

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

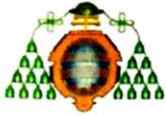
**Seguridad alimentaria: desarrollo de
microorganismos en ovoproductos**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

MARTA SÁNCHEZ SUÁREZ-OTERO

JULIO, 2017



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Mario Díaz Fernández (Universidad de Oviedo)

Dra. Dña. Amanda Laca Pérez (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que Dña. **Marta Sánchez Suárez-Otero** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11ª promoción curso 2016-2017.

Oviedo, 11 de Julio de 2017

D. Mario Díaz

Dña. Amanda Laca

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario Díaz Fernández, por darme la oportunidad de trabajar en el grupo de Tecnología de Bioprocesos y Reactores en la unidad de Tecnología Alimentaria.

A las Dras. Amanda y Adriana Laca, por el interés y tiempo invertido. Por sus ideas y consejos. Por hacerme sentir cómoda y estar siempre disponibles dentro y fuera de su horario de trabajo. Por su dedicación y paciencia.

A mis compañeros del máster, por hacer más amenas todas las horas de estudio y trabajo.

A mi familia, por su apoyo durante todos estos meses. Por estar siempre ahí.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Lista de Figuras.....	3
Lista de Tablas.....	5
Lista de abreviaturas.....	6
1. Introducción.....	7
2. Fundamentos teóricos.....	10
2.1. Enfermedades de transmisión alimentaria.....	10
2.1.1. Causas de enfermedades alimentarias.....	11
2.2. Huevos y ovoproductos.....	15
2.2.1. Estructura y composición del huevo.....	15
2.2.2. Huevos y ETA.....	17
2.3. Métodos para controlar el desarrollo de microorganismos en alimentos.....	19
2.3.1. Frio.....	20
2.3.2. Calor.....	21
2.3.3. Modificación del contenido en agua.....	22
2.3.4. Uso de aditivos.....	22
2.3.5. Otros métodos de conservación.....	23
2.4. Modelos predictivos en seguridad alimentaria.....	23
2.4.1. Microorganismos modelo.....	24
2.4.2. Alimentos modelo.....	26
2.4.3. Desarrollos matemáticos.....	27
2.5. Caracterización estructural de muestras alimentarias.....	27
3. Material y métodos.....	30
3.1. Cepa bacterianas y condiciones de cultivo empleadas.....	30
3.1.2. Condiciones de cultivo.....	30
3.1.2.1. Medio líquido.....	30

3.1.2.2. Medio sólido	32
3.2. Pruebas de reología	34
3.2.1. Barrido de esfuerzo	34
3.2.2. Barrido de frecuencia	35
3.3. Microscopía.....	35
4. Resultados.....	37
4.1. Medio líquido.....	37
4.1.1. Efecto de la composición del huevo.....	37
4.1.2. Efecto del oxígeno	37
4.2. Medio sólido	41
4.2.1. Caracterización del alimento sólido	41
4.2.1.1. Ensayos reológicos.....	41
4.2.1.2. Microscopía.....	46
4.2.2. Desarrollo del microorganismo en medio sólido	49
4.2.2.1. Efecto de la posición	49
4.2.2.2. Efecto de la temperatura de cocción	51
4.2.2.3. Efecto de la temperatura de conservación.....	54
5. Conclusiones.....	59
6. Bibliografía.....	60

RESUMEN

En los últimos años la preocupación de los consumidores por la aparición de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) ha conllevado el desarrollo de la seguridad alimentaria que engloba aquellas medidas destinadas a garantizar la inocuidad y calidad de los alimentos. En España la producción industrial de huevos y ovoproductos ha experimentado un notable incremento. Aproximadamente el 40% de intoxicaciones alimentarias en nuestro país son debidas al consumo de estos alimentos, lo que ha supuesto la puesta en marcha de acciones que aseguren la seguridad y el control durante toda la cadena de producción.

El objetivo de este trabajo ha sido analizar la supervivencia y desarrollo de microorganismos patógenos en huevo y ovoproductos bajo diversas condiciones, empleando como microorganismo modelo *Staphylococcus warneri*. Para ello se estudió el desarrollo del microorganismo en medios líquidos y sólidos. Se analizó también el efecto de la temperatura sobre la estructura del alimento sólido modelo. Se han empleado para ello, técnicas de cultivo en placa y microscópicas así como ensayos reológicos.

Conforme a los resultados obtenidos, el cultivo del microorganismo modelo en medio líquido preparado a partir de huevo entero, alcanzó valores de crecimiento menores que en yema, debido al efecto antimicrobiano de la clara. En cuanto al crecimiento microbiano en ovoproductos sólidos, se observó el efecto que la disponibilidad de oxígeno presentaba en el alimento considerando los resultados obtenidos en distintas posiciones. Asimismo se estudió el efecto de la temperatura de cocción y conservación sobre la evolución del microorganismo considerado como modelo.

ABSTRACT

In the last years, consumers concern about the occurrence of foodborne diseases has implied the development of food security including measures aimed to ensure the safety and quality of foods. In Spain, the industrial production of eggs and egg derivatives has suffered a remarkable increase. Approximately, 40% of food poisoning in our country is due to the consumption of these foods, which has meant the implementation of actions to ensure safety and control throughout the production chain.

The aim of this work has been to analyze the survival and development of pathogenic microorganisms in eggs and eggs derivatives under different conditions, using *Staphylococcus warneri* as model bacterium. The development of the microorganism was studied in liquid and solid media. The effect of temperature on the solid food structure was also analyzed. Microbiological cultures, microscopic techniques as well as rheological tests have been used for this purpose.

Results showed that the culture of the model microorganism in liquid medium prepared with whole egg reached values of growth lower than in yolk due to the antimicrobial effect of the egg white. Regarding the microbial growth in solid egg products, the effect of the oxygen availability on the food was observed by considering the results obtained in different positions. The effect of cooking and conservation temperatures on the development of the microorganism considered as model was also studied.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Claves para la prevención de ETA (OMS).....	12
Figura 2. Microorganismos causantes de ETA (FDA)	13
Figura 3. Microorganismos causantes de ETA (FDA).....	14
Figura 4. Corte transversal de huevo de gallina.....	15
Figura 5. Estructura de la cáscara de huevo.....	16
Figura 6. Curva de congelación de una solución.....	21
Figura 7. Bote para anoxia.....	31
Figura 8. Tortillas.....	33
Figura 9. Reómetro modelo HAAKE Mars II.....	34
Figura 10. Microscopio automático Olympus BX61.....	35
Figura 11. Crecimiento a 20°C en huevo entero diluido en diferentes condiciones de oxígeno.	38
Figura 12. Ajustes en fase exponencial para crecimiento a 20°C en aerobiosis.....	39
Figura 13. Ajustes en fase exponencial para crecimiento a 20C en hipoxia.....	40
Figura 14. Ajustes en fase exponencial para crecimiento a 20°C en anoxia.....	40
Figura 15. Barrido de esfuerzo.....	42
Figura 16. Barrido de frecuencia de tortillas sin cocer.....	42
Figura 17. Barrido de esfuerzo de tortillas cocidas a 60°C.....	43
Figura 18. Barrido de frecuencia de tortillas cocidas a 80°C.....	43
Figura 19. Barrido de frecuencia de tortillas cocidas a 100°C.....	43
Figura 20. Ajustes en fase exponencial de tortillas sin cocer.....	44
Figura 21. Ajustes en fase exponencial de tortillas cocidas a 60°C.....	45
Figura 22. Ajustes en fase exponencial de tortillas cocidas a 80°C.....	45
Figura 23. Ajustes en fase exponencial de tortillas cocidas a 100°C.....	46
Figura 24. A. Estructura de patata sin cocer. B. Estructura de patata cocida a 60°C durante 8 minutos. C. Detalle de célula de patata sin cocer. D. Detalle de célula de patata cocida.....	47
Figura 25. <i>Staphylococcus warneri</i> en medio líquido.	48
Figura 26. <i>S. warneri</i> inoculado en tortilla.....	48
Figura 27. Tinción con fluorocromos de células de <i>S. warneri</i>	49
Figura 28. Crecimiento de <i>S. warneri</i> en tortillas a 60°C e incubadas a 20°C.....	50
Figura 29. Crecimiento de <i>S. warneri</i> en tortillas a 80°C e incubadas a 20°C.....	52

Figura 30. Crecimiento de <i>S. warneri</i> en tortillas a 100°C e incubadas a 20°C.....	52
Figura 31. Ajustes en fase exponencial de tortillas a 60°C e incubadas a 20°C.....	53
Figura 32. Ajustes en fase exponencial de tortillas a 80°C e incubadas a 20°C.....	53
Figura 33. Ajustes en fase exponencial de tortillas a 100°C	54
Figura 34. Crecimiento de <i>S. warneri</i> en tortillas incubadas a 30°C.	55
Figura 35. Crecimiento de <i>S. warneri</i> en tortillas incubadas a 6°C.....	55.
Figura 36. Crecimiento de <i>S. warneri</i> en tortillas incubadas a 20°C.....	56.
Figura 37. Ajustes en fase exponencial de tortillas incubadas a 30°C.....	56
Figura 38. Ajustes en fase exponencial de tortillas a 6°C.....	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ en experimentos en medio líquido.....	41
Tabla 2. Parámetros A y z obtenidos a partir de los barridos de frecuencia.....	46
Tabla 3. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ en experimentos en medio sólido.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AECOSAN Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición

CECT Colección Española de Cultivos Tipo

ETA Enfermedades de Transmisión Alimentaria

ICMSF Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos

MSSSI Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad

OMS Organización Mundial de la Salud

UFC Unidades Formadoras de Colonias

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado la conciencia social sobre los riesgos asociados al sector alimentario, debido a los diversos brotes de enfermedades alimentarias y prácticas derivadas de los sistemas de producción intensivos, así como del procesado industrial de alimentos. Como consecuencia de ello, y con la finalidad de satisfacer la demanda de alimentos sanos y sostenibles, la trazabilidad, calidad y seguridad alimentaria se abordan simultáneamente a lo largo de las diferentes etapas de la cadena alimentaria. En este sentido, la seguridad alimentaria incluye aquellas prácticas relacionadas tanto con la producción, como con el consumo de alimentos, con el fin de prever y asegurar la ausencia de peligros para la salud pública. Entre los microorganismos patógenos implicados en los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) destacan bacterias del género *Escherichia*, *Listeria*, *Salmonella* y *Staphylococcus*. Dentro de estos últimos se incluye a *Staphylococcus aureus* implicado en importantes intoxicaciones en alimentos como carne, huevo y sus derivados, leche productos lácteos.

Su hábitat primario son los animales calientes, en concreto, en el hombre forma parte de la microbiota normal de la mucosa naso-faríngea (especialmente de las fosas nasales) y también de la piel (sobre todo en zonas pilosas como el cabello), por ello, dada su amplia difusión, las prácticas para eliminar este patógeno son totalmente impracticables de manera que las medidas de control se basan en normas de higiene y manipulación de los alimentos.

En España, se ha llevado a cabo un importante desarrollo en la producción industrial de huevos y ovoproductos en los últimos años, lo que ha generado una necesidad de garantizar tanto la seguridad como la calidad de estos productos con un mayor control de su producción, transporte y almacenamiento. De hecho, casi el 40% de los brotes de intoxicación alimentaria notificados en nuestro país está relacionado con el consumo de huevos y productos derivados, resultando por tanto, uno de los sectores más importantes para la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos (OMS, 2016).

Para afrontar estos riesgos de contaminación biológica, es importante caracterizar las fuentes de contaminación, así como los factores que regulan el crecimiento microbiano y desarrollar técnicas efectivas de control. En relación a esto, la modelización del comportamiento microbiano en alimentos es una herramienta fundamental, ya que permite conocer la respuesta de los patógenos ante diversos factores ambientales, pudiendo de este modo seleccionar aquellas prácticas que garanticen la calidad y seguridad microbiológica, así como diagnosticar el grado de infección de un producto alterado y su tratamiento adecuado.

La mayoría de los modelos predictivos se basan en las cinéticas de crecimiento microbiano en medio líquido para predecir el comportamiento microbiano en alimentos estructurados y, por ello, no tienen en cuenta el efecto del medio sólido sobre el desarrollo microbiano que genera limitaciones difusionales dando lugar a ambientes con diferentes características que pueden causar alteraciones fisiológicas y, en definitiva, que pueden afectar al crecimiento microbiano (Dervakos y Webb, 1991; Meldrum et al., 2003). Por el contrario, el mecanismo de transporte en medio líquido, no presenta esas limitaciones difusionales, de manera que las células se distribuyen libre y homogéneamente sin causar alteraciones físicas. Por ello, en la modelización predictiva es importante tener en cuenta la estructura del alimento que será responsable de la magnitud, tipo y distribución de la contaminación.

El conocimiento de las propiedades del alimento es necesario para el desarrollo de estos modelos, ya que éstas determinarán el grado de desarrollo microbiano y proporcionarán datos fiables de los parámetros de transporte y cinéticos bajo condiciones controladas. Sin embargo, el carácter heterogéneo de los alimentos reales dificulta el estudio por lo que en la actualidad se emplean alimentos modelo que simulan la composición y estructura de alimentos reales facilitando así el análisis.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el comportamiento y desarrollo de microorganismos patógenos en huevo y productos derivados. Para ello se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio del desarrollo de patógenos en diferentes condiciones en ovoproductos líquidos empleando como microorganismo modelo la bacteria *Staphylococcus warneri*.

2. Analizar el crecimiento de patógenos en ovoproductos sólidos empleando como microorganismo modelo la bacteria *Staphylococcus warneri*.
3. Caracterizar estructuralmente los ovoproductos sólidos mediante técnicas reométricas y microscópicas.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA (ETA)

De acuerdo con la organización mundial de la Salud (OMS), las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) son aquellas que se atribuyen a un alimento específico, a una sustancia que se le ha incorporado o a su contaminación a través de recipientes mientras se prepara o distribuye. Aunque la incidencia de estas enfermedades ha disminuido considerablemente en los países desarrollados, continúa siendo un problema a nivel mundial. De hecho, constituyen uno de los problemas de salud pública más extendidos en el mundo, lo que ha originado en los últimos años un incremento de la conciencia social sobre los riesgos asociados al sector alimentario. Además, ocasionan importantes pérdidas económicas y causan una gran alarma social, reflejada en la frecuencia con que aparecen noticias sobre enfermedades alimentarias en los medios de comunicación (Mossel et al., 1995).

Las enfermedades de transmisión alimentaria pueden ser de tres tipos:

- **Infeciones:** Aquellos casos en que un microorganismo llega vivo al hospedador humano y se multiplica dentro de él causándole daños.
- **Intoxicaciones:** Debidas a la ingestión de una sustancia tóxica presente en el alimento, que puede ser de origen microbiano (toxina) o de origen abiótico.
- **Toxiinfecciones:** Hace referencia a la combinación de las dos anteriores, en las que un patógeno vivo coloniza un determinado órgano o tejido del hospedador a la vez que produce toxinas *in situ* y no en el alimento.

La seguridad alimentaria comprende las buenas prácticas implementadas en la producción, distribución y consumo de alimentos con el propósito de anticipar y garantizar la ausencia de riesgos para la salud pública. Dichos riesgos se encuentran distribuidos a lo largo de la cadena alimentaria y según su naturaleza se clasifican en químicos, físicos o biológicos. Estos últimos hacen referencia a la presencia de microorganismos no deseados, bien de forma natural en las materias primas (endógenos), o bien incorporados al alimento durante su procesado, almacenamiento y transporte, a través del personal y las superficies de contacto (exógenos). Estos microorganismos se clasifican en saprófitos, que alteran la calidad del alimento, y patógenos, responsables de las enfermedades transmitidas por alimentos.

2.1.1. Causas de enfermedades alimentarias

Las ETA más frecuentes se deben a la contaminación de los alimentos con patógenos y a su posterior multiplicación incontrolada. En la mayoría de los casos son consecuencia de un tratamiento incorrecto de los alimentos durante su obtención, transformación, almacenamiento o preparación.

Los estudios epidemiológicos realizados en España consideran que entre los factores más relevantes relacionados con las ETA se encuentran:

a) Consumo y conservación incorrecta de alimentos y platos preparados

La conservación del alimento a temperatura ambiente supone un riesgo importante ya que, aunque la mayoría de los patógenos tienen su óptimo de crecimiento entre 37°C y 42°C, pueden desarrollarse a temperaturas más bajas. En relación con la temperatura, también cabe destacar que una refrigeración insuficiente en la que se alcancen temperaturas entre 10-15°C puede provocar, aunque de manera más lenta, el desarrollo de microorganismos no deseados.

Por otro lado, la preparación de platos con excesiva antelación (más de dos horas) contribuye a que los alimentos se expongan durante mucho tiempo a condiciones que favorecen el crecimiento de microorganismos como el contacto con el aire, la exposición a la luz o la temperatura ambiente antes citada.

Por último, es importante el grado en el que se cocina un alimento ya que aquellos que se consumen crudos o muy poco cocinados, así como un recalentamiento inapropiado o descongelación incorrecta, favorecen la aparición de estas enfermedades.

b) Contaminación debida a equipos y manipuladores infectados

La limpieza en los equipos de cocina, tanto antes como después de su uso, es esencial para evitar la contaminación del alimento. Asimismo, los malos hábitos higiénicos de los manipuladores potencian el riesgo de transmisión. Tiene especial importancia la existencia de manipuladores portadores asintomáticos (conocidos como portadores sanos) de agentes patógenos que no suelen causar sintomatología, pero que en el caso de llegar a los alimentos (contacto con piel, tos, estornudos, etc.) pueden multiplicarse en el alimento y causar problemas (Varnam et al., 1996).

c) Contaminación cruzada entre productos crudos y cocinados

La contaminación de alimentos a veces no ocurre directamente si no por contacto con alimentos crudos, utensilios, superficies contaminadas, etc., es lo que se conoce como contaminación cruzada.

Según la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) se define contaminación cruzada como “*aquel proceso por el que los microorganismos patógenos de una determinada área son trasladados a otra área, antes limpia, de manera que contaminarán los alimentos o superficies que colonicen de nuevo*”. En general, si un alimento ha sido manipulado y cocinado de forma correcta, no debe ser peligroso para la salud, pero si entra en contacto con otros productos crudos contaminados, los patógenos pueden pasar al alimento y provocar enfermedad.

Por su parte la OMS ha definido cinco claves para la inocuidad de los alimentos (Figura 1) con el fin de divulgar las prácticas inocuas de manipulación de los alimentos.

CINCO CLAVES PARA LA INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

Mantenga la limpieza

- Lávese las manos antes de preparar alimentos y a menudo durante la preparación
- Lávese las manos después de ir al baño
- Lave y desinfecte todas las superficies y equipos usados en la preparación de alimentos
- Proteja los alimentos y las áreas de cocina de insectos, mascotas y de otros animales (guarde los alimentos en recipientes cerrados)

¿Porqué?

En la tierra, el agua, los animales y la gente se encuentran microorganismos peligrosos que causan enfermedades originadas en los alimentos. Ellos son trasladados de una parte a otra por las manos, los utensilios, ropa, trapos de limpieza, esponjas y cualquier otro elemento que no ha sido adecuadamente lavado y un contacto leve puede contaminar los alimentos.

Separe alimentos crudos y cocinados

- Separe siempre los alimentos crudos de los cocinados y de los listos para comer
- Use equipos y utensilios diferentes, como cuchillas o tablas de cortar, para manipular carne, pollo y pescado y otros alimentos crudos.
- Consérvese los alimentos en recipientes separados para evitar el contacto entre crudos y cocidos

¿Porqué?

Los alimentos crudos, especialmente carne, pollo y pescado y sus jugos, pueden estar contaminados con microorganismos peligrosos que pueden transferirse a otros alimentos, tales como comidas cocinadas o listas para comer, durante la preparación de los alimentos o mientras se conservan.

