

PREDICTIVE MICROBIOLOGY ON DAIRY INDUSTRY

MICROBIOLOGIA PREDICTIVA EN INDUSTRIAS LÁCTEAS

Autor: Hernán Gonçalo Lopes Correia

Tutor: Fernando Perestelo Rodríguez

Máster en Calidad y Seguridad de los Alimentos
Julio de 2018

Contenido

1. Resumen.....	4
2. Abstract.....	5
3. Introducción	6
4. Modelos predictivos	7
4.1. Limitaciones de los modelos predictivos.....	10
5. Aplicaciones de la microbiología predictiva en la industria alimentaria.	10
6. La microbiología predictiva en la industria láctea.	12
6.1. Leche.....	12
6.2. Queso	14
6.3. Yogurt	14
6. Principales Bases de datos y softwares informáticos en la predicción de la cinética de los microorganismos.....	16
6.1. Combase.....	16
6.2. Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)	16
6.3. Combase predictor	17
6.4. Pathogen Modeling Program (PMP).....	18
7. Conclusión.....	19
8. Referencias	21

Lista de Ilustraciones

Ilustración 1. Proceso de filtro de resultados pretendidos en ComBase.....	16
Ilustración 2. Página inicial del Food Spoilage and Safety Predictor	17
Ilustración 3. ComBase Predictor	18
Ilustración 4. Interface grafico para el modelo de crecimiento de Pathogen Modeling Program online	19

Lista de tablas

Tabla 1. Ejemplos de modelos predictivos primarios y secundarios.....	8
Tabla 2. Lista de softwares predictivos presentados En la 8ª Conferencia Internacional sobre Modelado Predictivo en Alimentos	9
Tabla 3. Aplicaciones de la microbiología predictiva relacionadas con la industria alimentaria	11

1. Resumen

La microbiología predictiva es el área de investigación, dentro de la Ciencia de los Alimentos, que explora la elaboración y utilización de modelos matemáticos para caracterizar la cinética del crecimiento microbiano y, en función de éstos, predecir su comportamiento sobre diferentes matrices. Consecuentemente, se trata de un área con un amplio campo de aplicación en el control de calidad y seguridad alimentaria como, por ejemplo, los relacionados con el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) y la determinación de la vida útil de los alimentos.

Los alimentos derivados de la industria láctea son altamente perecederos, con características propicias para el desarrollo de patógenos, lo que exige la necesidad de un estricto control que abarque desde el proceso de producción hasta su consumo. Al respecto, la aplicación del modelado predictivo en la industria láctea ha supuesto un éxito en cuanto a la mejora en su calidad. Este ha sido el caso para la optimización de los procesos de producción de leche, queso, yogur y otros derivados lácteos.

La aplicación de softwares predictivos de uso libre ha sido demostrada ampliamente en la literatura, permitiendo a los usuarios estimar el crecimiento, supervivencia o inactivación de patógenos transmitidos por los alimentos en diferentes entornos. En consecuencia, la microbiología predictiva juega un papel importante en asegurar la calidad y seguridad de los alimentos y se ha convertido en un elemento esencial de la microbiología alimentaria moderna.

Palabras claves: Microbiología Predictiva, Industria Láctea, Softwares Predictivos, Modelos Predictivos.

2. Abstract

Predictive microbiology is the research area, within the Food Science, which explores the development and use of mathematical models to characterize the kinetics of microbial growth and, depending on these, predict their behavior on different matrices. Consequently, it is an area with a wide field of application in quality control and food safety, such as those related to the Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) and the food shelf life determination.

Foods derived from the dairy industry are highly perishable, with characteristics conducive to the development of pathogens, which requires the need for strict control that covers from the production process to its consumption. In this regard, the application of predictive modeling in the dairy industry has been a success in terms of improving its quality. This has been the case for the optimization of the production processes of milk, cheese, yogurt and other dairy products.

The application of free predictive softwares has been widely demonstrated in the literature, allowing users to estimate the growth, survival or inactivation of foodborne pathogens in different environments. Consequently, predictive microbiology plays an important role in ensuring the quality and food safety and has become an essential element of modern food microbiology.

Key Word: Predictive Microbiology, Dairy Industry, Predictive Software, Predictive Models.

