

# Grado en Biología

## Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Evolución del contenido de microorganismos presentes en alimentos comerciales con relación a la proximidad de la fecha de caducidad establecida**

**Evolución do contido de microorganismos presentes en alimentos comerciais con relación á proximidade da data de caducidade establecida**

**Evolution of the content of microorganisms in commercial foodstuffs in relation to the proximity of the established use-by date**



**Dimas López Martínez**

**Curso 2022 - 2023. Convocatoria de Setembro**

*Director: José Enrique Torres Vaamonde*

## RESUMEN

En la industria alimentaria los microorganismos juegan un papel fundamental en la fabricación, conservación e inocuidad de los alimentos. Su papel es clave a la hora de establecer la vida útil y la salubridad de los alimentos consumidos. La presencia de determinados grupos microbianos es uno de los principales factores de deterioro de los alimentos, así como una de las principales vías de transmisión de patógenos. Debido a esto, existe una legislación para el control de dichos riesgos. En esta legislación, los microorganismos aerobios mesófilos totales, las enterobacterias totales y los coliformes fecales están considerados tres grupos microbianos adecuados para el estudio del estado microbiológico de los alimentos. Por este motivo, el estudio de la carga de dichos microorganismos en alimentos envasados consumidos habitualmente en España puede ayudar a comprender cómo es el estado microbiológico del alimento durante su periodo de consumo. Además, la determinación y estudio de la velocidad específica de crecimiento microbiano en relación con los parámetros fisicoquímicos obtenidos para cada alimento, puede ayudar a entender cómo se comportan los microorganismos en dichos alimentos a lo largo de su vida útil. En este trabajo se observó que el 30.77 % de los alimentos estudiados no resultaron aptos para el consumo humano el día de la fecha de caducidad, mientras que el 69.23 % restante sí era apto, aunque presentaban unos niveles microbianos sustancialmente inferiores a los límites legislativos establecidos. También se obtuvieron diferencias entre las velocidades específicas de crecimiento de los microorganismos aerobios mesófilos totales presentes en los distintos alimentos analizados, indicando que la composición de dichos alimentos y los tratamientos aplicados pueden ser claves en el comportamiento de los microorganismos en los alimentos. Se observó una tendencia en la que el agua puede ser un factor importante que favorezca el crecimiento microbiano, mientras que la sal lo ralentice. La vida útil de los alimentos analizados que no alcanzaron los límites microbiológicos el día de su caducidad podría verse sustancialmente incrementada si se determinara la fecha de caducidad de forma más exacta.

**Palabras clave:** Microbiología alimentaria, aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes fecales, velocidad específica de crecimiento, vida útil.

## RESUMO

Na industria alimentaria os microorganismos xogan un papel fundamental na fabricación, conservación e inocuidade dos alimentos. O seu papel é clave á hora de establecer a vida útil e a salubridade dos alimentos consumidos. A presenza de determinados grupos microbianos é un dos principais factores de deterioración dos alimentos, así como unha das principais vías de transmisión de patóxenos. Debido a isto, existe unha lexislación para o control dos devanditos riscos. Nesta lexislación, os microorganismos aerobios mesófilos totais, as enterobacterias totais e os coliformes fecais están considerados tres grupos microbianos adecuados para o estudo do estado microbiolóxico dos alimentos. Por este motivo, o estudo da carga dos devanditos microorganismos en alimentos envasados consumidos habitualmente en España pode axudar a comprender como é o estado microbiolóxico do alimento durante o seu período de consumo. Ademais, a determinación e estudo da velocidade específica de crecemento microbiano en relación cos parámetros fisicoquímicos obtidos para cada alimento, pode axudar a entender como se comportan os

microorganismos nos devanditos alimentos ao longo da súa vida útil. Neste traballo observouse que o 30.77 % dos alimentos estudados non resultaron aptos para o consumo humano o día da data de caducidade, mentres que o 69.23 % restante si era apto, aínda que presentaban uns niveis microbianos substancialmente inferiores aos límites lexislativos establecidos. Tamén se obtiveron diferenzas entre as velocidades específicas de crecemento dos microorganismos aerobios mesófilos totais presentes nos distintos alimentos analizados, indicando que a composición dos devanditos alimentos e os tratamentos aplicados poden ser claves no comportamento dos microorganismos nos alimentos. Observouse unha tendencia na que a auga pode ser un factor importante que favoreza o crecemento microbiano, mentres que o sal retárdeo. A vida útil dos alimentos analizados que non alcanzaron os límites microbiolóxicos o día da súa caducidade podería verse substancialmente incrementada se se determinase a data de caducidade de forma máis exacta.

**Palabras clave:** Microbioloxía alimentaria, aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes fecais, velocidade específica de crecemento, vida útil.

## SUMMARY

In the food industry, micro-organisms play a fundamental role in the manufacture, preservation and safety of food. They play a key role in establishing the shelf life and wholesomeness of the food consumed. The presence of certain microbial groups is one of the main factors in food spoilage, as well as one of the main pathways for the transmission of pathogens. Because of this, legislation exists to control these risks. In this legislation, total mesophilic aerobic microorganisms, total enterobacteria and faecal coliforms are considered as three microbial groups suitable for the study of the microbiological status of food. For this reason, the study of the load of these microorganisms in packaged foods commonly consumed in Spain can help to understand the microbiological state of the food during its consumption period. Furthermore, the determination and study of the specific rate of microbial growth in relation to the physicochemical parameters obtained for each food can help to understand how microorganisms behave in these foods throughout their shelf life. In this work it was observed that 30.77 % of the foods studied were unfit for human consumption on the day of the expiry date, while the remaining 69.23 % were fit for human consumption, although they had microbial levels substantially below the established legislative limits. Differences were also obtained between the specific growth rates of total mesophilic aerobic microorganisms present in the different foods analysed, indicating that the composition of the foods and the treatments applied may be key in the behaviour of microorganisms in foods. A trend was observed in which water may be an important factor favouring microbial growth, while salt slows it down. The shelf life of the tested foods that did not reach the microbiological limits on the day of expiry could be substantially increased if the expiry date was determined more accurately.

**Key words:** Food microbiology, mesophilic aerobes, enterobacteria, faecal coliforms, specific growth rate, shelf life.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVOS .....	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	3
Selección de los alimentos .....	3
Determinación de la carga microbiológica.....	4
Cálculo de la velocidad específica de crecimiento microbiano .....	5
Determinación de las variables fisicoquímicas .....	6
Mediante recopilación de los valores de las etiquetas nutricionales de cada alimento .....	6
Mediante determinación experimental .....	6
Análisis estadístico .....	7
Análisis de la varianza unifactorial (ANOVA I).....	7
Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS).....	7
Regresión lineal múltiple (RLM) .....	7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	7
Estudio de la calidad microbiológica en la fecha de caducidad establecida.....	7
Relación entre las variables fisicoquímicas y la velocidad específica de crecimiento microbiano	13
CONCLUSIONES .....	20
CONCLUSIÓNS .....	20
CONCLUSIONS .....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	21
ANEXO .....	I

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son seres vivos presentes en todo el ambiente que nos rodea, y son especialmente relevantes en muchos de los alimentos consumidos por el ser humano a nivel mundial, tanto en la fabricación como siendo importantes vectores de transmisión de patógenos. Aunque se usan en la producción de alimentos desde la antigüedad, también son responsables de su deterioro que los lleva a dejar de ser aptos para su consumo. La propia composición química de los alimentos proporciona las condiciones ideales de crecimiento para muchos microorganismos, por lo que dichas características intrínsecas pueden determinar la viabilidad del producto a lo largo de la cadena alimentaria y del tiempo (Madigan et al., 2015).

Los microorganismos encuentran en el propio alimento los nutrientes y requisitos necesarios para poder multiplicarse. Tortora *et al.* (2010) describieron que las condiciones fisicoquímicas en las que se encuentra el alimento determinan el éxito del crecimiento de su microbiota. Así, la biodisponibilidad y cantidad de macro y micronutrientes, de oxígeno y de agua, determinarán la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos, así como la presencia y ausencia de determinados grupos microbianos. Esta serie de características intrínsecas y extrínsecas del alimento resulta en una variabilidad en la microbiota presente entre distintos alimentos (Bramwell *et al.*, 2022).

El crecimiento de los microorganismos se traduce en un deterioro de los alimentos que los portan, que se reduce considerablemente aplicando al producto conservantes en su proceso de fabricación (Zouharová *et al.*, 2023), o mediante el envasado y/o reducción del oxígeno presente una vez finalizada la producción, lo que se conoce como Envasado en Atmósfera Protectora (MAP, por sus siglas en inglés). El Instituto Galego do Consumo e da Competencia define un alimento envasado como la *unidad de venta que se presenta, formada por un producto alimenticio y el envase en el que ha sido acondicionado antes de ser puesto a la venta*. Los tratamientos MAP en alimentos consiguen que se reduzca la concentración de oxígeno, lo cual repercute en una disminución de la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos aerobios. Pese a que el tratamiento con conservantes y MAP es uno de los mejores métodos de conservación de alimentos, la seguridad alimentaria de los productos depende siempre de los microorganismos que estén presentes a la hora de fabricar el producto. Por ello, la seguridad alimentaria depende de las buenas prácticas de fabricación que supone producir alimentos con una carga microbiológica lo más baja posible, para que pueda ser controlada por estos métodos. Si la carga es alta, estos métodos no funcionan y éstos tratamientos no consiguen ralentizar el crecimiento de los microorganismos (Phillips, 1996).

Aún con los tratamientos aplicados, es posible el crecimiento de los microorganismos en productos envasados (Sauvala *et al.*, 2023), por lo que se hacen necesarios los controles microbiológicos de los alimentos antes de ser consumidos, para garantizar la idoneidad e inocuidad del producto para el consumidor, y evitar la posible transmisión de patógenos por vía alimentaria. Para ello, la Unión Europea (EU) establece una normativa aplicable a todos los países miembros sobre seguridad alimentaria (Unión Europea, Consejo, 2005), donde se consideran dos disposiciones clave para

entender la importancia de que las empresas empleen mecanismos de control microbiológico de los alimentos eficaces: (i) *Los productos alimenticios no deben contener microorganismos ni sus toxinas o metabolitos en cantidades que supongan un riesgo inaceptable para la salud humana*; (ii) *(...) es conveniente fijar (...) criterios microbiológicos para la seguridad de los alimentos que establezcan un límite por encima del cual un producto alimenticio deba considerarse contaminado de forma inaceptable*. Para ello, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha desarrollado un documento orientativo para que las empresas productoras de alimentos establezcan, de la manera más adecuada posible, las fechas de caducidad de sus productos alimenticios. A pesar de esto, no existe una norma uniforme en la que se establezca un único protocolo estandarizado para la determinación de la vida útil (Koutsoumanis et al., 2020). Por ello, podría ser inadecuado el establecimiento de las fechas de caducidad de algunos alimentos, llevando a periodos de vida útil infraestimados, por lo que dichos productos podrían consumirse durante un tiempo mayor del que marca la fecha de caducidad. La buena adecuación de la fecha de caducidad, y por consiguiente de la vida útil, propiciaría una reducción en el desperdicio alimentario. De hecho, la reducción del desperdicio de alimentos se considera un factor importante para disminuir las cargas medioambientales en el siglo XXI (Priefer et al., 2016). Según los datos aportados por la Comisión Europea, hasta 8.8 millones de toneladas de residuos alimentarios generados anualmente en la Unión Europea están vinculados a la fecha de caducidad en los productos alimenticios (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición [AESAN], 2020).

