

Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos

(Recibido: 26/04/2016; Aceptado: 14/07/2016)

Garre Pérez, A.¹; Egea Larrosa, J.A.²; Fernández Escámez, P.S.¹.

¹Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena (ETSIA)

²Departamento de Matemática Aplicada y Estadística. Universidad Politécnica de Cartagena (ETSII)
Email: pablo.fernandez@upct.es

Resumen. Los requerimientos actuales de calidad y seguridad microbiana en los alimentos sólo pueden ser satisfechos a través de una descripción detallada del comportamiento de los microorganismos patógenos durante el ciclo de vida del producto. La microbiología predictiva es clave en este aspecto, ya que describe por medio de modelos matemáticos la evolución de la población microbiana bajo diferentes condiciones ambientales. En esta contribución se presentan los modelos matemáticos más utilizados actualmente para la descripción de crecimiento microbiano.

Palabras clave. microbiología predictiva; crecimiento microbiano; modelización matemática

Abstract. Current standards on food quality and microbial safety can only be fulfilled through a detailed description of the behaviour of the pathogen microorganism during the life cycle of the product. Predictive microbiology serves a key role in this aspect. This science describes through mathematical models the evolution of a microbial population under different environmental conditions. This contribution presents the mathematical models most commonly used for the description of microbial growth.

Keywords. predictive microbiology; microbial growth; mathematical modelling

1. Introducción

Los estándares actuales de seguridad y calidad alimentaria sólo pueden ser satisfechos a través de un conocimiento detallado del comportamiento de los microorganismos patógenos durante el ciclo de vida del producto. La microbiología predictiva ha demostrado ser clave en este aspecto. Esta rama de la microbiología intenta describir el comportamiento de un microorganismo bajo unas condiciones ambientales dadas a través de modelos matemáticos.

La evaluación del riesgo microbiológico de un microorganismo requiere de la descripción tanto de la inactivación durante los tratamientos de esterilización aplicados en la industria, como del crecimiento durante la conservación. En esta contribución se presentan los modelos matemáticos más utilizados actualmente para la descripción de crecimiento microbiano.

El crecimiento de un microorganismo suele ilustrarse a través de la curva de crecimiento, que es la representación del logaritmo del número de microorganismos con respecto al tiempo. En la Fig. 6 se ilustra la forma sigmoideal que usualmente se observa para esta curva bajo condiciones constantes favorables para el crecimiento.

Aunque las condiciones del medio sean favorables para el crecimiento, el microorganismo necesita un tiempo para adaptarse a ese nuevo ambiente antes de comenzar el crecimiento. Esta etapa se conoce como fase de adaptación. A continuación, la población microbiana entra en la denominada fase exponencial,

caracterizada por un crecimiento exponencial con ratio constante (μ_{max}). Este crecimiento se mantiene hasta que la población microbiana se estabiliza, deteniéndose el crecimiento. Esta nueva fase se denomina fase estacionaria. Por último, la población microbiana decae cuando se consumen todos los recursos del medio. Esta última fase no suele ser de interés para la microbiología de alimentos y se omitirá en esta publicación.

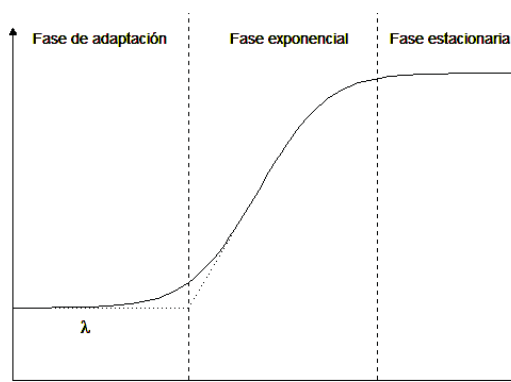


Fig. 6: Curva de crecimiento microbiano (logaritmo del número de microorganismos vs. tiempo) tipo para una población bajo condiciones ambientales constantes.

El método más extendido para cuantificar la duración de la fase de adaptación (λ) consiste en trazar una línea tangente a la curva de crecimiento durante la fase exponencial, tal y como se muestra en la Fig. 6. El punto en que esta línea interseca a una línea horizontal que corta al eje de abscisas en el valor del recuento inicial define el valor de λ .

2. Modelos de crecimiento microbiano

El modelado del crecimiento microbiano se realiza usualmente en dos pasos. En primer lugar, la relación entre el tamaño de la población microbiana (N) y el tiempo (t) se describe a través de un modelo matemático (modelo primario). En un segundo paso, la relación entre los parámetros del modelo primario y las condiciones ambientales se describe a través de un segundo modelo matemático (modelo secundario).

