

**Inactivación de *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*
mediante la aplicación de tecnología de obstáculos***

**CAPITULO DE LIBRO para optar el título de Especialista en Alimentación y
Nutrición**

Mary Luz Castrillón R.

**Asesor
Jaime Andrés Cano S., PhD**

**CORPORACION UNIVERSITARIA LASALLISTA
Facultad de Ingeniería
Especialización en Alimentación y Nutrición
Caldas (Antioquia)
2013**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	5
1. MATERIALES Y MÉTODOS	7
1.1 Microorganismos y condiciones de crecimiento.....	7
1.2 Preparación del inóculo.	7
1.3 Preparación del mix de hongos previo a la inoculación de los microorganismos.	7
1.4 Segunda etapa. Experimentos de inactivación microbiana.....	8
1.5 Enumeración de células viables y lesionadas.....	9
1.6 Recuento de Esporas de Clostridium sulfito reductor.	9
1.7 Recuento de Mohos y Levaduras.	9
1.8 Recuento de E. coli por siembra en superficie.....	9
1.9 Diseño experimental.	9
1.10 Análisis estadístico.	10
2. ANÁLISIS DE RESULTADOS	11
2.1 Efecto del pH, la concentración de conservante y el tratamiento.....	11
3. DISCUSIONES.....	14
4. CONCLUSIONES.....	15
5. AGRADECIMIENTOS	177
REFERENCIAS	188

RESUMEN

El objetivo de esta investigación es la evaluación de la influencia simultánea del pH (3,8-4,0), el porcentaje de conservante (0,15- 0,30% m/m) y el tratamiento térmico (a 94°C) (15-35 min) en una conserva a base de hongos comestibles inoculada con *Candidaalbicans*(10⁵ UFC/mL), *Escherichiacoli* (10⁶UFC/mL) y *Clostridium perfringens* (10⁴ UFC/mL).

Se utilizó un diseño de superficie de respuesta Box Benhken para analizar los posibles efectos individuales y las interacciones entre los factores evaluados. El análisis estadístico mediante ANOVA mostró que tanto el pH como la concentración de conservantes, presentaron diferencias estadísticamente significativas para *E. coli*, en la cual se logró reducir de 4 - 6 log₁₀ (ciclos logarítmicos). Los niveles de estudio de los factores fueron efectivos para la inactivación de *C. albicans* y *C. perfringens* (vegetativo y esporulado), donde se presentó reducción de 5 log₁₀ y 4 log₁₀ respectivamente.

Por lo tanto la aplicación de tecnología de obstáculos mediante la combinación de factores en los rangos aplicados en ese producto, permiten realizar un control efectivo de microorganismos alterantes, patógenos, y esporulados en un producto en conserva a base de hongos comestibles.

Palabras clave: tecnología de obstáculo, *C. albicans*, *E. coli*, *C. perfringens*

SUMMARY

The aim of this study is the simultaneous assessment of the influence of pH (3.8 to 4.0), percentage of preservative (0.15 - 0.30% m / m) and heat treatment (at 94 ° C) (15-35 min) in base of preserves edible fungi inoculated with *Candida albicans* (10⁵ CFU / mL), *Escherichia coli* (10⁶UFC/mL) and *Clostridium perfringens* (10⁴ CFU / mL).

Statistical analysis used a response surface Box Benhken to analyze individual effects and interactions between the factors evaluated. Statistical analysis using ANOVA showed that both the pH and the concentration of preservative, showed statistically significance to *E. coli*, which was reduced from 4 to 6 log₁₀ (log units). The different levels between factors were effective in inactivating *C. albicans* and *C. perfringens* (vegetative and sporulated), which was presented reduction of 5 log₁₀ and 4 log₁₀ respectively.

Therefore the application of hurdle technology by combining factors applied in this product ranges, allow effective control of spoilage microorganisms, pathogens, and sporulated in a product based canned mushrooms.

Keywords: technology obstacle, *C. albicans*, *E. coli*, *C. perfringens*.