Cocine completamente

- Cocine completamente los alimentos, especialmente carne, pollo, huevos y pescado
- Hierva los alimentos como sopas y guisos para asegurarse que ellos alcancen 70°C (158°F). Para carnes rojas y pollos cuide que los jugos sean claros y no rosados. Se recomienda el uso de termómetros
- Recaliente completamente la comida cocinada

¿Porqué?

La correcta cocción mata casi todos los microorganismos peligrosos. Estudios muestran que cocinar el alimento tal que todas las partes alcancen 70°C (158°F), garantiza la inocuidad de los alimentos para el consumo. Existen alimentos, como tocinos grandes de carne, pollos enteros o carne molida, que requieren especial control de la cocción. El recalentamiento adecuado mata los microorganismos que pueden haberse desarrollado durante la conservación de los alimentos.

Mantenga los alimentos a temperaturas seguras

- No deje alimentos cocidos a temperatura ambiente por más de 2 horas
- Refrigere lo más pronto posible los alimentos cocinados y los perecibles (preferiblemente bajo los 5°C (41°F))
- Mantenga la comida caliente (arriba de los 60°C (140°F))
- No guarde comida mucho tiempo, aunque sea en la heladera. Los alimentos listos para comer para niños no deben ser guardados
- No descongele los alimentos a temperatura ambiente

¿Porqué?

Algunos microorganismos pueden multiplicarse muy rápidamente si el alimento es conservado a temperatura ambiente, pues necesitan alimento, humedad, temperatura y tiempo para reproducirse. Bajo los 5°C (41°F) o arriba de los 60°C (140°F) el crecimiento microbiano se hace más lento o se detiene. Algunos microorganismos patógenos pueden todavía crecer en temperaturas bajo los 5°C (41°F).

Use agua y materias primas seguras

- Use agua tratada para que sea segura
- Seleccione alimentos sanos y frescos
- Para su inocuidad, elija alimentos ya procesados, tales como leche pasteurizada
- Lave las frutas y las hortalizas, especialmente si se comen crudas
- No utilice alimentos después de la fecha de vencimiento

¿Porqué?

Las materias primas, incluyendo el agua, pueden contener no sólo microorganismos sino también químicos dañinos. Es necesario tener cuidado en la selección de los productos crudos y tomar medidas de prevención como lavados y pelados que reducen el peligro.

Conocimiento = Prevención

Inocuidad de Alimentos
Organización Mundial de la Salud

Figura 1. Claves para la prevención de ETA (OMS)

Una correcta higiene de los alimentos está determinada por multitud de factores como son las condiciones de obtención de los mismos, características de medios de transporte, temperaturas y condiciones de conservación, estructura de los locales donde se manipulan los alimentos etc., destacando por su importancia las medidas de higiene por parte de los manipuladores de alimentos. Todos los factores citados se vigilan y controlan a lo largo del proceso de obtención y manipulación de alimentos. Una vez que el alimento está listo para su consumo, su análisis microbiológico puede informar acerca del resultado real de todo el proceso, ya que la presencia de determinados microorganismos en los alimentos es una medida de su calidad sanitaria y además un indicador de la incorrección de las manipulaciones efectuadas, según estableció en su día el Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2015).

Existen alimentos considerados de mayor riesgo, que, por sus características especiales de humedad, composición etc., constituyen un medio de cultivo ideal para el desarrollo de patógenos. Se consideran alimentos de alto riesgo la carne, productos lácteos, mariscos y huevos, así como productos derivados de los mismos. En las figuras 2 y 3 se muestran aquellos microorganismos que normalmente causan ETA así como el tiempo de aparición de las mismas, sus síntomas, duración y el origen alimenticio.

ORGANISMO	NO M BRE COMÚN DE LA ENFERMEDAD	TIEMPO DE APARICIÓN DESPUÉS DE LA INGESTA	SÍNTOMAS	DURACIÓN	ORIGEN ALIMENTICIO
<i>Bacillus cereus</i>	Envenenamiento por consumo de alimentos con <i>B. cereus</i> .	De 10 a 16 horas	Calambres abdominales, diarrea acuosa, náuseas.	De 24 a 48 horas	Carnes, guisos, jugo de carne, salsa de vainilla.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Campilobacteriosis	De 2 a 5 días	Diarrea, calambres, fiebre y vómitos; puede tener diarrea con sangre.	De 2 a 10 días	Carne de aves cruda o poco cocida; leche sin pasteurizar, agua contaminada.
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo	De 12 a 72 horas	Vómitos, diarrea, visión borrosa, visión doble, dificultad para tragar, debilidad muscular. Puede causar insuficiencia respiratoria y la muerte.	Variable	Alimentos mal enlatados, especialmente verduras enlatadas en el hogar; pescado fermentado, papas asadas en papel de aluminio, ajo envasado.
<i>Clostridium perfringens</i>	Intoxicación de alimentos por <i>Perfringens</i>	8 a 16 horas	Calambres abdominales intensos, diarrea acuosa	Habitualmente 24 horas	Carnes, aves, salsa de carne, alimentos precocidos o deshidratados, alimentos con mal uso de la temperatura o del tiempo de cocción.
<i>Cryptosporidium</i>	Criptosporidiasis intestinal	De 2 a 10 días	Diarrea (generalmente acuosa), calambres estomacales, males tar estomacal, fiebre leve.	Puede que se remita y hayan recaídas durante semanas o incluso meses	Alimentos crudos o contaminados por una persona enfermo que la manipuló luego de cocinarla; agua potable contaminada.
<i>Cyclospora cayatanensis</i>	Ciclosporiasis	De 1 a 14 días, generalmente al menos 1 semana	Diarrea (generalmente acuosa), pérdida del apetito, pérdida de peso significativa, calambres estomacales, náuseas, vómitos, fatiga.	Puede que se remita y hayan recaídas durante semanas o incluso meses	Varios tipos de frutas y verduras frescas (bayas, lechuga y albahaca importadas).
<i>E. coli (Escherichia coli) productor de toxina</i>	Infección por <i>E. coli</i> (causa com ún de la "diarrea del viajero")	De 1 a 3 días	Diarrea acuosa, calambres abdominales, algo de vómito.	De 3 a 7 o más días	Agua o alimentos contaminados con excrementos humanos.
<i>E. coli O157:H7</i>	Colitis hemorrágica o infección por <i>E. coli O157:H7</i>	De 1 a 8 días	Diarrea aguda (a menudo con sangre), dolores abdominales y vómitos. Por lo general, no se tiene fiebre o se tiene muy poca. Es más común en niños de 4 años o menos. Puede causar insuficiencia renal.	De 5 a 10 días	Carne de res poco cocida (especialmente hamburguesas); leche y jugos sin pasteurizar; frutas y verduras crudas (ej. brotes); y agua contaminada.

Figura 2. Microorganismos causantes de ETA (Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU, FDA).

ORGANISMO	NOMBRE COMÚN DE LA ENFERMEDAD	TIEMPO DE APARICIÓN DESPUÉS DE LA INGESTA	SÍNTOMAS	DURACIÓN	ORIGEN ALIMENTICIO
<i>Hepatitis A</i>	Hepatitis	28 días en promedio (De 15 a 50 días)	Diarrea, orina oscura, ictericia y síntomas similares a los de la gripe, por ejemplo, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y dolores abdominales.	Variable, de 2 semanas a 3 meses	Frutas y verduras crudas, agua potable contaminada, alimentos sin cocer o alimentos cocidos que no son recalentados luego de haber estado en contacto con una persona infectada que los manipuló.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis	De 9 a 48 horas para síntomas gastrointestinales, de 2 a 6 semanas para enfermedades invasivas	Fiebre, dolores musculares y náuseas o diarrea. Las mujeres embarazadas pueden tener síntomas leves similares a los de la gripe, y la infección podría ocasionar un parto prematuro o de un bebé muerto. Los ancianos o pacientes con deficiencias inmunitarias podrían contraer bacteremia o meningitis.	Variable	Leche sin pasteurizar, quesos blandos hechos con leche sin pasteurizar, carnes preparadas listas para comer.
Norovirus	Se le llama de distintas maneras: gastroenteritis viral, diarrea invernal, gastroenteritis aguda no bacteriana, envenenamiento por consumo de alimentos e infección por consumo de alimentos	De 12 a 48 horas	Náuseas, vómitos, calambres abdominales, diarrea, fiebre, dolor de cabeza. La diarrea es más frecuente en los adultos y los vómitos en los niños.	De 12 a 60 horas	Frutas y verduras crudas, agua potable contaminada, alimentos sin cocer o alimentos cocidos que no son recalentados luego de haber estado en contacto con una persona infectada que los manipuló; mariscos de aguas contaminadas.
<i>Salmonella</i>	Salmonelosis	De 6 a 48 horas	Diarrea, fiebre, calambres abdominales, vómitos	De 4 a 7 días	Huevos, aves, carne de res; no pasteurizados, leche o jugos; quesos, frutas y verduras crudas contaminadas.
<i>Shigella</i>	Shigelosis o disentería bacilar	De 4 a 7 días	Calambres abdominales, fiebre y diarrea. La materia fecal puede contener sangre y mucosidad.	De 24 a 48 horas	Frutas y verduras crudas, agua potable contaminada, alimentos sin cocer o alimentos cocidos que no son recalentados luego de haber estado en contacto con una persona infectada que los manipuló.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Envenenamiento por consumo de alimentos con estafilococos	De 1 a 6 horas	Inicio repentino de náuseas y vómitos severos. Calambres abdominales. Pueden presentarse diarrea y fiebre.	De 24 a 48 horas	Carnes de res, ensaladas de papa y huevo, y pasteles con crema no refrigerados o refrigerados incorrectamente.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Infección por <i>V. parahaemolyticus</i>	De 4 a 96 horas	Diarrea acuosa (ocasionalmente con sangre), calambres abdominales, náuseas, vómitos, fiebre.	De 2 a 5 días	Mariscos poco cocidos, tales como los moluscos.
<i>Vibrio vulnificus</i>	Infección por <i>V. vulnificus</i>	De 1 a 7 días	Vómitos, diarrea, dolores abdominales, infección transmitida por la sangre. Fiebre, sangrado bajo la piel, úlceras que deben extirparse quirúrgicamente. Puede ser fatal en el caso de personas con enfermedades hepáticas o sistemas inmunitarios débiles.	De 2 a 8 días	Mariscos poco cocidos, tales como los moluscos.

Figura 3. Microorganismos causantes de ETA (Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU, FDA).

2.2. HUEVOS Y OVOPRODUCTOS

2.2.1. Estructura y composición del huevo

En un huevo se diferencian tres partes fundamentales: la clara (aproximadamente un 60% del peso del huevo), la cáscara (10%) y la yema (30%) (IEH, 2017) (Figura 4).

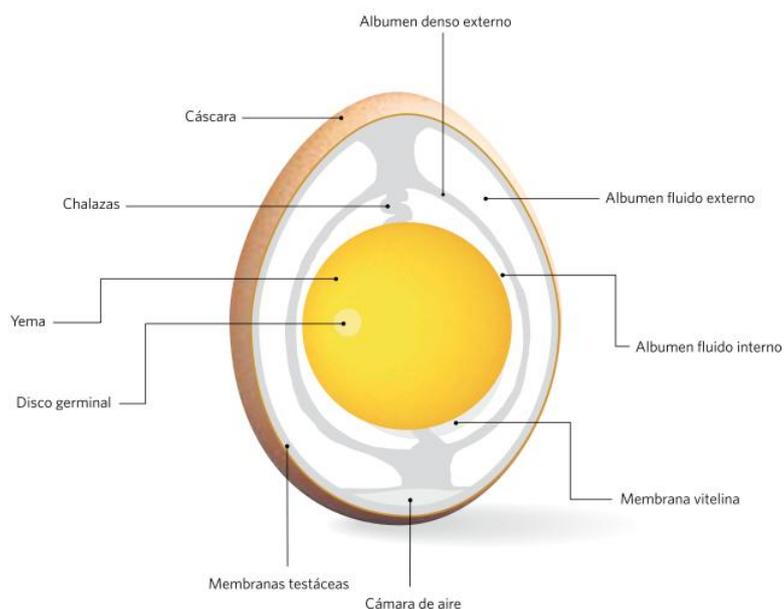


Figura 4. Corte transversal de un huevo de gallina (IEH, 2015).

a) La cáscara

La cáscara es la cubierta exterior del huevo. Mantiene su integridad física y actúa como barrera bacteriológica. Está constituida principalmente por una matriz cálcica porosa, además de otros minerales como sodio, magnesio, cinc, manganeso, hierro, cobre, aluminio y boro, en menores concentraciones. Dicha matriz permite el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior del huevo. El número de poros varía entre 7000 y 15000 y son especialmente numerosos en la zona de la cámara de aire.

La cáscara se encuentra recubierta por una cutícula orgánica formada principalmente por proteínas (90%) y pequeñas cantidades de lípidos y carbohidratos. Su función consiste en cerrar los poros para evitar la entrada de microorganismos y

evitar la pérdida de agua. Esta cutícula desaparece tras 2-4 días desde la puesta. La figura 5 representa la estructura de la cáscara de huevo.

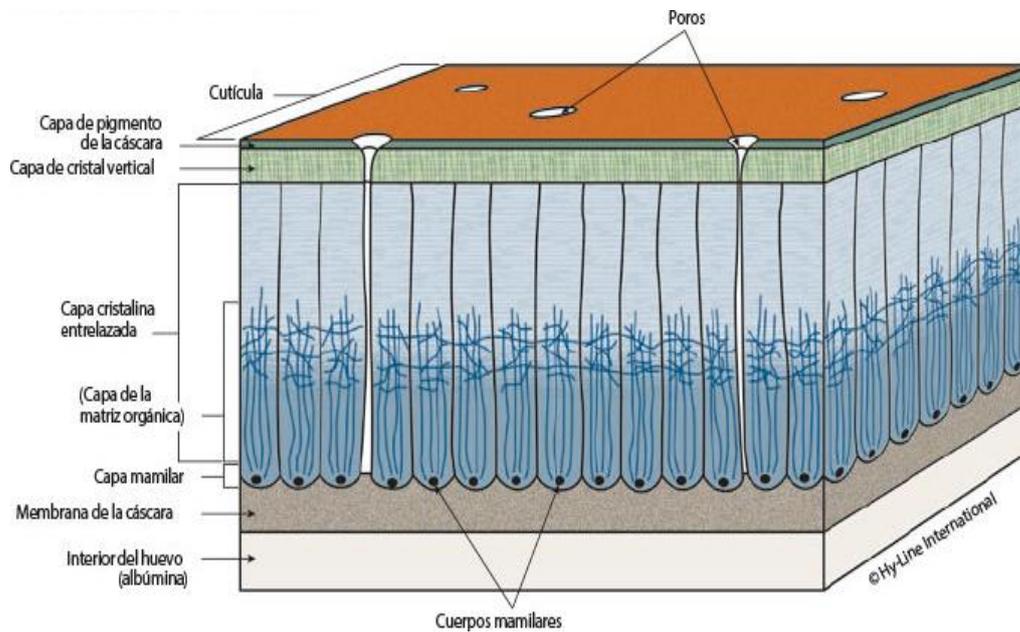


Figura 5. Estructura de la cáscara de huevo

En su interior, la cáscara está recubierta por la membrana testácea interna, constituida por una fina estructura de fibras de queratina entrelazadas, y la externa, mucho más porosa, que sirve como asentamiento para la formación de la cáscara. Ambas rodean el albumen y proporcionan protección contra la penetración bacteriana (IEH, 2017).

b) Clara o albumen

La clara está compuesta básicamente por agua (88%) y proteínas (12% aproximadamente). En la clara se encuentran algo más de la mitad de las proteínas del huevo y está exenta de lípidos. La proteína más abundante (54% del total proteico) es la ovoalbúmina, de especial interés desde el punto de vista nutritivo (IEH, 2017), es una fosfoglicoproteína que durante el almacenamiento se transforma en la sovoalbúmina, una forma más compacta y estable al calor. Además de la ovoalbúmina, las principales proteínas del albumen son:

- Conalbúmina u ovotransferrina: Glicoproteína que destaca por su facilidad para unirse a cationes Fe^{3+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} .

- Ovomucoide: Glucoproteína muy resistente al calor que inhibe la tripsina.
- Lisozima: Enzima proteico de acción lítica sobre la pared bacteriana hidrolizando las uniones β -(1,4) entre los residuos de ácido N-acetil-D-glucosamina que constituyen el esqueleto del peptidoglicano. La lisozima además tiene un alto carácter electropositivo y por ello puede igualmente aglutinar a las bacterias, que presentan sin excepciones carga electronegativa (Caso, 2014).
- Ovomicuna: Glicoproteína cuyas fibras dan la consistencia de gel a la clara.
- Ovoglobulinas: Agentes espumantes.
- Flavoproteínas: Glicoproteínas asociadas a la rivo flavina del complejo vitamínico B en la clara.
- Avidina: Glicoproteína asociada a la biotina del complejo vitamínico B y forma un complejo estable no absorbible por el intestino.

c) Yema o vitelo

Está rodeada de la membrana vitelina que da la forma a la yema y permite que se mantenga separada de la clara. En ella se encuentran las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo. Su contenido en agua es de aproximadamente el 50%.

En su interior se encuentra el disco germinal o blastodisco, que es un pequeño disco claro en la superficie de la yema, lugar en el que se inicia la división de las células embrionarias cuando el huevo está fecundado.

Sujetando la yema se encuentran las chalazas, unos engrosamientos del albumen con forma de filamentos enrollados, que van desde la yema hasta los dos polos opuestos del huevo (IEH, 2015).

2.2.2. Huevos y ETA

El sector de producción de huevos y ovoproductos ha experimentado en nuestro país un significativo crecimiento en los últimos años, lo que conlleva una mayor necesidad de control que garantice la seguridad y calidad de estos productos. En España hay, actualmente, más de 2000 granjas de producción de huevos que producen el 15%

de la producción total de huevos en la Unión Europea, siendo este sector uno de los primeros de Europa tanto en cantidad como calidad y competitividad, exportándose alrededor del 35% de la producción (MSSSI, 2015). Asimismo, es destacable que casi 1/4 de la producción total de huevos en la UE va destinada a la elaboración de ovoproductos.

A pesar de las medidas tomadas por la industria de ovoproductos con el fin de evitar los riesgos para la salud pública, de los brotes de intoxicación alimentaria notificados recientemente en España, alrededor del 38% estaba relacionado con el consumo de huevos y derivados. En este sentido, en la regulación EC 2073/20052 sobre criterios microbiológicos relacionados con los alimentos, han sido introducidos criterios de higiene para cinco categorías de alimentos entre los que se encuentran los huevos y ovoproductos. Estos criterios han sido definidos para seis peligros: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, toxinas estafilocócicas (producidas por *Staphylococcus* spp.), *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli* e histamina (Hennekinne et al., 2015).

El huevo es un alimento de gran valor nutritivo que de forma natural se encuentra protegido de la contaminación exterior gracias a la barrera física que le proporciona su cáscara y membrana y a las barreras químicas antibacterianas presentes en su composición. Por ello, un 90% de los huevos son estériles en el momento de la puesta, sin embargo, pueden resultar fácilmente contaminados por bacterias procedentes del aparato genital (ovario y oviducto) de las gallinas, de su tracto intestinal, de las heces y del ambiente. Además, los huevos pueden contaminarse por bacterias existentes en la alimentación de la gallina como por ejemplo *Salmonella*. Solo una pequeña parte de las bacterias son potencialmente patógenas, pero, a pesar de las medidas de seguridad, siempre existe el peligro de que las materias primas alimentarias sean contaminadas en algún momento de la cadena de producción (Perry & Yousef, 2012). En este sentido, la contaminación microbiana de los huevos depende del estado de limpieza de los lugares de puesta y de la manera que son manipulados tras ser obtenidos. Si la cáscara permanece intacta, la única vía de penetración de los microorganismos al interior del huevo son los poros y aunque la clara contiene lisozima, si estos patógenos atraviesan los poros, las consecuencias pueden ser graves.