Para determinar viabilidad e inocuidad y establecer la vida útil de un alimento se analiza, entre otros, la carga microbiológica de determinados grupos de microorganismos:

- **Microorganismos aerobios mesófilos totales:** Se entiende por aerobios aquellos organismos capaces de crecer en presencia de concentraciones de oxígeno normales (21 % en el aire), pudiendo ser facultativos (pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno en condiciones nutritivas y de cultivo adecuadas) o estrictos (necesitan el oxígeno para crecer y nunca crecen en anaerobiosis). En cuanto a la temperatura, los organismos mesófilos son aquellos que tienen su crecimiento óptimo entre los 20 °C y 45 °C (Montville, 2001). El análisis de los microorganismos aerobios mesófilos totales de un alimento es útil para determinar la calidad alimentaria del alimento, así como la higiene en el proceso de elaboración de este. Altos niveles de aerobios mesófilos totales se consideran poco aconsejables, ya que pueden indicar una materia prima excesivamente contaminada y/o deficiencias en los métodos de manipulación en algún punto de la cadena alimentaria. Pese a esto, altos niveles no indican *per se* la presencia de patógenos, ni niveles bajos aseguran que el alimento esté exento de patógenos o sus toxinas (Pascual Anderson & Calderón y Pascual, 2000c).
- **Enterobacterias totales:** Son bacilos gramnegativos de la familia *Enterobacteriaceae*, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, móviles o inmóviles, que fermentan la glucosa, reductoras de nitratos, citocromo-oxidasa negativos y que toleran la presencia de sales biliares para crecer en un rango de temperatura comprendido entre los 30 °C y los 37 °C. Son excelentes indicadores de contaminación fecal a lo largo de la cadena alimentaria o de

elaboración poco higiénica de productos procesados, aunque puede usarse como indicador en cualquier producto (Pascual Anderson & Calderón y Pascual, 2000b).

- Coliformes fecales: es un grupo compuesto por bacilos gramnegativos de la familia *Enterobacteriaceae*, anaerobios facultativos, capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y gas, en un periodo de 48 horas con una temperatura comprendida entre los 30 °C y los 37 °C. Son indicadores de contaminación fecal, ya que se encuentran con frecuencia en el intestino de vertebrados y en sus heces. En general, niveles altos de coliformes fecales indican manipulación y elaboración deficientes en la cadena alimentaria (Pascual Anderson & Calderón y Pascual, 2000a). Los adultos de más de 65 años, niños menores de 5 años, personas embarazadas, personas inmunodeprimidas y viajeros en países tropicales son los principales infectados por bacterias coliformes. Dichas infecciones pueden causar diarreas, cólicos, vómitos y fiebre, mientras que el 5-10% de los diagnosticados presentan la variante de *E. coli* O157, que produce la toxina Shiga y puede causar insuficiencia renal grave, pudiendo provocar la muerte. Por ese motivo el control alimentario exhaustivo es indispensable para la lucha de la transmisión de patógenos por vía alimentaria (CDC, 2023).

## OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el análisis microbiológico de alimentos comerciales envasados escogidos de manera aleatoria, con la finalidad principal de verificar que dichos alimentos cumplen, el día de la caducidad establecida por el fabricante, los límites microbiológicos establecidos por las normas UNE, atendiendo a la carga de aerobios mesófilos totales, enterobacterias y coliformes fecales.

Derivado de los datos obtenidos del objetivo anterior, se estudiará la posible relación de las características fisicoquímicas y los tratamientos de conservación aplicados a los alimentos, sobre la velocidad específica de crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos presentes en los alimentos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Selección de los alimentos

Se seleccionaron alimentos comerciales envasados mediante atmósfera modificada (MAP) y mediante envasado simple (sin modificación de atmósfera), y cuya vida útil no fuera muy elevada, de manera que el análisis microbiológico se pudiera realizar en el periodo de duración del trabajo. En una superficie comercial se hizo una recopilación de los productos que cumplían dichos requisitos, y a cada producto se le asignó un número y se hizo una ordenación aleatoria en Excel. Los alimentos analizados corresponden con los que Excel ordenó en las posiciones 1-13.

## Determinación de la carga microbiológica

Para conocer la población de microorganismos que contienen los alimentos en la fecha de caducidad, establecida por el propio fabricante, se analizaron un total de 13 alimentos envasados distintos, en los que se determinó la carga microbiológica de aerobios mesófilos totales, enterobacterias totales y coliformes fecales. Cada alimento se analizó por triplicado cada tres días, hasta un máximo de 12 días (días 0, 3, 6, 9 y 12), y haciendo coincidir el día de la fecha de caducidad con la tercera analítica (día 6).

En cada analítica se tomaron porciones de  $50.0 \pm 0.5$  g que se homogenizaron en 125 mL de agua destilada estéril mediante un *Stomacher*. Se realizaron diluciones seriadas hasta un valor de  $10^{-5}$ . Se sembró por triplicado en distintos medios de cultivo (Tabla 1), mediante siembra en superficie, 500  $\mu$ L de cada una de las diluciones seriadas. Posteriormente se incubaron las placas a la temperatura óptima de crecimiento, durante el tiempo necesario para la correcta visualización de colonias aisladas (Tabla 1) (Asociación Española de Normalización [AENOR], 2014) (Asociación Española de Normalización [AENOR], 2018).

**Tabla 1.** Parámetros utilizados para el cultivo de los microorganismos incluidos en el análisis microbiológico de alimentos según la normativa UNE.

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura	Tiempo
Aerobios mesófilos totales	PCA <sup>1</sup>	30 °C	72 h
Enterobacterias totales	VRBG <sup>2</sup>	37 °C	48 h
Coliformes fecales	MFC <sup>3</sup>		

<sup>1</sup> Plate Count Agar; <sup>2</sup> Violet Red Bile Glucose Agar; <sup>3</sup> Medium for Fecal Coliforms (ver Tabla 1 en el Anexo).

Una vez hubo transcurrido el tiempo de cultivo, se seleccionaron las placas correspondientes a la dilución que presentó entre 30 y 300 ufc (unidades formadoras de colonias). Se realizó el recuento de colonias en cada una de las tres réplicas. Por último, se calculó la carga microbiológica (expresada en ufc g<sup>-1</sup> de alimento) que contenía cada uno de los alimentos, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Carga microbiológica} = \frac{\bar{N} * V_{dM}}{V_s * F_d * g_m} \quad (1)$$

donde  $\bar{N}$  es la media de ufc de las tres réplicas,  $V_{dM}$  es el volumen de la dilución madre (mL),  $V_s$  es el volumen de siembra (mL),  $F_d$  es el factor de dilución de las placas escogidas, y  $g_m$  son los gramos de muestra pesados (g). Toda la analítica se realizó en condiciones de asepsia (Figura 1)

Todos los recuentos microbiológicos se recopilaron en una hoja de Excel, para el posterior tratamiento estadístico de los datos.

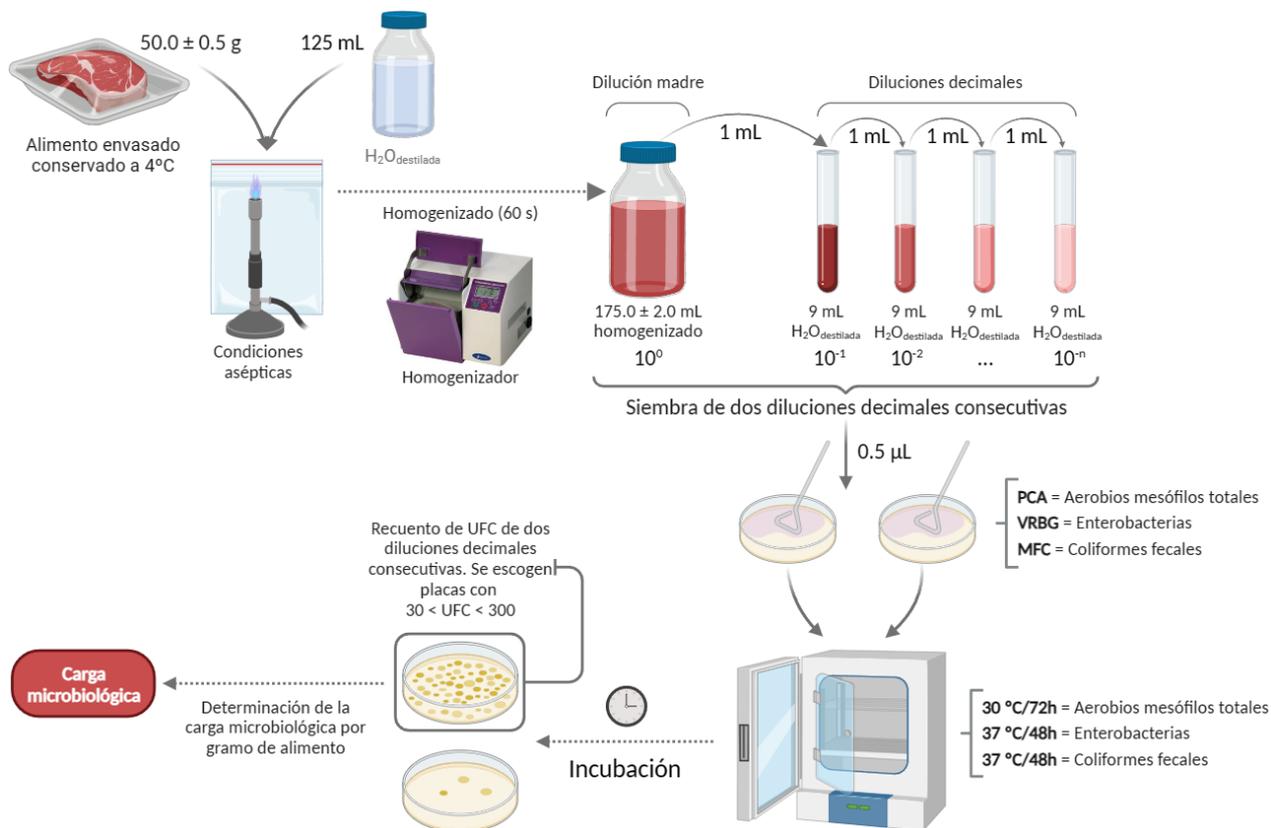


Figura 1. Protocolo completo para la determinación de la carga microbiológica de alimentos envasados.

### Cálculo de la velocidad específica de crecimiento microbiano

Para conocer la velocidad específica de crecimiento de la microbiota presente en cada alimento, se utilizaron los datos obtenidos de recuento de aerobios mesófilos totales ( $\text{ufc g}^{-1}$ ) en el estudio de la carga microbiológica. Se aplicó un modelo exponencial de crecimiento, que viene definido por la ecuación:

$$N_t = N_o * e^{\mu t} \quad (2)$$

donde  $N_t$  es el recuento ( $\text{ufc g}^{-1}$ ) a tiempo  $t$ ,  $N_o$  es el valor del recuento inicial ( $\text{ufc g}^{-1}$ ),  $t$  es el tiempo (días) y  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento ( $\text{días}^{-1}$ ). Para calcular  $\mu$  se linealiza la ecuación anterior mediante una transformación semilogarítmica, obteniéndose la ecuación lineal:

$$\ln N_t = \ln N_o + \mu * t \quad (3)$$

donde la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) es la pendiente de la recta. Por este motivo, se representó el logaritmo neperiano ( $\ln$ ) de las  $\text{ufc g}^{-1}$  frente al tiempo (días) para cada una de las réplicas. Se realizó un ajuste lineal a los puntos donde se observó crecimiento exponencial (observando la gráficas de la representación directa de las  $\text{ufc g}^{-1}$  frente a los días de análisis), y se obtuvieron las ecuaciones de las rectas de ajuste para cada una de las réplicas, de donde se obtuvo

la pendiente de la recta. Dicha pendiente correspondió a la velocidad específica de crecimiento microbiano ( $\mu$ ), que se recopiló en una tabla de Excel (ver Tabla II del Anexo).