2.1 Modelos primarios

Zwietering et al. (1990)

El primer modelo en ganar popularidad para la descripción de crecimiento fue el modelo log-logístico propuesto por Gibson et al. (1987). Debido a las dificultades para interpretar los parámetros de este modelo, Zwietering et al. (1990) lo reparametrizaron para darle un significado microbiológico. La función resultante se muestra en la ecuación (1), donde N indica el número de microorganismos a tiempo t y N_0 es el valor de N en el momento de inoculación. A , μ_{max} y λ son los parámetros del modelo. λ indica la duración de la fase de adaptación, μ_{max} representa el ratio de crecimiento específico durante la fase exponencial y A es el tamaño máximo de la población microbiana.

$$\ln \frac{N}{N_0} = A \cdot e^{-\exp\left(\frac{\mu_{max} \cdot e}{A}(\lambda - t) + 1\right)} \quad (1)$$

Al no estar escrito en forma diferencial, este modelo únicamente es capaz de representar perfiles de temperatura isotermos. Además, es un modelo empírico que carece de una base mecanística.

Baranyi y Roberts (1994)

El modelo propuesto por Baranyi y Roberts (1994), descrito en la ecuación (2), es uno de los más extendidos para el modelado del crecimiento microbiano en la actualidad. Este modelo describe el crecimiento como una cinética de primer orden de ratio $\mu(t)$, que varía en función de las condiciones ambientales y según la fase en que se encuentre la población. Durante la fase exponencial este coeficiente es igual a μ_{max} , mientras que durante las fases de adaptación y estacionaria se reduce por medio de los coeficientes $\alpha(t)$ y $\gamma(t)$, ambos comprendidos entre cero y uno.

$$\frac{dN}{dt} = \alpha(t) \cdot \mu_{max} \cdot \gamma(t) \cdot N(t) \quad (2)$$

En este modelo se describe la fase de adaptación asumiendo que existe una sustancia ficticia $P(t)$ que hace de cuello de botella. El crecimiento de esta sustancia sigue una cinética de Michaelis-Menten, lo que se ve reflejado en el parámetro $\alpha(t)$ tal y como define la ecuación (3).

$$\alpha(t) = \frac{P(t)}{K_p + P(t)} = \frac{P(t)/K_p}{1 + P(t)/K_p} = \frac{Q(t)}{1 + Q(t)} \quad (3)$$

La variable $Q(t) = P(t)/K_p$, sin significado microbiológico, caracteriza el estado fisiológico de la célula. Esta variable crece exponencialmente a lo largo del experimento con ratio v , tal y como se describe en la ecuación (4). Usualmente se considera que $v = \mu_{max}$ para reducir la complejidad del modelo.

$$\frac{dQ}{dt} = v \cdot Q(t) \quad (4)$$

La fase estacionaria se modela a través del parámetro $\gamma(t)$, que introduce una regulación interna de la población de manera que no puede exceder un valor determinado (N_{max}), tal y como se muestra en la ecuación (5).

$$\gamma(t) = \left(1 - \frac{N(t)}{N_{max}}\right)^m \quad (5)$$

El parámetro m define la suavidad de la transición entre la fase exponencial y la estacionaria. Este parámetro se suele considerar igual a la unidad.

Pese a su clara intención mecanística, no existe una manera de determinar a priori la sustancia $Q(t)$, de manera que tiene que aproximarse a partir de datos experimentales. Además, Alavi et al (1999) observaron que este parámetro no siempre se mantiene constante para poblaciones con idéntica historia de conservación. Mellefont and Ross (2003) dedujeron que la hipótesis de Baranyi de que el parámetro $Q(t)$ sólo depende de las condiciones de pre-inoculación es válido solamente para incrementos bruscos de temperatura (no para reducciones).

Buchanan et al. (1997)

El modelo trilinear propuesto por Buchanan et al. (1997) es el modelo de crecimiento microbiano más sencillo. Este modelo representa las fases de adaptación y estacionarias como líneas horizontales. La fase de crecimiento exponencial se describe a través de una línea recta de pendiente μ_{max} .

Este modelo es capaz de describir la curva de crecimiento de la población microbiana cuando la transición entre fases es súbita. Sin embargo, cuando esta transición es suave pierde efectividad.