INTRODUCCIÓN

En aras de satisfacer las necesidades del mercado, la industria alimentaria se ha visto inclinada a diversificarse referente al uso de tecnologías de conservación tradicionales de cara a garantizar inocuidad sin detrimento de la calidad. Así pues, se hace menester la búsqueda incesante de innovación y vanguardismo de las metodologías de elaboración y estabilización de los alimentos respecto al beneficio del consumidor final. De este modo, surge la necesidad de abastecer satisfactoriamente las necesidades de un mercado cada vez más ágil, competitivo que busca el suministro constante de productos con mayores periodos de vida útil y calidad, independientemente de la temporada o disponibilidad de estos. Así pues, las empresas de conservas son una apuesta ideal de cara al abastecimiento de necesidades y gustos en rangos de tiempo incluso atípicos para determinados alimentos. Del mismo modo y no en segunda instancia, se reitera la búsqueda de opciones para alargar la vida útil de diferentes matrices alimentarias, garantizando al mismo tiempo las más óptimas condiciones microbiológicas, nutricionales y sensoriales.

Tanto la esterilización como la pasteurización son los métodos térmicos más comúnmente aplicados para la conservación de alimentos. Pero la aplicación de estos tratamientos térmicos severos en muchos caso van en detrimento de la calidad de los alimentos debido a la degradación de compuestos termolábiles tales como las vitaminas y flavonoides, del mismo modo estos tratamientos generan reacciones de maillard, las cuales producen sabores y colores indeseables. Surgen entonces métodos alternativos tales como la acidificación y el tratamiento térmico, que son ampliamente utilizados en conservas,¹ sin embargo, determinados tipos de bacterias pueden ser tolerantes a dichas condiciones adversas.²

Los alimentos acidificados, según la Resolución 2195 de 2010 del Ministerio de Protección social de Colombia, define como: *alimentos de baja acidez a los cuales se les añade ácido o alimentos ácidos para reducir su pH; estos alimentos tienen una actividad de agua (a_w) mayor a 0.85 y un pH en equilibrio final de 4.6 o menor.* Dicha norma indica que los productos tipo conserva que son sometidos a tratamientos térmicos y sellados herméticamente deben cumplir con esterilidad comercial, definida como: *la condición alcanzada por la aplicación de calor dejando al alimento libre de microorganismos capaces de reproducirse en condiciones normales de almacenamiento, distribución, no refrigerada, y libre de microorganismos viables (incluyendo esporas) de importancia para la salud pública.*³

Prácticamente todas las matrices alimentarias son un excelente vehículo para el transporte de microorganismos; debido a la presencia de agua y nutrientes que

son el sustrato básico para la generación de un ambiente favorable para el crecimiento natural de bacterias en un periodo muy corto de tiempo.⁴

En cuanto a los microorganismos de origen alimentario que son de interés en la industria conservera y particularmente en este trabajo, se evaluó el comportamiento de cepas tales como: *Candidaalbicans*; típica levadura presente en la descomposición de alimentos, principalmente los que presentan alto contenido de ácido, sal y azúcar,² condiciones presentes en el producto evaluado. En cuanto a la *Escherichiacoli*, diferentes estudios han demostrado la capacidad de este microorganismo para sobrevivir en los productos vegetales ácidos⁵, del mismo modo, Mazzotta (2001), determinó que la especie O157: H7 es el patógeno más resistente al calor y a los ácidos en estudios realizados en zumos de diferentes frutas. Finalmente, el bacilo esporulado,⁶ patógeno, *Clostridium perfringens* causante de importantes enfermedades histotóxicas y gastrointestinales (GI) en humanos y animales,⁷ se evaluó en este estudio porque puede ser comparado con *Clostridium botulinum*, ya que ambos microorganismos pertenece al grupo de los clostridios, con características específicas de termorresistencia, y condiciones extremas.

Por lo tanto las diferentes barreras interpuestas en los productos tales como: bajo pH, a_w , presencia de conservantes, aplicación de tratamiento térmico, pueden limitar el crecimiento vegetativo, pero no asegurar la no letalidad del patógeno. Como ejemplo de esto se ha documentado que *C. perfringens* puede sobrevivir en condiciones de estrés y temperaturas aproximadas a 100° C por 1 h, esto se atribuye a la formación de esporas resistentes al calor².