### Determinación de las variables fisicoquímicas

Mediante recopilación de los valores de las etiquetas nutricionales de cada alimento

Se recopilaron los valores de grasas, hidratos de carbono, proteínas y sal por cada 100 g de alimento, y la técnica de conservación empleada. Esta última se definió como una variable cualitativa de tres niveles, que se asignaron en base a la ausencia de atmósfera modificada y conservantes (en este caso se le asignó un 0 al alimento), presencia sólo de atmósfera modificada o sólo de conservantes (se le asignó un 1 al alimento), y presencia tanto de atmósfera modificada como de conservantes (se le asignó un 2 al alimento).

Mediante determinación experimental

La variable obtenida de esta manera fue el porcentaje de agua presente en cada alimento. De cada alimento se obtuvieron  $50.0 \pm 0.5$  g, que se introdujeron en recipientes secos sin tapa (cuyo peso en vacío se determinó previamente), y se determinó el peso inicial conjunto. Se eliminó el agua de cada muestra de alimento mediante calor seco en un horno a  $60^\circ\text{C}$  durante el tiempo necesario para obtener un peso estable, y se determinó el peso final del conjunto (Figura 2).

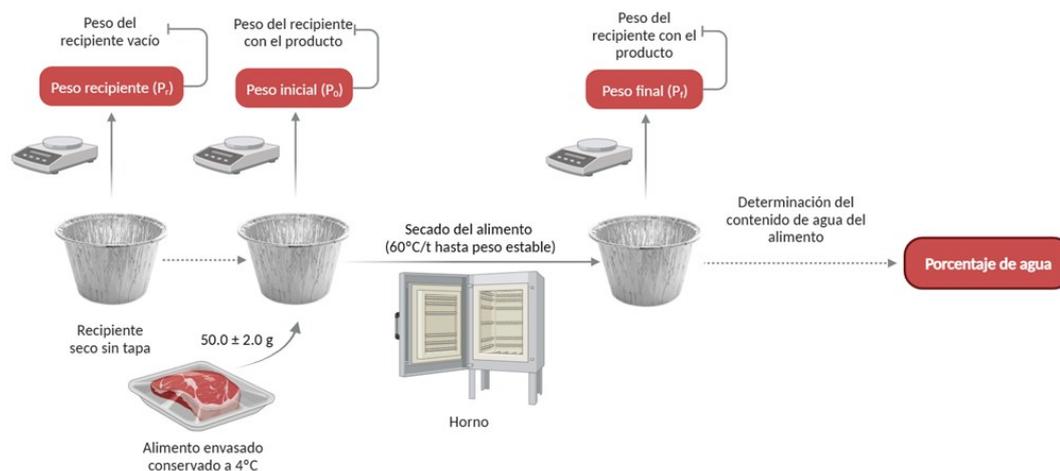


Figura 2. Protocolo completo para la determinación del porcentaje de agua presente en los alimentos.

El cálculo del porcentaje de agua que contiene cada alimento se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de agua} = \frac{P_o - P_f}{P_o - P_r} * 100 \quad (4)$$

donde  $P_o$  es la masa inicial del recipiente con el alimento (g),  $P_r$  es la masa del recipiente vacío (g) y  $P_f$  es la masa final del recipiente con el alimento (g). Los datos de todas las variables fisicoquímicas se recopilaron en una hoja de Excel (ver Tabla II en el Anexo).

## **Análisis estadístico**

Para el tratamiento de los datos experimentales, se realizaron los siguientes análisis estadísticos:

### Análisis de la varianza unifactorial (ANOVA I)

Para conocer si existen diferencias significativas en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) entre los distintos alimentos estudiados, se aplicó un método de análisis de la varianza unifactorial (ANOVA I). Una vez ajustado el modelo se estudió la idoneidad del modelo mediante el análisis de la normalidad y la homocedasticidad en los residuos. Si el modelo resultó estadísticamente significativo y se cumplen las hipótesis de normalidad y homocedasticidad, se procedió a realizar la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. El resultado de la prueba de Tukey permitió determinar entre qué alimentos se establecen diferencias estadísticamente significativas en relación con la velocidad específica de crecimiento.

### Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS)

Para poder ordenar los alimentos en función de las variables fisicoquímicas, se aplicó un método de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS). Se escogió este método de ordenación debido a que las variables aplicadas no son todas de la misma naturaleza (agua, grasas, hidratos de carbono, proteínas y sal son variables continuas, mientras que la técnica de conservación es una variable discreta). La distancia usada para la representación del NMDS fue la de Gower, ya que es la más adecuada cuando hay una mezcla de variables continuas y discretas (Legendre, 1998). Se obtuvo un gráfico que permitió reducir la dimensión y así poder ordenar cada alimento en función de sus variables fisicoquímicas. Se determinó el *stress* relativo al modelo, cuyo valor determina una ordenación útil siempre que se encuentre por debajo de 0.20 (Dexter et al., 2018).

### Modelos de regresión lineal

Se aplicaron dos tipos de modelos de regresión lineal, una regresión lineal simple (RLS) y una regresión lineal múltiple (RLM). Se estudió la significación estadística de cada modelo mediante el análisis de correlaciones ( $R^2_{adj}$ ).

Todos los contrastes estadísticos, los ajustes de los modelos y los gráficos se realizaron con R (R Core Team, 2023). Para la obtención del NMDS se usó el paquete de R *vegan* (Oksanen et al., 2022). Todos los contrastes se realizaron a un nivel de significación del 5%.

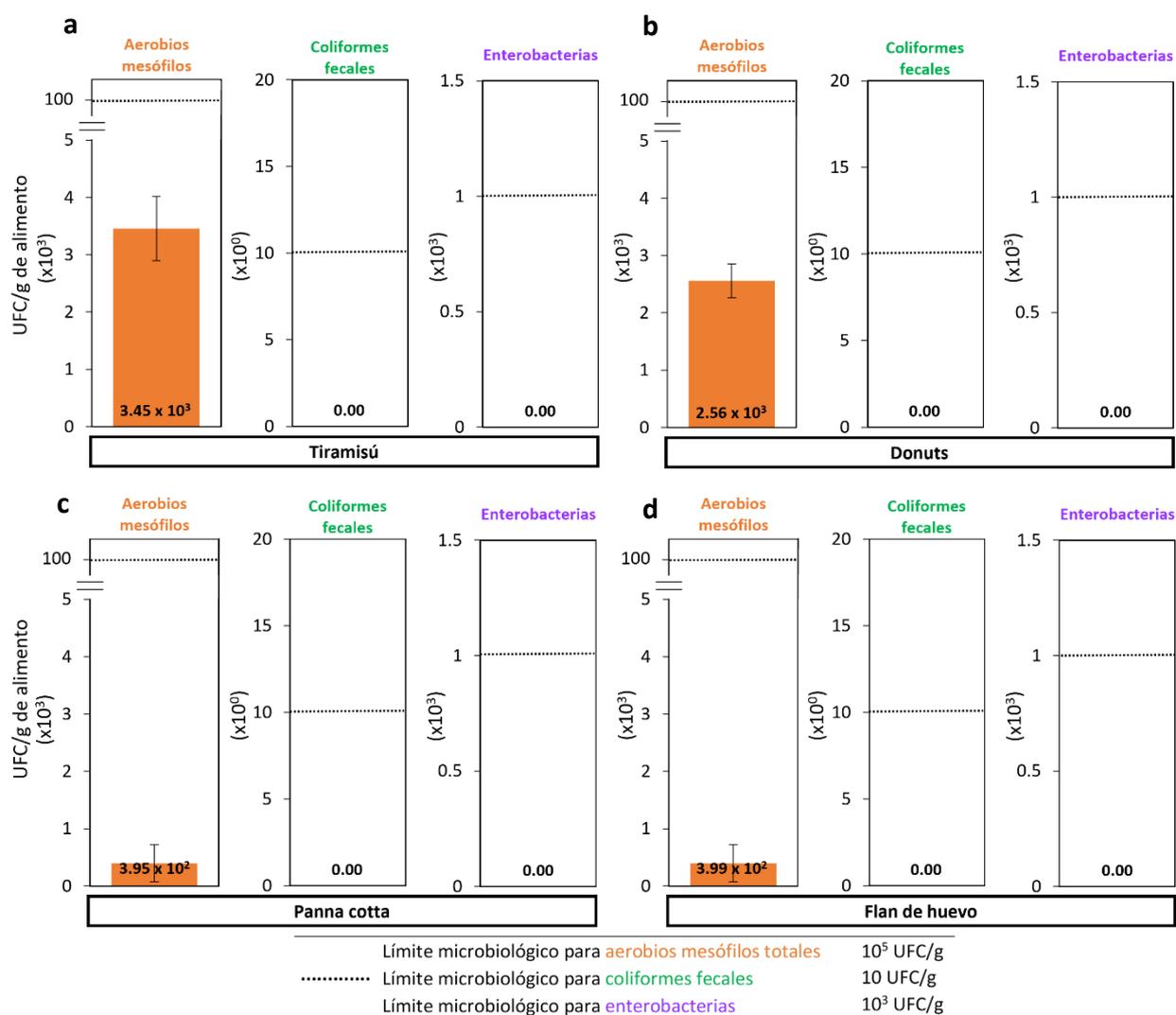
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Estudio de la calidad microbiológica en la fecha de caducidad establecida**

La determinación de la carga microbiológica permitió conocer el estado microbiológico de los alimentos el día de la fecha de caducidad establecida por el fabricante. Dicho estado microbiológico

se basó en el contenido en microorganismos aerobios mesófilos, coliformes fecales y enterobacterias de cada alimento. Cada contenido determina si un alimento es apto para el consumo humano o no, siempre que no sobrepase los límites establecidos por la legislación (AENOR, 2014) (AENOR, 2018).

En la Figura 3 se representan los datos obtenidos para el crecimiento de los microorganismos analizados en el tiramisú, donuts, panna cotta y flan de huevo. Se puede observar que no se detectó crecimiento de coliformes fecales ni enterobacterias totales en ninguno de estos cuatro alimentos. En relación con los aerobios mesófilos totales, en los que sí se detectó presencia en los cuatro



**Figura 3.** Carga microbiológica presente en el tiramisú (a), donuts (b), panna cotta (c) y el flan de huevo (d) y los límites microbiológicos contemplados en la legislación.

alimentos, el que mayor carga poseyó fue el tiramisú ( $3.45 \times 10^3 \pm 5.64 \times 10^2$  ufc  $g^{-1}$ ), seguido del donuts ( $2.56 \times 10^3 \pm 2.98 \times 10^2$  ufc  $g^{-1}$ ), el flan de huevo ( $3.99 \times 10^2 \pm 3.26 \times 10^2$  ufc  $g^{-1}$ ) y la panna cotta ( $3.95 \times 10^2 \pm 3.23 \times 10^2$  ufc  $g^{-1}$ ), siendo este la que presentó la menor carga microbiológica de los cuatro alimentos. En ninguno de los cuatro alimentos se sobrepasó el límite establecido por la legislación. Se observa que tanto el tiramisú (Figura 3a) como el donuts (Figura 3b) tuvieron una carga microbiológica cien veces menor a la carga por la que dejaría de

serapto para el consumo. Lo mismo se observa en el caso de la panna cotta (Figura 3c) y el flan de huevo (Figura 3d), cuya carga microbiológica fue mil veces menor que la del límite legislativo.