McKellar (2001)

El modelo estocástico propuesto por McKellar (2001) extiende el modelo descrito en McKellar (1997). El modelo original divide la población ($N(t)$) en dos subpoblaciones independientes (sin intercambio de células entre ellas). La primera ($NG(t)$) no varía durante el proceso, es decir, no experimenta crecimiento. Por otro lado, la segunda subpoblación ($G(t)$) crece según la ecuación log-logística (ecuación (6)).

$$\frac{dNG}{dt} = 0$$

$$\frac{dG}{dt} = \mu_{max} \left[1 - \frac{G(t)}{N_{max}} \right] \cdot G(t) \tag{6}$$

McKellar posteriormente extendió este modelo implementando la transferencia de de la población $NG(t)$ a $G(t)$. En el nuevo modelo, consideró que en el momento de inoculación todos los microorganismos forman parte de la población $NG(t)$ ($G(t=0)=0$). El paso de la célula i a la población $G(t)$ viene determinado por la evolución de una variable $p_i(t)$. Esta variable es un indicador del estado fisiológico de cada célula, que decrece linealmente según la ecuación (7). Cuando $p_i = 0$, la célula i pasa a formar parte de la población $G(t)$ y crece siguiendo la ecuación log-logística.

$$\frac{dp_i}{dt} = -\mu_{max} \tag{7}$$

Uno de los principales problemas de este modelo es que la variable p_i es completamente empírica. De manera que la distribución de probabilidad empleada para sus valores iniciales es desconocida. McKellar et al. (2002a,b) observaron que el valor inicial del parámetro $p_{i,0}$ no depende de las condiciones del medio de crecimiento, lo que supone una ventaja considerable con respecto al modelo de Baranyi.

2.2 Modelos secundarios

Modelos secundarios para el ratio máximo de crecimiento

La relación entre μ_{max} y las condiciones ambientales se intentó describir inicialmente por medio de la ecuación de Arrhenius (Labuza y Riboh, 1982). Sin embargo, esta ecuación desde el punto de vista de la microbiología no se sustenta en ninguna base mecanística y es puramente empírica.

La tendencia actual consiste en la descripción de esta relación por medio de un modelo multiplicativo, en el que cada factor ambiental se considera independientemente (Rosso et al., 1995). Existen dos corrientes principales, que difieren en el punto en que se sitúa el origen de las condiciones ambientales. Los modelos secundarios similares al propuesto por Zwietering (1992) describen el ratio de crecimiento en función de la diferencia entre las condiciones ambientales actuales y las óptimas para el crecimiento. Por otro lado, modelos secundarios como el propuesto por Wijtzes et al. (1993) consideran la diferencia entre las condiciones ambientales y las condiciones teóricamente límites para el crecimiento. Es de destacar que estas condiciones límites son puramente teóricas y no reflejan el comportamiento real del microorganismo.

Modelos secundarios para la duración de la fase de adaptación

Inicialmente, los modelos secundarios para la duración de la fase de adaptación solamente consideraban las condiciones del medio de crecimiento ($\langle ENV_2 \rangle$). Sin embargo, observaciones posteriores mostraron la necesidad de considerar las condiciones del medio de incubación ($\langle ENV_1 \rangle$) para la descripción de la fase de adaptación.

El modelo secundario para la duración de la fase de adaptación más básico, en el que se basan muchos de los actuales, es el modelo de la raíz cuadrada de Ratkowsky et al. (1982) (ecuación (8)). Este modelo solamente considera la temperatura del medio de crecimiento (T) y una temperatura mínima necesaria para el crecimiento (T_{min}) desde el punto de vista teórico, de manera que las condiciones del medio de incubación no se tienen en cuenta.

$$\ln(\lambda) = \ln \left[\frac{1}{(b(T - T_{min}))^2} \right] \tag{8}$$

Otros autores han desarrollado modelos secundarios similares al de Ratkowsky para considerar la relación entre λ otros factores ambientales como el pH, la concentración de $NaNO_2$ o de $NaCl$. Tal y como mostró Robinson et al. (1998), la relación entre los diversos factores ambientales usualmente no es aditiva. Por lo tanto, las interacciones entre los diversos factores deben considerarse en el modelo secundario.

La influencia de las condiciones de preincubación en la duración de la fase de adaptación fueron estudiadas por Augustin et al. (2000). En este trabajo se inoculó una población de *Listeria monocytogenes* en un ambiente favorable para el crecimiento ($\langle ENV_1 \rangle$). A continuación, esta población se trasplantó a un nuevo medio aún más favorable ($\langle ENV_2 \rangle$). En la Fig. se representa la duración de la fase de adaptación en $\langle ENV_2 \rangle$ (λ_2) en función del tiempo de incubación de la población en $\langle ENV_1 \rangle$ (t_1).