Con base a lo anterior, se han evaluado las tecnologías de obstáculos como un concepto clave en la elaboración de alimentos económicos, seguros, estables, nutritivos y de óptimas características sensoriales. Este concepto no es nuevo, en el pasado se usó la combinación de factores para extender la vida útil de los alimentos.⁴ Una combinación de obstáculos puede asegurar la estabilidad y seguridad microbiana de los alimentos en conserva. Los más importantes obstáculos aplicados en la conservación de alimentos son la temperatura (Alta o baja), la actividad de agua, la acidez, el potencial redox, conservantes y microflora competitiva. Cada obstáculo implica poner los microorganismos en un ambiente hostil, que inhibe su crecimiento o provoca su muerte.⁸

El objetivo de esta investigación fue evaluar la aplicación de tecnologías de obstáculos buscando la inactivación de *Escherichiacoli*, *Candidaalbicans* y *Clostridium perfringens* usando dos niveles de pH, concentración de conservantes y tiempo de pasteurización para un mix de hongos (*Pleurotostreatus*, *Lentinulaedodes* y *Agaricusbisporus*) en conservas envasadas en vidrio.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria – INTAL, ubicada en Itagüí, Antioquia.

1.1 Microorganismos y condiciones de crecimiento.

Para el estudio se seleccionaron Cepas ATCC de concentración conocida disponibles en el cepario del Laboratorio Microbiológico de la Fundación INTAL: *Escherichiacoli* ATCC 8739, *Clostridium perfringens* ATCC 13124 y *Candidaalbicans* ATCC 10231.

1.2 Preparación del inóculo.

A partir de los frascos liofilizados (E power™ Microorganismos) de *Escherichiacoli* ATCC 8739, *Clostridium perfringens* ATCC 13124 y *Candidaalbicans* ATCC 10231 mantenidos a una temperatura entre 2°C a 8°C, se tomó un pellet de cada microorganismo y se rehidrató con 10 mL de agua peptonada tamponada a pH de 7,2 a una temperatura entre 34°C a 38°C. Posteriormente, se colocó la suspensión de cada microorganismo en incubación a 35°C (KryovenDies), durante 2 horas para asegurar completa hidratación. Después de la incubación, se mezcló el material hidratado para conseguir una suspensión homogénea y la distribución equitativa de la cepa en toda la suspensión hidratada. Por último, se sembró por triplicado la suspensión de cada microorganismo en agar Tripticasa de Soya y se incubó a 35°C +/- 2°C por 18-24 horas; para verificar la concentración inicial de cada microorganismo usada como inóculo.

1.3 Preparación del mix de hongos previo a la inoculación de los microorganismos.

Se usó la aleatoriedad del diseño establecido para tres factores y dos niveles, que son: el pH (3,8 y 4,0), la concentración de conservante (0,15 y 0,30%) y el tiempo de pasteurización (15 y 35 minutos), rangos seleccionados mediante ensayos previos.

Los mix de hongos a inocular se elaboraron en dos etapas: la primera, consta del acondicionamiento de las materias primas, escaldado de los hongos: Shiitake (*Lentinula edodes*), Orellanas (*Pleurotus ostreatus* ssp.) y champiñones (*Agaricus bisporus*), se mezclaron con: proteína de soya de una marca comercial, paste de tomate, almidón y especias, posteriormente se agregó el conservante-

mezcla marca TECNAS S.A., con un contenido mayoritario de nisina y ácido láctico). Se ajustó el pH con ácido cítrico marca TECNAS S.A., usando un pH metro marca SCHOTT- Instruments Modelo, HANDYLAB PH12, serial: 11370659, previamente calibrado; se llevó a temperatura de envasado hasta 55°C (temperatura establecida en un bajo nivel para evaluar condiciones extremas de procesamiento), cada tratamiento se realiza independiente y se ajustan a los niveles de los factores a arrojados por el diseño experimental, y en el orden aleatorizado especificado por el software DesignExpert 8.0.6.

1.4 Segunda etapa.Experimentos de inactivación microbiana.

Los inóculos preparados se adicionaron al mix de hongos en las siguientes concentraciones: *E. coli* 17×10^6 UFC/mL, *C. perfringens* 22×10^4 UFC/mL y *C. albicans* 33×10^5 UFC/mL, de cada microorganismo se adicionó 1mL/kg de muestra a una temperatura de 55°C.