Existen varios trabajos recientes en los que se ha estudiado la contaminación del huevo por *Salmonella*, centrándose fundamentalmente en las rutas de entrada de la bacteria en el huevo (Raspoet et al., 2011; Rieke & Gast, 2014), también ha sido

descrito el efecto protector de las barreras naturales, tanto físicas como químicas del huevo frente a la contaminación por *Salmonella* (Howard et al., 2012). Incluso algunos autores han estudiado el efecto protector de ciertas barreras adicionales como el quitosano que parece ser eficaz en la preservación de la calidad interna del huevo (Lelelu et al., 2011).

Aunque algunos autores han incluido en sus trabajos otros microorganismos además de *Salmonella*, en general se ha prestado poca atención a otras bacterias responsables de las enfermedades transmitidas por alimentos (De Reu et al., 2006; Chemaly & Salvat, 2011). Asimismo, tampoco han sido publicadas muchas investigaciones acerca de peligros de intoxicaciones alimentarias provocadas por ovoproductos y platos preparados derivados del huevo, ya que la mayor parte de la bibliografía se centra en técnicas de prevención asociadas a la contaminación del huevo durante el proceso productivo en las explotaciones avícolas, pero no durante su procesado posterior (Gole et al., 2014).

Dentro de esos microorganismos que también son causantes de enfermedades transmitidas por alimentos destaca la familia de los Staphylococcaceae, bacterias Gram positivas que incluyen el género Estafilococos (*Staphylococcus*). Este género comprende microorganismos que se encuentran de manera ubicua en la naturaleza (están presentes en el aire y en el agua y también en la mucosa y en la piel de los mamíferos), incluyendo más de 30 especies y varias subespecies. Son bacterias muy resistentes y puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en un ambiente seco, y son muy persistentes en alimentos con contenido alto en sales y azúcares. Dentro de este grupo destaca *S. aureus* implicado en importantes intoxicaciones por alimentos como carne y derivados, aves, huevo y derivados, ensaladas, leche y productos lácteos, y en especial, aquellos alimentos que requieren mucha manipulación durante su preparación y que necesitan mantenerse por largos periodos de tiempo a altas temperaturas después de su cocinado (Cuevas et al., 2008).

2.3. MÉTODOS PARA CONTROLAR EL DESARROLLO DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS

Los sistemas de conservación de alimentos son aquellos que evitan que las alteraciones causadas por los microorganismos alterantes puedan llegar a producirse. Existen varios mecanismos para controlar el desarrollo de estos microorganismos en el

alimento, entre los que destacan métodos físicos como el frío, calor o modificación del contenido en agua, químicos (aditivación) y biológicos, así como otras tecnologías desarrolladas recientemente (Mas, 2005).

2.3.1 Frío

El frío tiene efectos negativos sobre el crecimiento de microorganismos ya que produce una ralentización de procesos químicos y metabólicos de los mismos. En este sentido, un descenso de la temperatura produce un retraso de los cambios en los alimentos durante su almacenamiento que será mayor cuanto más baja sea la temperatura. Sin embargo, hay que destacar que, incluso a bajas temperaturas, hay microorganismos capaces de sobrevivir por lo que es muy importante evitar la interrupción de la cadena de frío (Mas, 2005).

Dentro de las técnicas de conservación por frío destacan la refrigeración y congelación.

a) Refrigeración

Consiste en la conservación de productos a bajas temperaturas, pero siempre por encima de su temperatura de congelación, esto es, entre 0°C y 8°C. De esta forma se consigue que tanto el valor nutricional como las características organolépticas del alimento se mantengan casi intactas respecto al inicio de su almacenaje (Lamúa, 2000).

b) Congelación

A diferencia de la anterior, la congelación es una técnica de conservación a largo plazo que consiste en convertir el agua presente en los alimentos en hielo con gran rapidez así como su almacenamiento a temperaturas muy bajas (alrededor de -18°C). La conversión de agua en hielo da lugar a una desecación del alimento y, por tanto, una mejor conservación del mismo.

El proceso de congelación en alimentos es más complejo que en agua pura ya que éstos contienen diferentes solutos. La evolución de la temperatura en el alimento durante el proceso de congelación se conoce como curva de congelación. En la figura 6 se muestra una curva de congelación típica de una solución en la que se distinguen varias secciones. En la **sección AS** el alimento se enfría por debajo del punto de

congelación, en el punto S el agua permanece en estado líquido. En la **sección SB** la temperatura aumenta rápidamente hasta alcanzar el punto de congelación. En la **sección BC** el calor latente se elimina con la formación de hielo, el aumento en la concentración de solutos reduce el punto de congelación y es la fase donde se forma la mayor parte del hielo. **Sección CD**, los solutos comienzan a cristalizar, la liberación del calor latente correspondiente provoca el aumento de la temperatura hasta la temperatura del soluto. **Sección DE**, la cristalización del agua y solutos continúa. En la **sección EF** la temperatura de mezcla del agua y hielo desciende (Choi et al., 1986).

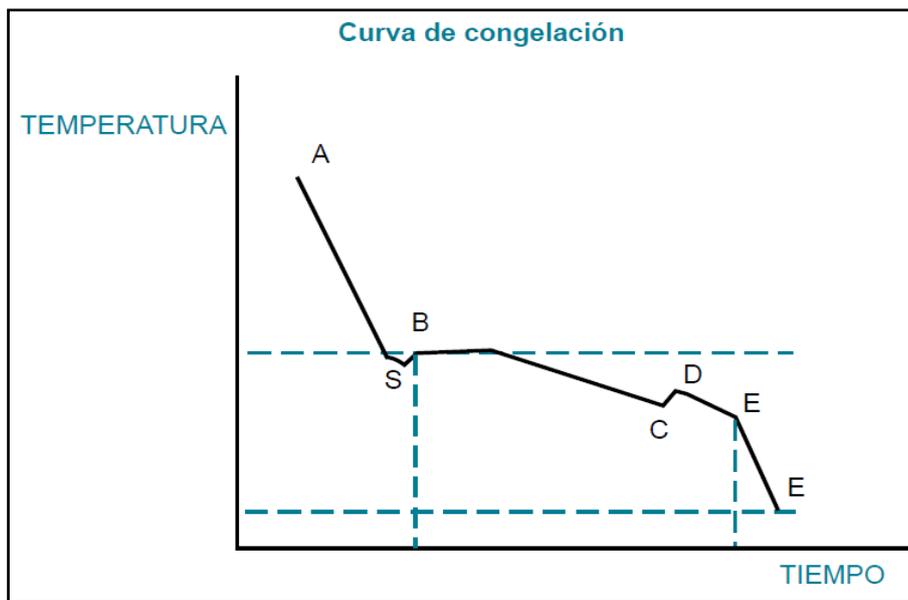


Figura 6. Curva de congelación típica de una solución (Choi et al., 1986)

2.3.2 Calor

El efecto del calor se basa en la desnaturalización de proteínas, lo que produce una desactivación de los enzimas. Es considerado uno de los sistemas más antiguos de conservación de alimentos. Además de la cocción y horneado, hoy en día se han desarrollado nuevas técnicas como son el escaldado, pasteurización y esterilización. El primero se suele aplicar a frutas y verduras y consiste en aplicar agua o vapor durante unos minutos a temperaturas entre 95-100°C. La pasteurización es común para la conservación de lácteos y ovoproductos en los que reduce la contaminación inicial y elimina patógenos como *Salmonella* y *Staphylococcus* alcanzando temperaturas entre 55°C y 60°C, aunque no elimina las esporas. Por último, la esterilización es un método

empleado para aquellos alimentos que deben conservarse durante largos periodos de tiempo. Se realiza en un autoclave a temperaturas de 120°C de calor húmedo y altas presiones y, a diferencia de la pasteurización, elimina por completo tanto patógenos como sus esporas. Estos métodos presentan el inconveniente de que pueden alterar las propiedades organolépticas del alimento y ser destructivas desde el punto de vista nutricional (Gutiérrez, 2000).

2.3.3. Modificación del contenido en agua

Una disminución en el contenido de agua del alimento favorece una buena conservación ya que la mayor parte de los procesos de los microorganismos se llevan a cabo en medio acuoso. Un alimento con una actividad de agua (A_w) por debajo de 0,70 se considera muy estable ya que la mayor parte de patógenos tales como bacilos Gram-negativos o cocos Gram-positivos requieren A_w entre 0,85 y 0,95.

Existen varios métodos para modificar el contenido de agua de un alimento:

- a) **Desecación o secado:** Cuando la humedad del alimento se reduce hasta equilibrarla con la del ambiente. Esto se consigue sometiendo el alimento a la acción del calor. A veces se añaden sustancias para acelerar el proceso como la sal en embutidos o pescados.
- b) **Deshidratación:** Cuando la eliminación del agua en un alimento es casi total por la acción de aire caliente. De esta forma se obtienen productos tales como leche en polvo, huevos deshidratados, café en polvo etc.
- c) **Liofilización:** Consiste en la eliminación del agua de un producto por sublimación del agua libre de la fase sólida acompañada de la evaporación de algunas porciones remanentes de agua no congelable. Se considera uno de los mejores métodos de conservación de alimentos ya que mantiene las propiedades organolépticas de los mismos (Ayala et al., 2010).

2.3.4. Uso de aditivos

La aditivación es una práctica muy utilizada para la conservación de alimentos. La adición de sales o salazón es uno de los métodos más antiguos para la conservación

de carnes y pescados. En este caso el alimento se trata con NaCl durante cierto tiempo creando un ambiente hostil para los microorganismos. Cuando el salazón va seguido de un tratamiento térmico (cocción por vapor o por agua), el proceso se conoce como curado. El ahumado es otra forma de conservar carnes y pescados aunque hoy en día se ha extendido a quesos y embutidos. Consiste en someter los alimentos a los efectos del humo, lo que tiene un efecto bactericida y antifúngico así como antioxidante. La adición de azúcar como método de conservación es frecuente en frutas ya sea en la elaboración de frutas en almíbar o en mermeladas (Varnam et al., 1996).

2.3.5. Otros métodos de conservación

Las fermentaciones, enmarcadas dentro de los métodos biológicos, se utilizan especialmente para la conservación de productos lácteos eliminando (Varnam et al., 1996). También se emplean en la conservación de zumos de fruta originando bebidas alcohólicas (cerveza, vino, sidra etc.)

Por otro lado, la demanda creciente de productos alimenticios con características propias de productos frescos, ha introducido nuevas tecnologías en el ámbito de la conservación de alimentos. Así, el uso de radiaciones, tanto ionizante (irradiación), como no ionizante (microondas), altas presiones, campos eléctricos, magnéticos, etc. Estas tecnologías se aplican también al envasado (atmósferas modificadas y controladas, vacío etc.) (Mas, 2005).

2.4. MODELOS PREDICTIVOS EN SEGURIDAD ALIMENTARIA

La microbiología predictiva se basa en la premisa de que la respuesta microbiana ante los factores ambientales es siempre reproducible (Ross et al., 2014). Por tanto, un conocimiento pormenorizado del comportamiento microbiano, esto es crecimiento, supervivencia o inactivación, y las variables reguladoras del mismo, contribuirá al desarrollo de modelos eficientes para predecir cuantitativamente la evolución de microorganismos patógenos causantes de diversas alteraciones en alimentos.

Esta microbiología predictiva es una herramienta fundamental en seguridad alimentaria y junto con determinadas medidas podría llegar a evitar la proliferación de patógenos en alimentos. La mayoría de las técnicas empleadas actualmente interfieren

en mecanismos homeostáticos desarrollados por microorganismos para sobrevivir en condiciones ambientales adversas, es decir, sobre factores físicos o químicos que influyen en el crecimiento y supervivencia microbiano (Noriega et al., 2010). Los modelos que predicen el crecimiento de microorganismos patógenos así como la producción de toxinas, resultan una herramienta fundamental en el diseño de procesos en industria alimentaria (Magnússon et al., 2012; Ross et al., 2014).

2.4.1. Microorganismos modelo

Como se ha mencionado en el punto 2.2.2., existen varias publicaciones en las que se estudia el efecto negativo de *Salmonella* en huevos y ovoproductos. Sin embargo, no se ha prestado atención a otras bacterias responsables de ETA ni se encuentran muchas investigaciones acerca de intoxicaciones alimentarias procedentes de huevos y sus derivados.

Staphylococcus es un género muy notable dentro de seguridad alimentaria ya que incluye varios patógenos importantes como *Staphylococcus aureus* que, además de ser altamente resistentes, producen toxinas altamente estables y resistentes al calor, congelación e irradiación por lo que una vez formadas en el alimento, resulta extremadamente difícil eliminarlas. De hecho, uno de los seis peligros alimentarios incluidos en la regulación EC 2073/20052 sobre criterios microbiológicos son las toxinas estafilocócicas (Hennekinne et al., 2015), Estas toxinas se pueden transmitir a las personas a través del consumo de alimentos contaminados por falta de higiene e inadecuadas prácticas de cocinado y conservación.

S.aureus es el miembro más virulento de este género y es uno de los contaminantes alimentarios más importantes ya que es una de las especies productoras de toxinas termorresistentes responsables de intoxicaciones alimentarias. Durante el procesado de los alimentos, *S. aureus* puede contaminar los alimentos, lo que puede causar la intoxicación de los consumidores (Morente et al., 2016). Además, en los últimos años, han surgido nuevas circunstancias que hacen aconsejable llevar a cabo estudios de vigilancia de la situación actual de la resistencia a antimicrobianos de estos patógenos (Cuevas et al., 2008). La habilidad de *S. aureus* para adaptarse a condiciones selectivas ha facilitado el desarrollo de resistencias en la cadena alimentaria, siendo

muy importante su control desde el punto de vista de la seguridad alimentaria (Morente et al., 2016).

Dado que el género *Staphylococcus* se encuentra presente de modo ubicuo en la naturaleza, los huevos pueden contaminarse en el proceso de producción, mientras que los ovoproductos y alimentos preparados pueden contaminarse después de ser procesados debido a una manipulación inadecuada. Para poder garantizar la calidad de los alimentos es necesario un conocimiento tanto de las posibles fuentes de contaminación, como de los factores que afectan la multiplicación de los microorganismos dentro de los alimentos, así como la puesta a punto de métodos analíticos que permitan la rápida detección de posibles contaminaciones. Se podrían resumir por lo tanto los campos de trabajo para tratar los riesgos de intoxicación por patógenos y la seguridad alimentaria en tres líneas fundamentales:

- 1. Evitar la infección.** Para ello, es necesario un adecuado diseño de los locales y cadenas de fabricación, así como el mantenimiento de un nivel de higiene, impuesto por las prácticas de limpieza, desinfección y mantenimiento general de la fábrica. No menos importante resulta la higiene del personal y el empleo de condiciones adecuadas durante la comercialización de los productos.
- 2. Crecimiento/Modelización.** Una vez que un producto está contaminado, el grado de desarrollo de los microorganismos es clave para determinar el posible tratamiento térmico o químico, o en su caso para conocer el grado de infección sanitaria. El conocimiento y modelización del crecimiento resulta imprescindible para cualquier prevención o actuación.
- 3. Análisis.** Por último, y como medida final para asegurar la calidad del producto, se hace necesario el desarrollo de rápidas técnicas de análisis que permitan detectar de manera sencilla y eficaz posibles contaminaciones en el producto acabado con el fin de eliminar los lotes contaminados y, siempre que sea posible, detectar el foco de infección en la cadena de fabricación.

Por tanto, para llevar a cabo el crecimiento de microorganismos patógenos y la modelización del mismo con el fin de obtener modelos predictivos se suelen emplear lo que se conoce como microorganismos modelo. Se definen como una especie

ampliamente estudiada debido a que es fácil de mantener y reproducir en un entorno de laboratorio así como por sus ventajas experimentales particulares. En general en los trabajos de investigación para facilitar el trabajo experimental y evitar riesgos en el laboratorio, se suele sustituir la manipulación de patógenos por especies inocuas de comportamiento similar, esto es, microorganismos modelo. Por ejemplo el uso de *Listeria innocua* en lugar de *L. monocytogenes* ya que ambas especies comparten características morfológicas, bioquímicas y moleculares similares e incluso su incidencia en el mismo tipo de alimentos es similar (Noriega et al., 2010).

2.4.2. Alimentos modelo

La mayoría de publicaciones acerca del efecto de *Salmonella* y otros patógenos causantes de ETA, se centran en alimentos como el huevo y productos derivados del mismo. Varios de estos trabajos analizan el efecto de la cáscara del huevo frente a la penetración de microorganismos (Chemaly & Salvat, 2011; Raspoet et al., 2011; Howard et al., 2012). Algunos autores han descrito la influencia de factores como temperatura, humedad, tiempo de almacenamiento o naturaleza de la cáscara, en la contaminación del huevo a través de la cáscara (Theron et al., 2003; De Reu et al., 2006; Cabeza et al., 2011; Lasagabaster et al., 2011; Samiullah et al., 2013; Park et al., 2015). Ciertos trabajos describen específicamente el efecto protector frente a la contaminación microbiana de otras barreras de protección naturales presentes en el huevo, tales como determinadas proteínas (Réhault-Godbert et al., 2011) o la cutícula (Muñoz et al., 2015), incluso recientemente ha sido publicado un trabajo en el que se estudia el efecto protector del albumen de huevo frente a *Salmonella* (Baron et al., 2016). Sin embargo, es destacable los pocos trabajos que centran su atención en otros microorganismos (Theron et al., 2003; De Reu et al., 2006) y, a pesar de que en muchos casos se tratan de determinar los factores que afectan a la contaminación del huevo a través de la cáscara, en ningún caso se trata de modelizar dicho transporte.

Otros autores analizan el efecto de diversos factores sobre el crecimiento y viabilidad de patógenos en alimentos como carne de cerdo (Moller et al., 2013), huevo líquido (Huang, 2015) o manzana (Pérez-Rodríguez et al., 2014).

Para llevar a cabo este tipo de estudios se suelen utilizar alimentos modelo que se definen como aquellas sustancias, de composición química sencilla, seleccionada por

sus propiedades extractivas, en las condiciones específicas del ensayo, y por su similitud a las características fundamentales del alimento al que pretende sustituir. Existen varios trabajos que emplean estos alimentos para llevar a cabo diferentes experimentos, por ejemplo el estudio del comportamiento de *L. innocua* en caldos preparados con una composición similar a los quesos (Noriega et al., 2008).

2.4.3. Desarrollos matemáticos

El desarrollo de modelos matemáticos es una etapa importante para cuantificar los efectos de factores ambientales en el crecimiento de microorganismos en alimentos (Fernández et al., 1997).

Los modelos predictivos microbiológicos pueden clasificarse en cinéticos y de probabilidad. Los primeros calculan la vida microbiológica de los alimentos y los segundos determinan si el microorganismo puede crecer, e identifica las condiciones de almacenamiento con baja o nula probabilidad de crecimiento (Tienungoon et al., 2000). Los modelos de probabilidad a su vez se pueden dividir en aquellos basados en determinación secuencial de un factor o modelos polinomiales que determinan el efecto de varios factores sobre el crecimiento microbiano.

Whiting y Buchanan propusieron una clasificación de modelos matemáticos predictivos muy utilizada actualmente (Geeraerd et al., 2004). En ella se distinguen tres niveles: modelos primarios que describen cambios del número microbiano en función del tiempo, modelos secundarios que caracterizan parámetros en función de las condiciones del medio y modelos terciarios que pueden combinar los dos primeros modelos basados en experimentos de laboratorio (Whiting, 1995; Geeraerd et al., 2004).

