λ corta), la historia fisiológica del microorganismo, los cambios fisicoquímicos del medio como: la disponibilidad de nutrientes, el pH y la actividad de agua (Ray, 2004; Dens et al., 2005).

Los efectos estimados para la fase λ , demuestran que el pH, la temperatura y la concentración del inóculo de *E. coli* son significativos ($p \leq 0.05$) (Cuadro 16). Evidenciando que el pH y la temperatura son los factores que mayor contribuyen al efecto de la fase λ con valores de 38.64 y 19.52 en el término lineal y cuadrático, así como 21.62 y 6.31, respectivamente.

Cuadro 16. Efectos estimados de λ ; con datos del Bioscreen y un diseño Box-Behnken 3^{4-1} .

Factor	Efecto	Std.Err.	t(223)	p	Coeff.	Std.Err.
Media/Interc.	53.05	1.68	31.50	0.000000	53.05	1.68
Bloque(1)	6.07	1.75	3.48	0.000603	3.04	0.87
Bloque(2)	-6.11	1.67	-3.66	0.000317	-3.06	0.84
(1) pH (L)	-77.27	1.86	-41.46	0.000000	-38.64	0.93
pH (Q)	-39.03	1.35	-28.93	0.000000	-19.52	0.68
(2) a_w (L)	-2.76	3.07	-0.90	0.369929	-1.38	1.54
a_w (Q)	-2.66	2.56	-1.04	0.300573	-1.33	1.28
(3) Temperatura(L)	-43.26	1.75	-24.79	0.000000	-21.63	0.87
Temperatura(Q)	-12.62	1.32	-9.56	0.000000	-6.31	0.66
(4) Inóculo inicial(L)	-15.05	1.86	-8.07	0.000000	-7.50	0.93
Inóculo inicial (Q)	-6.33	1.69	-3.74	0.000235	-3.16	0.85

Números en negrita indican diferencias significativas con probabilidad de ($p \leq 0.05$). $R^2 = 0.94374$; R Adj: 0.94121, 234 Runs; MS Residual=82.23.

El análisis de varianza confirma la influencia del pH, la temperatura y la concentración de inóculo para evaluar la fase λ de *E. coli* O157:H7, que mostró diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) (Cuadro 17). El valor de R^2 mostrada para el modelo fue de 0.944 que indica un buen ajuste a los datos experimentales.

Cuadro 17. Análisis de varianza de λ con datos del Bioscreen en un diseño Box- Behnken 3^{4-1} .

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	p
Bloques	1379.10	2	689.50	8.386	0.000308
(1) pH (L)	141346.90	1	141346.90	1718.923	0.000000
pH (Q)	68831.20	1	68831.20	837.057	0.000000
(2) a_w (L)	66.40	1	66.40	0.807	0.369929
a_w (Q)	88.50	1	88.50	1.077	0.300573
(3) Temperatura(L)	50518.20	1	50518.20	614.353	0.000000
Temperatura(Q)	7520.80	1	7520.80	91.461	0.000000
(4) Inóculo inicial(L)	5359.50	1	5359.50	65.177	0.000000
Inóculo inicial(Q)	1149.40	1	1149.40	13.978	0.000235
Error	18337.30	223	82.20		
Total SC	325918.20	233			

Números en negrita indican diferencias significativas con probabilidad de $p \leq 0.05$. $R^2 = 0.94374$; R Adj: 0.94121, 234 Runs; MS Residual=82.23. SC: suma de cuadrados.

En las Figuras 3A, 3B, 3C y 3D, se muestran las diferencias significativas que tienen el pH, la a_w , la temperatura y la concentración de inóculo sobre la fase λ . Se observaron diferencias notables para 15 °C (67.3 h), 25 °C (42 h) y 35 °C (24.7 h) y 0.965 a_w (41 h), 0.981 a_w (48 h) y 0.998 a_w (35.8 h). Sin embargo a pH 4 (sin crecimiento) se mostró diferencia significativa respecto al pH 5.5 (26 h) y pH 7 (22.5 h), que fueron significativamente iguales. Para el caso de la concentración de inóculo se mostró que 40000 UFC (29 h) fue significativamente diferente de 4 UFC (47 h) y 400 UFC (48 h) (Figura 3D).

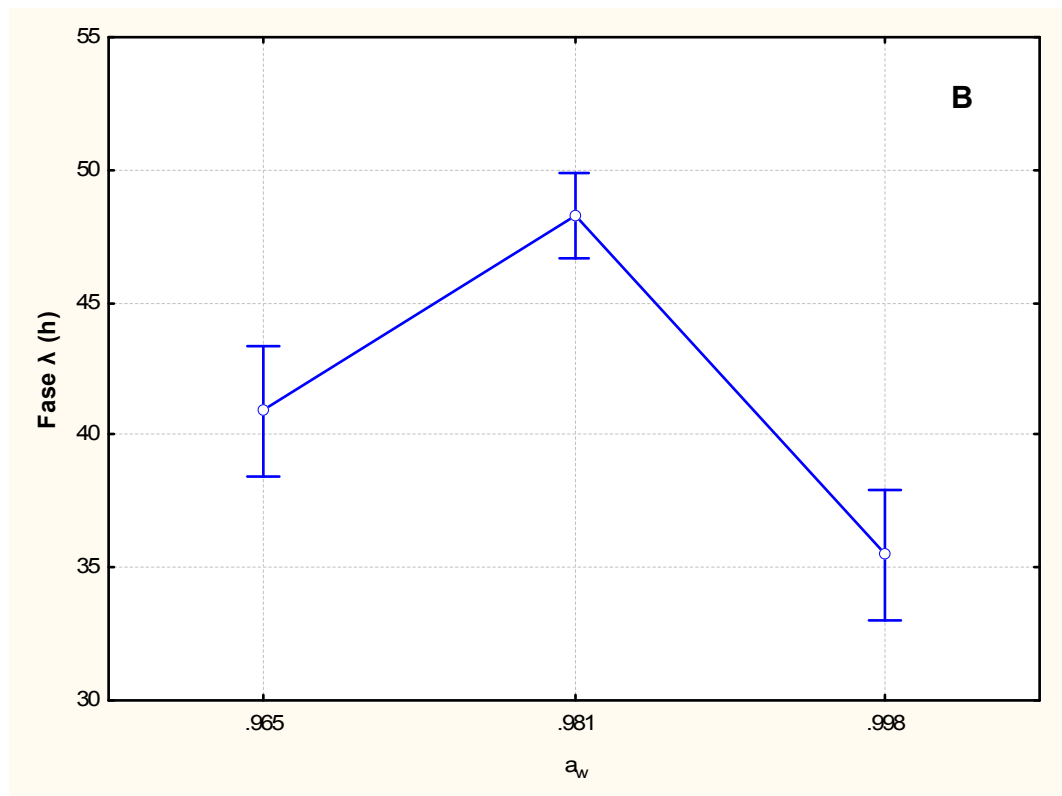
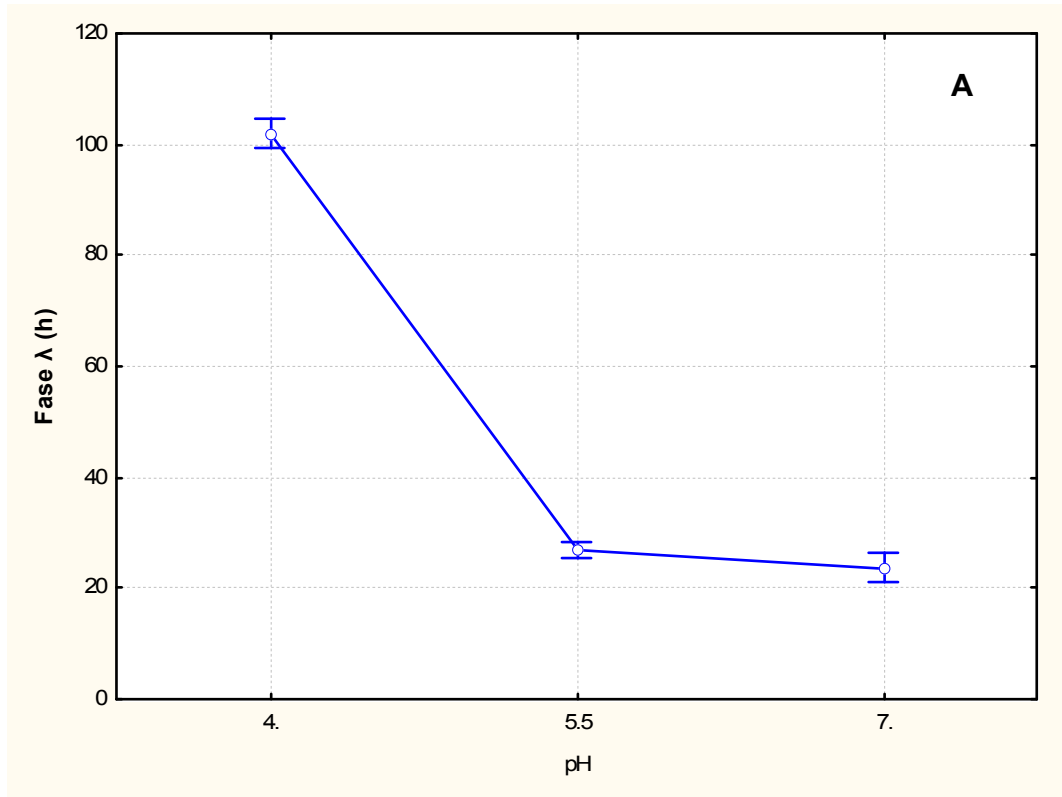


Figura 3. Efecto **(A)** del pH y **(B)** la a_w en el parámetro λ para evaluar el comportamiento de *E. coli* O157:H7, usando datos del Bioscreen.

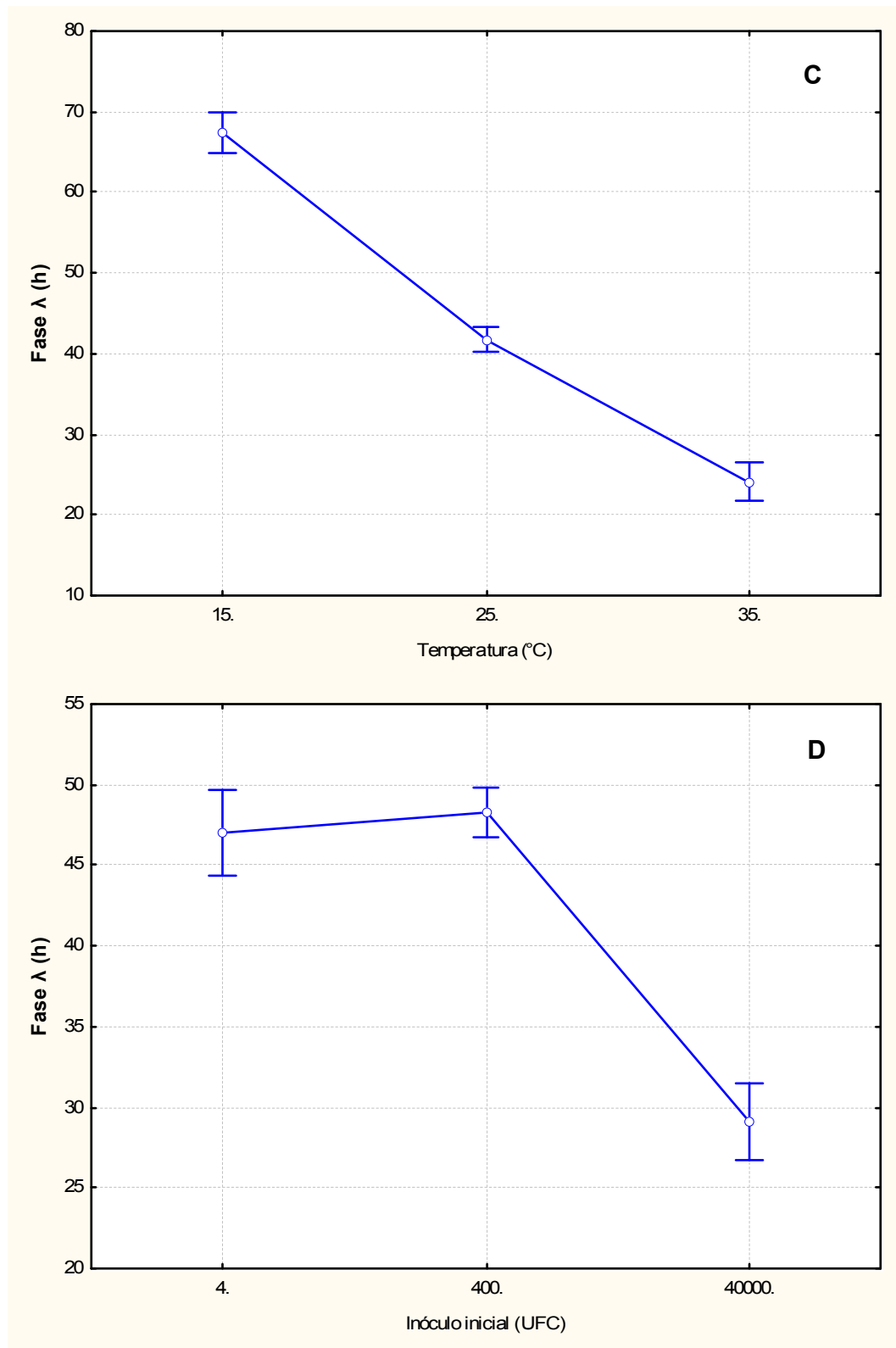


Figura 3. Efecto de **(C)** la temperatura y **(D)** el tamaño del inóculo, en el parámetro λ para evaluar el comportamiento de *E. coli* O157:H7, usando datos del Bioscreen.