Posteriormente se mezcló el producto con una cuchara estéril y se envasó 125 g de la conserva en recipientes de vidrio estériles y se sellaron, los envases cerrados herméticamente se desinfectaron externamente con amonio cuaternario a 1000 ppm marca TECNAS S.A. y por último se pasteurizaron a 94 °C en una marmita a vapor de 50 Litros, marca CI TALSA, serie MV50, a 15, 25 y 35 minutos, posteriormente fueron sumergidos en agua fría, para realizar choque térmico y fueron incubados a 35 y 45°C, se realizó seguimiento en los días cero, 7, 14, 21 y 28.

1.5 Enumeración de células viables y lesionadas.

Para realizar los análisis microbiológicos de las muestras inoculadas, se pesaron 10 g de cada tratamiento y se diluyeron en 90 mL de agua peptona estéril al 1,5% la cual corresponde a la dilución 10^{-1} , luego se transfirió 1 mL de esta dilución a 9 mL de agua peptonada estéril la cual corresponde a la concentración 10^{-2} . Posteriormente se realizaron los análisis para cada microorganismo de prueba:

1.6 Recuento de Esporas de Clostridium sulfito reductor.

Este análisis, es considerado como el recuento indicador más importante de las bacterias anaeróbicas espora formadoras. Para esto, se sembró 1 mL de la dilución 10^{-1} y 10^{-2} en un tubo de ensayo estéril, se sometió a 80°C durante 10 minutos en un baño serológico, luego se realizó choque térmico en agua fría y por último se adicionó 10 mL de agar SPS (Sulfato PolimixinaSulfadiacina), se dejó solidificar el agar y se selló con 1 mL del mismo medio de cultivo para generar condiciones de anaerobiosis. Se incubó en anaerobiosis en una jarra OXOID a $35^{\circ}\text{C}/72\text{h}$ (KryovenDies). El resultado es positivo cuando se evidencian colonias negras, producción de H_2S , algunas veces producción de gas y segmentación del medio de cultivo.

1.7 Recuento de Mohos y Levaduras.

Se sembró 1 mL de la dilución 10^{-1} y 10^{-2} en profundidad en cajas de Petri totalmente estériles, se adicionó 15 mL de agar YGC (Yeast Glucosa Cloranfenicol). Se incubó a $25^{\circ}\text{C}/3-5$ días en una incubadora Memmert. Se reportan como levaduras las colonias que macroscópicamente se evidencian blancas, cremosas, convexas y de forma regular.

1.8 Recuento de E. coli por siembra en superficie.

Para este recuento se sembró 0.1mL de la dilución 10^{-1} y 10^{-2} en superficie, en Agar Chromocult *E. coli* (Sharlau). Se incubó a $35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ en una incubadora KryovenDies. Pasado este tiempo se realizó la lectura de las colonias de color azul violeta.

1.9 Diseño experimental.

Se utilizó un diseño de superficie de respuesta Box Benhken para analizar los posibles efectos individuales y las interacciones entre el pH, la concentración de conservante, y el tiempo de pasteurización en la inactivación de los microorganismos inoculados mediante los métodos combinados. Las variables

independientes fueron pH 3,8 a 4,0 (valores muy propios del producto, acidificado), concentración de conservante-mezcla 0,15%- 0,30% (límite superior es el máximo sugerido por el proveedor) y el tiempo de tratamiento térmico a 94°C, 15 y 35 minutos. El punto central que consiste en un pH: 3,9, % de conservante 0,225% y 25 minutos de tratamiento térmico se repitió tres veces para estimar la varianza debida a la variabilidad experimental y a la aleatoriedad del diseño. Todos los experimentos se realizaron de manera independiente conservando la aleatorización asignada por el diseño para excluir los posibles efectos perturbadores de las condiciones ambientales.

1.10 Análisis estadístico.

Se determinó la influencia del pH, la concentración de conservante y el tiempo de pasteurización en la inactivación de los microorganismos, los resultados obtenidos fueron analizados mediante ANOVA, usando el software StatgraphicsCenturionXV.11.; el pH y la concentración del conservante mostraron diferencias estadísticamente significativas para el recuento de *E. coli*, mientras para *Candida albicans* y *Clostridium perfringens* no se presentó diferencias entre los diferentes tratamientos aplicados.