2.5. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE MUESTRAS ALIMENTARIAS

Para la caracterización estructural de alimentos se suelen utilizar diversas técnicas. Una de las más utilizadas son los ensayos reológicos.

La reología es la rama de la física que tiene por objeto el estudio de la deformación y el flujo de la materia bajo la acción de fuerzas mecánicas. La deformación es el cambio de forma o volumen experimentado por un cuerpo bajo la acción de un sistema de fuerzas; y el flujo, una deformación continua en el tiempo (Schramm, 2004).

La aplicación de fuerzas externas de intensidad suficiente puede provocar una deformación de la materia, realizándose un trabajo que se acumula como energía interna de deformación. Cuando estas transformaciones son reversibles y las fuerzas externas dejan de actuar, el sistema recupera instantáneamente la forma y dimensiones originales, mientras que la energía acumulada retorna en forma de trabajo. Se habla entonces de comportamiento elástico. En otras ocasiones, la materia también se deforma bajo la acción de fuerzas aplicadas, pero el trabajo realizado se disipa completamente en forma de calor. Por ello, cuando la acción de dichas fuerzas cesa, el estado de deformación permanece. Se habla entonces de un comportamiento viscoso. Los fluidos viscoelásticos son sustancias complejas con un comportamiento elástico y viscoso a la vez. Así, al aplicar un esfuerzo parte de la energía se disipa en forma de calor, pero también parte se almacena.

Los ensayos reológicos pueden ser estacionarios u oscilatorios. Los ensayos oscilatorios se caracterizan porque en lugar de aplicar un esfuerzo o una velocidad de deformación de manera constante, estos se aplican sobre la muestra de manera oscilatoria a una determinada frecuencia. Se utilizan para caracterizar productos viscoelásticos. Los ensayos oscilatorios aportan información relacionada con la viscosidad y la elasticidad en función de la frecuencia aplicada. Los resultados son sensibles a la composición química y la estructura física del producto, por lo que este tipo de ensayos permite estudiar la estructura interna de las muestra (Schramm, 2004)s.

Para obtener un resultado repetible debe trabajarse en la región lineal viscoelástica, en donde el módulo complejo (G^*) que depende de las elasticidad (G') y de la viscosidad (G'') es constante. Hay varios tipos de ensayos oscilatorios, entre los que se destacan los siguientes:

- a) **Barrido de esfuerzo:** para una sustancia cuyo comportamiento reológico es desconocido este sería el primero de los ensayos oscilatorios que se debería de realizar, ya que aporta la información necesaria para determinar la zona lineal viscoelástica. En este test, con una frecuencia y una temperatura determinadas, se parte de un esfuerzo inicial que se va incrementando hasta alcanzar un esfuerzo final. Ambos valores son prefijados y se observa como varían las características de la muestra dentro de ese intervalo de esfuerzos.

b) Barrido de frecuencia: aporta información relacionada con las características estructurales de la muestra analizada. Este ensayo se realiza a una temperatura determinada aplicando un esfuerzo constante, que debe de estar dentro de la región lineal viscoelástica. Se parte de una frecuencia inicial que se va incrementando hasta alcanzar un esfuerzo final.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO EMPLEADAS

Los procedimientos detallados a continuación se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar (Telstar PV-100) y un autoclave modelo AES-75 (Raypa) para esterilizar el material.

3.1.1 Cepas bacterianas

Staphylococcus aureus es un patógeno oportunista que se encuentra en la piel humana, y por tanto puede aparecer en diferentes alimentos procesados, tales como productos derivados del huevo como consecuencia de la manipulación de los mismos (dos Santos, 2007). Se incluye dentro del grupo de “riesgo 2” (riesgo individual y poblacional moderado), por ello, en este trabajo se ha utilizado como microorganismo modelo *S. warneri*, perteneciente al mismo género que *S. aureus* y se incluye dentro del grupo de “riesgo 1” (riesgo individual y poblacional escaso o nulo). Además, debe destacarse que *S. warneri* se ha identificado en la microbiota del huevo (Neira, 2016) siendo considerado uno de los microorganismos transmitidos por el huevo (Lelelu et al, 2011).

Se utilizó una cepa comercial de *Staphylococcus warneri*, (CECT 236), suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

3.1.2 Condiciones de cultivo

3.1.2.1 Medio líquido

Para estudiar la influencia del oxígeno en el crecimiento de *S. warneri* y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en trabajos anteriores (Neira, 2016) se empleó como medio de cultivo huevo líquido.

Para preparar dicho medio, se homogeneizó el contenido de varios huevos (previamente lavados con etanol al 96% para evitar que los posibles microorganismos presentes en la superficie del huevo contaminasen el medio) en Stomacher. El medio líquido se preparó en una proporción de 10 ml de huevo con 90 ml de agua destilada. El experimento se llevó a cabo en tres condiciones diferentes: aerobiosis, hipoxia y anoxia.

- a) **Aerobiosis:** Se añadieron 100 ml de medio líquido a cada uno de los matraces de 500 ml (relación 1:5) y se les inoculó 1 ó 2 colonias de *S. warneri*. Tras esto, se incubaron en un agitador orbital (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) a 250 rpm y 20°C.
- b) **Hipoxia:** Se llenaron botellas de pyrex de 100 ml a capacidad para evitar la difusión del oxígeno del aire del espacio de cabeza al medio. Se inocularon las botellas del mismo modo que el descrito en el apartado anterior y posteriormente se incubaron a 20°C en estufa (AquaLytic) sin agitación.
- c) **Anoxia:** El medio líquido se distribuyó en botellas de pyrex de 250 ml, se llenaron a capacidad con 1 ó 2 colonias de *S. warneri* y se inocularon. Previamente, para eliminar el oxígeno disuelto, se inyectó nitrógeno durante 30 minutos que, al añadirlo al medio, desplaza al oxígeno presente. Una vez inoculadas las muestras, se inyectó nitrógeno durante 10 minutos para homogeneizar la muestra y asegurar las condiciones anóxicas. Para realizar este proceso en condiciones estériles se empleó un filtro (Figura 7). Los botes se incubaron a 20 °C en estufa (AquaLytic) sin agitación.



Figura 7. Bote para anoxia

Regularmente (aproximadamente cada dos horas) se tomaron 100 µl del medio de cultivo (en las tres condiciones) y se sembraron diluciones seriadas en placas. Estas se incubaron a 30°C durante 24-48 horas para su posterior recuento.

En el caso del cultivo anóxico, cada vez que se tomó muestra se inyectó previamente N₂ durante 5 minutos para homogeneizar la muestra y asegurar la ausencia de O₂ en el medio.

Al inicio y al final del experimento, en todos los casos se midió el oxígeno con un oxímetro (Modelo 58, YSI Hydrodata Letchworth, Reino Unido). Puesto que el electrodo no es autoclavable, su introducción en el cultivo para medir la concentración de oxígeno supondría la pérdida de esterilidad del medio. Por ello, se prepararon en paralelo cultivos idénticos para las medidas, eliminando el correspondiente recipiente después de su muestreo.

Las concentraciones estuvieron entre 7,8 y 8,2 mg/L O₂ en aerobiosis, entre 5,6 y 6,6 mg/L O₂ en hipoxia y < 1 mg/L O₂ en anoxia.

Todos los ensayos fueron llevados a cabo al menos por duplicado.

3.1.2.2 Medio sólido

Como alimento modelo para el estudio de crecimiento de microorganismos en ovoproductos, se realizaron tortillas. Para preparar estos alimentos modelo, se tomaron 20 ml (18,5g) de huevo (preparado de igual modo que el descrito en el apartado 3.1.2.1) y 30 g de patata pelada y cocida en agua hirviendo durante aproximadamente 20 minutos. A esta mezcla se le añadió *S. warneri* procedente de un preinóculo preparado previamente (se inocularon dos colonias de *S. warneri* en 100 ml de medio líquido Nutrient Broth (Biokar) en matraces Erlenmeyer de 500 ml con una relación medio: volumen de 1:5 y se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 24 horas en un agitador). Para ello se centrifugaron 2 ml de este preinóculo a 13000 g durante 5 minutos. Este pellet se resuspendió en 1 ml de NaCl al 0,7% y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, evitando así añadir medio de cultivo a las tortillas. Este pellet se resuspendió en huevo homogeneizándose junto con la patata durante 60 segundos en Stomacher.

Con esta mezcla se rellenaron jeringas de 10 ml, hasta aproximadamente 8 ml. La parte superior de las mismas se tapó con algodón y papel de aluminio (simulando la superficie aerobia de la tortilla) y la parte inferior con papel de aluminio y parafilm (simulando el interior anaerobio de la tortilla) (Figura 8).

Una vez preparadas las jeringas, se mantuvieron durante 8 minutos a 60°C en una estufa (Memmert). En estas condiciones se simula el proceso de cocción de una tortilla de patata. Posteriormente se analizaron tres tortillas recién hechas y a las 24, 48 y 72 horas. Las jeringas se incubaron durante esas 72 horas a 20°C (simulando el mantenimiento del producto a temperatura ambiente) en estufa (AquaLytic)

Para ver el efecto de la temperatura de tratamiento, esto mismo se repitió empleando las temperaturas de 80°C y 100°C durante 8 minutos e incubándolas también a 20°C.

Por otra parte, para observar el efecto de la temperatura de conservación, se repitió el proceso cocinándose las tortillas a 60°C durante 8 minutos e incubándose después a 6°C (simulando el mantenimiento del producto en nevera) y 30° (simulando el mantenimiento del producto a temperatura ambiente).

En todos los casos para el análisis llevado a cabo, se pesó 1 g de tortilla de la zona superior, central e inferior de cada tortilla, se diluyó en 9 ml de NaCl al 0,7% y se realizaron siembras de diluciones seriadas. Las placas se incubaron durante 24 horas a 30°C.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.



Figura 8. Tortillas.

3.2 PRUEBAS DE REOLOGÍA

Con el objetivo de determinar el efecto de los tratamientos térmicos que simulan el proceso de cocción sobre la estructura de la tortillas, se realizaron varias medidas reológicas.

Se utilizó un reómetro rotacional modelo HAAKE MARS II (Figura 9) de Thermo Fisher Scientific con sistema Peltier de control de temperatura con un sensor placa-placa (PP60-Ti).

Se analizaron tortillas sin inocular, sin cocer y cocidas a las temperaturas de 60, 80 y 100°C durante 8 minutos en una estufa (Memmert). La temperatura de análisis se mantuvo a 20 °C, la ranura entre placas empleada fue de 1,000 mm y se dejó la muestra, una vez colocada en el equipo, durante 10 minutos para que las tensiones generadas a la muestra durante su colocación fuesen eliminadas. Todos los ensayos fueron realizados, al menos, por duplicado.

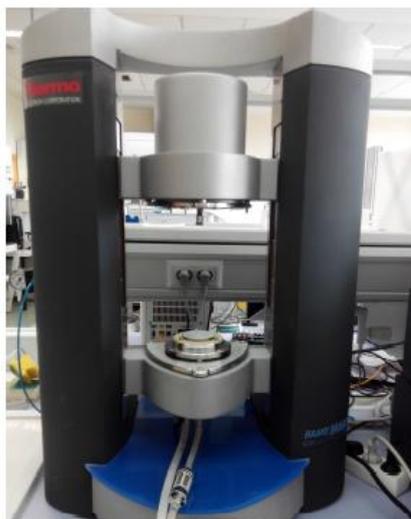


Figura 9. Reómetro modelo HAAKE Mars II

3.2.1 Barrido de esfuerzo

Para una sustancia cuyo comportamiento reológico se desconoce, el barrido de esfuerzo es el primer ensayo dinámico a realizar ya que aporta información para determinar la zona lineal viscoelástica.

Con una frecuencia de 1 Hz y una temperatura de 20°C, se partió de un esfuerzo inicial de 0,01 Pa que se incrementó durante 300 segundos hasta alcanzar un esfuerzo final de 500 Pa, observándose las variaciones de los módulos elástico (G') y viscoso (G'').

3.2.2 Barrido de frecuencia

Aporta información relacionada con las características estructurales de las muestras analizadas. Este ensayo se realiza a una temperatura determinada y un esfuerzo constante que debe estar dentro de la región lineal viscoelástica, en este caso 20°C y 5 Pa que se tomaron de la zona viscoelástica lineal determinada en el barrido de esfuerzo. Se realizó una rampa de frecuencia de 0,1 a 10 Hz.

A partir de los datos obtenidos en los barridos de frecuencia se calculó el número de coordinación z , parámetro que refleja las unidades reológicas correlacionadas con otras en la red tridimensional, y el coeficiente de proporcionalidad A , relacionado con la fuerza de interacción de estas unidades reológicas (Mancini et al., 2002). Ambos parámetros están relacionados según la ecuación $G^* = A \cdot \nu^{1/z}$ (Gabriele et al., 2001), donde G^* es el módulo complejo en Pa y ν la frecuencia en Hz.

3.3. MICROSCOPIA

Para conocer la estructura de la tortilla así como la morfología de *S. warneri*, se realizaron observaciones al microscopio automático Olympus BX61 (Figura 10).



Figura 10. Microscopio automático Olympus BX61

Se hicieron observaciones en fresco en medio líquido (Nutrient Broth), así como observaciones de tortillas sin cocer y cocidas (60°C, 8 minutos), teñidas con diferentes fluorocromos.

Uno de ellos es el yoduro de propidio, un intercalante de doble cadena de DNA que solo penetra en células que muestran una membrana dañada o permeable por lo que se utilizó para observar células muertas (teñidas de rojo). También se utilizó SYTO-9, otra sustancia intercalante que se une a la doble cadena de DNA y emite una señal fluorescente. Tiñe tanto células vivas como muertas de color verde y se suele emplear como sistema de fluorescencia para la PCR a tiempo real.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MEDIO LÍQUIDO

4.1.1. Efecto de la composición del huevo

En un trabajo previo (Neira, 2016) se ha estudiado la influencia de la composición del medio de cultivo derivado del huevo en la supervivencia de *S. warneri*. Se observó que en medio preparado con clara diluida e incubado a 20°C y 250 rpm se produce una disminución en el número de UFC inoculadas llegando a 0 a las 24 horas, lo que podría explicarse por la presencia de lisozima y ovotransferrina en la clara de huevo (Chen et al., 2005; Koshani et al., 2015; Silvetti et al., 2017). Por el contrario, en la yema diluida partiendo de 10^3 UFC/ml e inoculada a 25°C y 250 rpm, se observó crecimiento alcanzando valores próximos a 10^7 UFC/ml.

En este trabajo se ha analizado el crecimiento de *S. warneri* empleando como medio de cultivo huevo entero diluido (yema y clara) a 20°C y 250 rpm (ver aerobiosis Figura 11). Los datos correspondientes a la fase de crecimiento exponencial se pueden ajustar a una ecuación de primer orden $r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} X$; siendo $\mu_{m\acute{a}x}$ la velocidad máxima de crecimiento específico y X la concentración bacteriana. En este caso se obtuvo una $\mu_{m\acute{a}x} = 0,0639 \text{ h}^{-1}$.

Los datos obtenidos en el experimento de crecimiento bacteriano en yema anteriormente citado (Neira, 2016) a tres temperaturas (11, 25 y 37°C) ajustan a la ecuación de Arrhenius $\mu_{m\acute{a}x} = Ae^{B/T}$ ($A = 8,23 \times 10^{18} \text{ h}^{-1}$ y $B = -12952 \text{ K}$). Se utilizó esta ecuación para estimar la $\mu_{m\acute{a}x}$ a 20°C y poder comparar los resultados con los del presente trabajo, obteniéndose un valor de $\mu_{m\acute{a}x} = 0,53 \text{ h}^{-1}$. Este valor es muy superior al obtenido en huevo entero ya que la presencia de la clara provoca ese efecto antimicrobiano que no existe en el crecimiento en yema.

4.1.2. Efecto del oxígeno

Para estudiar el efecto de la concentración de oxígeno en el crecimiento de *S. warneri*, se realizaron varios experimentos inoculando el microorganismo en medio preparado a partir de huevo entero e incubado a 20°C en diferentes condiciones (aerobiosis, hipoxia y anoxia), mostrándose los resultados en la figura 11.

En aerobiosis ($7,8 \text{ mg/L O}_2 < \text{OD} > 8,2 \text{ mg/L O}_2$), partiendo de una concentración inicial de 2×10^5 UFC/ml se observó un crecimiento del microorganismo de dos órdenes de magnitud. En estas condiciones, *S. warneri* presenta una fase de latencia de aproximadamente unas 3 horas. A partir de ahí, comenzó la fase exponencial con una duración de 57 entrando a continuación en fase estacionaria. Se observó cómo a partir de las 70 horas, el cultivo entró en la fase de muerte bacteriana.

En hipoxia ($5,6 \text{ mg/L O}_2 < \text{OD} > 6,6 \text{ mg/L O}_2$), el crecimiento bacteriano fue menor, llegando a valores del orden de 10^6 UFC/ml respecto a la carga microbiana inicial, que era del orden de 10^5 UFC/ml. En este caso, la fase de latencia se alargó hasta unas 6 horas, a partir de las cuales comenzó la fase exponencial. Se alcanzó la fase estacionaria al mismo tiempo que en aerobiosis, observándose de nuevo el inicio de la fase estacionaria a partir de las 50 horas.

Finalmente, el crecimiento en anoxia ($\text{OD} < 1 \text{ m/L O}_2$) es menos significativo que en las situaciones anteriores, no alcanzando siquiera el aumento de un orden de magnitud mayor respecto a la carga microbiana inicial. Presentó una fase de latencia más larga que las anteriores, durante unas 8 horas aproximadamente. La fase exponencial llegó hasta el tiempo 52 a partir del cual, el cultivo entra en fase estacionaria no llegándose a apreciar la fase de muerte bacteriana.

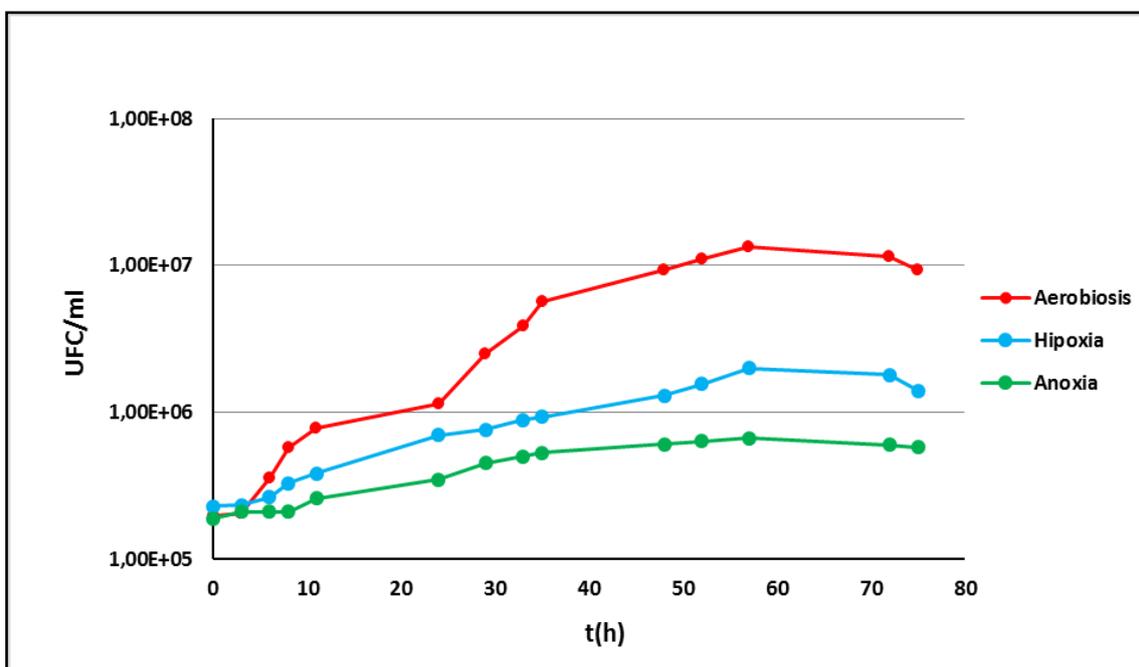


Figura 11. Crecimiento a 20°C en huevo entero diluido en diferentes condiciones de oxígeno, coeficiente de variación (CV) < 5%. Los datos que se muestran son los valores medios de dos experimentos llevados a cabo por duplicado.