Finalmente con base en el análisis realizado para la técnica de Bioscreen, el pH, la temperatura, la concentración de inóculo y la actividad de agua son determinantes en el comportamiento de *E. coli* O157:H7. Debido a esto resulta importante manejar dichos factores con precaución para evitar el crecimiento microbiano.

5.4. Calorimetría Diferencial de Barrido

Los termogramas obtenidos para *E. coli* no patógena (Figura 4) a pH 7 y 35 °C en Caldo Soya Trypticaseina (CST) usando las cuatro concentraciones de inóculo, se observaron en dinámicas que ocurren durante el crecimiento del microorganismo y que se identifican en tres puntos: inicio, punto máximo y fin del termograma. Las diferencias entre las cuatro dinámicas (Figura 4) dan una idea clara del tiempo necesario para obtener una señal con el Calorímetro, el cual varió según la concentración del inóculo inicial probado.

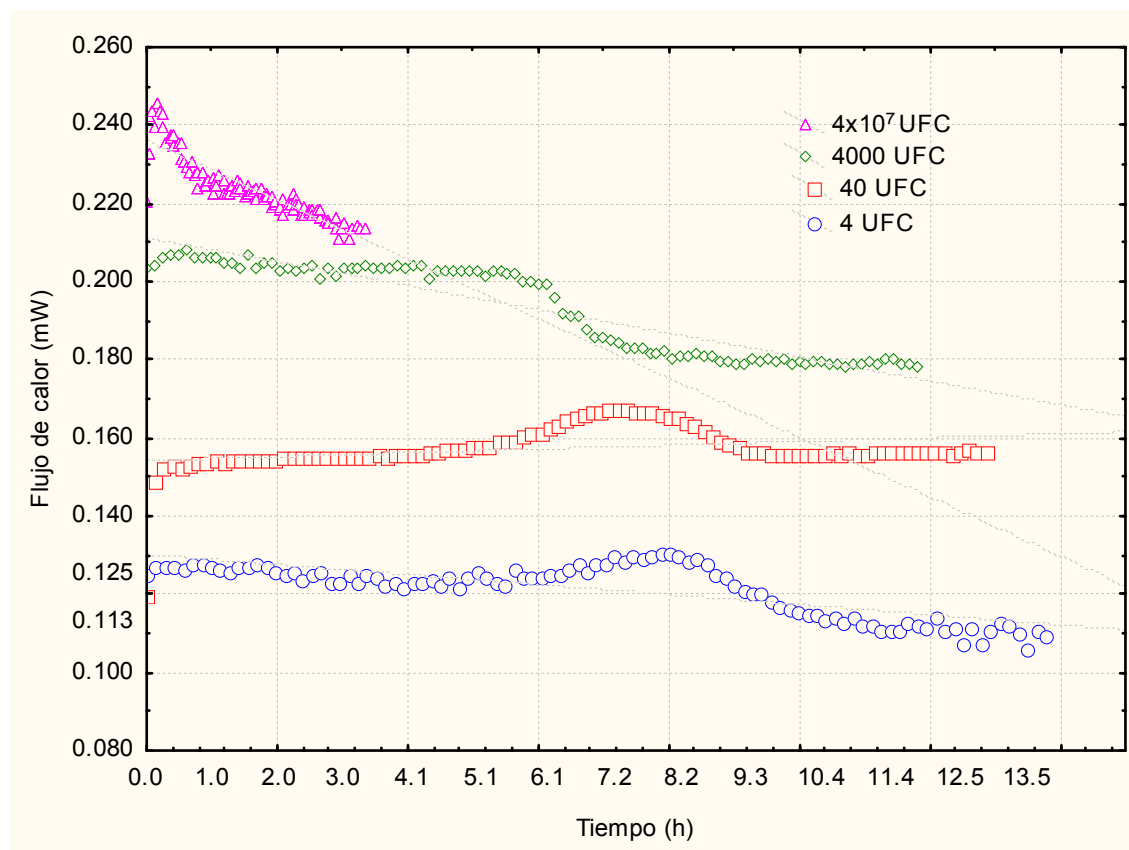


Figura 4. Termogramas del desarrollo de *E. coli* en CST a 35 °C y pH 7.0.

Se observó que a mayor concentración de inóculo, menor es el tiempo de desarrollo para que el Calorímetro detecte una respuesta.

Una característica destacable de *E. coli* es su habilidad para crecer rápidamente en presencia de escasos nutrientes y en ausencia de oxígeno. Esta bacteria puede crecer en medios de cultivo simples teniendo como única fuente de carbono y energía glicerol o glucosa (BAM, 1998). En este trabajo observamos que la bacteria puede crecer sin problema en CST y con baja concentración de oxígeno, lo cual es concordante con el Manual de Bergey's (2005).

El crecimiento de *E. coli* en CST correspondió a una función hiperbólica. Los termogramas del desarrollo bacteriano que se han obtenido con Microcalorimetría muestran una forma distinta a los termogramas que obtuvimos con el Calorímetro (Stockar y Marison, 1989). Boe y Lovrien (1990), determinaron que *E. coli* presenta un solo pico en forma de cono al metabolizar la Glucosa y al ser evaluado en una bomba calorimétrica con 10^9 UFC. *E. coli* produce calor en condiciones aeróbicas a 25 °C, obteniendo una respuesta en el intervalo de 8 a 16 min.

El tiempo en el que se detectó el inicio del termograma, el valor máximo alcanzado y el final del termograma, así como el calor liberado por *E. coli* durante su desarrollo se resume en el Cuadro 18. Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los valores obtenidos de los termogramas. El tiempo necesario para detectar la señal fue relacionada con el desarrollo en los cuatro inóculos iniciales depositados, los cuales variaron de 0.23 a 4.83 h, mientras que el tiempo al cual se alcanzó el máximo o pico máximo de los termogramas fue de 0.47 a 8.7 h y para el final de detección de respuesta fue de 0.71 a 11.55 h, lo cual indica la mayor y la menor concentración depositada de *E. coli*. La producción de calor es una medida de toda la capacidad metabólica, la cual depende del número de células, es decir es proporcional a la masa celular con actividad metabólica (Boe y Lovrien, 1990).

Cuadro 18. Tiempo transcurrido al inicio, en el pico y al final de los termogramas del desarrollo de *E. coli* a 35 °C y calor total generado.

Inóculo inicial (UFC)	Tiempo de detección (h)			Calor liberado (Integral [mJ])
	Inicio	Pico	Final	
4	4.83 ± 0.33 a ²	8.70 ± 0.47 a	11.55 ± 0.51 a	163.4 ± 13.3 a
40	3.88 ± 1.19 b	7.28 ± 0.43 b	9.68 ± 0.18 b	149.6 ± 71.4 a
4000	2.27 ± 0.40 c	4.95 ± 0.24 c	7.50 ± 0.20 c	113.3 ± 28.5 a
4x10 ⁷	0.23 ± 0.005 d	0.47 ± 0.10 d	0.71 ± 0.02 d	8.1 ± 1.7 b

²Letras distintas dentro de las columnas indican diferencia significativa con probabilidad de ($p \leq 0.05$) con la prueba de Duncan.

El calor liberado por *E. coli* durante su crecimiento fue de 8.1 a 163.4 mJ. Se registró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) cuando el inóculo inicial fue de 4×10^7 UFC, respecto al resto de las concentraciones (Cuadro 18). Con éste inóculo (4×10^7 UFC) ocurre una escasa multiplicación celular ya que la cantidad de calor liberado o detectado por el Calorímetro es muy baja (8.1 mJ). La detección del calor empezó a las 0.23 h en el CST y puede ser relacionada con la actividad enzimática (degradación de azúcares) (Boe y Lovrien, 1990) y con multiplicación celular (Marison y Stockar, 1985). De hecho, se sabe que previo al inicio de la multiplicación celular (fase lag) ocurren una serie de reacciones bioquímicas que pueden conllevar a la generación de calor (Zhang et al., 1993). Es posible que al encontrarse desde el inicio una concentración de bacterias alta, la cantidad de calor generada por las reacciones ocurridas en la fase lag sea detectado por el Calorímetro. Lo cual concuerda con la evaluación realizada por Boe y Lovrien (1990), con un número de células elevada (10^9 UFC), donde puede ocurrir una generación rápida de calor en poco tiempo. El rendimiento calórico es una medida de la capacidad metabólica, la cual es dependiente y proporcional al número de células y a su masa (Boe y Lovrien, 1990). Marison y Stockar (1985), determinaron una relación lineal entre el calor generado por el desarrollo de *E. coli* en un caldo de cultivo y el peso seco de las células. La producción de calor representa los cambios de entalpía asociados con el crecimiento de dicho microorganismo (Marison y Stockar, 1985).

En el presente estudio, para conocer la concentración aproximada de células de *E. coli* que se alcanzó en diferentes momentos en el caldo de cultivo se monitoreó el desarrollo del microorganismo mediante Cuenta en Placa inoculado en CST las mismas concentraciones de células examinadas en el Calorímetro (Figura 5).

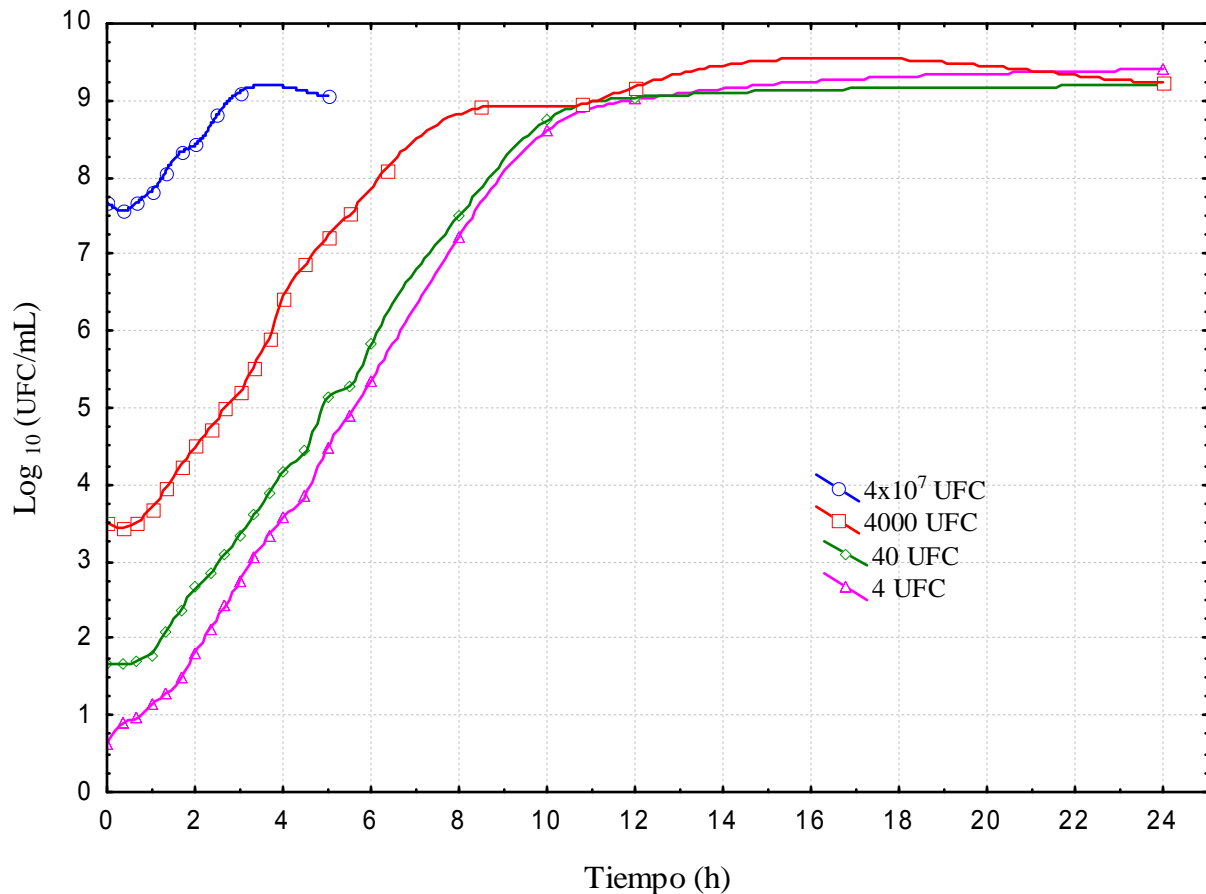


Figura 5. Curvas de desarrollo de *E. coli* a 35 °C usando la técnica de CP a partir de 4 inóculos iniciales diferentes.

Se observó que independientemente del inóculo inicial depositado la concentración final de células que se alcanzó en los caldos de cultivo fue semejante (Cuadro 19). Por otro lado, en el caldo inoculado con 4×10^7 UFC/mL se presentó una menor multiplicación que con los otros inóculos (7.51 Log₁₀ UFC).