El diseño central compuesto, como superficie de respuesta Box Benhken, se llevó a cabo utilizando el paquete de software de diseño-Expert 6.0.6 (Stat-Ease Inc.)

2. ANÁLISIS DE RESULTADOS

2.1 Efecto del pH, la concentración de conservante y el tratamiento.

La tabla 1. Muestra la reducción de ciclos logarítmicos obtenidos para *E. coli*, bajo las condiciones experimentales investigadas (pH, concentración de conservante y tratamiento térmico aplicado, ver tabla 1.). Se obtuvo una reducción de *E. coli* desde 3 ciclos logarítmicos en los tratamientos 1, 7 y 10, de 4 ciclos logarítmicos en los tratamientos 1, 2, 3, 7, 8 y 11, mientras en los tratamientos 4, 5, 6, 9, 12, 13, 14 y 15, se observó una inactivación de 6 ciclos logarítmicos en el recuento de *E. coli*(UFC).

Al realizar el análisis estadístico, se observó que el pH y la concentración de conservante presentaron diferencia estadísticamente significativa sobre el crecimiento de *E. coli*. A pesar que el rango de pH seleccionado es corto, este intervalo seleccionado presentó efecto positivo sobre la inactivación del microorganismo.

Algunos autores como Huang y Chen, 2011, atribuyen la inhibición del crecimiento de microorganismos a algunos ácidos débiles, debido a que estos afectan la homeostasis, por el estrés generado por el pH a nivel intracelular y a la acumulación de aniones tóxicos.⁹Akbas y Ölmez, 2007 y Laury et al., 2009 indican que el uso de ácidos suaves como el ácido láctico, ácido acético y el ácido cítrico pueden inhibir el crecimiento de *E. coli* O157: H7.

La temperatura de incubación del producto no presentó diferencias significativas sobre los recuentos de este microorganismo ya que a 45 °C se presentó un mayor crecimiento de *E.coli* frente a los resultados obtenidos a 35 °C.

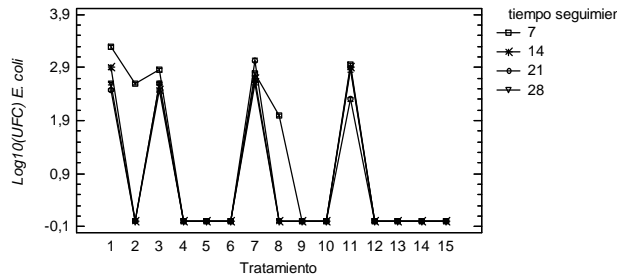
Dado el diseño experimental propuesto las combinaciones de factores fueron efectivas para la inactivación de las cepas inoculadas en el producto de *Candidaalbicans* ATCC 10231 y *Clostridium perfringens* ATCC 13124., para este último se evaluó tanto en su forma vegetativa como esporulada.

Tabla 1. Resultados del diseño experimental para la inactivación de *E. coli*, usando una combinación de factores en una conserva de hongos comestibles.

Diseño experimental					Reducción en ciclos logarítmicos de <i>E. coli</i>								
TTO	pH	%Con	tpo (min)	Inóculo <i>E. coli</i> (UFC)	Día cero	Día 7/ 35°C	Día 7/ 45°C	Día 14/ 35°C	Día 14/ 45°C	Día 21/ 35°C	Día 21/ 45°C	Día 28/ 35°C	Día 28/ 45°C
1	3,9	0,15	15	10 ⁶	6log ₁₀	4 log ₁₀	3log ₁₀	3log ₁₀	4 log ₁₀	4 log ₁₀	4 log ₁₀	4 log ₁₀	4 log ₁₀
2	3,9	0,3	35	10 ⁶	6log ₁₀	6log ₁₀	4log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀
3	3,9	0,15	35	10 ⁶	6log ₁₀	4 log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀
4	4	0,15	25	10 ⁶	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀
5	4	0,23	15	10 ⁶	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀
6	3,8	0,3	25	10 ⁶	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀
7	4	0,3	25	10 ⁶	6log ₁₀	3log ₁₀	4 log ₁₀	6log ₁₀	4log ₁₀	6log ₁₀	3log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀
8	3,8	0,23	15	10 ⁶	6log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀	6log ₁₀	4log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀
9	3,9	0,3	15	10 ⁶	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀
10	3,8	0,23	35	10 ⁶	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	3log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀
11	3,9	0,23	25	10 ⁶	6log ₁₀	4 log ₁₀	4 log ₁₀	6log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀	4log ₁₀
12	3,8	0,15	25	10 ⁶	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀
13	4	0,23	35	10 ⁶	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀
14	3,9	0,23	25	10 ⁶	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀
15	3,9	0,23	25	10 ⁶	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀	6log ₁₀