3. Introducción

En la industria alimentaria, el tiempo necesario para la obtención de un resultado tras el correspondiente análisis microbiológico de un alimento, repercute negativamente en el proceso de toma de decisiones (Presser, et al, 1998). De hecho, el tiempo requerido para el crecimiento y recuento bacteriano es de, al menos 24 horas, además del uso de técnicas bioquímicas para la identificación del supuesto patógeno, lo cual requiere aún más tiempo. Por esta razón, se han desarrollado métodos más rápidos a fin de acortar el tiempo para la obtención de resultados, entre los que se encuentra las estrategias propias de la Microbiología Predictiva (Rasooly & Herold, 2008).

Esta rama de la microbiología de los alimentos combina elementos de la microbiología, matemáticas y estadística, con el fin de estudiar y desarrollar modelos que describan y predigan, matemáticamente, el crecimiento, supervivencia o muerte de microorganismos frente a distintos factores ambientales como el pH, temperatura, actividad de agua, etc. (Santesteban-López & López-Malo, 2008). Su elaboración se basa, principalmente, en observaciones obtenidas experimentalmente bajo condiciones controladas, utilizando modelos experimentales simplificados (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013).

La aplicación correcta del modelo obtenido puede considerarse una alternativa rentable, frente a las pruebas microbiológicas tradicionales, para estimar la vida útil y seguridad microbiológica de un alimento (McMeekin, et al, 2002), sin embargo, no reemplaza completamente la evaluación y comprobación del comportamiento microbiano, ni la evaluación crítica del microbiólogo experimentado, si bien proporciona una información valiosa para la toma de decisiones, tanto en el proceso de fabricación como de conservación (Santesteban-López & López-Malo, 2008).

Aunque el término “microbiología predictiva” es relativamente reciente, su aplicación surge a raíz de la descripción de la muerte térmica de esporas de *Clostridium botulinum* mediante un modelo logarítmico lineal (Esty & Meyer, 1922), aún utilizado para estimar el procesamiento térmico necesario en alimentos enlatados de baja acidez. Pero, es a partir de los años 60 y 70, como consecuencia del notable incremento en los casos de deterioro y contaminación alimentaria y, sobre todo, de los años 80 con la disponibilidad de equipos y programas informáticos específicos, cuando la microbiología predictiva experimenta su

mayor crecimiento (Ratkowsky, et al, 1982) (Wijtes, et al, 1993) (Rosso, et al, 1995) (Zwietering, et al, 1996) (McMeekin T. , et al, 2002) (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013).

Este hecho, despertó la atención de diversos investigadores y agencias de países europeos, Estados Unidos y Australia, dando origen a importantes proyectos de investigación dirigidos al control de la calidad e inocuidad de los alimentos (McClure, y otros, 1994). En los últimos años, se ha producido un gran desarrollo de la microbiología predictiva como una herramienta fundamental para apoyar la toma de decisiones en el campo de calidad y seguridad alimentaria. De hecho, los modelos obtenidos pueden dar respuesta rápida y fiable a cuestiones específicas, por lo que, en muchos países, la política de seguridad alimentaria está basada en estudios cuantitativos de evaluación de riesgo microbianos, ampliamente respaldados por la aplicación de modelos predictivos (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013).

4. Modelos predictivos

Para conocer el comportamiento de los microorganismos en condiciones previsibles es preciso conocer la evolución de los factores que influyen sobre su crecimiento como, por ejemplo, pH, actividad de agua, temperatura y sal. Precisamente, la microbiología predictiva se basa en que el crecimiento microbiano sobre los alimentos resulta, en cierto modo, reproducible frente a estos factores ambientales. Por consiguiente, se trata de un comportamiento que podría recogerse en distintos modelos matemáticos que estimen tanto el crecimiento microbiano, como su inactivación, producción de toxinas, probabilidad de crecimiento, etc. (Ross, et al, 2000).