Se realizaron ajustes a la fase de crecimiento exponencial (Figuras 12, 13 y 14) obteniéndose los valores de $\mu_{\text{máx}}$ en las tres condiciones (Tabla 1). Los valores obtenidos encajan con los resultados esperados puesto que en aerobiosis como ya se había comentado, la $\mu_{\text{máx}}$ resultante fue de 0,0639 (h^{-1}), más alta que en las otras dos condiciones, hipoxia 0,0354 (h^{-1}) y anoxia 0,0237 (h^{-1}), condición para la que se obtuvo la $\mu_{\text{máx}}$ más baja de todas.

Estos resultados muestran que, a pesar de que *S. warneri* es un microorganismo anaerobio facultativo, puede crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, prefiere ambientes oxigenados en los que alcanza mayores tasas de crecimiento tanto en lo que respecta a las concentraciones máximas alcanzadas, como en cuanto a las velocidades específicas de crecimiento máximo. De acuerdo con esto, algunas publicaciones (Noriega et al., 2010) hacen referencia a otros patógenos facultativos causantes de ETAs como *Listeria monocytogenes* y a métodos para ralentizar o prevenir su crecimiento mediante la modificación de la concentración de oxígeno en el medio, lo que también sería de aplicación para este microorganismo en el caso de ovoproductos.

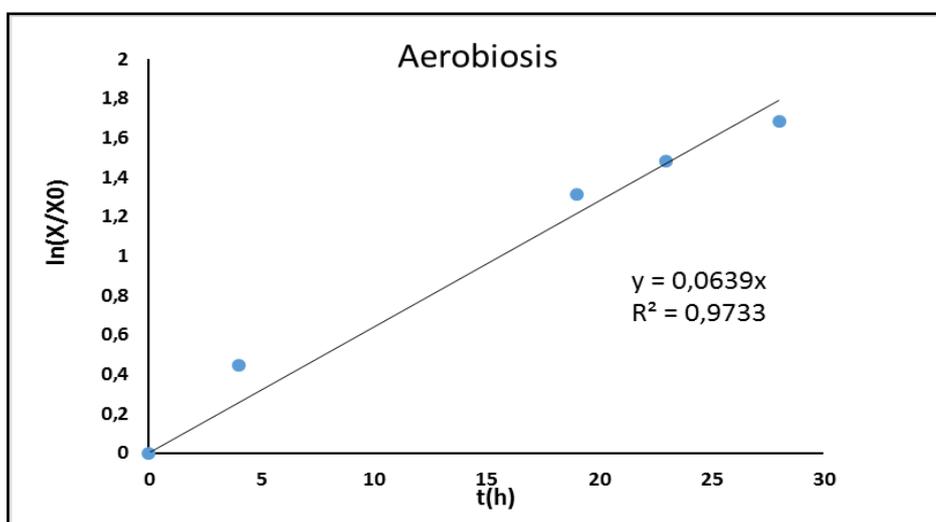


Figura 12. Ajustes en la fase exponencial para datos de crecimiento en cultivos llevados a cabo a 20°C en condiciones de aerobiosis

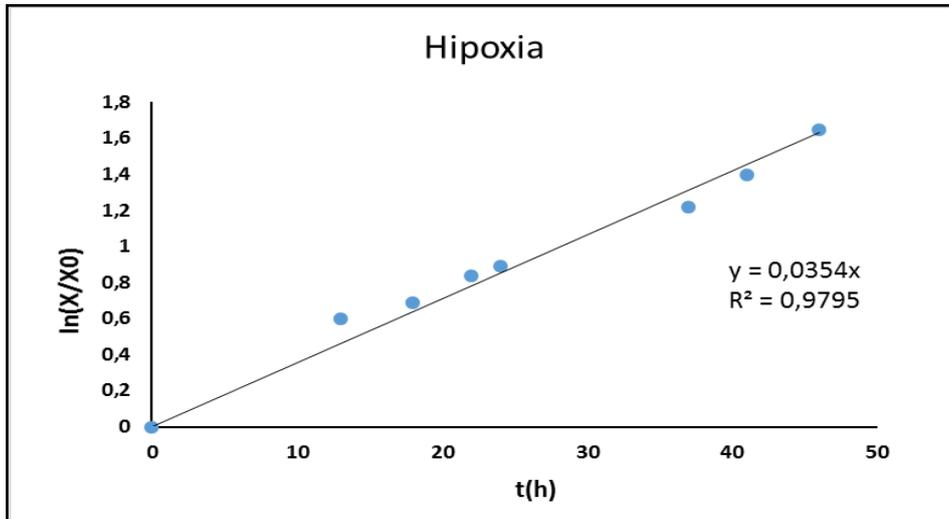


Figura 13. Ajustes en la fase exponencial para datos de crecimiento en cultivos llevados a cabo a 20°C en condiciones de hipoxia.

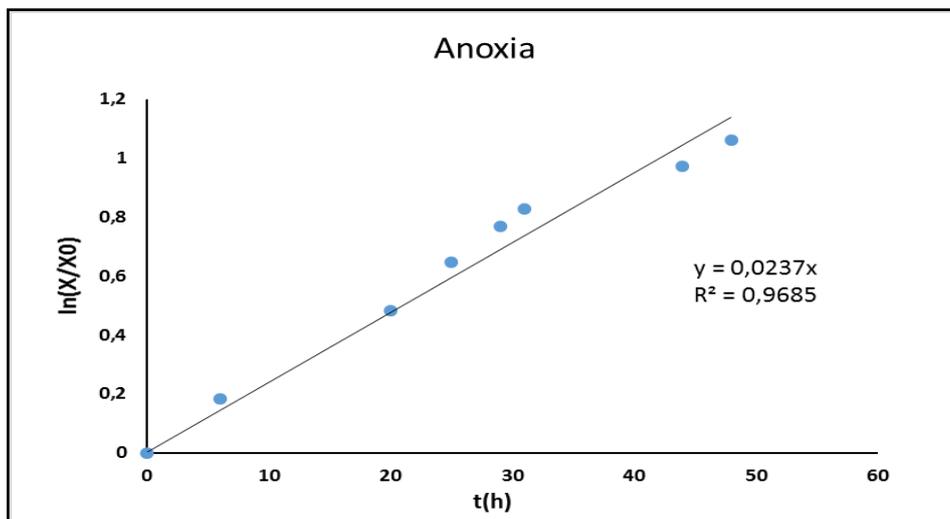


Figura 14. Ajustes en la fase exponencial para datos de crecimiento en cultivos llevados a cabo a 20°C en condiciones de anoxia.

Tabla 1. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ de los diferentes experimentos realizados en medio líquido.

Condición			Valores de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})
Tipo de medio	T° cocción	Concentración de oxígeno	
Líquido	20°C	Aerobiosis (250 rpm) 7,8 mg/L O₂ < OD > 8,2 mg/L O₂	0,0639
		Hipoxia 5,6mg/L O₂< OD > 6,6 mg/L O₂	0,0354
		Anoxia OD < 1 mg/L O₂	0,0237

4.2. MEDIO SÓLIDO

4.2.1. Caracterización del alimento sólido

Con el objetivo de determinar el efecto de los tratamientos térmicos que simulan el proceso de cocción sobre la estructura de la tortilla preparada tal y como se indica en el apartado de material y métodos, se realizaron varias medidas reológicas. Asimismo, se realizaron observaciones al microscopio óptico.

4.2.1.1. Ensayos reológicos

Se realizaron barridos de esfuerzo de las tortillas sin cocer con el fin de determinar el rango viscoelástico lineal. Los resultados se muestran en la Figura 15 donde se representan los módulos elástico (G') y viscoso (G'') frente al esfuerzo. Se puede observar que el intervalo viscoelástico lineal va desde los 0,1 Pa hasta aproximadamente los 500 Pa, valor a partir del cual comienza a romperse la estructura de la muestra tal y como refleja el comportamiento de los módulos elástico y viscoso. Para el rango de esfuerzos estudiado, las muestras resultaban más elásticas que viscosas.

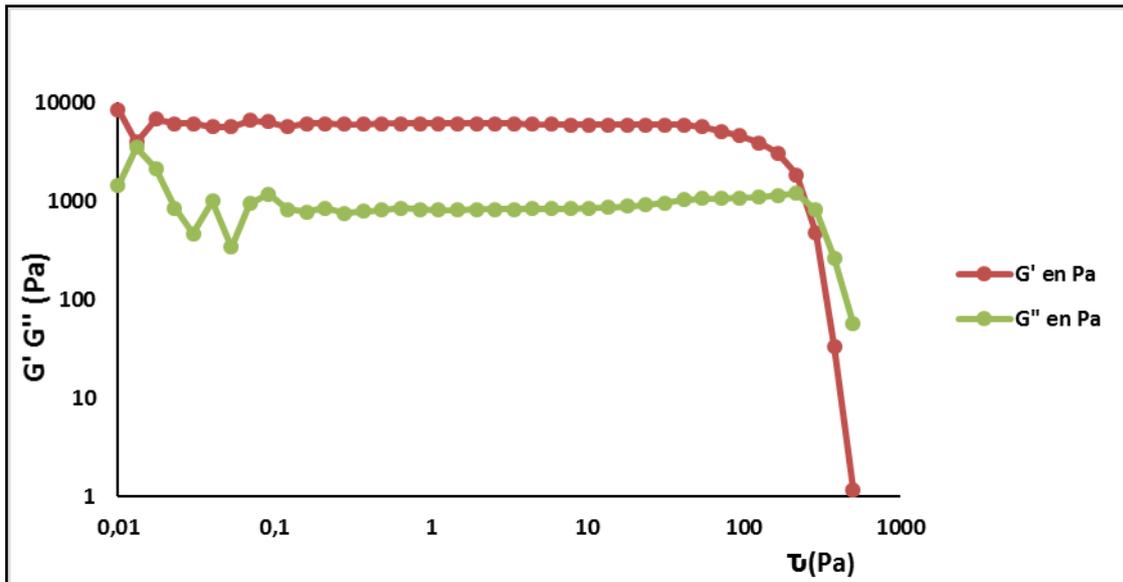


Figura 15. Barrido de esfuerzo con una frecuencia de 1 Hz y una temperatura de 20°C

Asimismo con el fin de determinar el efecto de la cocción sobre la estructura, se hicieron barridos de frecuencia las tortillas sin cocer y cocidas a 60, 80 y 100°C durante 8 minutos. Los resultados se muestran en las Figuras 16, 17, 18 y 19 donde se representan G' y G'' frente al esfuerzo.

En las muestras sin cocer se obtienen valores de ambos módulos ligeramente más bajos que una vez cocidas. Además, a medida que aumenta la temperatura de cocción, se observa cómo el módulo elástico aumenta ligeramente y lo mismo ocurre en el caso del módulo viscoso. De nuevo el módulo elástico es superior al módulo viscoso en todos los ensayos, mostrando el carácter predominantemente elástico de las muestras.

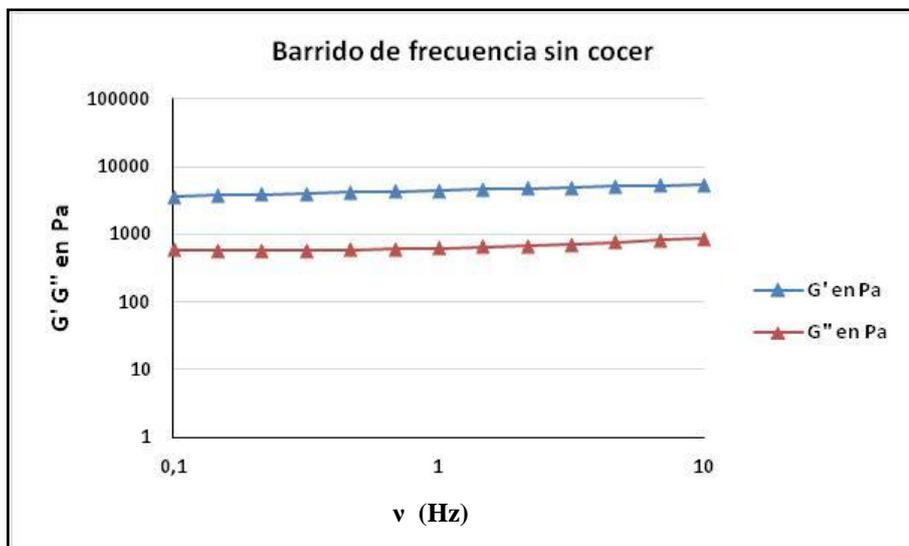


Figura 16. Barrido de frecuencia de tortillas sin cocer. Los datos mostrados son los valores medios del experimento realizado por duplicado.

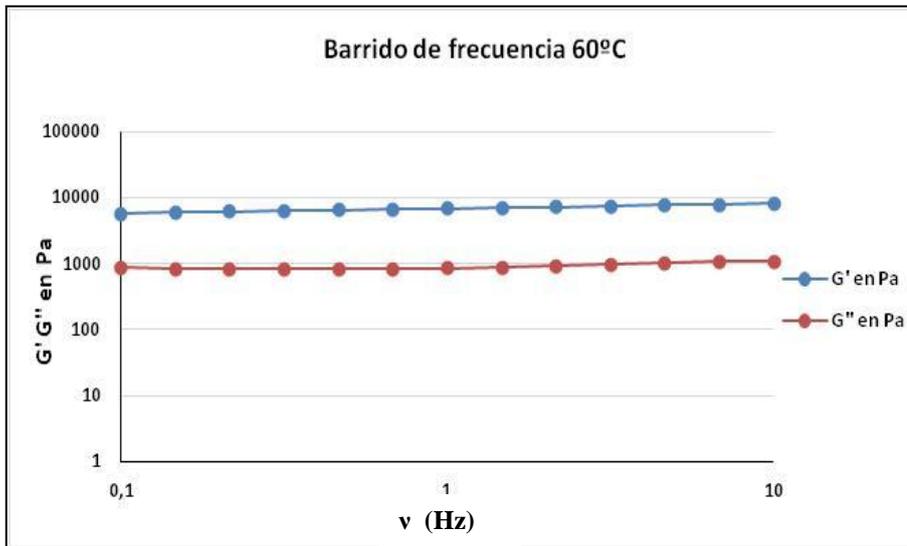


Figura 17. Barrido de frecuencia de tortillas cocidas a 60°C. Los datos mostrados son los valores medios del experimento realizado por duplicado.

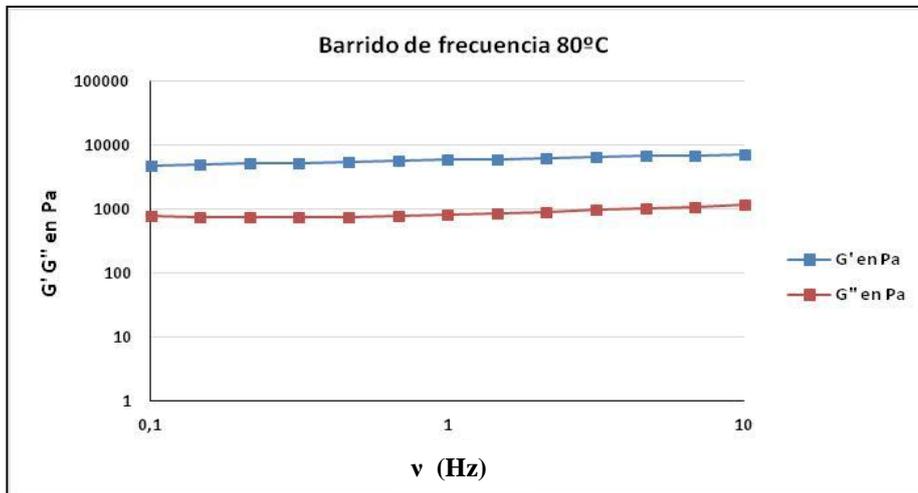


Figura 18. Barrido de frecuencia de tortillas cocidas a 80°C. Los datos mostrados son los valores medios del experimento realizado por duplicado.

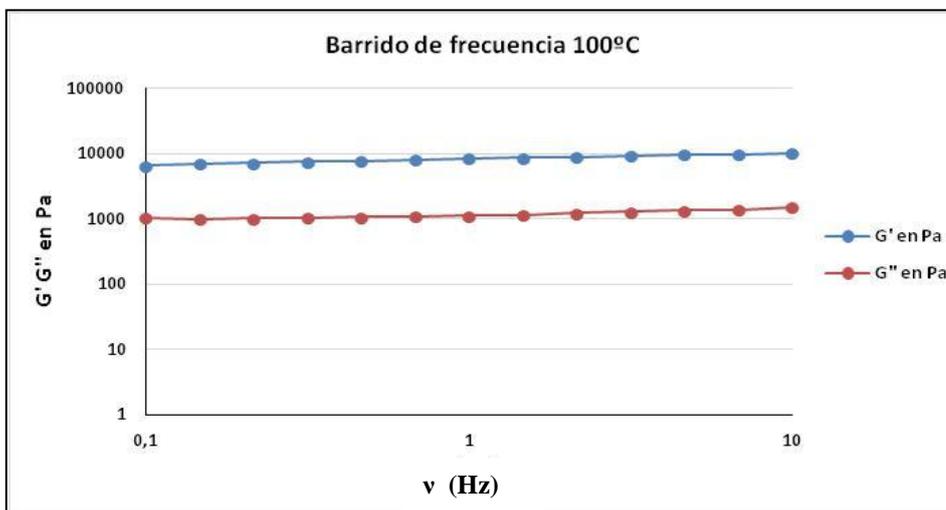


Figura 19. Barrido de frecuencia de tortillas cocidas a 100°C. Los datos mostrados son los valores medios del experimento realizado por duplicado.

Se calculó el número de coordinación z y el coeficiente de proporcionalidad A . Tal y como se observa en los valores de r^2 de la Tabla, el ajuste de los datos a la ecuación $G^* = A \cdot v^{1/z}$ (Gabriele et al., 2001) mostrados en las figuras, fue en todos los casos muy bueno (Figuras 20, 21, 22 y 23). Como era de esperar, a mayor temperatura de cocción de las muestras, mayor fuerza de interacción se formaba entre los diferentes componentes. Así, los valores de A eran mayores a 100°C que a 80°C , que a su vez es mayor que a 60°C y este mayor que en tortillas sin cocinar. Por el contrario, el número de uniones similar independientemente de las temperaturas de cocción. Algunas referencias (Migliori et al. 2009) realizaron experimentos similares utilizando solamente huevo como muestra y los resultados obtenidos cuando se considera el parámetro z fueron semejantes a los mostrados en la Tabla 2, obteniéndose valores en torno a 12. Sin embargo, en el citado trabajo, no se obtuvieron valores crecientes de A a medida que se aumentaba la temperatura. Podría pensarse que esta diferencia en los resultados se debiera a que en este trabajo se analizó una muestra de huevo y patata, lo que presenta un comportamiento reológico diferente al huevo solo, debido probablemente a la presencia del almidón.