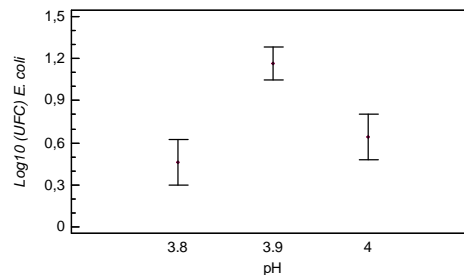
TTO: tratamiento, % Cons: Porcentaje de conservante, tpo: tiempo, min: minutos

Figura 1. Comportamiento de los tratamientos en el recuento de *E. coli* durante el tiempo de seguimiento de una conserva de hongos comestibles.



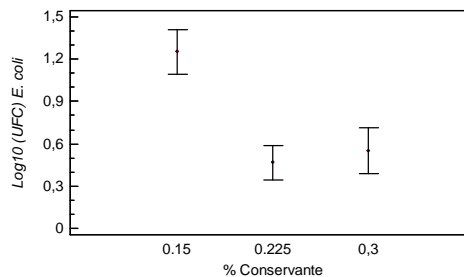
En la figura 1 se observa el crecimiento de *E. coli*, en los tratamientos, durante el tiempo de seguimiento en los días 7, 14, 21 y 28. También se puede ver que, en los tratamientos 4, 5, 6, 9, 12, 13, 14 y 15 no se presentó crecimiento de este microorganismo.

Figura 2. Efecto del pH en el recuento de *E. coli* (log10) ATCC8739, en conserva de hongos comestibles pasteurizada.



El pH en el análisis de datos mostró diferencia estadísticamente significativa en el recuento de *E. coli*, se pudo observar que, a un pH de 3,8 se presentó un menor recuento del microorganismo, mientras que a un pH de 3,9 que es el rango intermedio, hubo un mayor conteo de *E. coli*.

Figura 3. Efecto de la concentración de conservante en el recuento de *E. coli* (log10) ATCC8739 en una conserva de hongos comestibles.



La concentración de conservante fue un factor importante en la reducción del recuento de *E. coli*, al parecer un efecto sinérgico entre los tres factores pudo influir en este, sin embargo, se ve claramente como el porcentaje de conservante donde se obtuvo un menor crecimiento de este microorganismo, se presentó en el nivel intermedio de concentración.

3. DISCUSIONES

El pH y la concentración del conservante presentaron diferencias estadísticamente significativas en el recuento de *E. coli*, sin embargo, y a diferencia de *C. albicans* y *C. perfringens*, este microorganismo si presentó crecimiento y una menor inhibición. De acuerdo con algunos estudios la mayoría de los patógenos transmitidos por los alimentos son susceptibles al efecto letal de un bajo pH.^{10, 11}

Encontrándose que autores como Han y Linton (2004) y en otros estudios han informado que *E. coli* O157:H7 sobrevive bien a valores de pH por debajo de 3,4 y ha estado implicado en varios brotes por en frutas y jugos ácidos.⁹ También Holck, 2001, reporta que varias cepas de *E. coli* O157:H7 han demostrado sobrevivir en ambientes ácidos (pH = 1,5-3,0) que son similares a los niveles de pH encontrados en el jugo gástrico de los seres humanos. La inhibición del crecimiento y la supervivencia dependen del tipo de ácido utilizado.¹⁰

El pH y la concentración de conservante fueron los dos factores que presentaron diferencia estadísticamente significativa sobre el crecimiento de *E. coli*. Lográndose para *E. coli*, una reducción de 6 ciclos logarítmicos en 8 tratamientos (4, 5, 6, 9, 12, 13,14 y 15).