La carga microbiológica observada en el caso del salmón (Figura 4) fue adecuada para el consumo humano. En cuanto a los coliformes fecales y a las enterobacterias totales, no se detectó carga microbiológica por lo que se encontró por debajo de los límites marcados por la legislación. En el caso de los aerobios mesófilos totales, se observa que hay una carga de  $4.14 \times 10^5 \pm 2.25 \times 10^4$  ufc  $g^{-1}$ , y el límite marca una carga máxima de  $10^7$  ufc  $g^{-1}$ , cien veces menor que el propio límite, por lo que el alimento fue apto para el consumo humano según los límites microbiológicos establecidos.

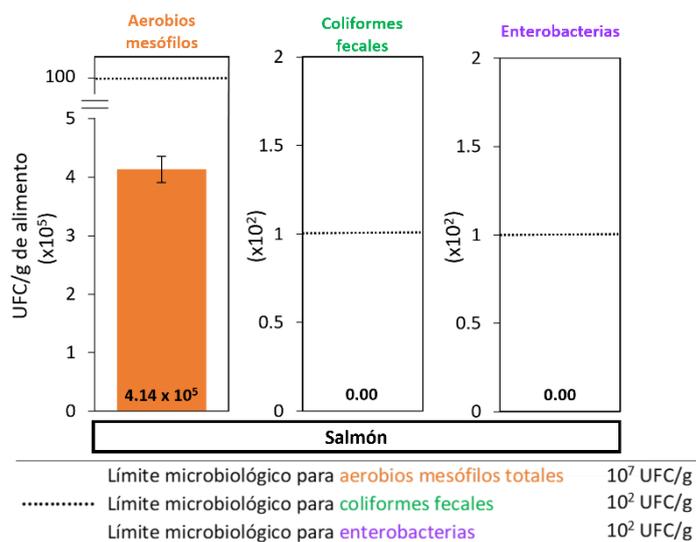


Figura 4. Carga microbiológica presente en el salmón y límite microbiológico contemplado en la legislación.

En el caso de la ensaladilla, el sándwich y las patatas alioli (Figura 5) no se observa ningún indicador cuya carga microbiológica haga que los alimentos no fueran aptos para el consumo el día de la caducidad. La mayor carga microbiológica de aerobios mesófilos totales la presentaron las patatas alioli ( $7.60 \times 10^5 \pm 9.64 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$ ), siendo éste el que más se acerca de los tres a su límite microbiológico ( $10^6$  ufc  $g^{-1}$ ). El que menor carga microbiológica presentó fue el sándwich, con  $5.51 \times 10^4 \pm 4.79 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$ , siendo cien veces menor que el límite marcado por la legislación (Figura 5b). La ensaladilla presentó una carga microbiológica de aerobios mesófilos totales de  $2.85 \times 10^5 \pm 9.82 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  que fue compatible con el consumo humano atendiendo a los límites microbiológicos impuestos.

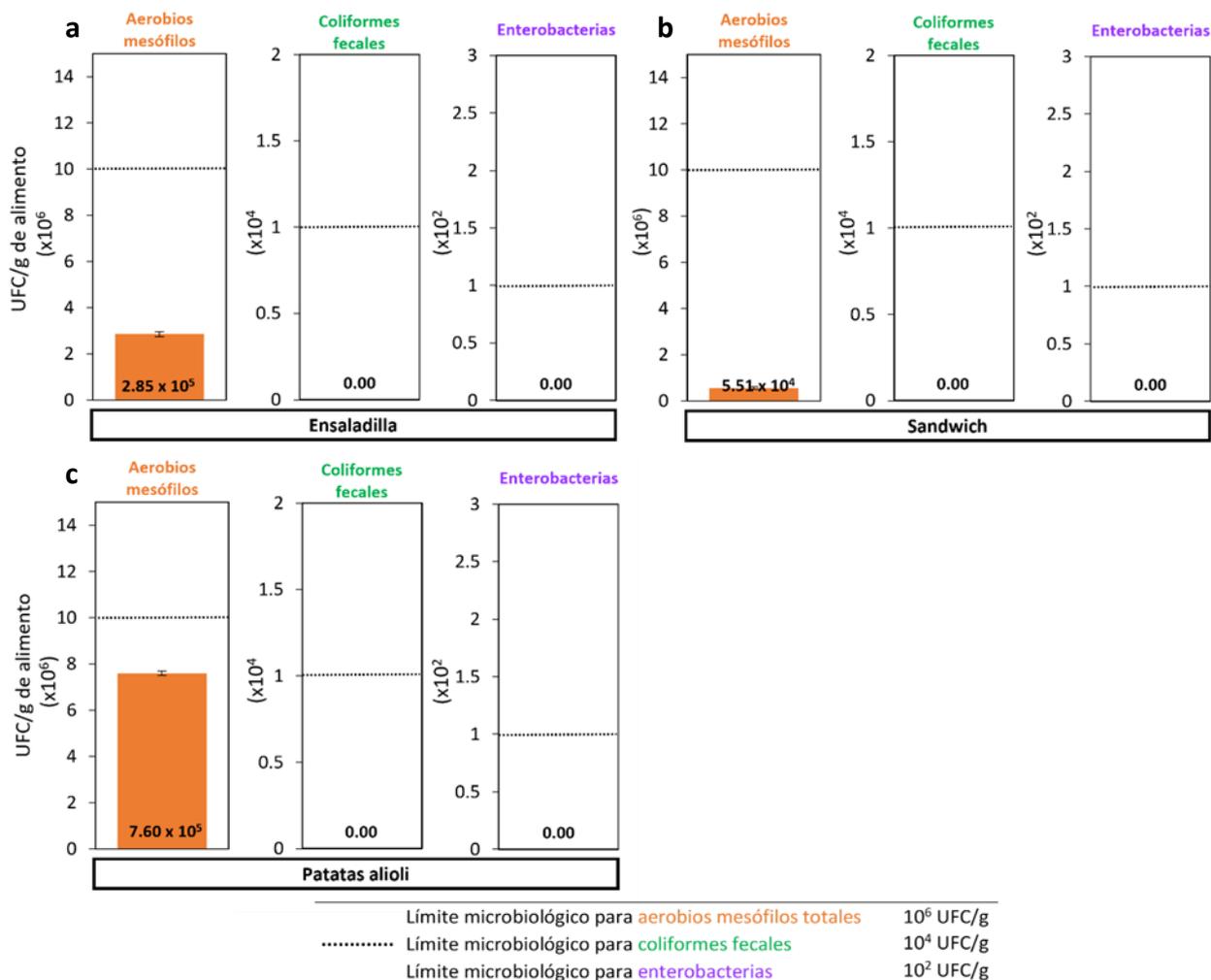


Figura 5. Carga microbiológica presente en la ensaladilla (a), sándwich (b) y patatas alioli (c), y los límites microbiológicos contemplados en la legislación.

En la Figura 6 se observa que la carga microbiológica presente el día de la caducidad en la tortilla para los aerobios mesófilos totales fue de  $9.88 \times 10^4 \pm 2.60 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$ , muy cercano al límite legislativo ( $10^5$  ufc  $g^{-1}$ ), mientras que no se detectó presencia ni de coliformes fecales ni de enterobacterias totales. Se observa que la cola superior del intervalo de confianza de los aerobios mesófilos totales supera dicho límite, por lo que no se podría asegurar que la tortilla presentara las características microbiológicas adecuadas, en términos de aerobios mesófilos totales, para el consumo humano.

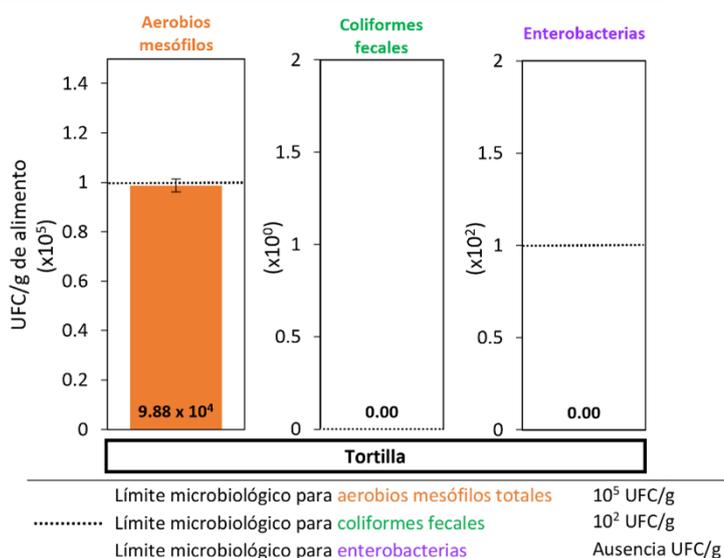


Figura 6. Carga microbiológica presente en la tortilla y límite microbiológico contemplado en la legislación.

En el caso de la carne picada y la hamburguesa (Figura 7), la legislación sólo contempla el análisis de aerobios mesófilos totales y coliformes fecales, no siendo necesario el análisis de enterobacterias totales. En el caso de la hamburguesa (Figura 7b), se observa que fue apta para el consumo humano según los límites microbiológicos establecidos, ya que no se detectó presencia de coliformes fecales y la carga de aerobios mesófilos totales ( $4.14 \times 10^4 \pm 2.55 \times 10^5$  ufc  $g^{-1}$ ) fue inferior al límite de  $5 \times 10^6$  ufc  $g^{-1}$  establecido por la legislación. En el caso de la carne picada (Figura 7a) se determinó que no fue apta para el consumo humano, ya que, aunque no se detectó presencia de coliformes fecales (cumpliendo los límites legislativos para este criterio), la carga de aerobios mesófilos totales fue casi diez veces mayor ( $2.46 \times 10^7 \pm 9.19 \times 10^5$  ufc  $g^{-1}$ ) que el límite máximo que establecen las normas microbiológicas ( $5 \times 10^6$  ufc  $g^{-1}$ ).

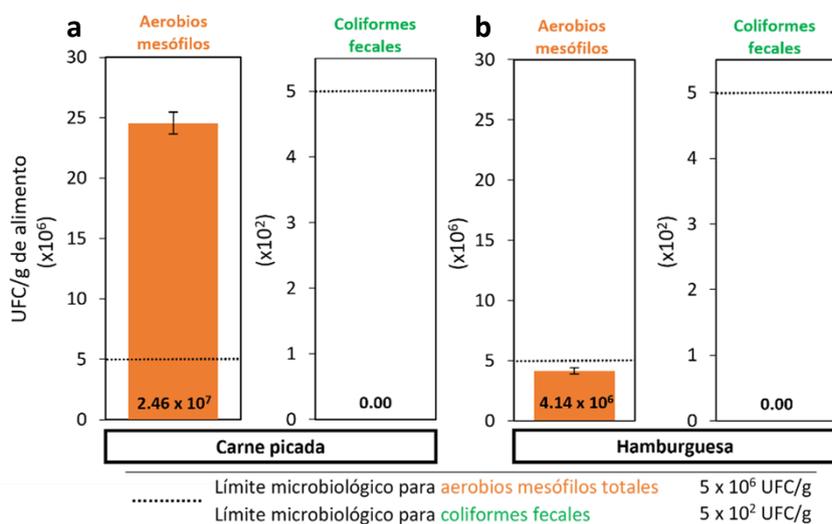


Figura 7. Carga microbiológica presente en la carne picada (a) y hamburguesa (b) y límite microbiológico contemplado en la legislación.