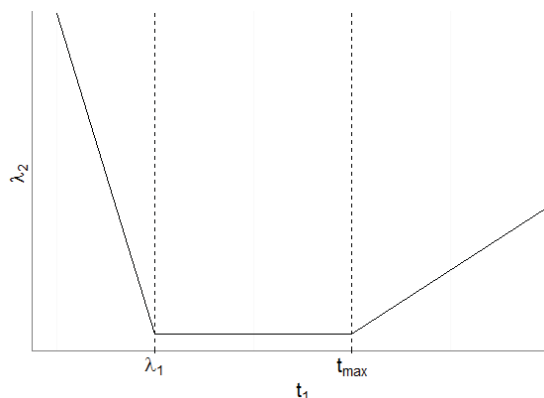


Fig. 2: Influencia de la duración del tiempo de preincubación (t_1) en el medio ($\langle ENV_1 \rangle$) en la duración de la fase de adaptación en el medio ($\langle ENV_2 \rangle$) (λ_2).

Si la población microbiana se encontraba en la fase de adaptación en el momento de la inoculación ($t_1 < \lambda_1$), la duración de la fase de adaptación en el segundo medio decreció linealmente con t_1 . Cuando

la población se encontraba en la fase exponencial en el momento de la inoculación, no se observó fase de adaptación. En aquellas observaciones en que t_1 es mayor que el tiempo en el que la población entra en la fase estacionaria (t_{max}), el valor de λ_2 creció linealmente con t_1 . Estos resultados demuestran la necesidad de considerar la historia del microorganismo para la determinación de la duración de la fase de adaptación.

5. Conclusiones

El cumplimiento de las exigencias actuales sobre calidad alimentaria y seguridad microbiológica requieren de la descripción detallada del comportamiento de la población microbiana durante el ciclo de vida del producto. Esto incluye la modelización del crecimiento de los microorganismos patógenos durante la conservación del alimento.

En esta contribución se han presentado los modelos primarios más utilizados actualmente para la descripción de crecimiento microbiano (Zwietering, Baranyi, Buchanan y McKellar). Además, se han descrito algunos modelos secundarios que relacionan los parámetros del primario con las condiciones ambientales.

Agradecimientos

La financiación para este proyecto fue proporcionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) del gobierno español y la European Regional Development Fund (ERDF) a través del proyecto AGL2013-48993-C3-1-R. Alberto Garre (BES-2014-070946) agradece al MINECO el contrato predoctoral concedido.

Referencias

- [1] Alavi, S.H., Puri, V.M. Knabel, S.J., Mohtar, R.H., Whiting, R.C., (1999) "Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk. J. Food Protect. 62 (2), 170-176.
- [2] Augustin, J.-C., Rosso, L., Carlier, V. (2000) "A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*". Int. J. Food Microbiol. 57, 169-181.
- [3] Baranyi, J., Roberts, T.A. (1994) "A dynamic approach to predicting bacterial growth in food" Int. J. Food Microbiol. 23, 277-294.
- [4] Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C. (1997) "When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves". Food Microbiol. 14, 313-326.
- [5] Gibson, A.M., N. Bratchell, Roberts, T.A. (1987) "The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry". J. Appl. Bacteriol.. 62, 479-490.
- [6] Labuza, T.P., Riboh, D, (1982) "Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient loss in foods". Food Technology 36, 66-74.
- [7] McKellar, R.C., (1997) "A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics". Int. J. Food Microbiol. 36, 179-186.
- [8] McKellar, R.C. (2001) "Development of a dynamic continuous-discrete-continuous model describing the lag phase of individual bacterial cells". J. Appl. Microbiol. 90, 407-413.
- [9] McKellar, R.C., Lu, X., Knight, K.P., (2002a) "Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*". Int. J. Food Microbiol. 73 (2), 127-135.
- [10] McKellar, R.C., Lu, X., Knight, J.P. (2002b) "Growth pH does not affect the initial physiological state parameter (p_0) of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 73 (2), 137-144.
- [11] Mellefont, L.A., Ross, T., (2003). "The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. Int. J. Food Microbiol. 83, 295-305.
- [12] Ratkowski, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A. (1982) "Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures". J. Bacteriol. 149 1-5.
- [13] Robinson T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M., (1998) "The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*". Int. J. Food Microbiol. 44, 83-92.
- [14] Rosso, L., Lobry, J.R., Bahard, S., Flandrois, J.P. (1995) "Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH". Appl. Environ. Microbiol. 61, 610-616.
- [15] Wijnztes, T., P.J. McClure, M.H. Zwietering, T.A. Roberts (1993) "Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature". Int. J. Food Microbiol. 18, 139-149.
- [16] Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and van't Riet K (1990). "Modeling of the Bacterial Growth Curve". Appl. Environ. Microb.. 56, 6, 1875-1881.
- [17] Zwietering, M.H., T. Wijnztes, J.C. de Wit, K. Van't Riet (1992). "A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods". J. Food Protect. 55, 973-979.