Este comportamiento soporta la hipótesis, la detección del calor puede estar relacionada con la actividad enzimática (degradación de azúcares) y con multiplicación celular, que planteamos previamente para explicar el comportamiento térmico que mostró *E. coli* en el caldo inoculado con la concentración más alta del microorganismo. La mayoría de las evaluaciones de calorimetría, mencionan el consumo que tiene *E. coli* en algunos sustratos (glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, ácido succínico), donde se mantiene a la cepa en condiciones de hambruna prolongada e inóculos generalmente altos (10^7 a 10^9 UFC). En estos trabajos la cantidad de energía metabolizada por el microorganismo se evidencia en forma de calor a través de Microcalorimetría (Dermoun y Belaich, 1980).

Los valores de Cuenta en Placa fueron relacionados con los termogramas obtenidos a partir de cada inóculo inicial examinado. Se determinó la concentración aproximada de células alcanzada al inicio de la detección de calor (inicio del termograma), en el punto máximo o pico del termograma y al finalizar la detección de calor. Para el caso del termograma obtenido a partir del inóculo de 4×10^7 UFC/mL, la concentración de células de *E. coli* al inicio, en el pico y final del termograma fue de 7.6 UFC/mL ($p \leq 0.05$) (Cuadro 19).

Cuadro 19. Concentración de células alcanzada al inicio, en el pico y al final de los termogramas del desarrollo de *E. coli*.

Inoculo inicial (UFC)	Concentración de células detectada (Log_{10} UFC)		
	Inicio	Pico	Fin
4	$4.3^1 \pm 0.3 \text{ a}^2$	$7.20 \pm 0.4 \text{ a}$	$8.79 \pm 0.2 \text{ a}$
40	$3.9 \pm 0.5 \text{ a}$	$6.86 \pm 0.2 \text{ ab}$	$8.52 \pm 0.5 \text{ a}$
4000	$4.7 \pm 0.2 \text{ ab}$	$6.92 \pm 0.6 \text{ ab}$	$8.60 \pm 0.3 \text{ a}$
4×10^7	$7.6 \pm 0.07 \text{ b}$	$7.6 \pm 0.1 \text{ ac}$	$7.51 \pm 0.4 \text{ b}$

² Letras distintas dentro de las columnas indican diferencia significativa con probabilidad ($p \leq 0.05$) con prueba de Duncan.

Con los inóculos iniciales de 4, 40 y 4000 UFC/mL, el Calorímetro comenzó a detectar calor cuando *E. coli* había alcanzado una concentración de 4 a 4.5 Log_{10} UFC/mL (Cuadro 19).

Mientras que cuando se presentó el máximo pico en los termogramas, *E. coli* se encontraba en un estado avanzado de la fase logarítmica con una concentración de 6.9 a 7.2 Log₁₀ UFC/mL. La tasa de desarrollo (μ_{max}) que *E. coli* mostró para 4, 40 y 4000 UFC fueron de 1.04, 0.96 y 0.91 h⁻¹ y tiempos de generación (t_g) de 0.67, 0.73 y 0.78 h⁻¹, respectivamente, lo cual indica un valor casi constante para estas concentraciones evaluadas. Al final del termograma el calor dejó de detectarse, lo cual indica que el microorganismo estaba concluyendo la fase logarítmica de desarrollo. La concentración de *E. coli* alcanzada al final de dicho evento fue de 8.5 a 8.8 Log₁₀ UFC/mL. En la etapa final de la fase logarítmica de las bacterias la velocidad de multiplicación celular disminuye de manera considerable y casi cesa al entrar a la fase estacionaria (Ramírez et al., 2005). Esto es debido entre otras cosas al agotamiento de los nutrientes. La disminución de liberación de calor que observamos en *E. coli* al final de la fase logarítmica se puede atribuir a la disminución de la tasa de desarrollo al acercarse a la fase estacionaria (Ray, 2004). Se ha reportado que la cantidad de calor liberado por una célula bacteriana depende de la actividad celular, la naturaleza de las fuentes de energía y carbono, particularmente del grado de reducción del sustrato, el coeficiente de producción de biomasa; y condiciones físicas tales como: temperatura, pH, respiración del microorganismo, así como la composición química del medio de cultivo (Chang-Li et al., 1988).

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) permitió monitorear el comportamiento de *E. coli* bajo diferentes concentración de inóculo iniciales. Esta técnica podría ser una alternativa en el estudio del desarrollo microbiano y en la determinación de diferentes parámetros relacionados con el crecimiento. Por otro lado, como se ha señalado para el caso de la Microcalorimetría, también la técnica de DSC es posible que sea útil en la identificación de microorganismos, ya que cada especie podría presentar termogramas específicos bajo determinadas condiciones de cultivo. Es necesario realizar más evaluaciones con diferentes microorganismos, condiciones de cultivo, sustratos y alimentos para conocer el potencial real de esta técnica en la microbiología de alimentos

5.5. Espectroscopia de Impedancia: Evaluación del Bactometer

El tiempo de detección del desarrollo (TDD) de *E. coli* no patógena en Caldo Soya Tripticaseína (CST) se detalla en el Cuadro 20 con factores como pH, temperatura y concentración de inóculo. A medida que el pH y la temperatura se alejan de los valores óptimos de crecimiento, se observa una disminución en el desarrollo y por tanto en su detección [fase lag (λ)]. En inóculos con 4, 400 y 40000 UFC, el TDD fluctuó de 56.95 a 4.55 h en el intervalo de 15 a 35 °C. Independientemente de la concentración inicial depositada y la temperatura, se observó que a pH 4, *E. coli* no desarrolló. Mientras que a 15 y 35 °C el TDD fue de 39.8 y 6.2 h a pH 7 con 400 UFC, respectivamente. En tanto que a pH 5.5 con 4 UFC el TDD fue de 56.95 y 8.25 h (Cuadro 20).

Cuadro 20. Evaluación del comportamiento de *E. coli* no patógena en CST usando un diseño factorial Box-Behnken 3^{4-1} .

Temperatura (°C)	pH	Inóculo inicial (UFC)	TDD (h)
35	7.0	400	6.20 ± 0.00
35	5.5	4	8.25 ± 0.21
35	5.5	40000	4.55 ± 0.07
35	4.0	400	-
25	7.0	4	15.95 ± 0.49
25	7.0	40000	7.70 ± 0.14
25	4.0	4	-
25	4.0	40000	-
25	5.5	400	17.45 ± 1.09
15	7.0	400	39.75 ± 1.20
15	5.5	4	56.95 ± 3.18
15	5.5	40000	35.65 ± 0.35
15	4.0	400	-

El TDD obtenido para cada condición evaluada fue inversamente proporcional al número de microorganismos en la muestra.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Batrinou et al. (2005), quienes usando Impedancia y Cuenta en Placa para cuantificar bacterias mesófilas aerobias en chocolate, determinaron que a medida que se incrementa la concentración del inóculo el TDD es inversamente proporcional, como lo observaron a 30 °C con 0.6, 2.4 y 4.7 Log₁₀ UFC que corresponden con 4, 400 y 40000 UFC donde se encontraron TDD de 9.16, 7.8 y 4.12 h, respectivamente; evaluados en el presente estudio.

Escherichia coli puede crecer a pH entre 6 y 8 pero no a 4 ó 5 (usando ácido acético) (Schilling, 2008) lo cual es concordante con los resultados aquí expuestos. Aunque a diferencia de Schilling (2008), se encontró desarrollo de *E. coli* a pH 5.5. De acuerdo con Prescott et al. (1999), cuando el pH baja a valores entre 6 y 5.5, *E. coli* sintetiza un grupo de proteínas (ATPasa translocadora), como parte de la denominada tolerancia a la acidez. Este grupo de proteínas produce más ATP y bombea protones fuera de la célula para protegerse. Si el pH externo disminuye a valores mayores o iguales a 4.5, se producen las proteínas de shock ácido o térmico.

En los resultados obtenidos se aprecia el efecto sinérgico del pH con la temperatura. El tratamiento que favoreció en mayor medida el desarrollo de *E. coli* fue un pH 7 con 400 UFC a 35 °C, ya que mostró el menor TDD (6.20 h). En todos aquellos tratamientos con pH 4, se limitó el desarrollo de *E. coli*. Los resultados obtenidos respecto a la temperatura concuerdan con las observaciones realizadas por Ray (2004), ya que a medida que se incrementan 10 °C, la velocidad catalítica de las enzimas se duplica, afectando la duración de la fase λ (Jones et al., 2006), por lo tanto se observa un incremento en el metabolismo de *E. coli*.

A partir del análisis de efectos con el modelo Box-Behnken y el análisis de varianza mostraron que el pH y la temperatura tienen efecto significativo ($p \leq 0.05$) para detectar el TDD de *E. coli* (Cuadro 21), a excepción de la concentración inicial de inóculo.

El Cuadro 21 muestra que los términos lineales (L) del modelo presentan un efecto significativo del pH, el intercepto y la temperatura con valores de 84.60, 47.23 y 28.34, respectivamente.

Los términos cuadráticos (Q) permiten la curvatura en la respuesta del modelo, lo que facilita el entendimiento y localización de una región en la superficie de respuesta y de esta manera ver la influencia de las variables en el TDD. La fiabilidad del modelo Box-Behnken se indica por una buena precisión del mismo a través de los valores de R^2 de 0.966 con una R ajustada de 0.957., $R^2 \geq 0.9$ indica un buen ajuste de los datos experimentales.

Cuadro 21. Efectos estimados en el Tiempo de Detección del Desarrollo usando Impedancia en un diseño Box-Behnken 3^{3-1} .

Factor	Efecto	Error Stand	t(23)	p	Coef	Error Standr
Media/Interc.	47.23	1.77	26.61	0.00	47.23	1.78
(1) Temperatura (L)	-28.34	4.04	-7.02	0.00	-14.17	2.02
Temperatura (Q)	-7.24	2.97	-2.44	0.023	-3.62	1.49
(2) pH (L)	-84.60	4.04	-20.96	0.00	-42.30	2.02
pH (Q)	-37.80	2.97	-12.72	0.00	-18.90	1.49
(3) Inóculo inicial (L)	-8.31	4.04	-2.06	0.051	-4.16	2.02
Inóculo inicial (Q)	-5.74	3.57	-1.61	0.122	-2.87	1.79

Números en negrita indican diferencias significativas con probabilidad de ($p \leq 0.05$) $R^2=0.96618$; R Adj:0.95736; MS Residual=65.17.

En algunos trabajos se ha mostrado el efecto que existe en la interacción de factores ambientales, Francois et al. (2005a), determinaron que el pH tiene influencia en el comportamiento del microorganismo, debido a que la T y a_w muestran un efecto sinérgico con el pH.

La Figura 6A, muestra las diferencias significativas que tiene la temperatura sobre el TDD. Se observaron diferencias notables para 15 °C (58 h) y 35 °C (30.5 h). Sin embargo a 15 °C (58.5 h) y 25 °C (49 h) no se encontró una diferencia significativa con el TDD, la cual puede ser debida a la variabilidad de los tratamientos.

El pH también mostró diferencias estadísticamente significativas del pH 4 (sin crecimiento) con el pH 7 (17 h) y pH 5.5 (25 h) (aunque esta diferencia es evidentemente marcada, porque no desarrollo a pH 4 y a pH 7 y 5.5 si lo hizo) (Figura 6B).

Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) debidas a la concentración inicial del microorganismo inoculado, 400 UFC (53.5 h) respecto a 40000 UFC (37.5 h) (Figura 6C). Mientras que fueron significativamente iguales 4 UFC (46 h) y 400 UFC (53.5 h). Por lo cual el manejo del microorganismo es determinante debido a que a bajas concentraciones de inóculos se puede generar enfermedad.

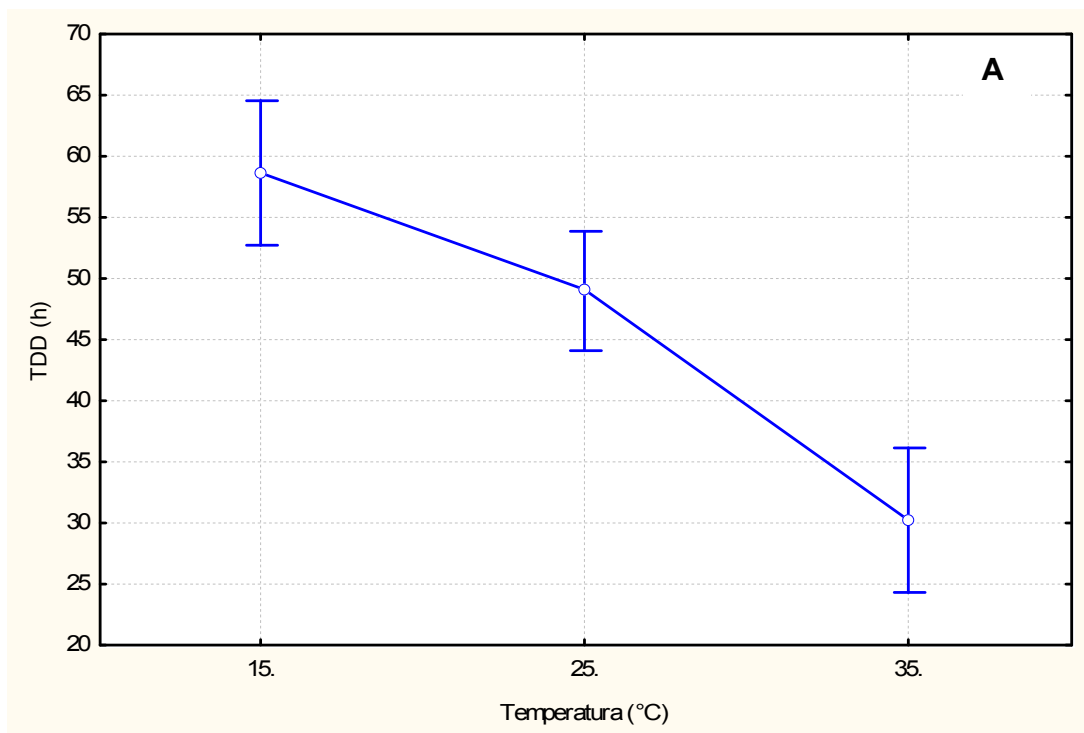


Figura 6. Efecto **(A)** de la temperatura en el TDD de *E. coli* no patógena usando datos de Impedancia.