Por último, tanto la carga microbiológica de la ensalada como del guacamole (Figura 8) resultaron en alimentos no aptos para el consumo humano el día de la caducidad. En el caso del guacamole (Figura 8b), no se detectó presencia de coliformes fecales ni de enterobacterias totales, mientras que la carga de aerobios mesófilos totales ( $4.79 \times 10^6 \pm 1.95 \times 10^5$  ufc  $g^{-1}$ ) superó diez veces el límite establecido por la legislación ( $10^5$  ufc  $g^{-1}$ ). En caso de la ensalada (Figura 8a), este alimento fue el único en el que se detectó presencia de los tres microorganismos analizados. En el caso de los coliformes fecales, la carga de  $6.14 \times 10^3 \pm 0.00$  ufc  $g^{-1}$  no superó el límite legislativo ( $10^4$  ufc  $g^{-1}$ ). No

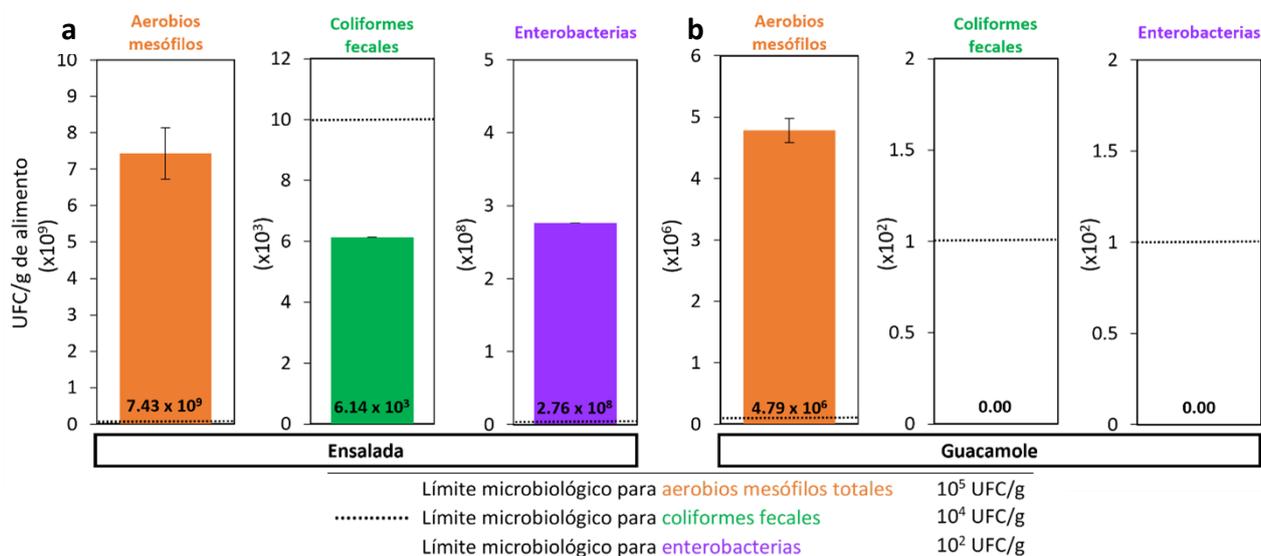
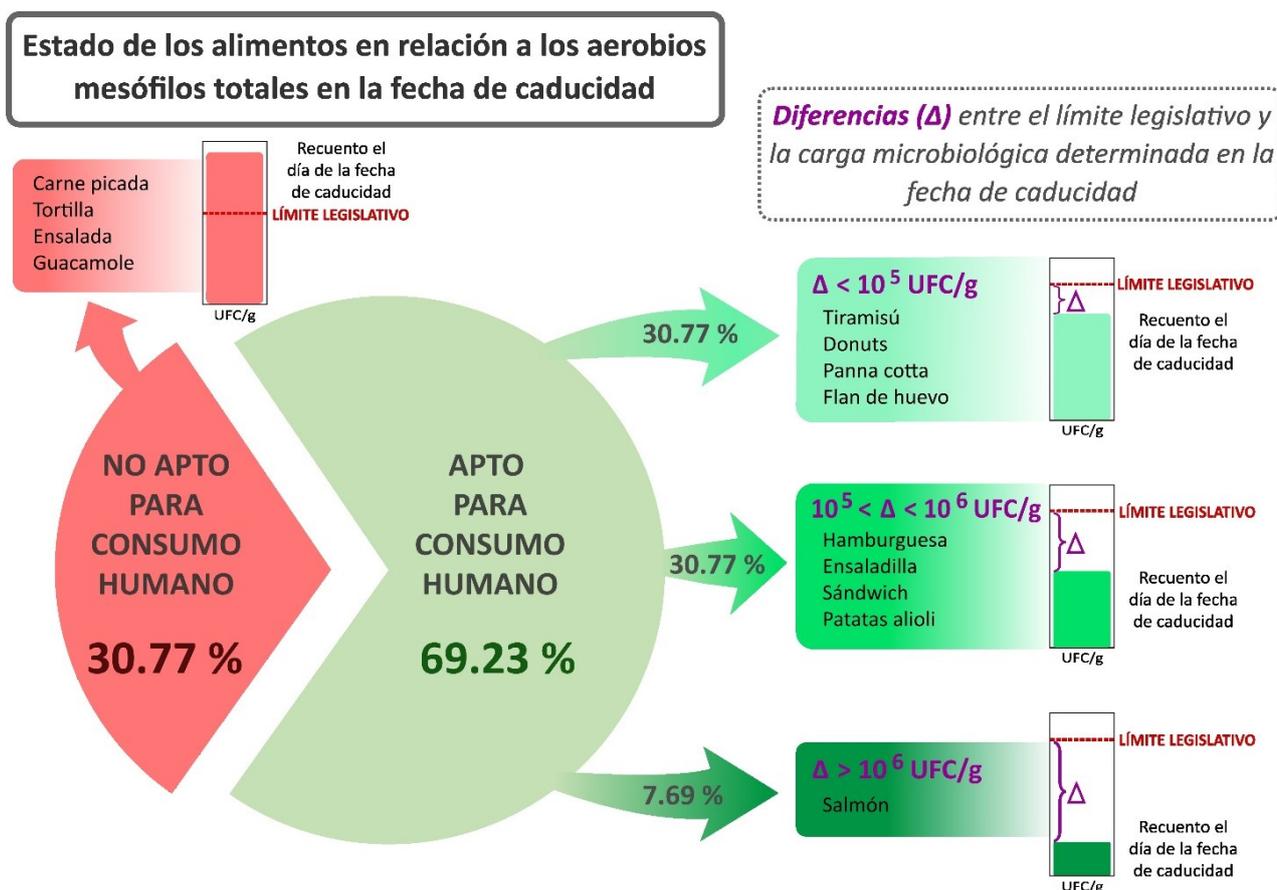


Figura 8. Carga microbiológica presente en la ensalada (a) y guacamole (b), y los límites microbiológicos contemplados en la legislación.

ocurrió lo mismo con las enterobacterias, en dónde la carga microbiológica ( $2.76 \times 10^8 \pm 0.00 \text{ ufc g}^{-1}$ ) superó en un millón de veces el límite microbiológico de  $10^2 \text{ ufc g}^{-1}$ , ni con los aerobios mesófilos totales, donde la carga detectada ( $7.43 \times 10^9 \pm 7.10 \times 10^8 \text{ ufc g}^{-1}$ ) también superó el límite microbiológico de  $10^5 \text{ ufc g}^{-1}$ . Se observó que en todos los alimentos se pudo determinar carga microbiológica de aerobios mesófilos totales, mientras que sólo en el caso de la ensalada se pudo determinar también carga de enterobacterias totales y coliformes fecales, por lo que este alimento es el único que podría presentar contaminación fecal, siendo un riesgo importante para el consumidor, mientras que el resto de los alimentos no presentaron dicho problema.



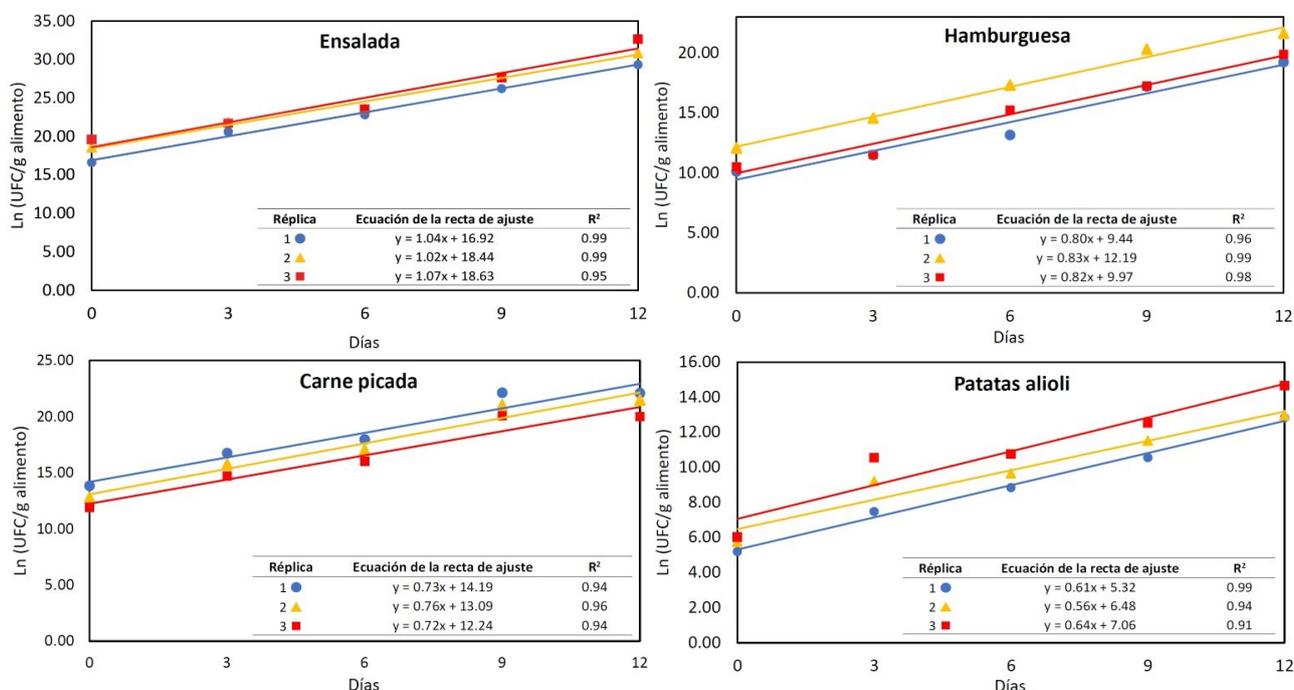
**Figura 9.** Diagrama sobre el estado microbiológico de los alimentos analizados con relación a los recuentos de aerobios mesófilos totales y sus diferencias con la carga microbiológica de los límites legislativos. Las diferencias ( $\Delta$ ) reflejan el incremento entre las  $\text{ufc g}^{-1}$  del límite legislativo de cada alimento y las  $\text{ufc g}^{-1}$  determinadas el día de la fecha de caducidad.