Básicamente, los modelos predictivos en función de su desarrollo se dividen en tres grupos: **modelos primarios** (tabla 1) (aquellos que describen la cinética de los microorganismos en función del tiempo) **modelos secundarios** (tabla 1) (describen los efectos de las condiciones ambientales sobre la cinética de los microorganismos) y **modelos terciarios** (basados en programas de software que proporcionan una interfaz entre los datos procesados y el usuario; permiten introducir datos en el modelo y observar estimaciones mediante salidas gráficas simplificadas) (Tabla 2). En consecuencia, los modelos terciarios utilizan la combinación de los modelos primario y secundario para generar nuevos modelos en un software informático, que permite a usuarios estimar el crecimiento, supervivencia o inactivación de patógenos y microorganismos responsables

del deterioro en diferentes matrices alimentarias. En este sentido, es preciso señalar que el rápido desarrollo de la tecnología informática ha favorecido la generación de algunos softwares de gran utilidad en microbiología predictiva, proporcionando una amplia gama de aplicaciones (Forsythe, 2002) (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013).

Tabla 1. Ejemplos de modelos predictivos primarios y secundarios

Modelos primarios		
Tipo	Modelo	Referencia
Modelo de crecimiento	Modelo sigmoideo	(Gibson, Bratchell, & Roberts, 1987)
	$\log x(t) = A + \exp \{- \exp [- B (t - M)]\}$	
	Modelos logísticos y linear	(Baty & Delignette-Mulle, 2004)
$\log(N_t) = \log \left(\frac{N_{max}}{1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0} - 1 \right) \cdot \exp(-\mu_{max} \cdot (t - t_{lag}))} \right)$ Se $t \geq t_{lag}$		
Modelo de inactivación	Modelo de Bigelow	(Geeraerd, Valdramidis, & Van Impe, 2005)
	$\log_{10}(N) = \log_{10}(N(0)) - \frac{t}{D}$ $= \log_{10}(N(0)) - \frac{K_{max} t}{\ln 10}$	
	Modelo de Weibull	(Martinus & van Boeke, 2002)
	$f(t) = \frac{B}{\alpha} \left(\frac{t}{b} \right)^{\beta - 1} \exp \left(- \left(\frac{t}{\alpha} \right)^\beta \right)$ Con t, α y $\beta > 0$	
Modelos secundarios		
Modelos polinomiales	$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{j \neq l}^k \beta_{jl} x_j x_l + \varepsilon$	(Zurera-Cosano, García-Gimeno, Rodríguez-Pérez, & Hervás-Martínez, 2006)
Modelos cinéticos	$\mu_{max} = \mu_{opt} Y(T) Y(pH) Y(aw)$	(Zwietering, Wiltjes, Rombouts, & van't Riet, 1993)

Tabla 2. Lista de softwares predictivos presentados En la 8ª Conferencia Internacional sobre Modelado Predictivo en Alimentos (Tenenhaus-Aziza & Ellouze, 2015)