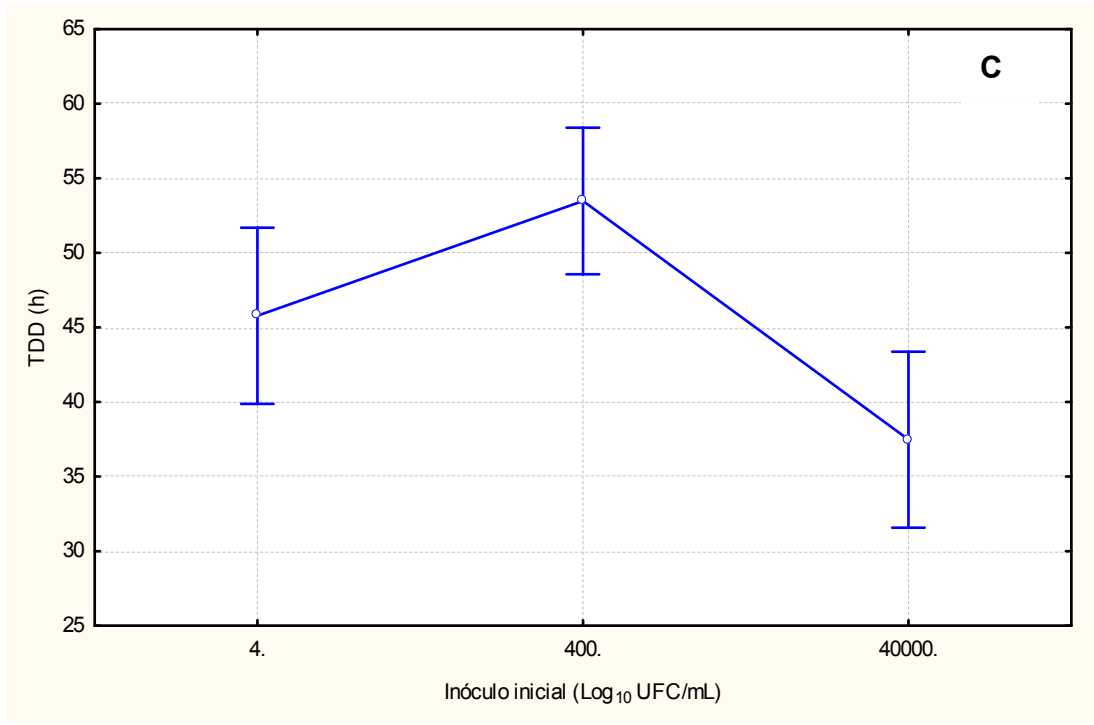
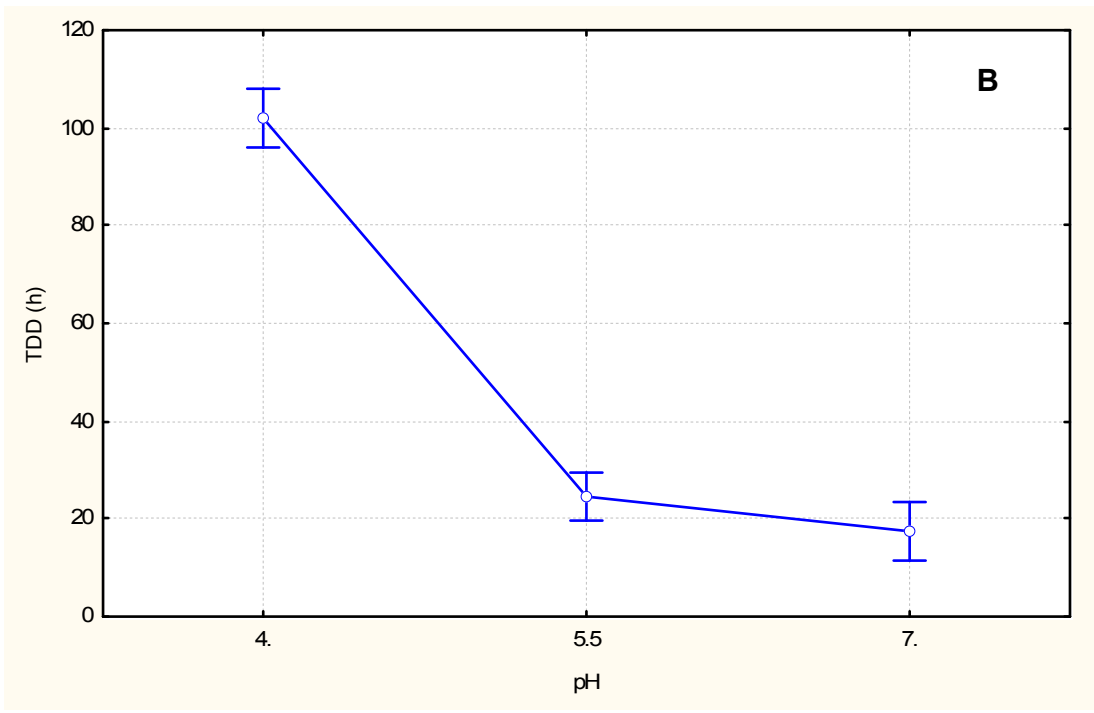


Figura 6. Efecto **(B)** del pH, y **(C)** el tamaño de inóculo en el TDD de *E. coli* no patógena usando datos de Impedancia.

Las curvas de crecimiento medidas con Impedancia permiten una rápida detección de la proliferación microbiana. Las mediciones de Impedancia han demostrado ser más rápidas y precisas que el Conteo en Placa (Madrid et al., 1999).

5.6. Comparación de la fase lag (λ) en las técnicas de Cuenta en Placa, Bioscreen y Calorimetría Diferencial de Barrido

Al comparar la duración de la fase lag (λ) de *E. coli* en condiciones óptimas de desarrollo (pH 7 a 35 °C y a_w 0.998) con diferentes inóculos y usando las técnicas de CP, DSC y Bioscreen (Cuadro 22), se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tiempos de detección.

El menor tiempo de detección se registró para Cuenta en Placa (CP) con 4 UFC con tiempo de 0.12 h. El tiempo de detección de la fase λ con 4, 40, 4000 y 4×10^7 UFC fluctuó de 0.12 h para CP a 7.31 h para Bioscreen. La técnica más rápida para detectar el desarrollo de *E. coli* fue la técnica tradicional (CP), seguido del DSC y Bioscreen (Cuadro 22).

Cuadro 22. Comparación de la fase lag (h) de *E. coli* no patógena en CST a 35 °C pH 7 y a_w 0.998 usando CP, DSC y Bioscreen.

Inóculo inicial (UFC)	Tipo de técnica	Fase λ (h)
4	CP	0.12 ± 0.07 a
4	DSC	4.83 ± 0.33 f
4	Bioscreen	7.31 ± 0.38 h
40	CP	0.68 ± 0.13 c
40	DSC	3.88 ± 1.19 d
40	Bioscreen	6.22 ± 0.07 g
4000	CP	0.59 ± 0.08 bc
4000	DSC	2.27 ± 0.40 e
4000	Bioscreen	4.04 ± 0.09 d
4×10^7	CP	0.38 ± 0.17 abc
4×10^7	DSC	0.23 ± 0.01 ab
4×10^7	Bioscreen	0.18 ± 0.08 ab

Letras distintas dentro de las columnas indican diferencia significativa con probabilidad de ($p \leq 0.05$) usando prueba de Duncan.

Esta detección estará relacionada de manera indirecta al crecimiento como es el cambio de volumen en el Bioscreen, la generación de calor en el DSC, o cambios iónicos en el equipo de Impedancia.

Los datos obtenidos en DSC y Bioscreen son inmediatos; mientras que la técnica del CP aunque aparenta ser rápida, necesitamos por lo menos 24 h para detectar su crecimiento. Es por ello que la técnica del DSC resulta promisoría en comparación a CP.

Para la concentración de 4×10^7 UFC no se observó diferencia estadísticamente significativa para detectar la fase lag, aunque el Bioscreen fue aparentemente el más sensible para inóculos altos con un tiempo de detección de 0.18 h, seguido por DSC (0.23 h) y 0.38 h para CP.

6. CONCLUSIONES

Los factores que mostraron mayor impacto en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 fueron pH, temperatura y concentración del microorganismo al evaluar el Conteo en Placa.

El comportamiento de *E. coli* no patógena en CST usando Conteo en Placa estuvo influenciada por el pH, la temperatura y la concentración de inóculo.

A pesar de que la a_w no fue un factor estadísticamente importante, la interacción con la temperatura mostró un efecto significativo ($p \leq 0.05$) para determinar el comportamiento del microorganismo.

La fase lag (λ) no pudo ser calculada para la técnica de Conteo en Placa, debido a que *E. coli* O157:H7 mostró crecimiento inmediato en la mayoría de las condiciones evaluadas, excepto para 0.998 y 0.981 a_w , ambas a pH 5.5 y 15 °C (con 400 y 4 UFC, respectivamente).

El modelo de Richards fue el mejor modelo usado para evaluar y predecir la tasa de crecimiento (μ_{max}) de *E. coli* O157:H7 usando Conteo en Placa, ya que obtuvo los mejores ajustes de los datos experimentales con R^2 entre 0.992 a 0.999, con una certeza ($p \leq 0.05$).

Mediante la técnica del Bioscreen se determinó que el comportamiento de *E. coli* O157:H7 fue influenciado por: pH, temperatura y concentración del microorganismo depositado. Aunque a_w aparenta ser un factor con menor significancia debemos cuidar su interacción con los demás factores evaluados. El modelo que ajustó mejor los datos experimentales de la fase λ fue el de Gompertz, seguido por el de Richards y el Logístico con valores de R^2 superiores a 0.992 ya que predice de una manera confiable los datos experimentales.

El modelo que mejor ajusta y predice a los datos experimentales del Conteo en Placa y el Bioscreen fue el modelo de Richards con una probabilidad ≤ 0.05 .

La Impedancia es una técnica rápida, automatizada y menos laboriosa, que podría utilizarse como un método alternativo para la detección anticipada de los niveles microbianos en alimentos.

La Calorimetría Diferencia de Barrido podría representar una alternativa cuando las muestras son opacas o turbias, que son imposibles de evaluarse en el Bioscreen.

Concentraciones superiores con inóculos altos (4×10^7 UFC) son más sensibles para detectarse con la técnica de Bioscreen y DSC, lo cual permite incluirlas como técnicas adecuadas para la microbiología de alimentos.

En el área de la microbiología predictiva, los datos generados por DSC, Impedancia y Bioscreen ayudaran a entender las cinéticas de crecimiento a través del flujo de calor, cambios eléctricos y turbidimétricos, respectivamente.

7. TRABAJO A FUTURO

Trabajar diferentes condiciones experimentales (pH, T, a_w , entre otros) en el DSC, incluyendo otros géneros microbianos de importancia en la Salud Pública, para monitorear el crecimiento microbiano. Debido a que la razón de crecimiento no sólo depende de la temperatura, la actividad de agua y el pH, sino también de otros factores ambientales que no están registrados necesariamente como la naturaleza del alimento puede tener una gran influencia.

Desarrollar modelos matemáticos predictivos que permitan la integración de las técnicas de Cuenta en Placa, Bioscreen, DSC e impedancia. Los modelos pueden ser usados en el desarrollo de nuevas tecnologías de alimentos preservando su inocuidad; en la enseñanza y la investigación; en la estimación de los riesgos en los alimentos o en el establecimiento de guías generales de manipulación.

Estudiar el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en alimentos ácidos y monitorear su comportamiento bajo condiciones fluctuantes de T, monitoreando el pH, a_w y concentración de microorganismos.

8. LITERATURA CITADA

Aidar-Ugrinovich, L., J. Blanco., M. Blanco., J. E. Blanco., L. Leomil., G. Dahbi., A. Mora., D. L. Onuma., W. D. Silveira, and C. A. F. Pestana. 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 115 (3): 297-306.

Augustin, J. C., A. Brouillaud-Delattre., L. Rosso, and V. Carlier. 2000. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4): 1706-1710.

Balart, G. R., M. J. López., S. D. García, and G. F. Parres. 2004. Técnicas Experimentales de análisis térmico de polímeros. Capítulo II. *In: Introducción a las Técnicas de Análisis Térmico*. Editorial UPV. Departamento de Ingeniería Mecánica y de Materiales. Escuela Politécnica Superior de Alcoy. pp 36, 40, 41, 51, 52 (Disponible en línea en: <http://www.site.ebrary.com/lib/uaeh/Doc?id=10047860&pp=1>) (consultado el 25 de abril de 2006).