Cómo se observa en la Figura 9, un 30.77 % de los alimentos no resultaron aptos para el consumo humano, por superar los límites legislativos de aerobios mesófilos totales, lo que supone un total de 4 alimentos de los 13 analizados. Los restantes 9 alimentos, un 69.23 % de los mismos, resultaron aptos para el consumo humano, ya que sus recuentos de aerobios mesófilos totales no superaron el límite legislativo. Al comparar los recuentos determinados con los límites microbiológicos legislativos, se observaron diferencias ( $\Delta$ ) de varias unidades logarítmicas. Se observan tres grupos: el primero, con las menores diferencias, corresponden con los alimentos dulces (tiramisú, donuts,

panna cotta y flan de huevo), y se observaron diferencias inferiores a  $10^5$  ufc  $g^{-1}$  con respecto al límite legislativo; diferencias entre  $10^5$  y  $10^6$  ufc  $g^{-1}$  se observaron en un grupo de comidas preparadas (hamburguesa, ensaladilla, sándwich y patatas alioli); mientras que las mayores se encontraron en el salmón, con un incremento mayor a  $10^6$  ufc  $g^{-1}$ . Estas diferencias sugieren que las fechas de caducidad podrían estar subestimadas, conduciendo a una vida útil más corta de lo que la carga de aerobios mesófilos totales permitiría. Se observa una relación directamente proporcional entre las diferencias ( $\Delta$ ) y la fecha de caducidad, y por consecuencia, con la vida útil del alimento. Esto quiere decir que cuanto mayores son las diferencias observadas ( $\Delta$ ), mayor sería la vida útil que se lograría estableciendo adecuadamente la fecha de caducidad, ya que el producto podría ser consumido durante un mayor número de días.

### Relación entre las variables fisicoquímicas y la velocidad específica de crecimiento microbiano

La determinación de la carga microbiológica a lo largo del tiempo permitió estimar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de aerobios mesófilos totales para cada alimento. Se realizó el estudio de dichos microorganismos puesto que es el único en el que se obtuvieron datos en todos los alimentos. Los valores de ajuste del modelo de los datos obtenidos al aplicar la Ecuación 3, siempre fueron superiores al 75% ( $R^2 = 0.75$ ), excepto en una réplica donde se reduce hasta el 61 %. Esto permite concluir que el ajuste de la regresión fue bueno (Legendre, 1998), por lo que los valores de la pendiente reflejan una velocidad específica de crecimiento ajustada a los datos experimentales.



**Figura 10a.** Representación gráfica del modelo de regresión lineal aplicado al logaritmo neperiano (ln) de la carga microbiológica de aerobios mesófilos totales frente a los días de análisis (Ecuación 3). Se muestran las ecuaciones de cada réplica ( $y = mx + b$ ), donde m se corresponde con la  $\mu$  para cada alimento. Cada ecuación muestra el valor

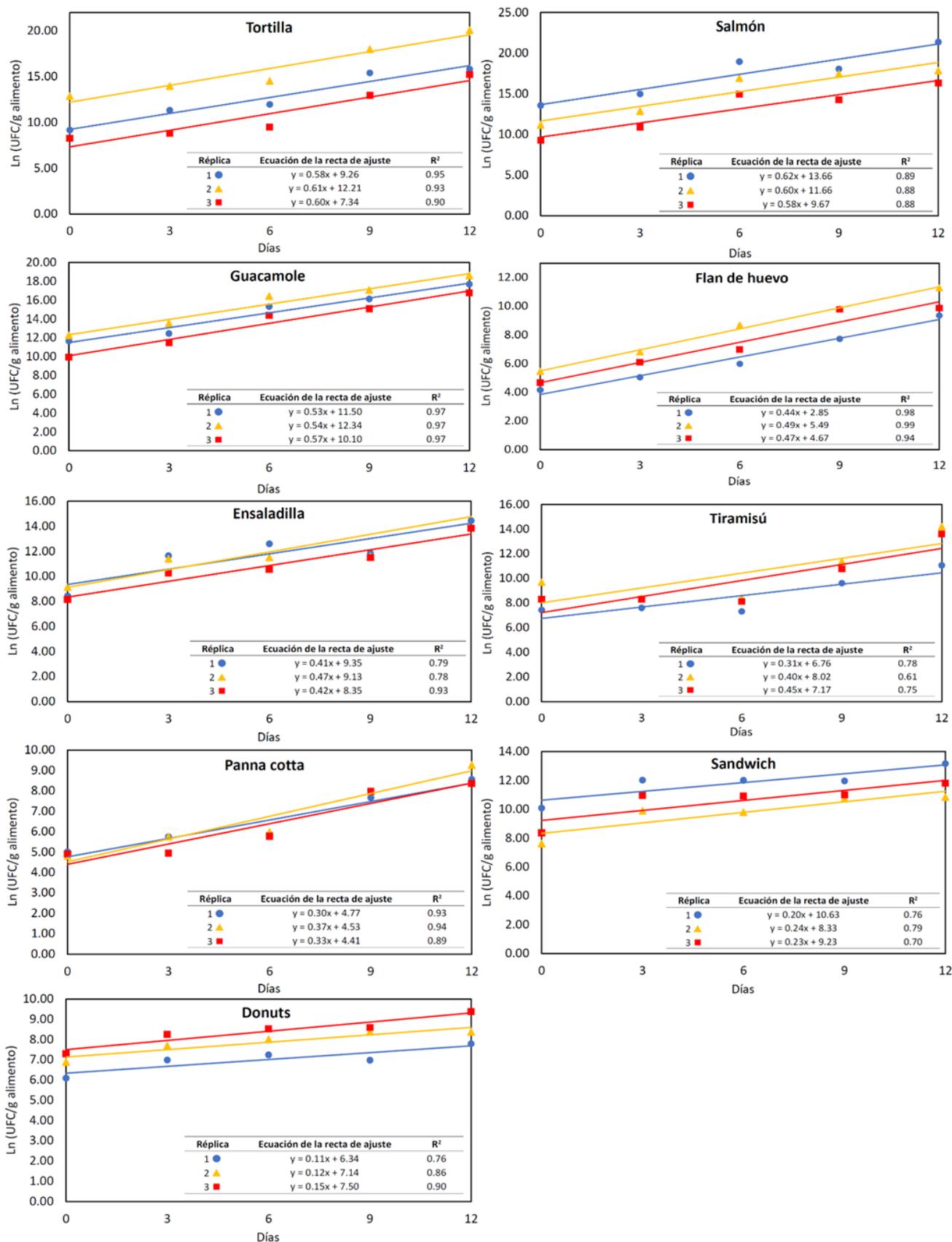
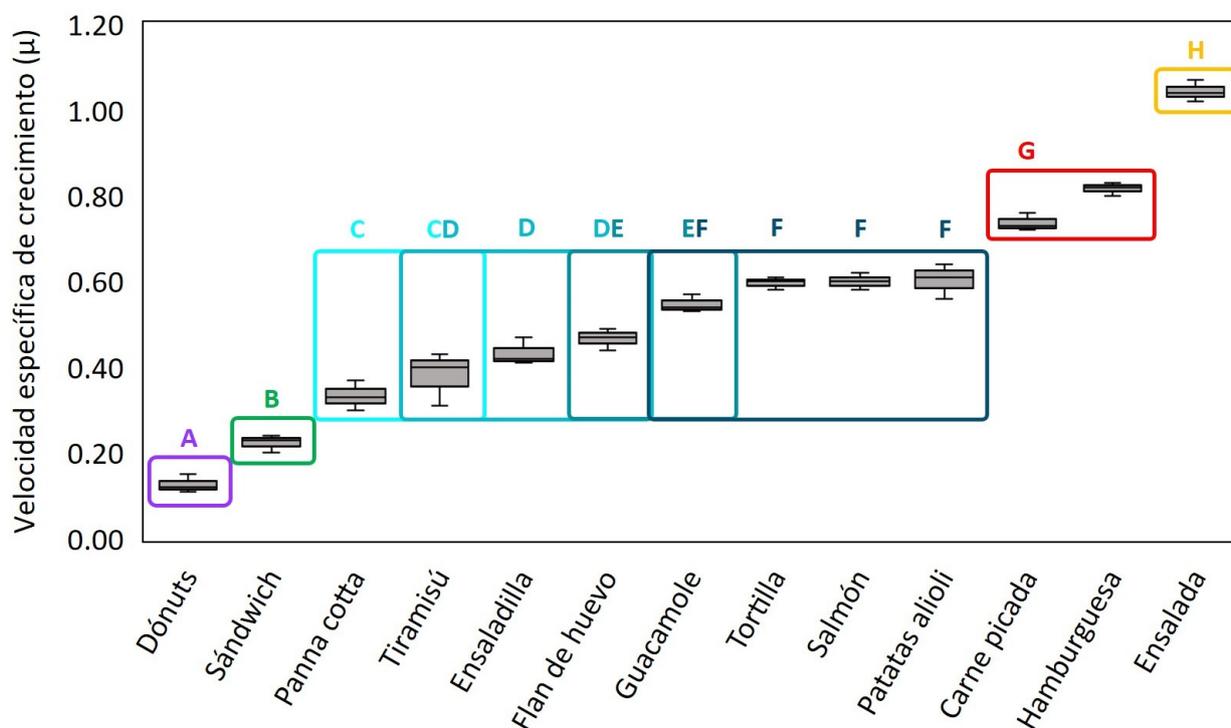


Figura 10b. Representación gráfica del modelo de regresión lineal aplicado al logaritmo neperiano (ln) de la carga microbiológica de aerobios mesófilos totales frente a los días de análisis (Ecuación 3). Se muestran las ecuaciones de cada réplica ( $y = mx + b$ ), donde m se corresponde con la  $\mu$  para cada alimento. Cada ecuación muestra el valor

En las Figuras 10a y 10b se observa que las mayores  $\mu$  obtenidas corresponden a la ensalada, siendo superior a 1.00 ( $\text{días}^{-1}$ ) en las tres réplicas (1.04, 1.02 y 1.07  $\text{días}^{-1}$ ). Valores elevados y medios ( $\mu > 0.50 \text{ días}^{-1}$ ) se han observado en la hamburguesa, carne picada, patatas alioli, tortilla, salmón y guacamole, mientras que valores medios-bajos ( $\mu < 0.50 \text{ días}^{-1}$ ) se observaron en el flan de huevo, ensaladilla, tiramisú, panna cotta, sándwich y donuts, siendo este último el que ha obtenido el valor de  $\mu$  más bajo en las tres réplicas (0.11, 0.12 y 0.15  $\text{días}^{-1}$ ).

Como las velocidades específicas de crecimiento fueron diferentes entre los alimentos, resultó útil estudiar si dichas diferencias fueron estadísticamente significativas y entre qué alimentos se encuentran dichas diferencias. Para ello se aplicó un modelo ANOVA I entre las velocidades de crecimiento y los alimentos (Figura 11).