Software	Enlace	Breve descripción
Baseline	www.baselineapp.com	Baseline simula el crecimiento y la inactivación de 5 patógenos diferentes en varias matrices de alimentos, utilizando modelos predictivos de la literatura. También se incluye un módulo para probar los planes de muestreo.
ComBase	http://www.combase.cc	ComBase proporciona una base de datos con más de 50 000 registros para describir la evolución (crecimiento e inactivación) de varios microorganismos en medios de cultivo o en diferentes alimentos. También proporciona algunos módulos de adaptación y simulación para el crecimiento y la inactivación. 15 microorganismos son contabilizados.
Dairy Products Safety Predictor	www.aqr.maisondulait.fr	El Predictor de seguridad de productos lácteos es un software comercial que realiza simulaciones de un modelo de evaluación de exposición o riesgo desarrollado previamente para un microorganismo específico en un producto lácteo específico. Los usuarios tienen cuentas personales donde se cargan sus modelos y luego pueden probar nuevos parámetros.
FDA-RISK	https://irisk.foodrisk.org	FDA-RISK permite priorizar el riesgo alimentario mediante la implementación de modelos de evaluación de riesgos para diferentes patógenos y matrices de alimentos. Se proponen plantillas para modelos de evaluación de riesgos.
FILTREX	http://w3.jouy.inra.fr/unites/miaj/public/logiciels/filtrex/	FILTREX evalúa con mucha precisión los parámetros del crecimiento primario y los modelos de inactivación y proporciona soporte para un diseño secuencial óptimo de experimentos de prueba de desafío.
FISHMAP	http://www.azti.es/downloads/downloads/fishmap/#tab-description	FISHMAP simula el crecimiento de 8 especies de deterioro en la matriz de los peces, utilizando la temperatura, el aire y el CO2.
Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)	http://fssp.food.dtu.dk	FSSP predice el crecimiento de 3 patógenos, 3 spoilers y microorganismos genéricos en productos de carne y marisco. 12 parámetros ambientales pueden integrarse en la simulación en condiciones dinámicas. Está disponible en 18 idiomas.
GInaFIT	http://cit.kuleuven.be/biotec/downloads.php	GinaFit permite ajustar diez modelos de inactivación en datos experimentales y seleccionar el mejor modelo
GroPIN	www.aua.gr/psomas/gropin	GroPin simula el comportamiento de 66 microorganismos, incluidas especies patógenas y de descomposición en diferentes matrices de alimentos. También se proporciona una base de datos de modelos predictivos que se puede implementar con nuevos modelos. Las simulaciones de Monte Carlo también se proponen para tener en cuenta la variabilidad.
Listeria Meat Model	www.cpmf2.be	El modelo Listeria Meat es un software comercial que simula el crecimiento del patógeno en la carne y en diferentes productos cárnicos.
MicroHibro	www.microhibro.com	MicroHibro evalúa y valida los parámetros de un modelo primario basado en datos experimentales. La implementación de modelos de evaluación de riesgos, seguida de un análisis de sensibilidad del modelo, también es posible en función de la combinación de varios procesos básicos y el uso de la base de datos de modelos predictivos proporcionados.
MRV, Microbial Responses Viewer	http://mrviewer.info/	Microbial Responses Viewer es una interfaz de crecimiento / no crecimiento basada en la base de datos ComBase. Proporciona una visualización de las tasas de crecimiento específicas.
NIZO Premia	Sin acceso en internet	NIZO Premia es un software comercial para predecir el comportamiento de microorganismos patógenos y defoliadores cuyas características son proporcionadas por el usuario o integradas en la herramienta. Estas predicciones se realizan principalmente en productos lácteos; otros sustratos son posibles si sus características son proporcionadas por el usuario.
PMM-Lab	https://sourceforge.net/projects/pmmlab/	PMM-Lab es un software de código abierto evolutivo que simula el comportamiento de patógenos y spoilers en diferentes matrices de alimentos, siempre que la información requerida sea proporcionada por el usuario. Proporciona una base de datos modelo que ayuda manejando datos experimentales.
Prediction of Microbial Safety in Meat Products	http://dmripredict.dk	El Prediction of Microbial Safety in Meat Products, predice y simula el comportamiento de cuatro especies de patógenos en productos cárnicos, basándose en la literatura y los modelos predictivos internos y en datos experimentales.
Sym'Previus	www.symprevius.org	Sym'Previus es un software comercial que simula el crecimiento y inactivación de 6 patógenos y 13 spoilers en varias matrices de alimentos tanto en condiciones estáticas como dinámicas. Se pueden usar enfoques deterministas o probabilísticos basados en datos experimentales internos o en datos de los usuarios.

4.1. Limitaciones de los modelos predictivos.

Generalmente, los modelos microbiológicos predictivos se desarrollan asumiendo la consistencia de las respuestas microbianas. En este sentido, es preciso señalar que, aunque dichos modelos proporcionan una alternativa económica para minimizar las pruebas microbiológicas en la determinación de vida útil, es posible encontrarnos situaciones en las que las predicciones del modelo pueden no ser precisas. Todo ello, como consecuencia de respuestas microbianas inconsistentes y variaciones en los medios de crecimiento. No obstante, debe señalarse que, los modelos microbiológicos predictivos, deben someterse a una validación previa su aplicación en la toma de decisiones, ante situaciones de inocuidad alimentaria. Ello implica, obviamente, comparar las predicciones del modelo con las observaciones experimentales que no se utilizan en el desarrollo del modelo (Food Safety Authority of Ireland, 2015).

5. Aplicaciones de la microbiología predictiva en la industria alimentaria.

A pesar de los avances tecnológicos en el procesamiento de alimentos, los riesgos microbiológicos asociados a los mismos y, por tanto, su evaluación, control, reducción y/o eliminación, resultan de vital importancia para los diferentes gobiernos y organismos relacionados con la salud pública.