BAM. Bacteriological Analytical Manual, 1998. 8th Edition, Revision A. *In: Methods for Specific Pathogens*. Chapter 4. Revision September 2002. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Chapter 4a. Revision July 2009 Diarrheagenic *Escherichia coli* (Disponible en línea en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>) (consultado el 10 de Febrero de 2010).

Batrinou, A. M., E. D. Katsogiannos., E. N. Koustoumpardis, and V. K. Spiliotis. 2005. Estimation of microbial population of bitter chocolate mix by impedance measurement. *NUTRITION* 29 (6): 260- 264.

Baty, F., J. P. Flandrois, and M. L. Delignette-Muller. 2002. Modeling the Lag Time of *Listeria monocytogenes* from Viable Count Enumeration and Optical Density Data. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (12): 5816-5825.

Bell, L. N. and T. P. Labuza. 2000. Moisture Sorption. Practical Aspects of isotherm measurement and use. Second Edition. *In: Chapter 3. Determination of moisture Sorption isotherms. A. Controlling Water Activity (Relative Humidity)*. Glycerol solutions. pp 14, 38.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1994. 9th Edition. Edited by John G. Holt. Copyright 1994. Williams & Wilkins, Baltimore.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2005. Volume 2. The Proteobacteria. Garrity, George M. (Ed.). 2nd ed., 2005, p. 2816. Originally published by Williams & Wilkins, 1984.

Boiling, E. A., G. C. Blanchard, and W. J. Russell. 1973. Bacterial identifications by microcalorimetry. *Nature* 241 (5390): 472-473.

Boe, I. and R. Lovrien. 1990. Cell Counting and Carbon Utilization Velocities via Microbial Calorimetry. *Biotechnology and Bioengineering* 35 (1):1-7.

Bovil, R. A., J. Bew, and J. Baranyi. 2001. Measurements and predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. II. Rapidly changing temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 67 (1-2), 131-137.

Brul, S., F. I. C. Mensorides., K. J. Hellingwerf, and M. J. Teixeira de Mattos. 2008. Microbial systems biology: New frontiers open to predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 128 (1):16-21.

Cady, P. 1978. Progress in impedance measurements in microbiology. *In: Sharpe, A. N. and Clark, D.S., Eds., Mechanizing Microbiology*, Springfield, pp. 199-239.

Carrasco, E., R. García-Gimeno., R. Seselovsky., A. Valero., F. Pérez., G. Zurera, and E. Todd. 2006. Predictive Model of *Listeria Monocytogenes* Growth Rate Under Different Temperatures and Acids. *Food Science and Technology International*; 12 (1): 47-56.

Carrillo, L. 2003. Microbiología Agrícola. 1era ed. Universidad Nacional de Salta: UNSA, Facultad de ingeniería volumen 1. Capítulo 2. Vía y muerte de los microorganismos. Washington, ASM Press. p.160. (Disponible en línea en <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap2.pdf>.) (consultado el 5 de febrero de 2010).

Castro, G., E. Valbuena., E. Sánchez., W. Briñez., H. Vera, and M. Leal. 2008. Comparación de Modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis*. *Revista científica*, septiembre-octubre, vol XVIII, número 005, Maracaibo, Venezuela, pp 582-588.

CDC: Center for Disease Control and Prevention. 1996. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with drinking unpasteurized commercial apple juice-British Columbia, California, Colorado, and Washington, October 1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 45:975.

CDC: Center for Disease Control and Prevention. 2005. Summary of Notifiable Diseases. United States, 2003. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 52 (54):1-85.

Cerna, C. J. F. 2003. Prevalencia y caracterización molecular de los principales grupos de *Escherichia coli* diarreogénicos, en niños menores de cinco años hospitalizados con diarrea aguda, en la cd. de México. Tesis de Doctorado en Ciencias en la Especialidad de Biomedicina Molecular. pp 9-11.

Cody, S. H., M. K. Glynn, and J. A. Farrar. 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurised apple juice. *Annals of International Medicine* (130): 202-209.

Chang-Li, X., T. Hou-Kuan., S. Zhau-hua., Q. Song-Sheng., L. Yao-Ting, and L. Hai-Shu. 1988. Microcalorimetric Study of Bacterial Growth. *Thermochimica Acta* 123:33-41.

CSIRO, Food and Nutritional Sciences Fact Sheet. 2005. Water Activity. This page is conducts food and nutrition research to support the health and wellbeing of the Australian community and the sustainability and viability of the Australian food industry. (Disponible en línea en: http://www.foodscience.afisc.csiro.au/water_fs.htm) (consultado el 9 de febrero de 2010).

Dalgaard, P., T. Ross., L. Kamperman., K. Neumeyer, and T. A. McMeekin. 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (3-4): 391-404.

Dalgaard, P. and K. Koutsoumanis. 2001. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, 43 (3): 183-196.

Decagon®. Disponible en línea en: (<http://www.decagon.com/aqualab/>) (consultado el 7 de febrero de 2010).

Dens, J. E., K. Bernaerts., R. A. Standaert, and F. J. Van Impe. 2005. Cell division theory and individual-based modeling of microbial lag. Part I. The theory of cell division. *International Journal of Food Microbiology*, 101 (3): 303-318.

Dermoun, Z. and J. P. Belaich. 1980. Microcalorimetric study of *Escherichia coli* Aerobic Growth: theoretical Aspects of Growth on Succinic Acid. *Journal of Bacteriology*, 143 (2): 742-746.

Dingman, D. W., 2000. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Bruised Apple (*Malus domestica*) Tissue as Influenced by Cultivar, Date of Harvest, and Source. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (3): 1077-1083.

Doyle, M. P. and J. L. Shoeni. 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 855-856.

Felice, J. C., E. R. Madrid., J. M. Olivera., V. I. Rotger, and E. M. Valentinuzzi. 1998. Impedance microbiology: Quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. Note: Some of the techniques herein described are protected by the Argentine pending patent # 960101249.

Fernández, E. E. 1981. Microbiología sanitaria: agua y alimentos. Vol. I Universidad Guadalajara, México D.F. p 175.

Fernández, E. E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México. pp. 295-296.

Firstenberg-Eden R., and G. Eden. 1984. Impedance Microbiology. John Wiley, New York, p 170.

Francois, K., F. Devlieghere., A. R. Standaert., A. H. Geeraerd., I. Cools., J. F. Van Impe, and J. Debevere. 2005a. Environmental factors influencing the relationship between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. Journal Applied Microbiology, 99 (6):1503-1515.

Francois, K., F. Devlieghere., K. Smet., A. R. Standaert., A. H. Geeraerd., J. F. Van Impe, and J. Debevere, 2005b. Modelling the individual lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 100 (1-3): 41-53.

Francois, K., F. Devlieghere., A. R. Standaert., A. H. Geeraerd., J. F. Van Impe, and J. Debevere, 2006. Effect of environmental parameters (temperature, pH and a_w) on the individual cell lag phase and generation time of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 108 (3): 326-335.

Garro, M. S., G. F. De Valdez, and G. S. De Giori. 2001. Application of Conductimetry for Evaluation of Lactic Starter Cultures in Soymilk. Food Microbiology and Safety, 67 (3): 1175-1178.

Gerolimatou, C. N., A. M. Batrinou., J. P. Tsaknis, and V. K. Spiliotis. 2004. Comparison of the Impedance Splitting Method to the Agar Dilution Method for the estimation of the antimicrobial activity of Food Preservatives. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 12 (4): 259–267.

Goldschmidt, M. C. and D. C. Fung. 1978. New methods for microbiological analysis of Food. Journal of Food Protection. Journal of Food Protection, 41 :201-219.

Goldschmidt, M. C. and D. C. Fung. 1979. Automated instrumentation for microbiological analysis. Food Technology, 33: 63-70.

Gomes, O., B. J. R. Feitosa., G. T. A. Tardelli., G. B. E. Cabilio., V. M. A. Midolli., N. Z. V. Furtado., V. M. Ibelli, and K. Irino, 2008. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. International Journal of Food Microbiology, 127: 139-146.

Grauke L. J., I. T. Kudva., J. W. Yoon., C. W. Hunt., C. J. Williams, and C. Hovde. 2002. Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 68(5):2269-2277.

Gyseman, K. P. M., K. Bernaerts., A. Vermeulen., A. H. Geeraerd., J. Debevere., F. Devlieghere, and J. F. Van Impe. 2007. Exploring the performance of logistic regression model types on growth/no growth data of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 114: 316-331.

Honglin, Z., L. Yongjun, and S. Haitao. 1993. Determination of thermograms of bacterial growth and study of optimum growth temperature. *Thermochimica Acta*, 216: 19-23.

Huang, L. 2008. Growth Kinetics of *Listeria monocytogenes* in Broth and Beef Frankfurters- Determination of Lag Phase Duration and Exponential Growth Rate under Isothermal Conditions. *Journal of Food Science*, 73 (5): 235- 242.

Huchet, V., D. Thuault., and C. M. Bourgeois. 1995. Development of a model predicting the effects of pH, lactic acid, glycerol and sodium chloride content on the growth of vegetative cells of *Clostridium tyrobutyricum* in a culture medium. *Lait* 75: 585.

Hudson, J. A. and S. J. Mott. 1994. Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of *Pseudomonas fragi*, *Journal of Food Safety*, 14: 329-339.

Hugo & Russell's. 2004. *Pharmaceutical Microbiology*. Seventh edition. Edited by Denyer, S. P., N. A. Hodges., S. P. Gorman. Part 1. Biology in microorganisms In: *Fundamental Features of Microbiology: Cultivation methods*. by Blackwell Publishing. pp. 10-17.

Hyun-Gyun, Y. and D. L. Marshall. 2004. Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH Alters Membrane Lipid Composition, Verotoxin Secretion, and Resistance to Simulated Gastric Fluid Acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6): 3500-3505.

Hyun-Gyun, Y. and D. L. Marshall. 2006. Effect of trisodium phosphate adaptation on changes in membrane lipid composition, verotoxin secretion, and acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 39-44.

ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. *Ecología microbiana de los alimentos I. Factores que afectan la supervivencia de los Microorganismos en los Alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza España.

INDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. 2001. Informe anual regional de los países participantes en la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos. pp 62-67. Disponible en línea en (<http://www.paho.org/spanish/AD/DPC/CD/amr-santa-cruz-mex.pdf>).

Jason, A. C. 1983. A deterministic model for monophasic growth of batch cultures of bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, pp. 513-536.

Jay, J. M. 2000. *Modern Food Microbiology*. Sixth edition. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg, Maryland.

Jones, T., C. O. Gill, and L. M. Mc-Mullen. 2003. Behavior of log-phase *Escherichia coli* at temperatures near the minimum for growth. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 55-61.

Jones, H. T., A. Murray., M. Johns., O. C. Gill, and M. L. McMullen. 2006. Differential expression of proteins in cold-adapted log-phase cultures of *Escherichia coli* incubated at 8, 6 or 2 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 107:12-19.

Kasper J. B., J. P. Natarro and H. L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Natural Reviews Microbiology*, 2(2): 123-140.

Koutsoumanis, K. P. and J. N. Sofos. 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and a_w limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 83-91.

Krist, K. A., T. Ross, and T. A. McMeekin. 1998. Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 195-203.

Lederberg, J. 2004. *E. coli* K-12. *Microbiology Today*, 31:116.

Lee, J., and G. Kaletun□, 2002a. Calorimetric determination of inactivation parameters of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 178-189.

Lee, J., and G. Kaletun□, 2002b. Evaluation of the Heat Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by Differential Scanning Calorimetry. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (11): 5379-5386.

Lengeler, J. W., G. Drews, and H. G. Schelegel. 1999. *Biology of the Prokaryotes*, Blackwell Science, New York. 80, p 110.

Lin, J., M. P. Smith, and K. C. Chapin. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *E. coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3094- 3100.

Madrid, R. E., C. J. Felice, and M. E. Valentinuzzi. 1999. Automatic on-line analyzer of microbial growth using simultaneous measurements of impedance and turbidity. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 37: 789-793.

Madrid, R. E and C. J. Felice. 2005. Microbial Biomass Estimation. Query Sheet. *Critical Review in Biotechnology*, 25: 1-16.

Marison, I. W. and U. von. Stockar. 1985. A Novel Bench-Scale Calorimeter for Biological Process Development Work. *Thermochimica Acta*, 85: 493-496.

Martínez, N. N., G. A. M. Andrés., B. A. Chiralt, and M. P. Fito. 1999. Capítulo 3. Concepto de Actividad del Agua. En *Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno*. Colección Libro Docente. Primera edición (México). Universidad Politécnica de Valencia (España) e Instituto Politécnico Nacional. pp 58- 66.

McCarthy, M. 1996. *E. coli* O157:H7 outbreak in USA traced to apple juice. *Lancet* 348: 1299.

McDonald, K. and D. W. Sun. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 52: 1-27.

McKellar, R. C. and K. Knigh. 2000. A combined discrete continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 54: 171.

McKellar, R.C. and L. Xuewen. 2004a. Chapter 1. Experimental Design and Data Collection by Rasch, M. Chapter 2. Primary Models by McKellar, R. C and L. Xuewen, CRC Serie in Contemporary Food Science. CRC PRESS. Printed in the United State of America. pp 21-62.