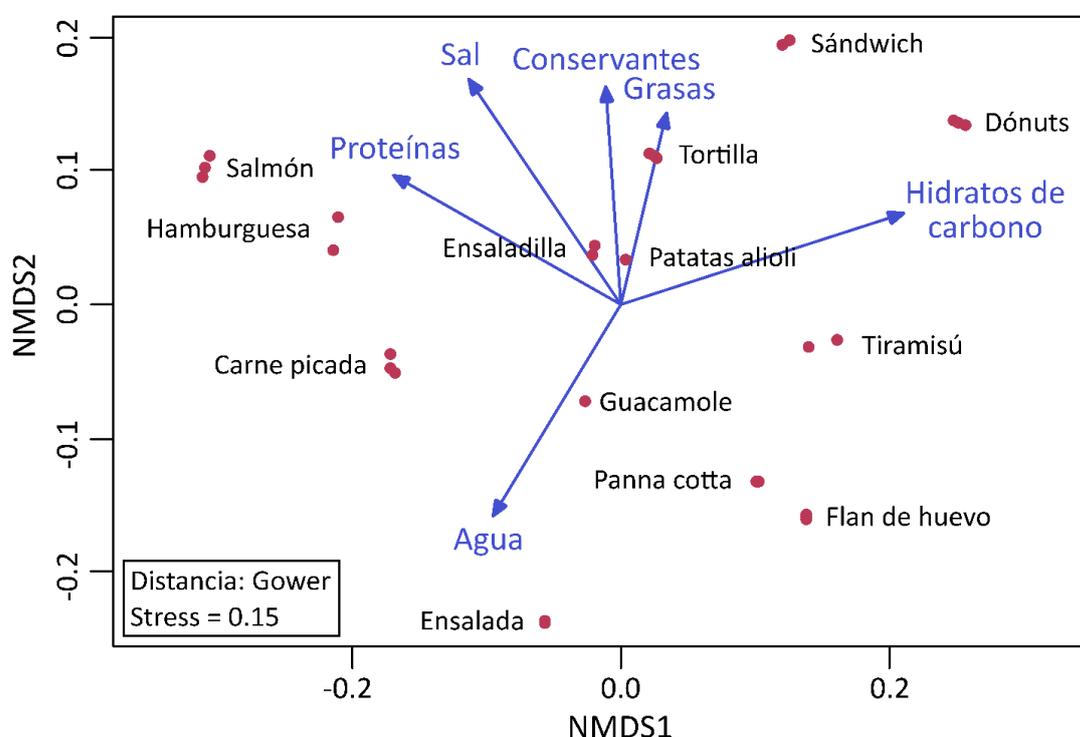


**Figura 11.** Representación gráfica del ANOVA I con la agrupación resultante de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se denotan los grupos de Tukey mediante cuadrados y letras, de manera que alimentos con la misma letra y rectángulo pertenecen a un mismo grupo.

Al ajustar el modelo ANOVA a la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos alimentos ( $p$ -valor  $< 0.01$ ). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey permitió determinar que existen al menos cuatro grupos de alimentos estadísticamente diferentes en cuanto a la velocidad específica de crecimiento (donuts, A; sándwich, B; carne picada y hamburguesa, G; y ensalada, H). En cambio, en los restantes alimentos (grupos C-F) se establecen relaciones estadísticamente distintas con los anteriores, pero no así entre ellos mismos. Esto se debería a que la variabilidad entre los alimentos del grupo C-F no es suficiente como para establecer diferencias con los demás grupos, mientras que la variabilidad entre los grupos A, B, G y H sí es suficiente para apreciar dichas diferencias. A pesar de no observar diferencias cuantitativas estadísticamente significativas en el grupo C-F, en la Figura 11 sí se observan ciertas

diferencias no significativas en el análisis gráfico. Se puede observar que las  $\mu$  parecen ser similares entre la panna cotta y el tiramisú, que éste compartiría  $\mu$  también con la ensaladilla y flan de huevo, que a su vez el flan de huevo tendría una  $\mu$  aparentemente similar al guacamole y, por último, éste tendría una  $\mu$  similar a la tortilla, al salmón y las patatas alioli.

Las variables fisicoquímicas determinadas experimentalmente (contenido en agua), recopiladas de las etiquetas nutricionales (grasas, hidratos de carbono, proteínas y sal) y creadas en base a las etiquetas nutricionales (técnica de conservación) (ver Tabla II en Anexo), se usaron para conocer cómo de aleatorio había resultado el muestreo de alimentos, y cómo son los mismos en función de dichas variables. Para dicho fin se aplicó un NMDS, cuya ordenación resultó significativa, ya que el nivel de *stress* que se obtuvo fue menor a 0.20 (*stress* = 0.15).



**Figura 12.** Representación gráfica del NMDS (Escalamiento multidimensional no métrico) para las variables fisicoquímicas agua, grasas, hidratos de carbono, proteínas, sal y técnica de conservación (conservantes), y los alimentos estudiados. Se usó la distancia de Gower y se muestra el stress obtenido.

En la Figura 12 se puede observar la representación gráfica del NMDS, en el que se observan como vectores las variables fisicoquímicas, mientras que los puntos corresponden a la ordenación de los alimentos en función de dichas variables. En primer lugar, se observa una dispersión aceptable de los alimentos en el espacio de dos dimensiones obtenido, por lo que los alimentos analizados representan la variabilidad intrínseca de las variables. Cada variable fisicoquímica tiene los valores máximos en el extremo del vector, mientras que opuestos al extremo los valores decrecen. En dicho gráfico se puede ver que la cantidad de agua se relaciona con las grasas de manera inversa, de manera que un alimento que tenga mucha agua será poco graso, y viceversa. Este caso se observa en la ensalada, donde el contenido en grasa fue muy bajo en relación con el agua, siendo el alimento

que presentó el valor más extremo en esta variable, seguido por el guacamole. También se observa en la tortilla, un alimento muy graso, pero con bajo contenido en agua, al igual que ocurre con el sándwich, dónde adicionalmente hubo un contenido mayor de hidratos de carbono que en la tortilla. Se puede observar que el salmón, la hamburguesa y la carne picada fueron los alimentos más proteicos, y de éstos, fue la carne picada la que destacó por mayores valores de agua, y el salmón por mayor contenido en sal. En el caso de los hidratos de carbono se observa que el alimento que destacó son los donuts. Hay un grupo de alimentos (tiramisú, panna cotta y flan de huevo) que poseyó niveles altos de agua y también niveles altos de hidratos de carbono. Por último, la ensaladilla y las patatas alioli presentaron valores medios de todas las variables, aunque el ligero desplazamiento hacia la parte superior del gráfico determina que el agua es una variable con valores más pequeños que las demás. Por todo ello, los resultados del NMDS concuerdan con la composición esperada en la mayor parte de los alimentos. Analizando conjuntamente el ANOVA y el NMDS se podría pensar que los alimentos extremos en el ANOVA se relacionan de manera inversa con el contenido en agua y grasas en el NMDS. De esta manera el donuts, que posee el valor más pequeño de  $\mu$ , posee valores altos de grasas y bajos de agua, mientras que la ensalada, con el mayor valor de  $\mu$ , posee valores bajos de grasas y altos de agua (Figuras 11 y 12).

Las diferencias encontradas anteriormente entre las velocidades de crecimiento ( $\mu$ ) específicas se pueden interpretar como resultado de la propia composición de los alimentos, así como de los tratamientos a los que se sometieron. Puesto que estas diferencias entre las velocidades específicas de crecimiento fueron estadísticamente significativas, y que además el NMDS permitió poner de manifiesto las diferencias existentes entre la composición de los alimentos analizados, es por ello, que para intentar explicar qué determina la velocidad de crecimiento de los aerobios mesófilos totales en cada alimento de los estudiados, se aplicó un modelo de regresión lineal múltiple (RLM). Este modelo permitió relacionar cada variable fisicoquímica con las  $\mu$ . Puesto que el p-valor de la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables fisicoquímicas y la  $\mu$ . Dicho modelo es capaz de explicar el 82.87 % de la variabilidad de los datos, resultando la siguiente ecuación:

$$\mu = 0.830 + 0.001 * Agua - 0.016 * Grasas - 0.015 * Hidratos de carbono - 0.005 * Proteínas - 0.026 * Sal + 0.0065 * Conservantes \quad (5)$$

donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento ( $\text{días}^{-1}$ ) y Agua, Grasas, Hidratos de carbono, Proteínas y Sal son variables fisicoquímicas cuantitativas (g por cada 100 g de alimento) y Conservantes es una variable factorial codificada como una variable numérica, de manera que se pudo introducir en el modelo con las demás variables fisicoquímicas.

Sin embargo, al analizar las estimaciones de los parámetros (Ecuación 5) y los p-valores del análisis, se observan resultados inconcluyentes: los p-valores asociados a las proteínas, sal y agua son mayores que 0.05 (0.45, 0.42 y 0.68, respectivamente), por lo que dichas variables no resultarían útiles para considerarlas al tratar de explicar la  $\mu$  en función de las variables fisicoquímicas.

A pesar de esto, y teniendo en cuenta la ecuación obtenida, se esperaría que el agua, las grasas, los hidratos de carbono y las proteínas, en diferente grado, fueran factores positivos en el crecimiento microbiano, mientras que la sal y los conservantes tuvieran un papel negativo, ralentizando la  $\mu$  (Casp-Vanaclocha & Abril-Requena, 2003). En el modelo obtenido, en las grasas, hidratos de carbono y proteínas, se observan estimaciones negativas, contrario a lo que sería microbiológicamente descrito. Los conservantes muestran un valor positivo, resultando, igual que en el caso anterior, contrario a la bibliografía. Sin embargo, en el agua se observa una relación positiva con la  $\mu$ , y en el caso de la sal una relación negativa, teniendo ambas relaciones sentido desde el punto de vista microbiológico, observando una cierta tendencia de la  $\mu$  a aumentar con la cantidad de agua presente en el alimento, lo que concuerda con lo descrito por Tortora *et al.* (2010). Dicha tendencia, que concuerda con la bibliografía, se observa en el caso de la sal, dónde la  $\mu$  tiende a disminuir con el aumento de la cantidad de sal presente en el alimento, lo que explicaría el adecuado uso de la sal como conservante, que sería un factor clave en la ralentización del aumento de la carga microbiológica en los alimentos (Aaslyng *et al.*, 2014).

Debido a los resultados obtenidos en ciertos alimentos en los que no se había sobrepasado el límite microbiológico el día de la fecha de caducidad (ver Figura 9), se pudo estimar el tiempo que se podría añadir a sus vidas útiles. Este nuevo tiempo añadido finalizaría en el momento en el que realmente los alimentos alcanzasen una carga microbiana de aerobios mesófilos totales igual al límite establecido por la legislación. Esto se pudo estimar obteniendo el tiempo a partir de la Ecuación 3, resultando la nueva ecuación:

$$t = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{\mu} \quad (6)$$

donde  $t$  es el tiempo que podría ampliarse la vida útil del alimento (días),  $N_t$  es la carga microbiológica marcada por el límite legislativo (UFG  $g^{-1}$ ),  $N_o$  es la carga microbiológica el día de la fecha de caducidad establecida por el fabricante (UFG  $g^{-1}$ ), y  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento ( $días^{-1}$ ), ambas determinadas experimentalmente. Estos tiempos se calcularon por triplicado.

**Tabla 2.** Estimaciones del aumento de días de vida útil promedio ( $\bar{X}t$ ) según la ecuación semilogarítmica de crecimiento.

Alimento	$\mu$ (días <sup>-1</sup> )	$N_0$ (ufc g <sup>-1</sup> )	$N_t$ (ufc g <sup>-1</sup> )	$\bar{X} t$ (días)
Tiramisú	0.31	3.45 x 10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	<b>8.92 ± 1.42</b>
	0.40			
	0.45			
Dónuts	0.11	2.56 x 10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	<b>29.43 ± 3.71</b>
	0.12			
	0.15			
Panna cotta	0.30	3.95 x 10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	<b>16.72 ± 1.43</b>
	0.37			
	0.33			
Flan huevo	0.44	3.99 x 10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	<b>11.86 ± 0.53</b>
	0.49			
	0.47			
Hamburguesa	0.80	4.14 x 10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>6</sup>	<b>0.23 ± 0.00</b>
	0.83			
	0.82			
Ensaladilla	0.41	2.85 x 10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	<b>2.91 ± 0.17</b>
	0.47			
	0.42			
Sándwich	0.20	5.51 x 10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	<b>13.06 ± 1.04</b>
	0.24			
	0.23			
Patatas alioli	0.61	7.60 x 10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	<b>0.46 ± 0.03</b>
	0.56			
	0.64			
Salmón	0.62	4.14 x 10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	<b>5.31 ± 0.14</b>
	0.60			
	0.58			

Como se observa en la Tabla 2, el dónuts es el alimento en el que se obtuvo un mayor valor en el incremento de la vida útil, pudiendo aumentar 29.43 ± 3.71 días, mientras que fue en el caso de la hamburguesa la que se obtuvo un posible menor incremento, de 0.23 ± 0.00 días. Al observar los incrementos se vio una posible relación negativa entre el incremento medio de vida útil ( $t$ ) y la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos aerobios mesófilos. Por ello, se ajustó un modelo de regresión lineal simple (RLS), para conocer la relación entre ambas variables. Se obtuvo un modelo que explica el 70.91 % de la variabilidad de  $t$ . El modelo resultó significativo, puesto que el p-valor fue inferior a 0.05 (p-valor = 0.004). La ecuación del modelo fue:

$$t = 26.39 - 37.24 * \mu \quad (7)$$

donde se puede observar que por cada unidad de incremento en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se reduciría el incremento en la vida útil (t), por término medio, 37.24 días.