En este contexto, anticipar el comportamiento de los patógenos en los alimentos es un objetivo primordial para la industria alimentaria. De ahí que, la microbiología predictiva, represente una herramienta importante para las entidades responsables de controlar la calidad de los alimentos, ya que permite estimar el crecimiento, supervivencia e inactivación de potenciales patógenos presentes, como consecuencia de las diversas operaciones de manipulación y procesamiento de los mismos (McMeekin T. , et al, 2002) (USDA, 2018). Además del control de calidad, la microbiología predictiva ofrece otras diversas aplicaciones (Tabla 3).

Tabla 3. Aplicaciones de la microbiología predictiva relacionadas con la industria alimentaria (Membré & Lambert, 2008) (McMeekin & Ross, 2002)

Principales aplicaciones de la Microbiología Predictiva
Análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC)
<ul style="list-style-type: none"> • Análisis preliminar de peligros • Identificación y establecimiento de puntos de control críticos • Medidas correctoras • Evaluación de la interacción de variables
Evaluación y gestión de riesgos
<ul style="list-style-type: none"> • Estimación de la dinámica de poblaciones microbianas a lo largo de la cadena alimentaria • Evaluación de la exposición hacia un patógeno específico • Diseño de estrategias de gestión con base científica para garantizar la seguridad alimentaria
Estudios de vida útil
<ul style="list-style-type: none"> • Predicción de crecimiento de microorganismos patógenos o responsables del deterioro en los alimentos
Medidas higiénicas e integración de temperatura
<ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de las consecuencias de la aplicación de la cadena de frío en el deterioro microbiano • Optimización de procesos de inactivación térmica y no térmica
Educación
<ul style="list-style-type: none"> • Educación del personal científico y no científico • Implementación y capacitación de sistemas de decisión basados en la informática
Diseño experimental
<ul style="list-style-type: none"> • Estimación del número de muestras a preparar • Definición de intervalos dentro de cada factor a analizar
Innovación y desarrollo de un nuevo producto
<ul style="list-style-type: none"> • Evaluación del impacto del deterioro microbiano en un producto alimenticio • Efecto del procesamiento en la calidad y seguridad de los alimentos • Evaluación del efecto de otros factores adicionales en toda la cadena alimentaria
Apoyo operativo
Respaldo en las decisiones de seguridad alimentaria cuando se mejore o ejecute un proceso de fabricación; establecer puntos de control críticos, y evaluar cómo las anomalías detectadas afectan la seguridad y calidad microbiológica del alimento.
Soporte de incidentes
Estimación del impacto en la seguridad del consumidor o la calidad del producto, en caso de presentarse alguna anomalía en el mercado

6. La microbiología predictiva en la industria láctea.

Los productos lácteos son alimentos altamente perecederos y, a menos que se procesen, envasen, distribuyan y almacenen correctamente, pueden volverse potencialmente inseguros debido al crecimiento de microorganismos patógenos. De entre los patógenos transmitidos por alimentos, *Listeria monocytogenes* es la que ofrece mayor preocupación dentro de la industria láctea. La razón que justifica tal preocupación deriva de la aparición de distintos brotes de listeriosis con el consumo de productos lácteos, incluida la leche pasteurizada, lo que sugiere la importancia de los mecanismos de control que abarcan, desde las condiciones de procesamiento hasta las de almacenamiento, pasando por su envasado y distribución (Dalton , y otros, 1997).

La calidad de los productos lácteos está regulada por el Reglamento (CE) N.º 853/2004 del Parlamento Europeo y el Consejo de 29 de Abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal y el Reglamento (CE) N.º 1441/2007 de la COMISIÓN de 5 de Diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) N.º 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, que establece determinados parámetros para el control microbiológico relativo a la leche y productos lácteos.

Para facilitar el control microbiológico sobre el producto final, o durante su procesamiento, es posible recurrir al modelado a lo largo de la cadena producción (Roupas, 2008). Se han propuesto distintos modelos matemáticos que permiten ajustar el comportamiento de los microorganismos en productos lácteos, algunos de los cuales son específicos para la leche pasteurizada (Murphy, et al, 1996) (Alavi, et al, 1999) (Xanthiakos, et al, 2006) y el queso (Tenenhaus-Aziza & Ellouze, 2015).