McKellar, R. C. and Lu, Xuewen. 2004b. Modeling Microbial Responses in Food, CRC Serie in Contemporary Food Science. CRC PRESS. Printed in the United State of America.

McMeekin, T. A., J. N. Olley., T. Ross, and D. Ratkowsky. 1993. Predictive Microbiology: Theory and application, John Wiley & Sons, New York, p. 340.

McMeekin, T. and T. Ross. 1996. Modeling applications. *Journal of Food Protection*, 59: 37-42.

McMeekin, T. A., J. Brown., K. Krist., D. Miles., K. Neumeyer., D. S. Nichols., J. Olley., K. Presser., D. A. Ratkowsky., T. Ross., M. Salter, and S. Soontranon. 1997. Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerging Infectious Diseases*, 3 (4): 541-549.

McMeekin, T. A., J. Olley., D. A. Ratkowsky, and T. Ross. 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 395-407.

Mellefont, L., K. Neumeyer., T. A. McMeekin, and T. Ross. 2000. Induction and manipulation of bacterial lag times. *In: Van Impe, J.F.M., Bernaerts, K. (Eds.), Predictive Modelling in Foods-Conference Proceedings. KULeuven/BioTeC, Belgium, pp 70-72.*

Membre, J. M., B. Leporq., M. Vialette., E. Mettler., L. Perrier., D. Thuault, and M. Zwietering. 2005. Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *International Journal of Food Microbiology*, 100: 179-186.

Métris, A., S. M. George., M. W. Peck, and J. Baranyi. 2003. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal of Microbiological Methods*, 55: 821-827.

Métris, A., Y. Le Marc., A. Elfwing., A. Ballagi, and J. Baranyi. 2005. Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of *E. coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 100: 13-19.

Miller, L. G. and C. W. Kaspar. 1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in place cider. *Journal of Food Protection*, 57:460-464.

Montville, J. T. and R. K. Matthews. 2005. *Food Microbiology an introduction*. ASM Press. American Society for Microbiology, Washington D.C. Capitulo 2 y 9. p. 11-28 y p.111-127.

NOM-110-SSA1-1994: Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Pascual, A. M. R. and P. V. Calderón. 2000 *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Segunda edición*. In: *Investigación y recuento de Escherichia coli*. Editorial Días de Santos, S.A. Madrid, España. p. 21.

Payton-Pruett W., T. Biela., C. P. Lattuada., P. M. Mrozinski., M. W. Barbour., R. S. Flowers., W. Osborne., J. O. Reagan., D. Theno., V. Cook., A. Mcnamara, and B. Rose. 2002. Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 in frozen beef patties produced over an 8-hour shift. *Journal of Food Protection*, 65(9):1363-1370.

Pearce, M. C., D. Fenlon., J. C. Low., A. W. Smith., H. I. Knight., J. Evans., G. Fostes., B. A. Syngé, and G. J. Gunn. 2004. Distribution of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine fecal pats and its impact on estimates of the prevalence of fecal shedding. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 70(10): 5737-5743

Perni, S., W.P. Andrew, and G. Shama. 2005. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. *Food Microbiology*, 22: 491-495.

Prescott, L. M., J. P. Harley., and D. A. Klein. 1999. *Microbiología 4a edición*. McGraw-Hill. Interamericana p. 114-136.

Ramírez, S. J., F. G. Contreras, and E. M. C. Gómez, 2005. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47 (3-4): 92-101.

Ramírez, N., A. Regueiro., O. Arias, and R. Contreras. 2009. Espectroscopía de Impedancia electroquímica, herramienta eficaz para el diagnóstico rápido microbiológico. *Biotecnología aplicada*, 26:65-71.

Rasch, M. 2004. Experimental design and data collection. *In: Modeling Microbial Responses in Food* ed. McKellar, R. C. and Lu, X. pp. 1–20.

Ray, B. 2004. *Fundamental Food Microbiology*. Chapter 5. *Microbial Growth Characteristics*. By CRC Press LLC. Printed in the United States of America. pp. 55-79.

Rivero, M. A., N. L. Padola., A. I. Etcheverria, and A. E. Parma. 2004. *Escherichia coli* Enterohemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. *MEDICINA (Buenos Aires)* 64: 352-356.

Robinson, T. P., M. J. Ocio., A. Kaloti, and B. M. Mackey. 1998. The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 44:83-92.

Robinson, T. P., O. O. Aboaba., A. Kaloti., M. J. Ocio., J. Baranyi, and B. M. Mackey. 2001. The effect of inoculums size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 70: 163-173.

Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México, 44:464-475.

Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. Journal of Applied Bacteriology, 81: 501-508.

Schilling, A. T. 2008. The Effect of pH on the Bacterium *E. coli*. Project Number J1429. California State Science Fair. Project Summary. Ap2/08.

Silley, P. and S. Forsythe. 1996. Impedance microbiology- a rapid change for microbiologists. A review. Journal of Applied Bacteriology, 80: 233-243.

Skinner, G. E. and J. W. Larkin. 1994. Mathematical modeling of microbial growth. Journal of Food Safety, 14: 175-217.

Slonczewski, J. L., T. A. Gonzalez., F. M. Bartholomew, and N. J. Holt. 1987. Mu-directed *lac Z* fusions regulated by low pH in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 169: 3001-3006.

Sperber, W. H. 1983. Influence of water activity on foodborne bacteria- A review. Journal of Food Protection, 46:142-150.

Srivastava, S. and P. S. Srivastava. 2003. Understanding bacteria. Chapter 5. Bacteria and life processes-1 Growth and multiplication. .Published by Kluwer Academic Publishers, Springer Netherlands. Printed in the Netherlands. pp. 110-169.

Stockar U. and W. I. Marrison. 1989. The Use of Calorimetry in Biotechnology. *In*: Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology. Vol 40. Fiechter, A. M. 95, Spronger-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 106, 115, 131, 132.

Swinnen, I. A. M., K. Bernaerts., E. J. J. Dens., A. H. Geeraerd, and J. F. Van Impe. 2004. Predictive modeling of the microbial lag phase: a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 137-159.

Tamplin, M. L. 2002. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Ground Beef Stored at 10 °C and the Influence of Competitive Bacterial Flora, Strain Variation, and Fat Level. Journal of Food Protection, 65 (10): 1535-1540.

Tamplin, M. L., G. Paoli., B. S. Marmer, and J. Phillips. 2005. Models of the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in raw sterile ground beef stored at 5 to 46 °C. International Journal of Food Microbiology, 100: 335-344.

Tosun, H. and S. Aktuğ-Gönül. 2005. The Effect of Acid Adaptation Conditions on Acid Tolerance Response of *Escherichia coli* O157:H7. Turkish Journal of Biology, 29:197-202.

Tsui-Chu, Y., L. Chin-Fung, and C. Cheng-Chun. 2007. Cell age, suspending medium and metal ion influence the susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 to water-soluble maltose chitose chitosan derivate. International Journal of Food Microbiology, 113:258-262.

Tucker, D. L., N. Tucker, and T. Conway. 2002. Gene Expression Profiling of the Response in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 184 (23): 6551-6558.

The Global Bioresource Center: American Type Culture Collection (<http://www.atcc.org/>) (consultado el 5 de junio de 2010).

User's Manual Bioscreen C, 2003. Version 2.4. Code of this User's Manual: 1506090. Helsinki, Finland. Disponible en línea en: (<http://www.bioscreen.fi>) (consultado el 7 de abril de 2007).

Vadasz, P. and A. S. Vadasz. 2005. Predictive modeling of microorganisms: LAG and LIP in monotonic growth. International Journal of Food Microbiology, 102:257-275.

Varela-Hernández, J. J., E. Cabrera-Díaz., M. A. Cardona-López., L. M. Ibarra-Velázquez., H. Rangel-Villalobos., A. Castillo., M. R. Torres-Vitela, and A. Ramírez-Álvarez. 2007. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. Short Communication. International Journal of Food Microbiology, 113: 237-241.

Vidal, G. J. E. 2003. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), una causa frecuente de diarrea infantil. Secretaria de Salud del estado de Tabasco, Villahermosa, México, Numero 001. Salud en Tabasco, 9:188-193.

Wachenheim, D. E., J. A. Patterson, and M. R. Ladisch. 2003. Analysis of the logistic function model: derivation and application specific to batch cultured microorganisms. Bioresource Technology, 86: 157-164.

Whiting, R. C. and L. K. Bagy. 2002. Modeling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 73 (2-3): 291-295.

World Health Organization, 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Fact sheet N° 125. Revised May. Disponible en línea en: (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/print.html>) (consultado el 9 de diciembre de 2009).

Yada, R. Y. and B. J. Skura. 1982. Scanning electron microscope study of *Pseudomonas fragi* in intact and sarcoplasm-depleted bovine longissimus dorsi muscle. Applied and Environmental Microbiology, 43:905-915.

Younghoon, K., O. Sejong., P. Sungsu, and H. K. Sae. 2009. Interactive transcriptome analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 and intestinal epithelial HT-29 cell after bacterial attachment. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 224-232.

Zhang, H., Y. Lin, and H. Sun. 1993. Determination of thermograms of bacterial growth and study of optimum growth temperature. *Thermochimica Acta*, 216: 19-23.

Zhao, T., M. P. Doyle and R. E. Besser. 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:2526-2530.

Zwietering, H. M., I. Jongenburger., M. F. Rombouts, and K'Van. Riet. 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6):1875-1881.

APÉNDICE A

Diseño experimental Box-Behnken.

Diseño experimental Box-Behnken 3 ⁴⁻¹ (Statistic versión 7).						
No.	Replica	Bloque	pH	a _w	T (°C)	[inóculo] (UFC/mL)
1	1	1	4	0.965	25	400
2	1	1	7	0.965	25	400
3	1	1	4	0.998	25	400
4	1	1	7	0.998	25	400
5	1	1	5.5	0.981	15	4
6	1	1	5.5	0.981	35	4
7	1	1	5.5	0.981	15	40000
8	1	1	5.5	0.981	35	40000
9	1	1	5.5	0.981	25	400
10	1	2	4	0.981	25	4
11	1	2	7	0.981	25	4
12	1	2	4	0.981	25	40000
13	1	2	7	0.981	25	40000
14	1	2	5.5	0.965	15	400
15	1	2	5.5	0.998	15	400
16	1	2	5.5	0.965	35	400
17	1	2	5.5	0.998	35	400
18	1	2	5.5	0.981	25	400
19	1	3	4	0.981	15	400
20	1	3	7	0.981	15	400
21	1	3	4	0.981	35	400
22	1	3	7	0.981	35	400
23	1	3	5.5	0.965	25	4
24	1	3	5.5	0.998	25	4
25	1	3	5.5	0.965	25	40000
26	1	3	5.5	0.998	25	40000
27	1	3	5.5	0.981	25	400
28	2	1	4	0.965	25	400
29	2	1	7	0.965	25	400
30	2	1	4	0.998	25	400
31	2	1	7	0.998	25	400
32	2	1	5.5	0.981	15	4

4 factor Box-Behnken design, 3 blocks, 27 runs (Spreadsheet1)
+ 2 replications

Continua APENDICE A						
Diseño experimental Box-Behnken 3^{4-1} (continuación).						
No.	Replica	Bloque	pH	a_w	T(°C)	[inóculo] (UFC/mL)
33	2	1	5.5	0.981	35	4
34	2	1	5.5	0.981	15	40000
35	2	1	5.5	0.981	35	40000
36	2	1	5.5	0.981	25	400
37	2	2	4	0.981	25	4
38	2	2	7	0.981	25	4
39	2	2	4	0.981	25	40000
40	2	2	7	0.981	25	40000
41	2	2	5.5	0.965	15	400
42	2	2	5.5	0.998	15	400
43	2	2	5.5	0.965	35	400
44	2	2	5.5	0.998	35	400
45	2	2	5.5	0.981	25	400
46	2	3	4	0.981	15	400
47	2	3	7	0.981	15	400
48	2	3	4	0.981	35	400
49	2	3	7	0.981	35	400
50	2	3	5.5	0.965	25	4
51	2	3	5.5	0.998	25	4
52	2	3	5.5	0.965	25	40000
53	2	3	5.5	0.998	25	40000
54	2	3	5.5	0.981	25	400
55	3	1	4	0.965	25	400
56	3	1	7	0.965	25	400
57	3	1	4	0.998	25	400
58	3	1	7	0.998	25	400
59	3	1	5.5	0.981	15	4
60	3	1	5.5	0.981	35	4
61	3	1	5.5	0.981	15	40000
62	3	1	5.5	0.981	35	40000
63	3	1	5.5	0.981	25	400
64	3	2	4	0.981	25	4
65	3	2	7	0.981	25	4
66	3	2	4	0.981	25	40000
67	3	2	7	0.981	25	40000

4 factor Box-Behnken design, 3 blocks, 27 runs (Spreadsheet1)
+ 2 replications (continuación)

Continua APENDICE A						
Diseño experimental Box-Behnken 3 ⁴⁻¹ (continuación).						
No.	Replica	Bloque	pH	a _w	T (°C)	[inóculo] (UFC/mL)
68	3	2	5.5	0.965	15	400
69	3	2	5.5	0.998	15	400
70	3	2	5.5	0.965	35	400
71	3	2	5.5	0.998	35	400
72	3	2	5.5	0.981	25	400
73	3	3	4	0.981	15	400
74	3	3	7	0.981	15	400
75	3	3	4	0.981	35	400
76	3	3	7	0.981	35	400
77	3	3	5.5	0.965	25	4
78	3	3	5.5	0.998	25	4
79	3	3	5.5	0.965	25	40000
80	3	3	5.5	0.998	25	40000
81	3	3	5.5	0.981	25	400