Esto puso de manifiesto que la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos debería tenerse en cuenta para el establecimiento de la fecha de caducidad en los alimentos analizados. Si se relacionan el t con las diferencias ( $\Delta$ ) entre el recuento obtenido y el límite legislativo propuestas en la Figura 9, se observa una tendencia en la que los alimentos analizados (dónuts, panna cotta y flan de huevo) que podrían tener una mayor vida útil se incluyan en el grupo con diferencias menores a  $10^5$  ufc  $g^{-1}$ , mientras que los que podrían tener el menor incremento de vida útil (hamburguesa, ensaladilla y patatas alioli) se encontrarían en un grupo con diferencias mayores que el grupo anterior (diferencias entre  $10^5$  y  $10^6$  ufc  $g^{-1}$ ). Esto explicaría que, aunque el alimento se encuentre muy lejos del límite microbiológico legislativo, siempre será clave no solo tener en cuenta la carga inicial, sino también la velocidad a la que crecen dichos microorganismos. Estas características son la que determinan el tiempo que tardarán en alcanzar una población igual a dicho límite legislativo.

## **CONCLUSIONES**

A lo largo del presente trabajo se ha observado que no todos los productos analizados cumplen los criterios microbiológicos el día de la fecha de la caducidad para los tres microorganismos analizados (aerobios mesófilos totales, enterobacterias totales y coliformes fecales). Algunos alimentos, cuya carga microbiológica es muy inferior al límite microbiológico establecido, podrían ver incrementada su vida útil, lo cual reduciría el derroche de comida, ya que una parte se desecharía cuando está aún en un estado microbiológico adecuado para el consumo humano.

## **CONCLUSIÓNS**

Ó longo do presente traballo observouse que non todos os produtos analizados cumpren os criterios microbiolóxicos o día da data de caducidade para os tres microorganismos analizados (aerobios mesófilos totais, enterobacterias totais y coliformes fecais). Algúns alimentos, cuxa carga microbiolóxica é moi inferior ó límite microbiolóxico establecido, poderían ver incrementada a súa vida útil, o cal reduciría o desperdicio de comida, xa que una parte se desbotaría cando está aínda nun estado microbiolóxico axeitado para o consumo humano.

## **CONCLUSIONS**

Throughout the present work it has been observed that not all the products analysed meet the microbiological criteria on the day of the expiry date for the three microorganisms analysed (total mesophilic aerobes, total enterobacteria and faecal coliforms). Some foods, whose microbiological load is well below the established microbiological limit, could have their shelf life increased, which would reduce food wastage, as part of the food would be discarded while it is still in a microbiological state suitable for human consumption

## BIBLIOGRAFÍA

- Asociación Española de Normalización. (2014). *Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos* (UNE-ISO 4833).
- Asociación Española de Normalización. (2018). *Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de Enterobacteriaceae* (UNE-ISO 21528).
- Aaslyng, M. D., Vestergaard, C., & Koch, A. G. (2014). The effect of salt reduction on sensory quality and microbial growth in hotdog sausages, bacon, ham and salami. *Meat Science*, 96(1), 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.06.004>
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición [AESAN]. (2020, diciembre 9). *La EFSA publica una guía de orientación sobre el marcado de la fecha en los alimentos envasados: Fecha de caducidad o fecha de consumo preferente*. [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/noticias\\_y\\_actualizaciones/noticias/2020/fecha\\_alimentos\\_envasados.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/noticias_y_actualizaciones/noticias/2020/fecha_alimentos_envasados.htm)
- Bramwell, P., Clarke, D., & De Silva, T. (2022). The food microbiological analyst: Pairing tradition with the future. *Microbiology Australia*, 43(2), 57-60. Scopus. <https://doi.org/10.1071/MA22024>
- Casp-Vanaclocha, A., & Abril-Requena, J. (2003). Principales causas de la alteración de los alimentos: Causas biológicas. En *Procesos de conservación de alimentos* (2ª ed., pp. 44-54). Mundi-Prensa.
- CDC. (2023, abril 25). *La E. coli y la seguridad de los alimentos*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/ecoli-and-food-safety.html>
- Dexter, E., Rollwagen-Bollens, G., & Bollens, S. M. (2018). The trouble with stress: A flexible method for the evaluation of nonmetric multidimensional scaling. *Limnology and Oceanography: Methods*, 16(7), 434-443. <https://doi.org/10.1002/lom3.10257>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Jacxsens, L., Skjerdal, T., Da Silva Felicio, M. T., Hengen, M., ... Lindqvist, R. (2020). Guidance on date marking and related food information: Part 1 (date marking). *EFSA Journal*, 18(12), e06306. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6306>
- Legendre, Pierre. (1998). Numerical ecology. En *Numerical ecology* (2nd. english ed.). Elsevier.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). Agua y alimentos como vehículos de enfermedades bacterianas microbiología actual. En *Brock. Biología de los microorganismos* (14ª ed., pp. 983-1006). Pearson.

- Montville, T. J. (2001). Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos. En *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras* (pp. 13-30). Acribia.
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M. D., Durand, S., ... Weedon, J. (2022). *vegan: Community Ecology Package*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pascual Anderson, M. del R., & Calderón y Pascual, V. (2000a). Investigación y recuento de Enterobacteriaceae lactosa-positivas (coliformes). En *Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas* (2ª ed., pp. 17-19). Diaz de Santos.
- Pascual Anderson, M. del R., & Calderón y Pascual, V. (2000b). Investigación y recuento de Enterobacteriaceae totales. En *Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas* (2ª ed., pp. 33-39). Diaz de Santos.
- Pascual Anderson, M. del R., & Calderón y Pascual, V. (2000c). Recuento de microorganismos aerobios mesófilos ( $31 \pm 1^\circ\text{C}$ ) revivificares. En *Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas* (2ª ed., pp. 13-15). Diaz de Santos.
- Phillips, C. A. (1996). Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science & Technology*, 31(6), 463-479. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1996.00369.x>
- Priefer, C., Jörissen, J., & Bräutigam, K.-R. (2016). Food waste prevention in Europe – A cause-driven approach to identify the most relevant leverage points for action. *Resources, Conservation and Recycling*, 109, 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2016.03.004>
- R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Sauvala, M., Johansson, P., Björkroth, J., & Fredriksson-Ahomaa, M. (2023). Microbiological quality and safety of vacuum-packaged white-tailed deer meat stored at 4 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 390, 110110. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110110>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2010). Microbial growth. En *Microbiology: An Introduction* (10ª ed., pp. 157-183). Pearson Education.
- Zouharová, A., Bartáková, K., Bursová, Š., Necidová, L., Haruštiaková, D., Klimešová, M., & Vorlová, L. (2023). Meat and fish packaging and its impact on the shelf life – a review. *Acta Veterinaria Brno*, 92(1), 95-108. <https://doi.org/10.2754/avb202392010095>

**ANEXO**

**Tabla I.** Composición química de los medios de cultivo utilizados para el análisis de los microorganismos incluidos en los análisis de los alimentos.

	Medio	pH final (25 °C)	Composición química	g/L
PCA	Agar de recuento en placa (Plate Count Agar)	7.0 ± 0.2	Peptona de caseína	5.0
			Extracto de levadura	2.5
			Dextrosa	1.0
			Agar	15.0
VRBG	Agar violeta, rojo, bilis con glucosa (Violet Red Bile Glucose Agar)	7.4 ± 0.2	Agar bacteriológico	15.0
			Sales biliares	1.5
			Cristal violeta	0.002
			Glucosa monohidratada	10.0
			Rojo neutro	0.03
			Cloruro de sodio	5.0
			Extracto de levadura	3.0
			Digerido enzimático de tejidos animales	7.0
m-FC	Agar para coliformes fecales (Fecal Coliforms Agar)	7.4 ± 0.2	Triptosa	10.0
			Extracto de levadura	3.0
			Peptona proteosa	5.0
			Sales biliares	1.5
			Cloruro de sodio	12.5
			Lactosa	12.5
			Azul de anilina	0.1
			Agar	15.0

**Tabla II.** Resultados de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y porcentajes de las variables fisicoquímicas de los alimentos utilizados para el análisis estadístico de los alimentos.

Alimento	$\mu^1$	Agua <sup>1</sup>	Grasas <sup>2</sup>	Hidratos de Carbono <sup>2</sup>	Proteínas <sup>2</sup>	Sal <sup>2</sup>	Técnica de conservación <sup>3</sup>
Carne picada	0.73	61.17					
	0.76	63.07	8.40	1.10	17.40	0.27	1
	0.72	59.97					
Hamburguesa	0.82	62.00					
	0.80	58.94	7.40	0.50	17.70	1.85	1
	0.83	59.01					
Salmón	0.58	62.35					
	0.60	63.42	10.00	0.50	22.00	2.80	0
	0.62	65.36					
Ensaladilla	0.47	66.00					
	0.41	68.32	17.00	8.30	5.50	0.87	1
	0.42	66.21					
Tortilla	0.60	68.49					
	0.58	69.28	9.30	13.00	5.00	1.00	2
	0.61	69.99					
Sándwich	0.20	46.14					
	0.24	45.39	10.80	29.50	5.80	1.37	2
	0.23	46.36					
Patatas alioli	0.64	73.50					
	0.61	74.03	19.00	13.00	1.50	1.30	1
	0.56	73.45					
Tiramisú	0.31	50.44					
	0.40	53.05	8.70	30.80	4.20	0.14	1
	0.43	53.14					

*EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN ALIMENTOS COMERCIALES CON RELACIÓN A LA PROXIMIDAD DE LA FECHA DE CADUCIDAD ESTABLECIDA*

	0.11	22.33					
Donuts	0.12	23.65	17.00	38.00	5.50	1.00	1
	0.15	24.23					
	0.30	66.50					
Panna cotta	0.37	66.97	9.00	20.00	2.30	0.11	0
	0.33	68.10					
	0.47	63.68					
Flan de huevo	0.49	61.96	3.20	24.00	4.90	0.15	0
	0.44	62.44					
	1.04	93.52					
Ensalada	1.07	93.20	0.17	3.50	0.96	0.07	1
	1.02	93.57					
	0.53	69.20					
Guacamole	0.54	69.28	14.10	3.70	2.30	1.30	0
	0.57	69.28					

<sup>1</sup> Variables obtenidas experimentalmente; <sup>2</sup> Variables recopiladas en base a la información nutricional del producto (valores por 100 g de alimento); <sup>3</sup> Variable creada en base a la información de la etiqueta del producto: ausencia de atmósfera modificada y conservantes (0), presencia sólo de atmósfera modificada o sólo de conservantes (1), y presencia tanto de atmósfera modificada como de conservantes (2).