6.1. Modelado predictivo en la leche

La mayoría de los procesos industriales destinados a la fabricación de productos lácteos son continuos y de gran capacidad, por lo que se hace necesario un alto nivel de control del proceso de fabricación. En ese contexto, la microbiología predictiva se ha revelado como una herramienta muy útil, sobre todo en el diseño y mantenimiento de equipos en línea, mejorando, significativamente la eficiencia del proceso de producción de variedad de productos lácteos (Roupas, 2008).

6.1.1. Modelos de inactivación (Pasteurización)

Estos modelos se han utilizado para determinar la calidad en la conservación de leche cruda y productos pasteurizados, mediante tratamientos térmicos o no térmicos. Aunque, tradicionalmente, se ha supuesto que la cinética de inactivación térmica es un proceso lineal, se dispone de suficientes evidencias que muestran lo contrario, tanto para tratamientos térmicos como no térmicos (Buzru & Alpas , 2004) (Chen, 2007) (Mishra & Puri, 2013).

Se han propuesto varios modelos para describir las curvas de supervivencia no lineal, entre los que se encuentran el de Baranyi, Gompertz, y Weibull (Cole, et al, 1993), (Baranyi & Roberts , 1994). El modelo de Weibull se ha utilizado con éxito para modelar la inactivación de *Listeria monocytogenes* en leche entera, bajo un efecto combinado de alta presión y temperatura (Chen & G. Hoover, 2003) (Chen, 2007); (Mishra & Puri, 2013).

En cualquier caso, el desarrollo y aplicación de estos modelos, matemáticamente consistentes, ayudarán a las industrias alimentarias a diseñar, desarrollar y optimizar condiciones de procesamiento seguras que incrementen la seguridad alimentaria.

6.1.2. Modelos de crecimiento

Koutsoumanis, et al (2010) aplicaron un modelo probabilístico para determinar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en leche pasteurizada, durante su distribución, almacenamiento al por menor y doméstico. El crecimiento de la bacteria fue calculado usando el modelo de raíz cuadrada desarrollado por Xanthiakos, et al. (2006) y validado bajo condiciones de temperaturas estáticas y dinámicas. Por tanto, conocer el efecto de los diversos factores de la cadena de enfriamiento sobre el crecimiento del patógeno, resultaría determinante en la toma de decisiones para la mejora de la seguridad del producto, especialmente en las industrias lácteas.

6.1.3. Modelos competitivos

Staphylococcus aureus se ha descrito como el agente responsable de diferentes brotes aparecidos en productos lácteos, debidos de la presencia de sus toxinas (Stewart, et al, 2002), aun cuando su concentración celular es baja, por el efecto inhibitorio producido por microorganismos competidores (bacterias lácticas) (Ratkowsky, et al, 1982)

(Giménez & Dalgaard, 2004) (Topisirovic, et al, 2006). Por ello, algunos autores han propuesto algunos modelos que reflejen el comportamiento de esta bacteria en presencia de bacterias lácticas, de forma que, su validación, prevendría los efectos anteriormente descritos (Valfk, et al, 2018). Estas interacciones entre especies justifican, para muchos autores, el desarrollo de futuros modelos predictivos, esencialmente porque, muchos modelos sobreestiman las predicciones y describen situaciones de "el peor caso", demasiado conservadoras (Giménez & Dalgaard, 2004) (Le Marc, et al, 2009) (Fujikawa, et al, 2014).

6.2. Modelado predictivo en el queso

El modelado predictivo en el proceso de elaboración del queso se ha centrado, principalmente, en su rendimiento, cultivo iniciador y medidas de control de calidad. Entre estas últimas, resultan de especial interés el crecimiento celular y la tasa de producción de ácido láctico, por lo que, encontrar un modelo que pueda predecir ambas variables representaría una mejora sustancial del proceso (Roupas, 2008).