Durante el estudio, *E. coli* demostró cierta resistencia a los tratamientos combinados de conservación, esto como resultado de la rápida adaptación del microorganismo a los cambios ambientales tales como las altas temperaturas. Según Yura, et al. (1993), en respuesta a los cambios de temperatura un conjunto de genes conservados, denominados genes de choque térmico (del inglés heat shock genes), son inducidos para la producción de proteínas Hsps. Estas proteínas son chaperonas moleculares (Dnak, GroEL, entre otras), que juegan un papel importante en el plegamiento, ensamble, transporte y reparación de las proteínas bajo condiciones de estrés y no estrés, permitiendo cambios en las propiedades de la membrana externa de *E. coli* (fluidez) y de esta manera la termorresistencia del microorganismo.^{12,13}

En ninguno de los tratamientos se presentó crecimiento de células viables de *C. albicans* y *C. perfringens*. En el caso del primer microorganismo, las levaduras son capaces de crecer a valores de pH más bajo que las bacterias, un rango entre 2,0 y 8,5, condición por la cual se utilizó como indicador de calidad en este producto; pero debido a su baja termorresistencia, son inhibidas fácilmente en aquellos productos donde se aplican tratamientos térmicos.² Por otra parte *C. perfringens* es un microorganismo con un amplio rango de temperatura de crecimiento (6-50 °C), y un rango de pH óptimo entre 6.0 - 7.0,¹⁴ estas características demuestran la sensibilidad del microorganismo en medios ácidos, resultando en la inhibición del microorganismo por el efecto sinérgico de los ácidos orgánicos (ácido cítrico y acético), la temperatura y la actividad bacteriostática del conservante (0,15-0,30% INBAC).

Las esporas de *C. perfringens*, no se desarrollaron en ninguno de los tratamientos, las combinaciones de factores establecidas por el diseño fueron efectivas para la inactivación de la respuesta del microorganismo para la formación de la espora termorresistente.

Las esporas se forman de tal manera que permanecen viables en condiciones desfavorables. Esto se logra aumentando su resistencia a ambientes extremos y reduciendo la actividad metabólica hasta la latencia.

Los diferentes microorganismos responden de manera diferente hacia el estrés provocado por el medio ambiente a que están expuestos. Esta es la razón por la que ciertos microorganismos o grupos de microorganismos están generalmente implicados con brotes que involucran tipos específicos de alimentos. El efecto antimicrobiano de estos factores puede combinarse para obtener el nivel deseado de estabilidad y seguridad en un producto.¹⁵

Según Vanderzant (1992), a los productos con pH de 4,6 o mayor son sometidos a tratamientos que involucran altas temperaturas y presión hasta obtener niveles de esterilidad comercial, pero aquellos productos con valores de pH menores a 4,6 son sometidos a tratamientos próximos a 100°C.¹⁶ alcanzando resultados similares de inocuidad. En este contexto, la combinación de los factores utilizados para la conservación del producto inoculado, resultó efectivo en la inhibición del desarrollo y crecimiento de *C. albicans* y *C. perfringens*, durante los 28 días del estudio, en 5log₁₀ UFC/g y 6log₁₀ UFC/g respectivamente.

4. CONCLUSIONES

La combinación de factores aplicados para la conservación del producto mix de hongos, mostró una mayor influencia en la inactivación microbiana de *C. albicans* y *C. perfringens*; donde todas las combinaciones de factores (tratamientos) fueron efectivas. En ninguno de los tiempos de seguimiento a las diferentes temperaturas de incubación se presentó crecimiento y/o desarrollo de estos dos microorganismos, por lo tanto se obtuvo una efectiva inactivación de la levaduras y de las esporas de *C. perfringens*.

E. colies una de las bacterias más resistente a las condiciones adversas del medio, debido a su capacidad para adaptarse rápidamente a los cambios del medio induciendo la expresión de genes de choque térmico (HSG) que le proveen de mecanismo de resistencia a los tratamientos térmicos y bajos niveles de pH, sin embargo algunas combinaciones de tratamientos fueron letales para este, tal como se describió anteriormente.

Se sugiere emplear rangos de pH más amplios, con el fin de evaluar la influencia de este factor en la inactivación de estos microorganismos particularmente, desde la zona de riesgo.