APÉNDICE B: Cuenta en placa

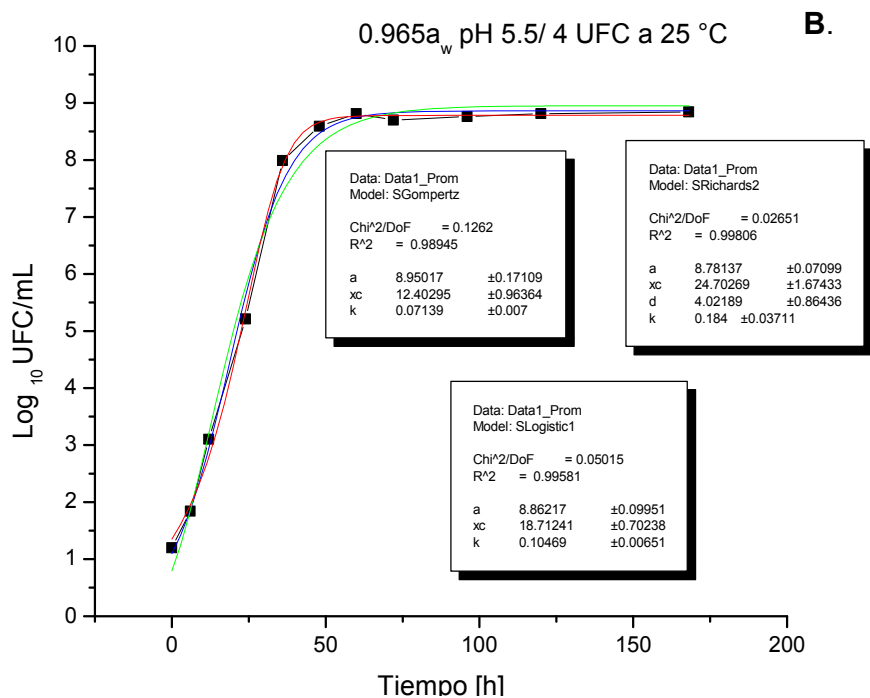
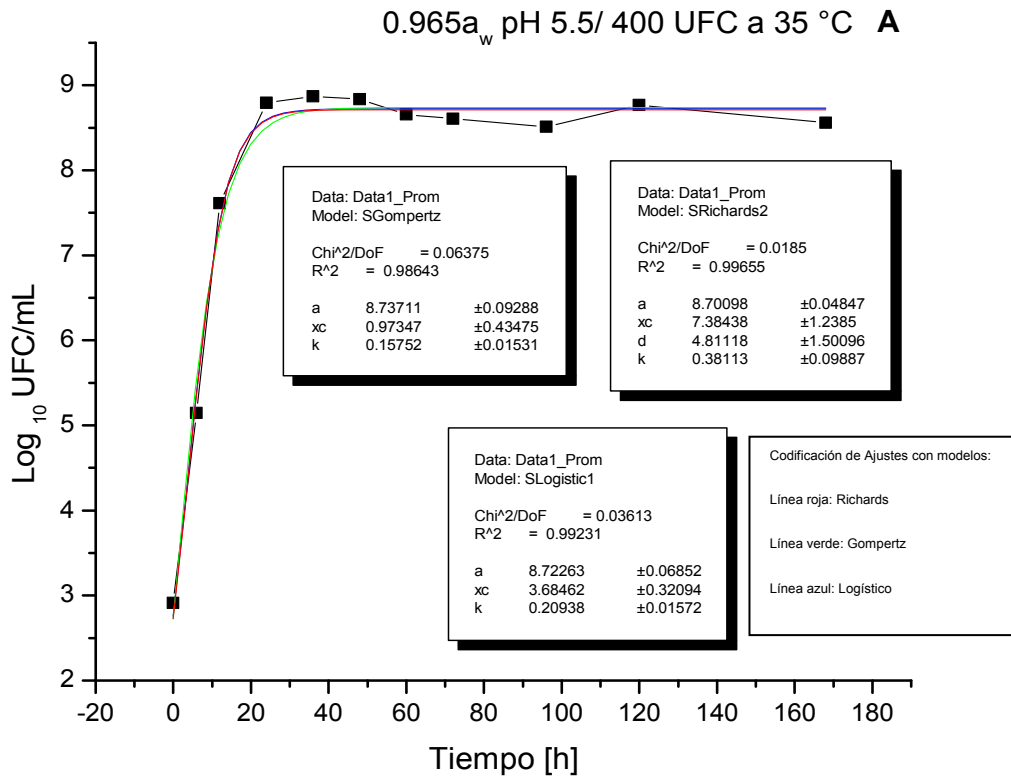


Figura 1 (A-B). Efecto de la temperatura, pH, tamaño de inóculo y a_w en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en CST usando cuenta en placa.

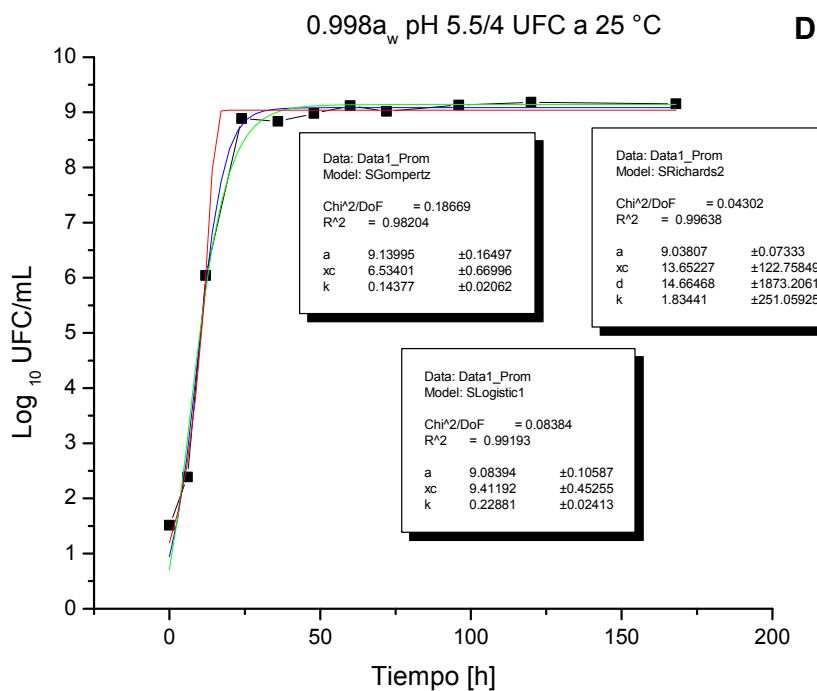
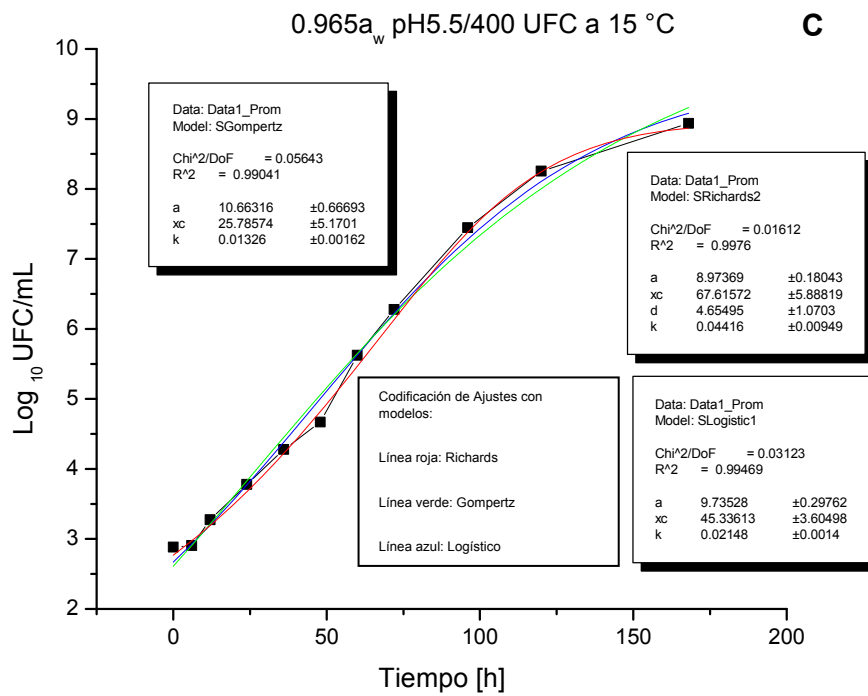
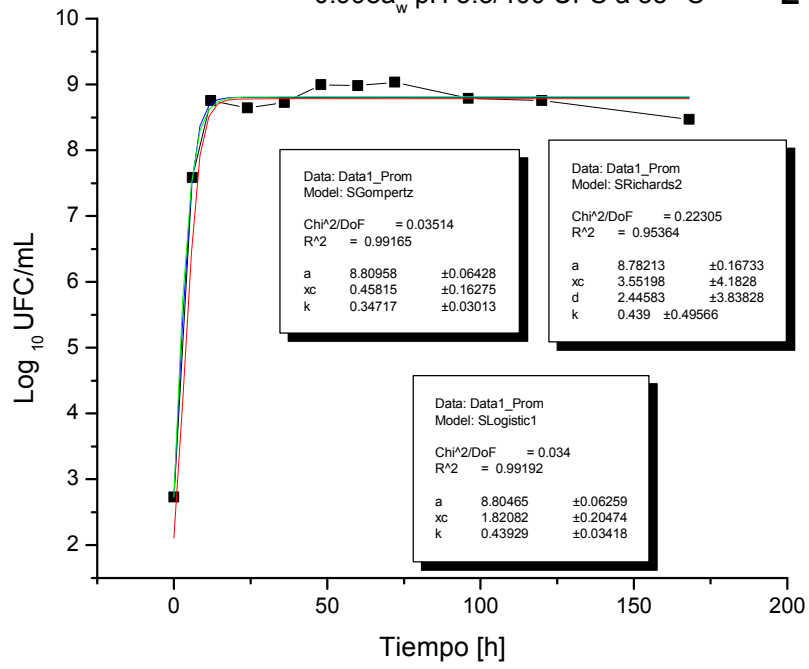


Figura 2 C-D. Efecto de la temperatura, pH, tamaño de inóculo y a_w en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en CST usando cuenta en placa (continuación...)

0.998_w pH 5.5/400 UFC a 35 °C

E



APÉNDICE C: Bioscreen C

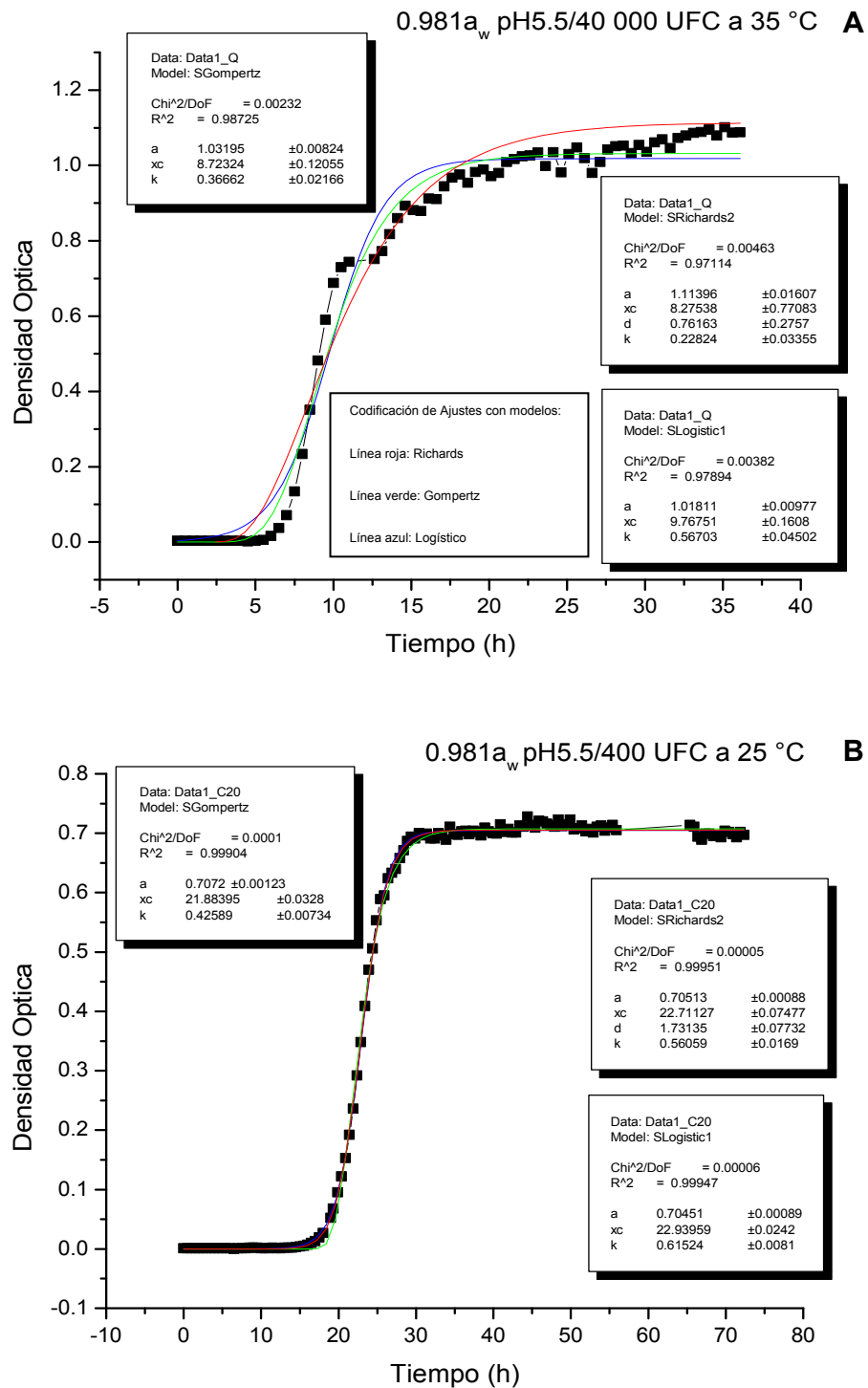


Figura 1 (A-B). Efecto de la temperatura, pH, tamaño de inóculo y a_w en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en CST usando Bioscreen.