Es conocido el uso de las bacterias lácticas en la industria de los alimentos fermentados, los cuales ven alargada su vida útil gracias al efecto antimicrobiano producido por el ácido láctico. Así lo han mostrado Østergaard, et al. (2014) en un estudio realizado sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en requesón. También, Lobacz, et al. (2013), han aplicado modelos predictivos (PMP y Combase Predictor) para seguir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en quesos, durante su maduración y almacenamiento.

Los estudios citados, mostraron una sobreestimación del crecimiento microbiano debido a que dichos modelos predictivos están basados en datos obtenidos en medios de cultivo líquido y en ausencia de efectos inhibitorios producidos por otros microorganismos. Consecuentemente, la utilidad y aplicabilidad de los modelos debe orientarse hacia productos, o grupos de productos, similares y los datos microbiológicos utilizados para construir el modelo deberían derivar de los ensayos realizados en alimentos directamente contaminados.

6.3. Modelado predictivo en el yogur

El yogur es un producto generalmente considerado como seguro, desde un punto de vista microbiológico, debido a su bajo pH, aunque se ha descrito la presencia de ciertos patógenos (*Listeria monocytogenes* y *Salmonella*) capaces de proliferar durante su

producción (O'Mahony, et al, 1990) (Siddiqui & Nadeem, 2007) (Scallan, et al, 2011) (Szczawińska & Szczawiński, 2011) (Hrnjez, y otros, 2014) (Sfakianakis & Tzia, 2014) (Lee, y otros, 2014). También, el tipo de producto final, la temperatura de almacenamiento y otros parámetros ambientales, pueden condicionar la aparición de dichos patógenos (Szczawiński, et al, 2014) (Szczawiński, et al, 2016).

Como en los casos anteriores, los modelos predictivos permitirían estimar el comportamiento de esos microorganismos patógenos, así como su utilización en el desarrollo y validación de las medidas de control (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013). En este sentido, se ha realizado diversos estudios sobre el comportamiento de los patógenos en el yogur (Ogwaro, et al, 2002) (Al-Haddad, 2003) (Bachrouri, et al, 2006) (Akkaya, et al, 2009) (Álvarez-Ordóñez, et al, 2013) y, más recientemente, sobre la aplicación de la microbiología predictiva en el control de calidad de yogur (Gougouli, et al, 2011) (Mataragas, et al, 2011) (Szczawiński, et al, 2014) (Bednarko-Młynarczyk, et al, 2015) (Szczawiński, et al, 2016) (Savran, et al, 2018).

En un estudio realizado sobre vida útil del yogur, Gougouli & Koutsoumanis (2010) diseñaron un modelo que simula el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el crecimiento fúngico. El modelo obtenido ofrecía predicciones precisas sobre la vida útil del producto en condiciones constantes y variables de temperatura.

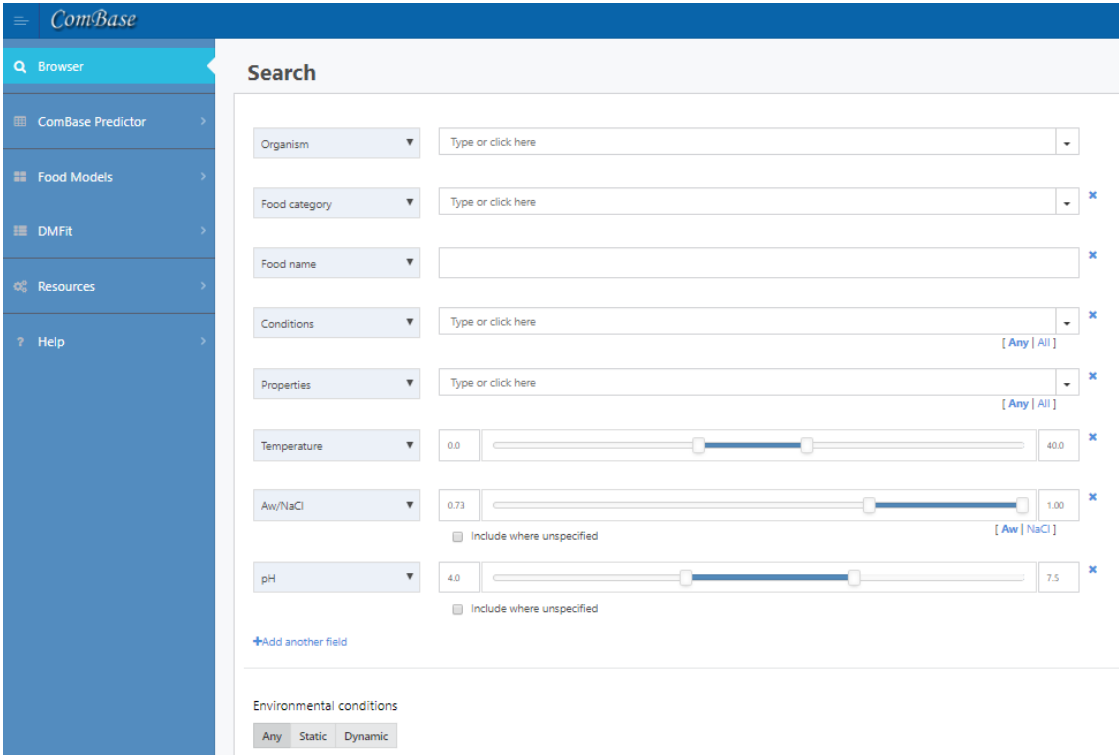
En otro estudio, realizado por Savran et al. (2018), los modelos obtenidos se centraron en determinar la influencia de la temperatura de almacenamiento en el comportamiento de *Salmonella enteritidis*. Los resultados obtenidos mostraron la multiplicación de *Salmonella* durante la etapa de fermentación, prolongándose su viabilidad durante días dentro del producto final e, incluso, durante su almacenamiento en refrigeración.