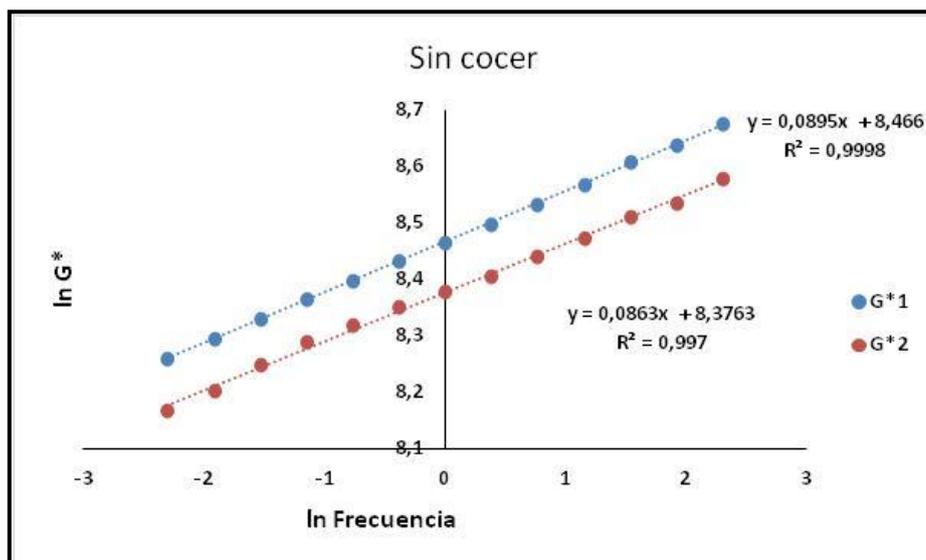


Figura 20. Gráfica de ajustes de los datos mostrados en la Figura según la ecuación indicada en el texto, sin cocer

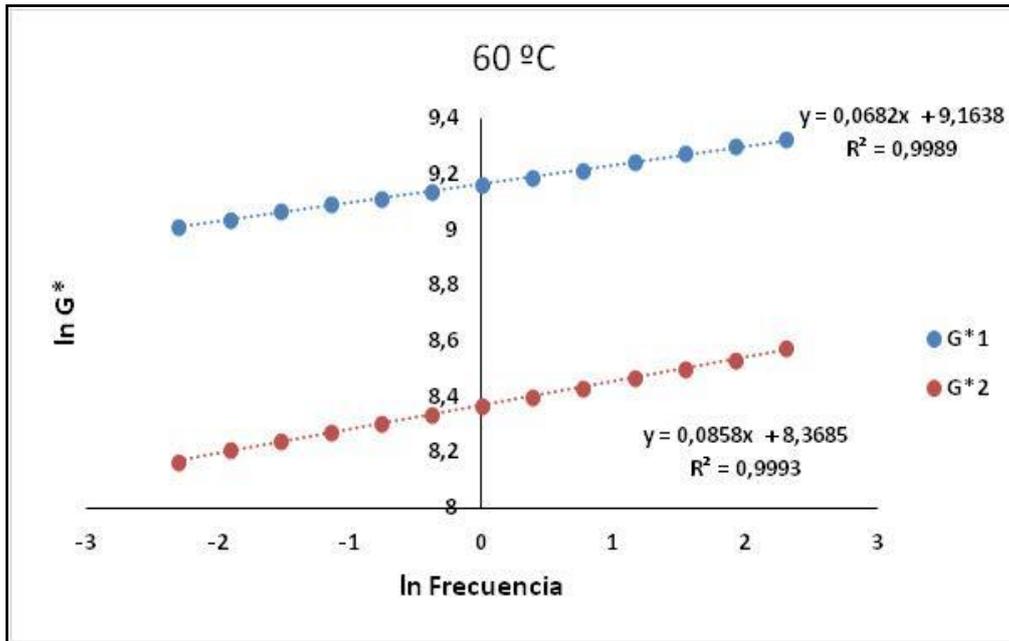


Figura 21. Gráfica de ajustes de los datos mostrados en la Figura según la ecuación indicada en el texto. Muestra cocida a 60°C.

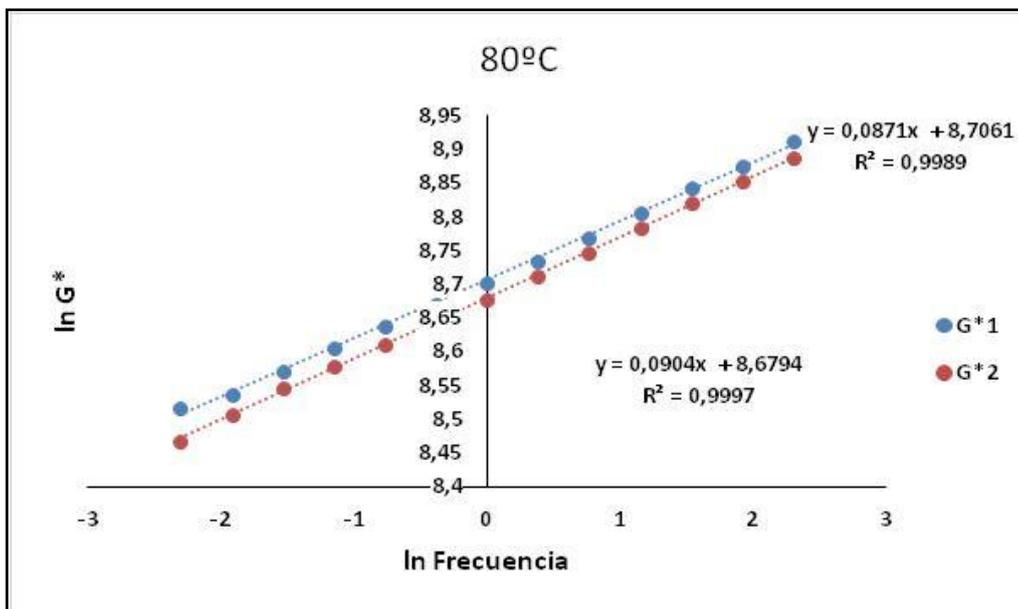


Figura 22. Gráfica de ajustes de los datos mostrados en la Figura según la ecuación indicada en el texto. Muestra cocida a 80°C.

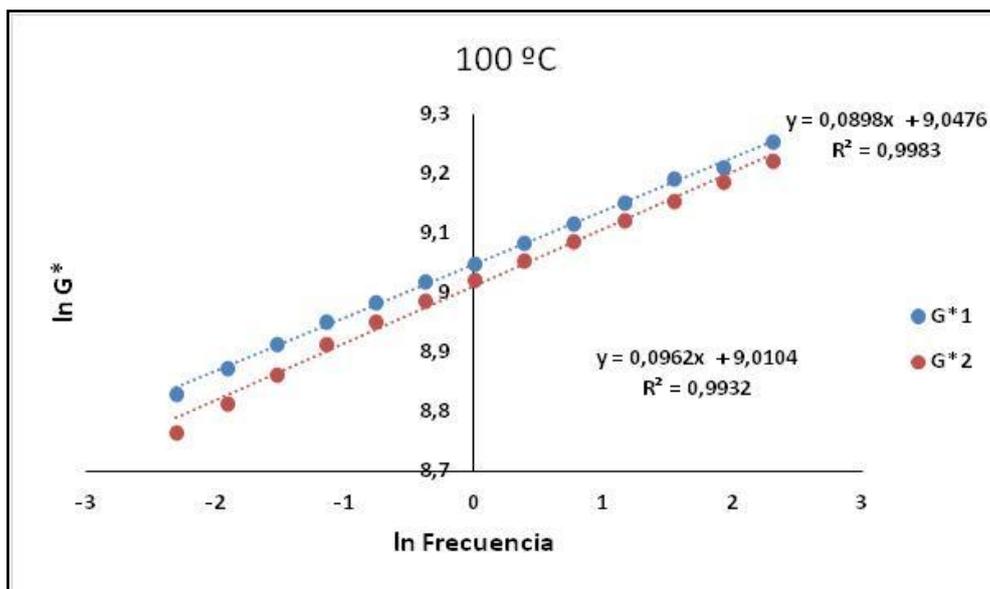


Figura 23. Gráfica de ajustes de los datos mostrados en la Figura según la ecuación indicada en el texto. Muestra cocida a 100°C.

Tabla 2. Parámetros A y z obtenidos a partir de los barridos de frecuencia realizados en tortillas.

	A (kPa)	z	r^2
Sin cocer (control)	$4,55 \pm 0,29$	$11,38 \pm 0,29$	0,993
Cocidas a 60°C	$5,57 \pm 1,78$	$11,34 \pm 0,45$	0,993
Cocidas a 80°C	$5,96 \pm 0,11$	$11,27 \pm 0,30$	0,993
Cocidas a 100°C	$8,34 \pm 0,22$	$10,77 \pm 0,52$	0,993

4.2.1.2. Microscopía

Asimismo, se observaron muestras de tortillas simuladas en fresco sin cocer y cocidas a 60°C durante 8 minutos. Si bien los barridos de frecuencia mostraron ligeras diferencias en el comportamiento reológico de las muestras estudiadas, al observar la estructura de las muestras con microscopio no se apreciaron dichas diferencias (Figura 24).

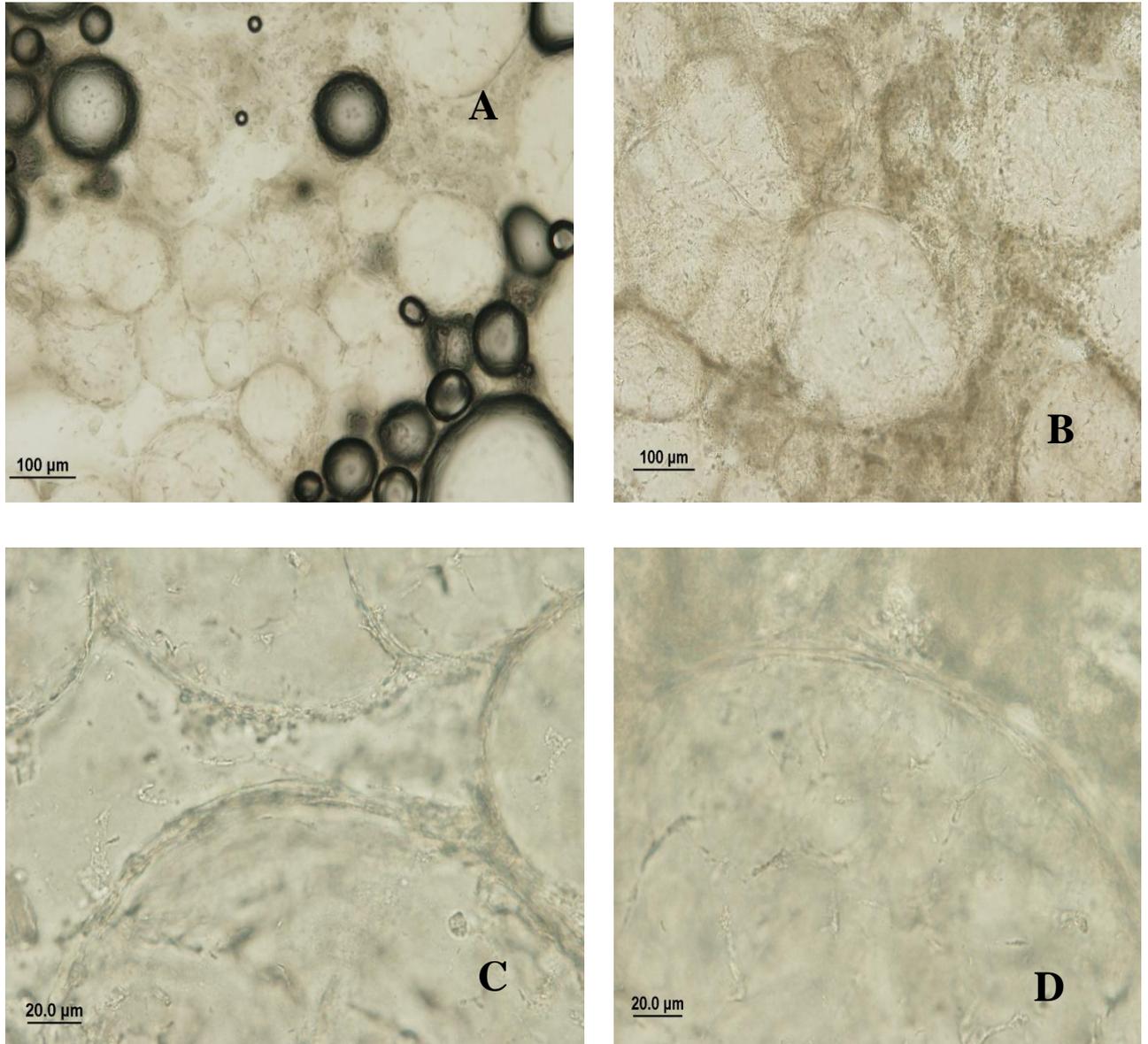


Figura 24. **A.** Estructura de patata sin cocer. **B.** Estructura de patata cocida a 60°C durante 8 minutos. **C.** Detalle de célula de patata sin cocer. **D.** Detalle de célula de patata cocida.

Se realizaron observaciones al microscopio del microorganismo inoculado en tortilla y también en medio líquido con el fin de poder compararlo. Como se puede ver en las figuras 25 y 26, *S. warneri* es un coco que en medio líquido parecen agruparse en pequeños racimos mientras que en medio sólido (tortilla) aparecen disgregados.

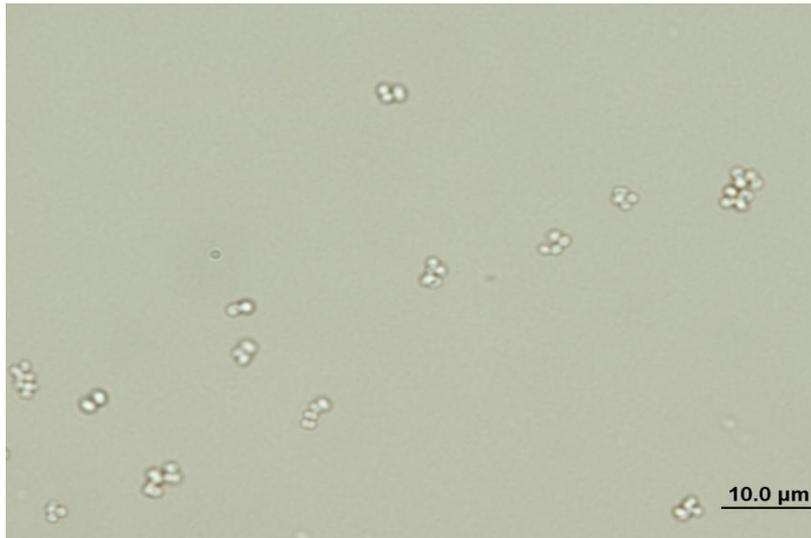


Figura 25. *S.warneri* en medio líquido Nutrient Broth (NB).

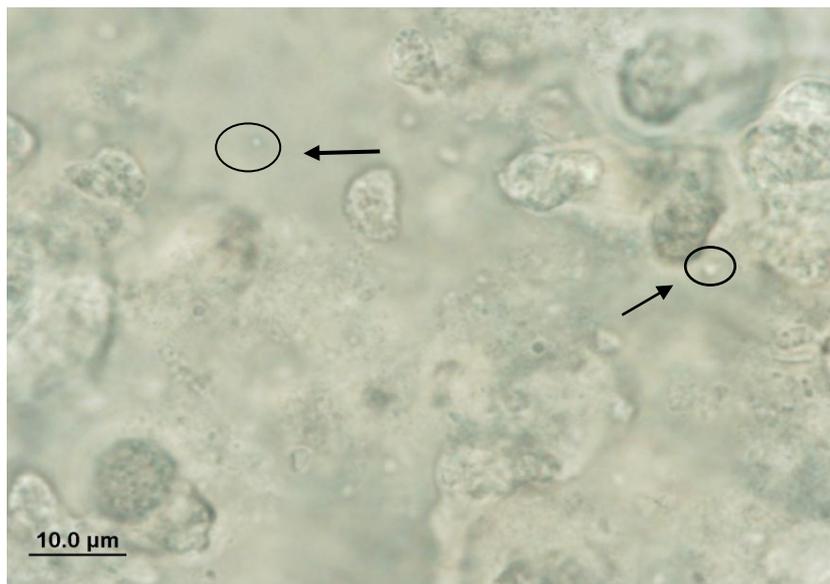


Figura 26. *S. warneri* inoculada en tortilla

Se realizaron tinciones con los fluorocromos ioduro de propidio y SYTO-9 de muestras de tortilla cocida a 60°C. En la figura 27 se muestran en rojo células muertas teñidas con ioduro de propidio y en verde células viables teñidas con SYTO-9.

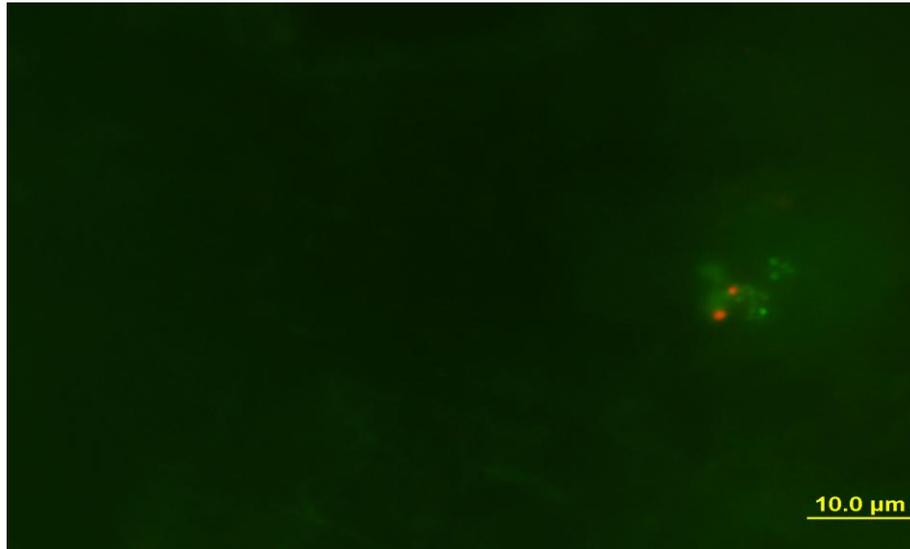


Figura 27. Tinción con fluorocromos ioduro de propidio y SYTO 9. En rojo células muertas y en verde células vivas

4.2.2. Desarrollo del microorganismo en medio sólido

4.2.2.1. Efecto de la posición

La masa de las tortillas se inoculó con *S. warneri* y se distribuyeron en jeringuillas tal y como se explica en material y métodos. A continuación, se cocinaron a 60°C durante 8 minutos y se inocularon a 20°C simulando conservación a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de las tortillas a distintos tiempos. De cada tortilla se analizó 1 g de la zona superior (simulando la superficie aerobia de la tortilla), 1 g de la zona central y 1 g de la zona inferior (equivalente al centro de la tortilla más alejado de la superficie). Los resultados se muestran en la figura 28, como tiempo cero se consideró la tortilla recién “cocinada” y se vio que a 60°C no se reducía significativamente el número de UFC en comparación con la muestra sin “cocinar” ya que en ambos casos se obtenían valores en torno a 2×10^7 UFC/g.