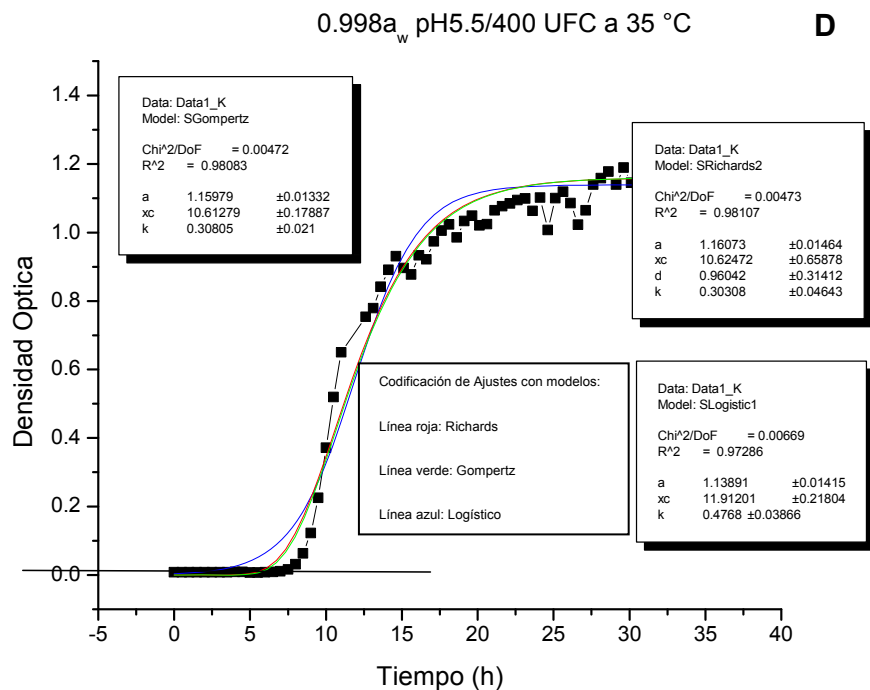
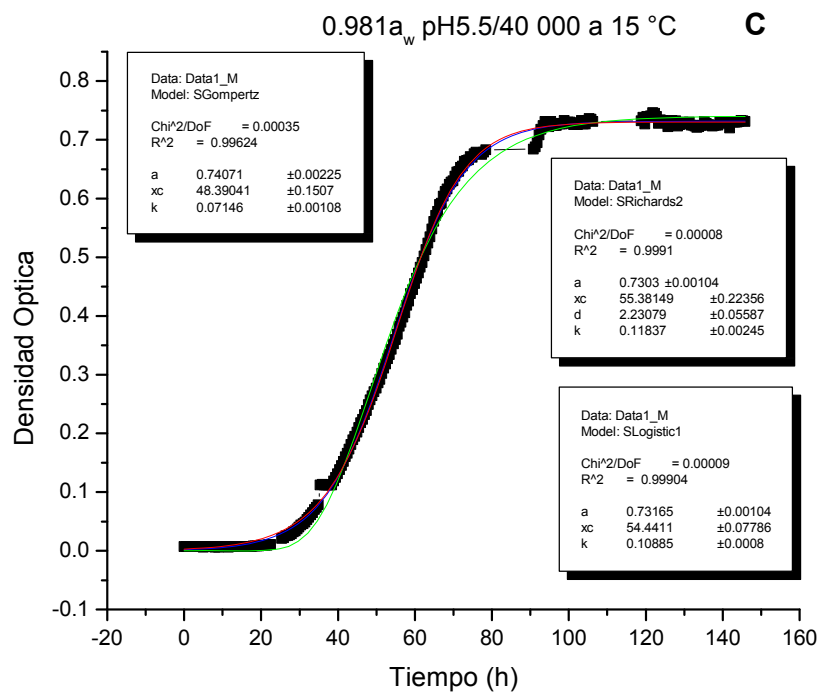


Figura 2 C-D. Efecto de la temperatura, pH, tamaño de inóculo y a_w en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en CST usando Bioscreen.

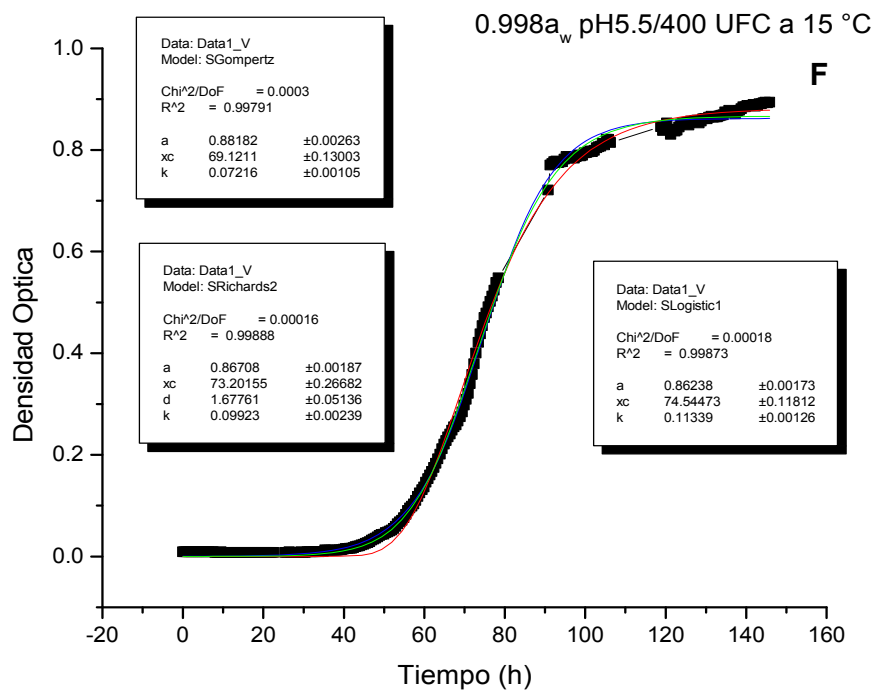
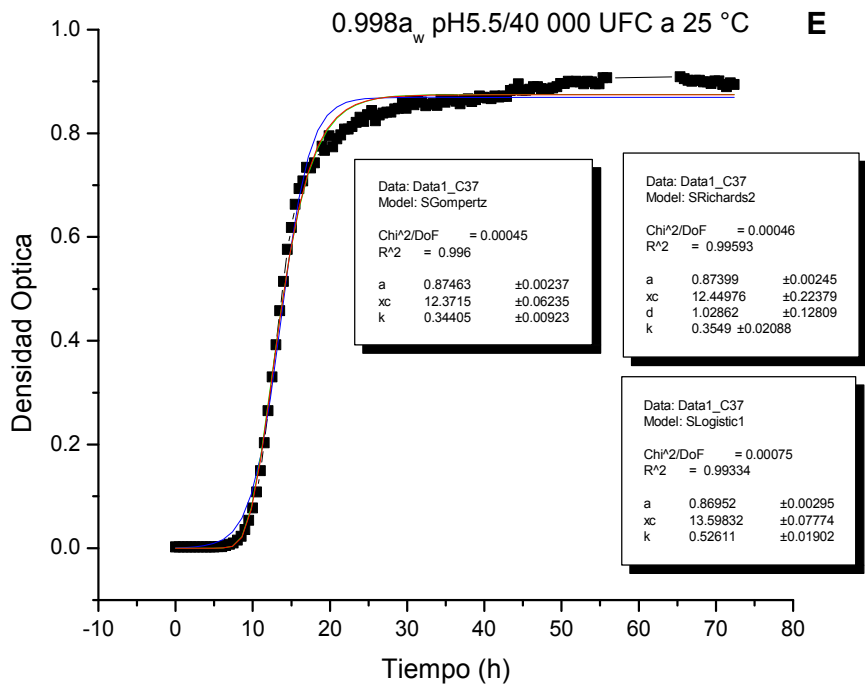


Figura 3 E-F. Efecto de la temperatura, pH, tamaño de inóculo y a_w en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en CST usando Bioscreen.

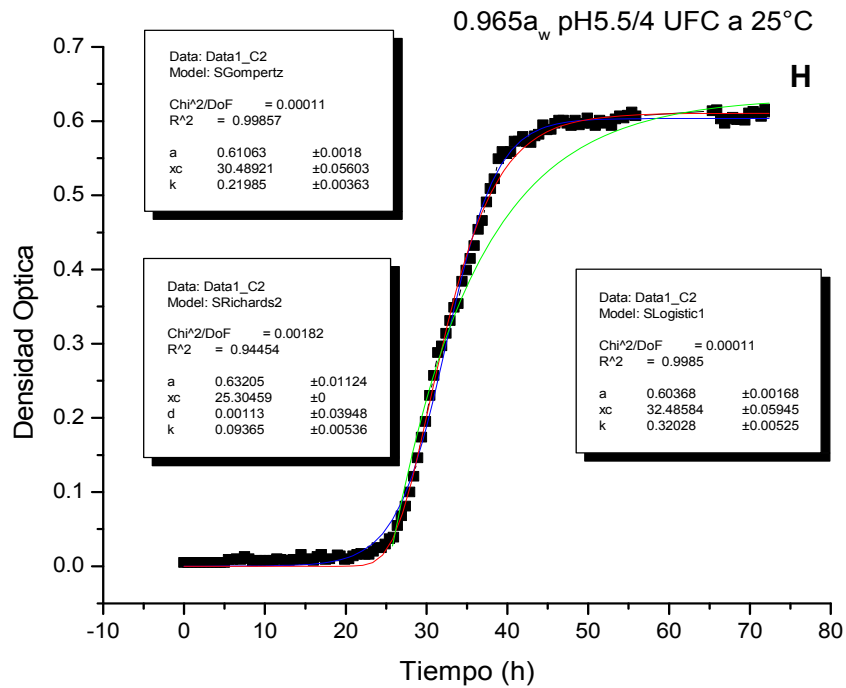
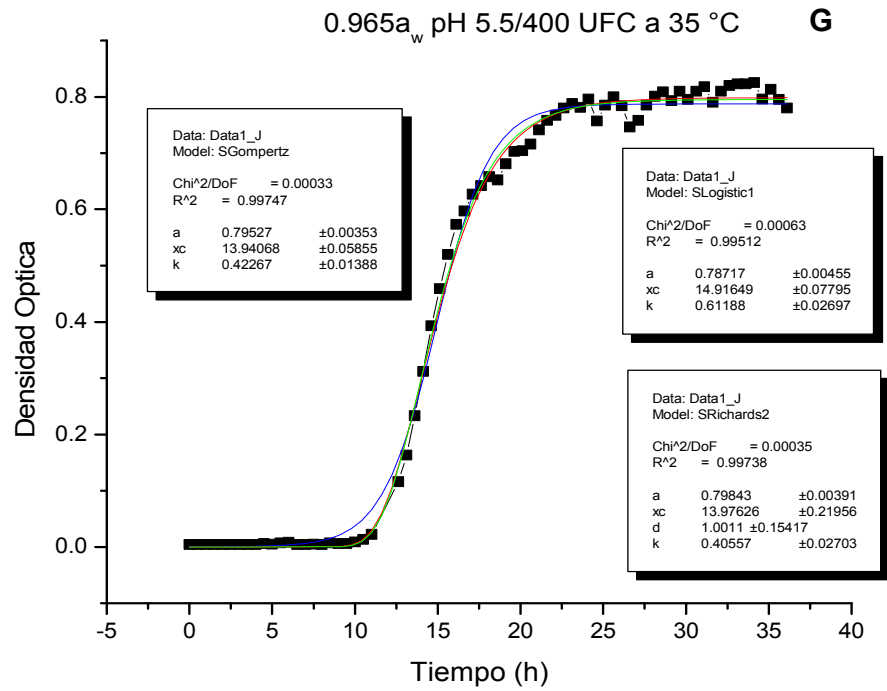


Figura 4 G-H. Efecto de la temperatura, pH, tamaño de inóculo y a_w en el comportamiento de *E. coli* O157:H7 en CST usando Bioscreen.

0.965a_w pH5.5/400 UFC a 15 °C