En productos con pH por debajo de 4,6 difícilmente pueden crecer y desarrollarse diversos microorganismos, lo que ocurre con las esporas de *C. perfringens*, que no logran repararse a los distintos tratamientos combinados de conservación provocando el agotamiento metabólico de este.

5. AGRADECIMIENTOS

Al convenio CO. 290/2011 celebrado entre la Fundación INTAL y COLCIENCIAS por el financiamiento de las actividades de investigación.

Al personal del laboratorio de microbiología y del CIE de la Fundación INTAL por el apoyo y compromiso.

A mi esposo y mi pequeño Martín por su amor, apoyo y comprensión.

REFERENCIAS

1. LUCAS, R.; et al. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. En: *Food and Chemical Toxicology*. May 2006. Vol. 44, p.1774 - 1781.
2. RAY, Bibek y BHUNIA, Arun. *Fundamentos de la microbiología de los alimentos*, cuarta edición, McGraw Hill, Mexico, 2008. Páginas 29, 53, 263, 266.
3. COLOMBIA, MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL, Resolución 2195 de 2010 (11, junio de 2010). Reglamento técnico sobre los requisitos que se deben cumplir durante el proceso térmico de alimentos envasados herméticamente de baja acidez y acidificados, que se fabriquen, transporten, expendan, distribuyan, importen, exporten y comercialicen para el consumo humano. Disponible en www.invima.gov.co. 19 de Agosto de 2010. P. 4.
4. BARBOSA CÁNOVAS, Gustavo V. y BERMÚDEZ AGUIRRE, Daniela. Procesamiento no térmico de alimentos. En: *Scientia Agropecuaria*. Enero 2010. No 1, p 81 – 93.
5. SALDAÑA, G.; et al. Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields. En: *Food Research International*. Marzo 2012. No. 45. P. 1080 -1086.
6. ESPINA Laura María; et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. En: *International Journal of Food Microbiology*. July 2012. No. 159 p. 9 -16.
7. CHAWLA, S.P.; CHANDER, Ramesh y SHARMA Arun. Safe and shelf-stable natural casing using hurdle technology. En: *Food Control*. 2006. No. 17, P. 127-131.
8. TAJKARIMI, Mehrdada IBRAHIM, Salam A. Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. En: *Food Control*. 2011 22801 – 22804.
9. HUANG, Yaoxiny CHEN, Haiqiang. Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. En: *Food Control*. 2011. No. 22, p. 1178-1183.
10. HOLCK, Askild L.; et al. Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages. En: *Meat Science*. 2011. No. 89, p. 286-295.
11. LEE, Sun Young y KANG, Dong Hyun. Combined effects of heat, acetic acid, and salt for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory media. En: *Food Control*. 2009. No. 20, p. 1006-1012.
12. YURA, T., H., Nagai y H. Mori. Regulation of the heat-shock response in bacteria. In: *Annu rev microbial*. 1993. Vol. 47, p. 321-350.

13. SHIGAPOVA, Natalia V., Alteration of membrane physical state regulates the *E. coli* heat-shock response. Ph. D. Thesis. Hungria. Instituto of Biochemistry, Biological Research centre. 2004, p.21.
14. JUNEJA, Vijay K. Delayed *Clostridium perfringens* growth from a spore inocula by sodium lactate in sous vide chicken products. En: Food Microbiology. 2006, No. 23. P. 105 -111.
15. GABRIEL, Alonzo A. y NAKANO, Hiroyuki. Responses of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 1/2 c and *Salmonella enteritidis* to pH, aw and temperature stress combinations. En: Food Control. 2010. Vol. 21, p. 644–650.
16. AKBAS, M. Y. y ÖLMEZ, H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. En: Letters in Applied Microbiology. 2007. Vol. 44, p. 619-624.
17. LAURY, A. M.; et al. Validation of a lactic acid- and citric acid-based antimicrobial product for the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on beef tips and whole chicken carcasses. En: Journal of Food Protection. 2009. No. 72, p. 2208 - 2211.
18. SPLITTSTOESSER, Vanderzant C. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, DC. 1992.
19. AKHTAR, Saeed; *et al.* Strategy to inactivate *Clostridium perfringens* spores in meat products. En: Food Microbiology. June 2009. No. 26, p. 272 – 277.