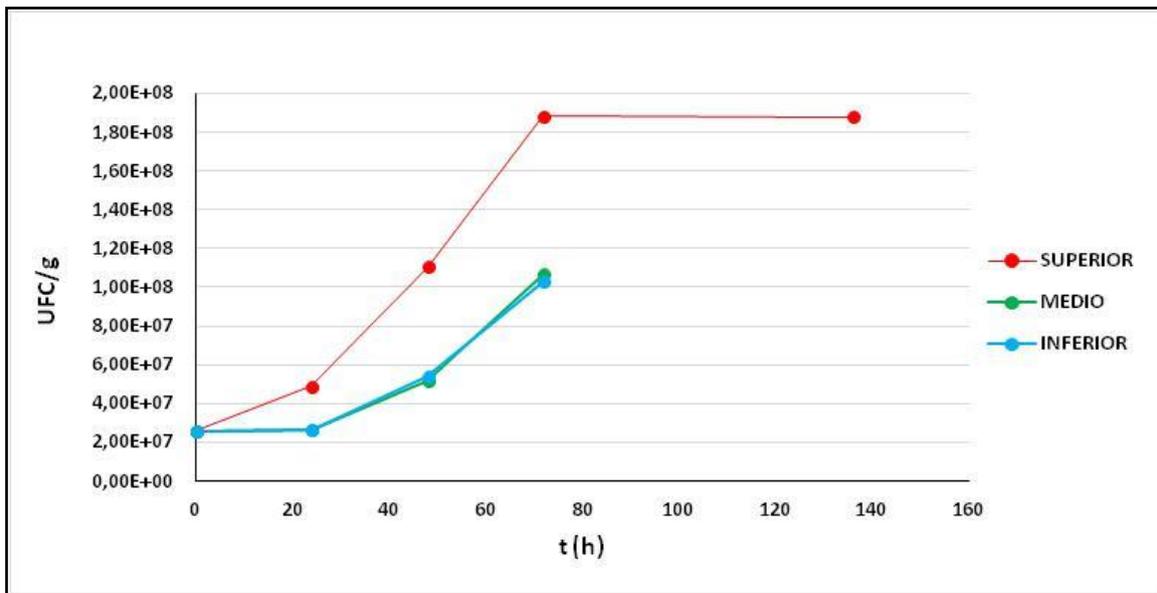


Figura 28. Crecimiento de *S. warneri* en tortillas cocinadas a 60°C e incubadas a 20°C. Coeficiente de variación < 5%. Estos datos corresponden a la media del experimento realizado por triplicado.

Como se observa en la Figura 28, partiendo de una concentración de inóculo de 2×10^7 ufc/g, en la zona superior de la tortilla el crecimiento de *S. warneri* fue más significativo que en la zona media e inferior. En estas zonas, si bien la concentración aumentó también un orden de magnitud mayor, no llegó a las concentraciones tan alcanzadas en la zona aerobia, si bien es posible que si se hubieran tomado muestras durante más tiempo, se hubieran alcanzado los mismos valores. Tanto en la zona media como en la inferior, el microorganismo se comporta prácticamente igual, con una fase lag más larga que en la zona superior donde apenas existe. En la zona superior el análisis de muestras se continuó por más tiempo para conocer el comportamiento del microorganismo a largo plazo observándose que a partir del tiempo 72 entró en fase estacionaria de crecimiento.

Los valores de $\mu_{\text{máx}}$ en los tres casos toman valores muy similares, entre 0,0282 y 0,0289 (h^{-1}) (tabla 3), próximos a los obtenidos en medio líquido de huevo en condiciones anóxicas. La disponibilidad de oxígeno afecta por tanto en medio sólido a la fase lag pero no a la velocidad específica de crecimiento máxima.

El comportamiento de la bacteria cuando crece en medio líquido difiere por tanto del que presenta cuando se desarrolla en el interior de un alimento sólido. Por una parte, el efecto de estar confinado en una estructura sólida puede modificar por sí

mismo el metabolismo de la bacteria, como consecuencia de alteraciones en el desarrollo celular, en la morfología y en la permeabilidad de la membrana. Además, la estructura del alimento sólido lleva asociadas limitaciones en la difusión responsables de gradientes de concentración a lo largo del alimento, que influyen, desde un punto de vista microbiológico, en la disponibilidad de nutrientes y acumulación de metabolitos. Como consecuencia, aparecen dentro del propio alimento entornos con distintas características que pueden resultar más o menos vulnerables a la proliferación de ciertos patógenos (Wimpenny et al., 1995; Malakar et al., 2000). Es necesario tener presente además, que la tortilla cuenta en su composición con patata no presente en el medio líquido.

4.2.2.2. Efecto de la temperatura de cocción

Para ver el efecto de la temperatura de tratamiento, se repitió el proceso anterior empleando las temperaturas de 80 y 100°C durante 8 minutos e incubándose también a 20°C. Los resultados obtenidos (Figura 29) muestran que, al igual que en el caso de 60°C, la concentración inicial de microorganismo no se ve afectada al “cocinar” la muestra a 80°C manteniéndose en valores del orden de 10^7 UFC/g. El comportamiento del microorganismo en la tortilla cocinada a 80°C fue similar al de 60°C. Partiendo de una concentración inicial de 2×10^7 UFC/g, alcanzó mayores tasas de crecimiento en la zona superior que en la central e inferior donde el patrón de crecimiento fue prácticamente el mismo. Los valores de $\mu_{\text{máx}}$ (Tabla 3) fueron también muy cercanos a los obtenidos cuando la tortilla se cocinaba a 60°C. Sin embargo, cuando la temperatura de cocción se aumentó hasta los 100°C (Figura 30) se observó que se producía una disminución de un orden de magnitud en la concentración inicial de *S. warneri*. ya que en este caso se partió de valores de 2×10^6 UFC/g, obtenidos después de la cocción aún cuando se partió del mismo inóculo.

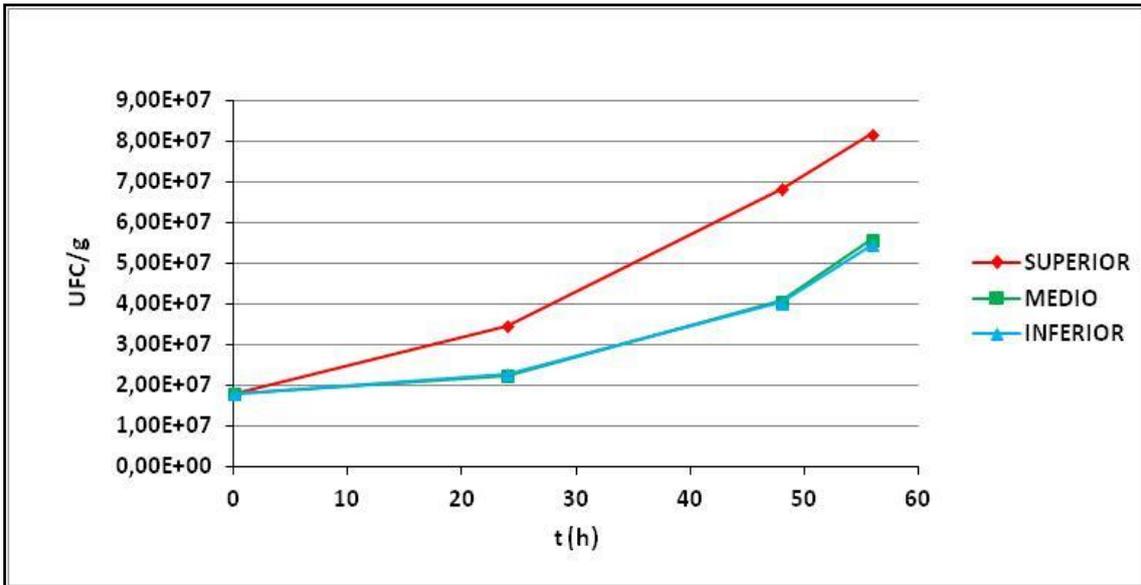


Figura 29. Curva de crecimiento de *S. warneri* en tortillas simuladas cocinadas a 80. Coeficiente de variación < 5%. Estos datos corresponden a la media del experimento realizado por triplicado.

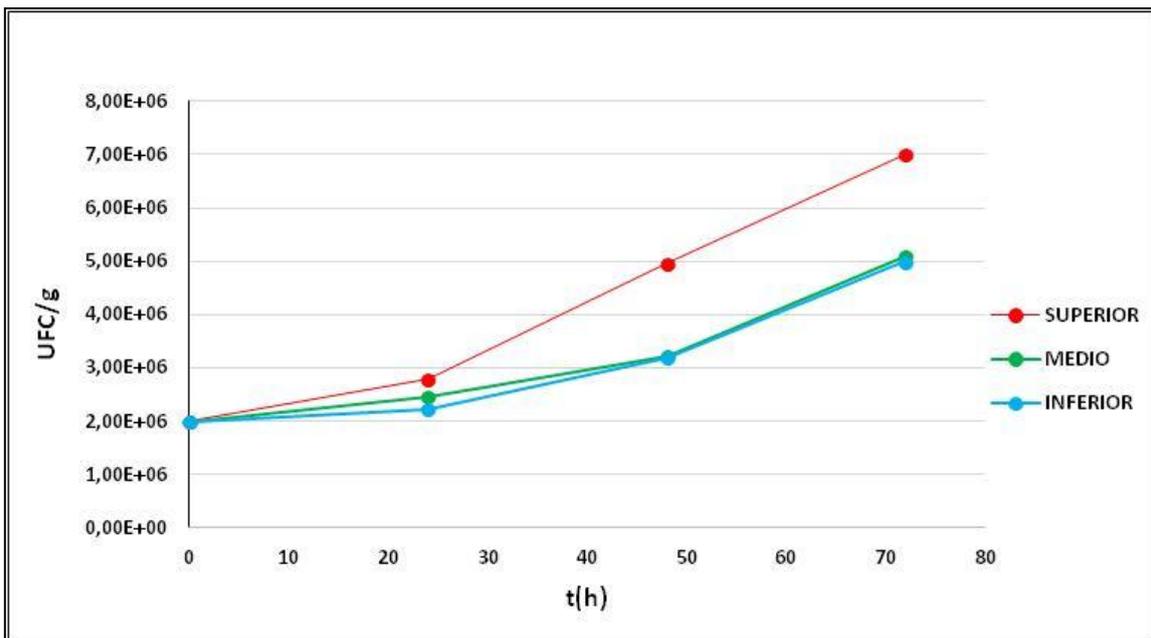


Figura 30. Curva de crecimiento de *S.warneri* a 100°C. Coeficiente de variación < 5%. Estos datos corresponden a la media del experimento realizado por triplicado.

El este caso los valores de $\mu_{\text{máx}}$ (Tabla 3) fueron inferiores a los obtenidos cuando la tortilla se cocinaba a 80°C o a 60°C, siendo aproximadamente la mitad los obtenidos en la zona media e inferior debido a una menor disponibilidad de oxígeno. De todos estos resultados, se puede extraer que el empleo de temperaturas de cocción superiores a 80°C minimiza el riesgo microbiológico, debido a la disminución de la carga microbiana gracias al proceso de cocción y a la ralentización en el crecimiento de los microorganismos que logran sobrevivir.

Los ajustes para obtener la $\mu_{\text{máx}}$ se muestran en las figuras 31, 32 y 33.

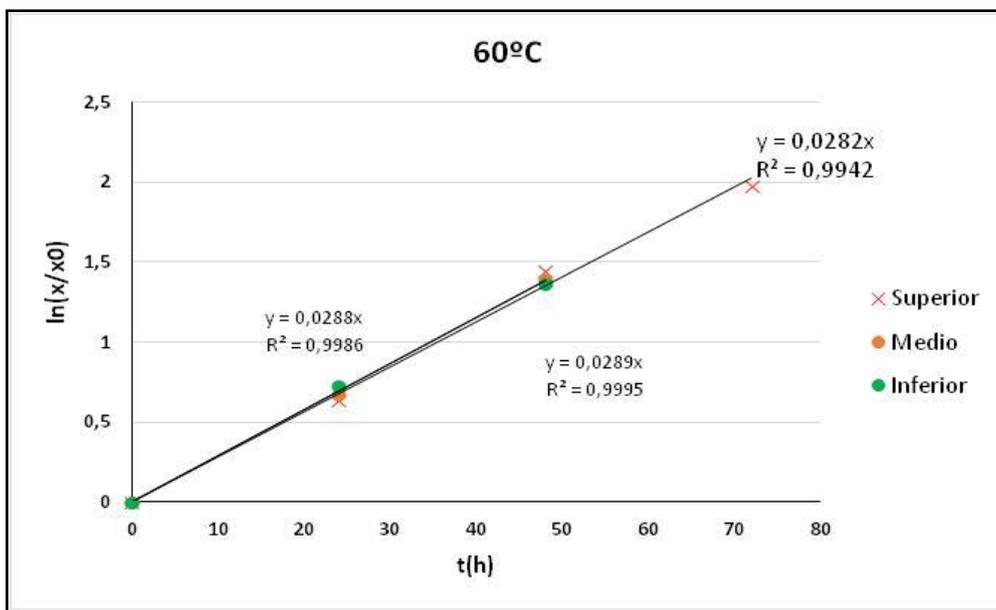


Figura 31. Gráficas de ajustes a fase exponencial a 60°C de cocción y 20°C incubación.

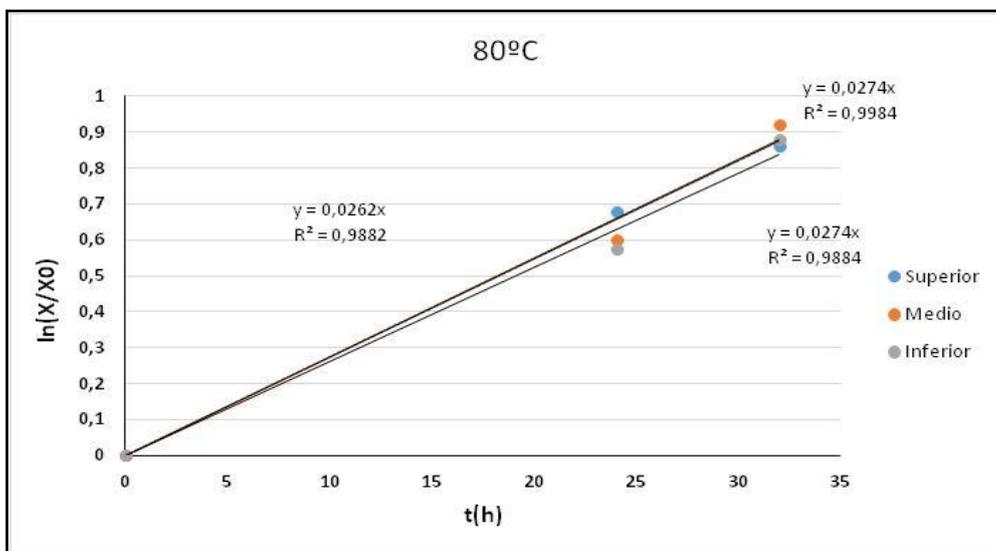


Figura 32. Gráficas de ajustes a fase exponencial a 80°C de cocción y 20°C incubación.

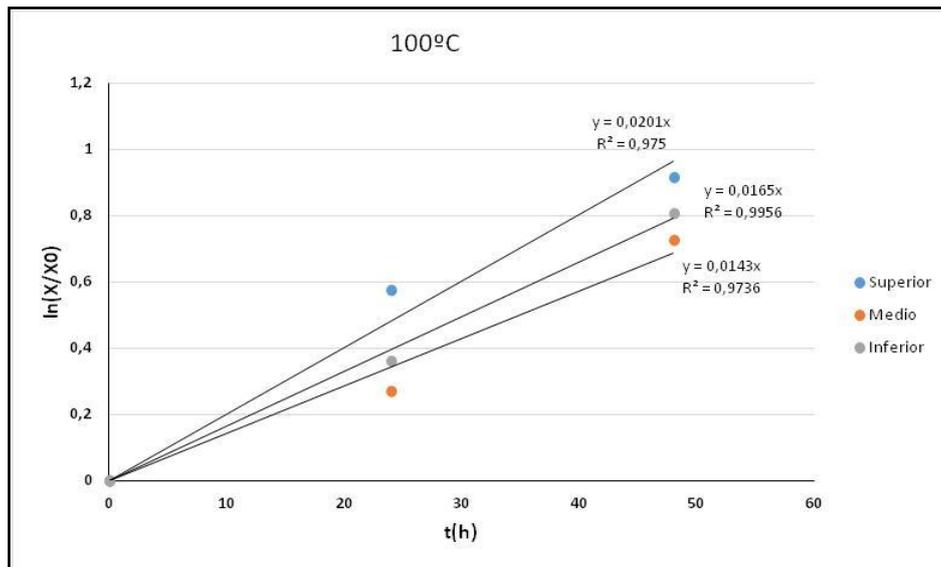


Figura 33. Gráficas de ajustes a fase exponencial a 100°C de cocción y 20°C incubación.

4.2.2.3. Efecto de la temperatura de conservación

Con el fin de analizar el efecto de la temperatura de conservación, se repitió el proceso cocinándose las tortillas simuladas a 60°C durante 8 minutos e incubándose después a 6°C (simulando el mantenimiento del producto en nevera) y 30° (simulando el mantenimiento del producto a temperatura ambiente en clima cálido).

Como muestra la Figura 34, la incubación a 30°C provoca un crecimiento mucho más rápido que para el resto de las temperaturas, no existiendo fase lag. Por el contrario, cuando la temperatura de incubación era de 6°C (Figura 35), en las tres zonas de la muestra se observa una fase lag de, aproximadamente, unas 24 horas. La concentración alcanzada a las 72 horas fue de $6,5 \times 10^7$ UFC/g en la superficie, mientras que a 20 (Figura 36) y 30°C se llegaba a concentraciones de $1,8 \times 10^8$ UFC/g. Al igual que en los casos anteriores, el crecimiento era mayor en la zona superficial.

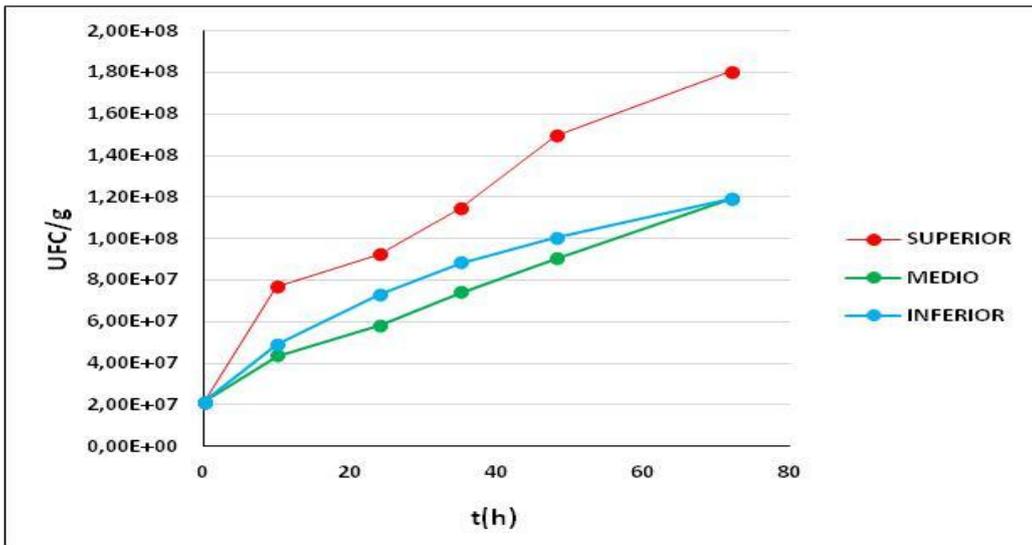


Figura 34. Curva de crecimiento de *S. warneri* en tortillas incubadas a 30°C y cocidas a 60°C. Coeficiente de variación < 5%. Los datos obtenidos corresponden a la media de experimentos realizados por triplicado.

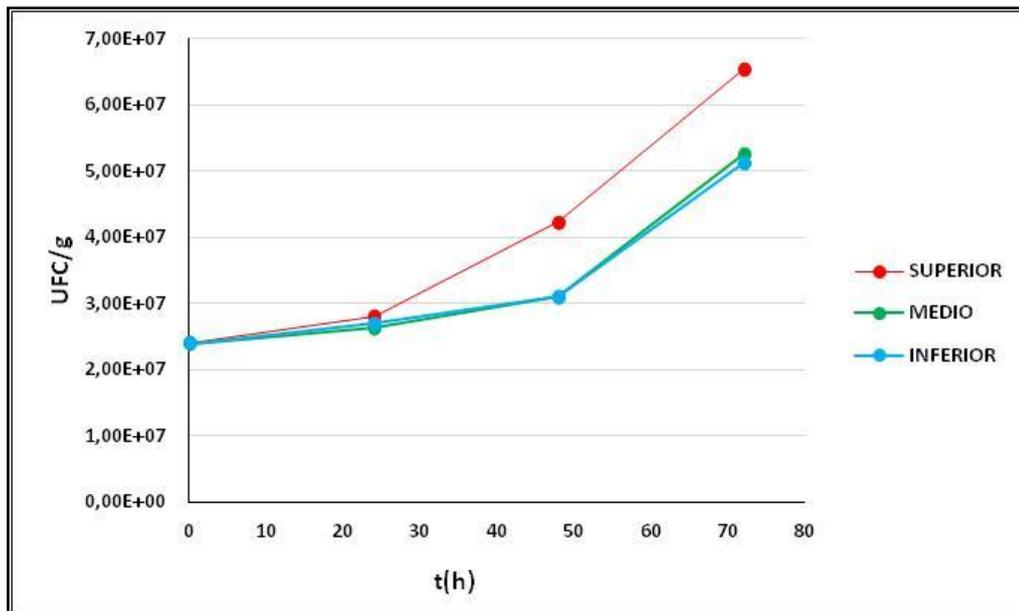


Figura 35. Curva de crecimiento de *S. warneri* en tortillas incubadas a 6°C y cocidas a 60°C. Coeficiente de variación < 5%. Los datos obtenidos corresponden a la media de experimentos realizados por triplicado.

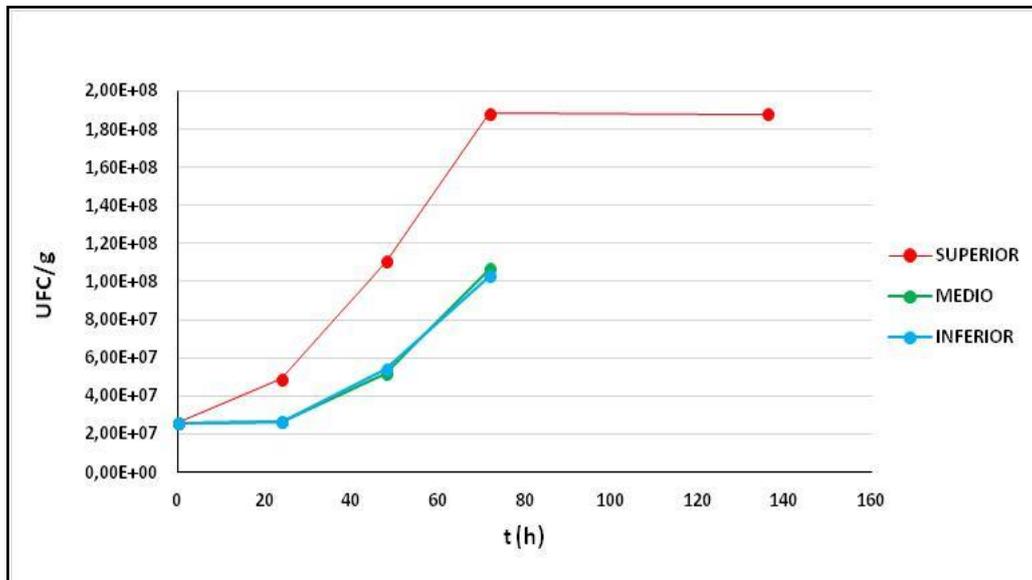


Figura 36. Curva de crecimiento de *S. warneri* en tortillas incubadas a 20°C y cocidas a 60°C. Coeficiente de variación < 5%. Los datos obtenidos corresponden a la media de experimentos realizados por triplicado.

Los ajustes realizados para obtener los valores de $\mu_{\text{máx}}$ mostrados en la Tabla, se representan en las Figuras 37 y 38.

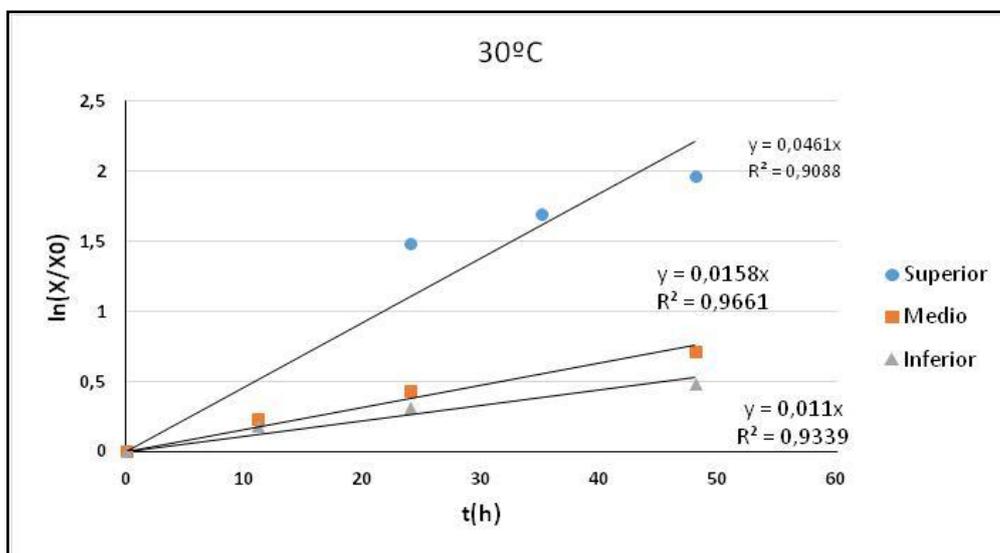


Figura 37. Gráfica de ajustes a fase exponencial a 60°C de cocción y 30°C incubación.

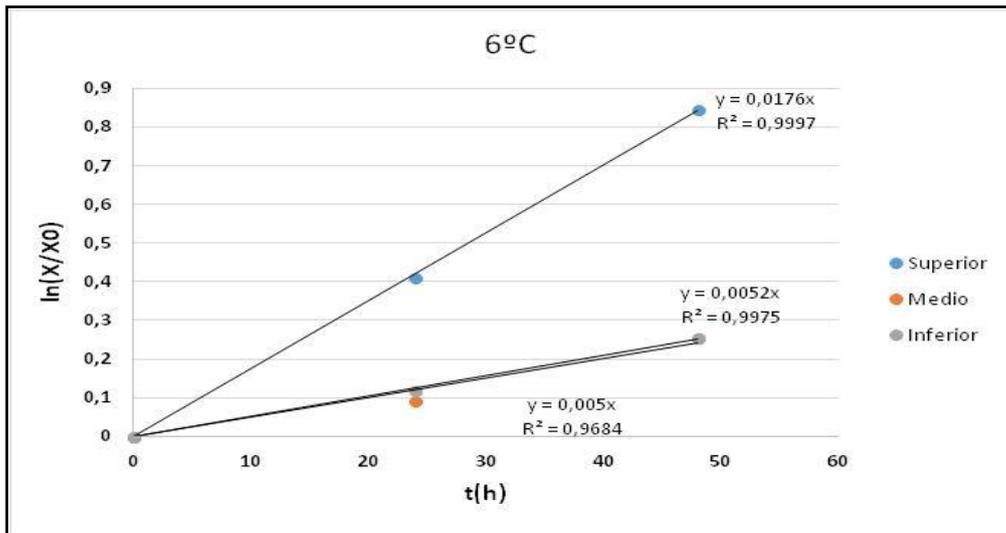


Figura 38. Gráficas de ajustes a fase exponencial a 60°C de cocción y 6°C incubación.

Respecto a las velocidades específicas de crecimiento máximo (Tabla 3), como cabría esperar, a 6°C se obtuvieron los valores más bajos de $\mu_{\text{máx}}$ de las tres zonas de la tortilla. En el caso de 30°C, se obtuvo una $\mu_{\text{máx}}$ mucho más elevada en la superficie que en el resto de condiciones llegando casi a triplicar el valor obtenido a 6°C. De todos estos resultados, se deduce el riesgo que supone mantener ovoproductos a temperatura ambiente, aumentando un orden de magnitud la carga microbiana en 72 horas a temperaturas de 20-30°C y comenzando la multiplicación de los microorganismos desde las horas iniciales. El empleo de refrigeración consigue que durante 24 horas no se produzca crecimiento. Asimismo, el empleo de condiciones libres de oxígeno permiten también alargar el tiempo de vida útil del producto, especialmente si se combinan con condiciones de refrigeración.

Tabla 3. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ de los diferentes experimentos realizados en medio sólido.

Condición				Valores de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})
Tipo de medio	T° cocción	T° incubación	Zona	
Sólido	60°C	20°C	Superior	0,0282
			Medio	0,0288
			Inferior	0,0289
	80°C	20°C	Superior	0,0274
			Medio	0,0262
			Inferior	0,0274
	100°C	20°C	Superior	0,0201
			Medio	0,0143
			Inferior	0,0165
	60°C	30°C	Superior	0,0461
			Medio	0,0158
			Inferior	0,0110
	60°C°	6°C	Superior	0,0176
			Medio	0,0052
			Inferior	0,0050

5. CONCLUSIONES

1. El crecimiento de la bacteria modelo en huevo entero (yema y clara) presentó un valor de $\mu_{\text{máx}}$ menor respecto a experimentos realizados solo en yema, debido a las propiedades antimicrobianas de la clara.
2. Se observó que aunque *S. warneri* es anaerobio facultativo, en medio líquido a 20°C crece mejor en condiciones aerobias mostrando mayores valores de $\mu_{\text{máx}}$.
3. Los ensayos reológicos mostraron que las tortillas presentan un carácter predominantemente elástico. Además, se observó que a mayor temperatura de cocción mayor era la fuerza de las uniones entre los componentes de las tortillas. Estas diferencias no se apreciaron en observaciones al microscopio.
4. El análisis de diferentes zonas de las tortillas mostró que, si bien se observó crecimiento en todas las posiciones, en la superficie alcanzaba concentraciones más elevadas gracias a una mayor disponibilidad de oxígeno.
5. Respecto al efecto de la temperatura de cocción, la concentración inicial del microorganismo no se vio afectada a 60 y 80°C mientras que sí se redujo un orden de magnitud cuando se empleó una temperatura de 100°C. En base a esto, se recomienda el empleo de temperaturas de cocción superiores a 80°C.
6. En relación al efecto de la temperatura de conservación, *S. warneri* creció a todas las temperaturas estudiadas (6°C, 20°C y 30°C), aunque a temperaturas más elevadas redujeron la fase de latencia y aumentaron considerablemente los valores de $\mu_{\text{máx}}$, lo que pone de manifiesto la necesidad de mantener los ovoproductos refrigerados con el fin de alargar su vida útil.

6 .BIBLIOGRAFÍA

Ayala, A. A.; Serna, L., Mosquera, E. S. Freeze-drying in yellow pitahaya, 2010.

Baron, F.; Nau, F.; Guérin-Dubiard, C.; Bonnassie, S.; Gautier, M.; Andrews, S.C.; Jan, S. (2016) Egg white versus *Salmonella* Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. Food Microbiology Part B 53: 82-93.

Chemaly, M. & Salvat, G. (2011) 2-Foodborne disease associated with eggs: microbial hazards and *Salmonella* Enteritidis risk assessment. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: 34-45.

Chemaly, M. & Salvat, G. (2011) 2-Foodborne disease associated with eggs: microbial hazards and *Salmonella* Enteritidis risk assessment. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: 34-45.

Chen, X., Niyonsaba, F. & Ushio, H. Synergistic effect of antibacterial agents human β -defensins, cathelicidin LL-37 and **lysozyme** against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 2005.

Choi, Y. and M.R. Okos. 1986. Effects of temperature and composition on the thermal properties of foods. In Food Engineering and Process Applications, vol. 1, pp. 93-101. M. LeMaguer and P. Jelen, eds. Elsevier Applied Science, London.

Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos (2015): www.icmsf.org.

Cuevas, O.; Cercenado, E.; Goyanes, M.J.; Vindel, A.; Trincado, P.; Boquete, T.; Marín, M.; Bouza, E. (2008) *Staphylococcus* spp. en España: situación actual y evolución de la resistencia a antimicrobianos (1986-2006) Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 26: 269-277.

De Reu, K.; Grijspeerdt, K.; Messens, W.; Heyndrickx, M.; Uyttendaele, M.; Debevere, J.; Herman, L. (2006) Eggshell factors influencing eggshell penetration and

whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. International Journal of Food Microbiology 112: 253-260.

Dervakos, George A. & Webb, Colin. On the merits of viable-cell immobilization. Biotechnology advances, volume 9: 559-612.

Dos Santos, A.G. (2007). Estudio del comportamiento cinético de los microorganismos de interés en la seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis.

Fernández, P. S.; George, S. M.; Sills, C. C. & Peck, M. W. Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology: 37-55. 1997

Gabriel, D., Cindio, B., D'Antona, P. A weak gel model for foods. 2000.

Geeraerd, A. H., Valdramidis, V.P., Devlieghere, F., Bernaert, H. & Van Impe, J. F. Development of a novel approach for secondary modeling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modeling. International Journal of Food Microbiology 91: 229-244. 2004.

Gole, V.C.; Roberts, J.R.; Sexton, M.; May, D.; Kiermeier, A.; Chousalkar, K.K. (2014) Effect of egg washing and correlation between cuticle and egg penetration by various *Salmonella* strains. International Journal of Food Microbiology 182–183: 18-25.

Gutiérrez., J. B.. Ciencia Bromatológica 2000.

Hennekinne, J.A.; Herbin, S.; Firmesse, O.; Auvray, F. (2015) European food poisoning outbreaks involving meat and meat-based products. Procedia Food Science 5: 93-96.

Howard, Z.R.; O'Bryan, C.A.; Crandall, P.G.; Ricke, S.C. (2012) *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. Food Research International 45: 755-764.

Huang, L. (2015) Direct construction of predictive models for describing growth of *Salmonella* Enteritidis in liquid eggs - A one-step approach. Food Control 57: 76-81.

Instituto de Estudios del Huevo (IEH) (Julio, 2017): www.institutohuevo.com/images/archivos/composicion_yema_y_clara_de_huevo.pdf.

Koshani, R., Aminlari, M., Niakosari, M. & Farahnaky. Production and properties of tragacanthin-conjugated lysozyme as a new multifunctional biopolymer.2015.

Lamúa Soldevilla, M. Aplicación del frío a los alimentos.1ª.Edición-Madrid, 2000.

Lasagabaster, A.; Arbolea, J.C.; Martínez de Marañón, I. (2011) Pulsed light technology for surface decontamination of eggs: Impact on *Salmonella* inactivation and egg quality. Innovative Food Science & Emerging Technologies 12: 124-128.

Leleu, S.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; De Reu, K.; Michiels, C.W.; De Baerdemaeker, J.; Messens, W. (2011) Effects on *Salmonella* shell contamination and trans-shell penetration of coating hens' eggs with chitosan. International Journal of Food Microbiology 145: 43-48.

Magnússon, S.H.; Gunnlaugsdóttir, H.; van Loveren, H.; Holm, F.; Kalogeras, N.; Leino, O.; Luteijn, J.M.; Odekerken, G.; Pohjola, M.V.; Tijhuis, M.J.; Tuomisto, J.T.; Ueland, Ø.; White, B.C.; Verhagen, H. (2012) State of the art in benefit–risk analysis: Food microbiology. Food and Chemical Toxicology 50: 33-39.

Mancini, F., Montanari, L., Fantozzi, P. Influence of alginate concentration and molecular weight on functional properties of mayonnaise. 2002.

Mas barón, A., «Historia de la conservación de los alimentos», Salas-Salvadó, Jordi, García Lorda, Pilar, Sánchez Ripollés, José M^a (Eds.), La alimentación y la nutrición a través de la Historia, Barcelona, 2005, pp. 447-462.

Møller, C.O.A.; Ilg, Y.; Aabo, S.; Christensen, B.B.; Dalgaard, P.; Hansen, T.B. (2013) Effect of natural microbiota on growth of *Salmonella* spp. in fresh pork – A predictive microbiology approach. Food Microbiology 34: 284-295.

Mossel, D.A.A; Corry, J. E. L. Struijk C. B. & Baird. R. M.: “*Essentials of the microbiology of foods*”. John Wiley & Sons, 1995.

Muñoz, A.; Dominguez-Gasca, N.; Jimenez-Lopez, C.; Rodriguez-Navarro, A.B. (2015) Importance of eggshell cuticle composition and maturity for avoiding trans-shell *Salmonella* contamination in chicken eggs. Food Control 55: 31-38.

- Neira, C. Seguridad alimentaria en ovoproductos. 2016. Trabajo Fin de Máster.
- Noriega, E., Laca, A. & Díaz, Mario. Nuevas estrategias para el control microbiológico en la industria alimentaria, 2010.
- Noriega., E; Laca, A., Díaz M. Modelling of diffusion-limited growth to predict *Listeria* distribution in structured model foods. Journal of Food Engineering, volume 87: 247-256. 2008
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2015): www.who.int
- Park, S.; Choi, S.; Kim, H.; Kim, Y.; Kim, B.; Beuchat, L.R.; Ryu, J.H. (2015) Fate of mesophilic aerobic bacteria and *Salmonella enterica* on the surface of eggs as affected by chicken feces, storage temperature, and relative humidity. Food Microbiology 48: 200-205.
- Perry, J.J & Yousef, A.E. (2012) Chapter Seven - *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: evolving concerns and innovative control measures. Advances in Applied Microbiology 81: 243-274.
- Raspoet, R.; Gantois, I.; Devloo, R.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R.; Van Immerseel, F. (2011) 3 - Internal contamination of eggs by *Salmonella* Enteritidis. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: 46-61.
- Réhault-Godbert, S.; Hervé-Grépinet, V.; Gautron, J.; Cabau, C.; Nys, Y.; Hincke, M. (2011) 9 - Molecules involved in chemical defence of the chicken egg. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: 183-208.
- Ricke, S.C. & Gast R.K. (2014) Salmonella. *Salmonella* Enteritidis. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition): 343-348.
- Ross, T.; McMeekin, T.A.; Baranyi, J. (2014) Predictive Microbiology and Food Safety. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition): 59-68.
- Samiullah; Chousalkar, K.K.; Roberts, J.R.; Sexton, M.; May, D.; Kiermeier, A. (2013) Effects of egg shell quality and washing on *Salmonella* Infantis penetration. International Journal of Food Microbiology 165: 77-83.

Schramm, G. (2004). A practical approach to Rheology and Rheometry. Thermo Electron GmbH, Karlsruhe (Germany).

Theron, H.; Venter, P.; Lues, J.F.R. (2003) Bacterial growth on chicken eggs in various storage environments. Food Research International 36: 969-975.

Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A. McMeekin, T. A. & Ross, T. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, NaCl, pH and lactic. Applied and Environmental Microbiology: 4979-4987. 2000.

Varnam, A. H. & Evans. M. G.: "*Foodborne pathogens, an illustrated text*". Manson Publishing, 1996.