En resumen, la aplicación de estos modelos podría extenderse para realizar predicciones bajo diferentes condiciones de temperatura, de tal manera que, estos modelos predictivos, proporcionarían una base cuantitativa más completa en la gestión de riesgos microbiológicos.

7. Principales bases de datos y softwares informáticos en la predicción de la cinética de los microorganismos

7.1. Combase

Combase es la base de datos online más grande y usada en microbiología predictiva. Con más de 60000 registros, describe la supervivencia y crecimiento de microorganismos en diferentes condiciones (www.combase.cc). Dada la gran cantidad de datos disponibles, permite realizar búsquedas por diferentes parámetros, incluyendo tipos de microorganismos, categoría y nombre del alimento, condiciones de crecimiento, propiedades, temperatura y pH, concentración de sal y actividad de agua, así como condiciones ambientales estáticas o dinámicas conforme la ilustración 1.



The screenshot displays the ComBase search interface. On the left is a navigation menu with options: Browser, ComBase Predictor, Food Models, DMFit, Resources, and Help. The main search area is titled 'Search' and contains several filter fields:

- Organism: A dropdown menu with a search box and a dropdown arrow.
- Food category: A dropdown menu with a search box and a dropdown arrow, marked with an 'x'.
- Food name: A search box with a dropdown arrow, marked with an 'x'.
- Conditions: A dropdown menu with a search box and a dropdown arrow, marked with an 'x'. Below it are links for '[Any | All]'.
- Properties: A dropdown menu with a search box and a dropdown arrow, marked with an 'x'. Below it are links for '[Any | All]'.
- Temperature: A dropdown menu with a search box and a dropdown arrow, marked with an 'x'. It includes a slider ranging from 0.0 to 40.0.
- Aw/NaCl: A dropdown menu with a search box and a dropdown arrow, marked with an 'x'. It includes a slider ranging from 0.73 to 1.00. Below the slider is a checkbox labeled 'Include where unspecified' and links for '[Aw | NaCl]'.
- pH: A dropdown menu with a search box and a dropdown arrow, marked with an 'x'. It includes a slider ranging from 4.0 to 7.5. Below the slider is a checkbox labeled 'Include where unspecified'.

At the bottom of the search area, there is a link '+Add another field' and a section for 'Environmental conditions' with buttons for 'Any', 'Static', and 'Dynamic'.

Ilustración 1. Proceso de filtro de resultados pretendidos en ComBase

7.2. Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)

FSSP se ha desarrollado para predecir el crecimiento de microorganismos patógenos y de descomposición en los alimentos, así como para predecir el efecto de las condiciones de almacenamiento de temperatura estática o dinámica en la vida útil del producto. (Ilustración 4).

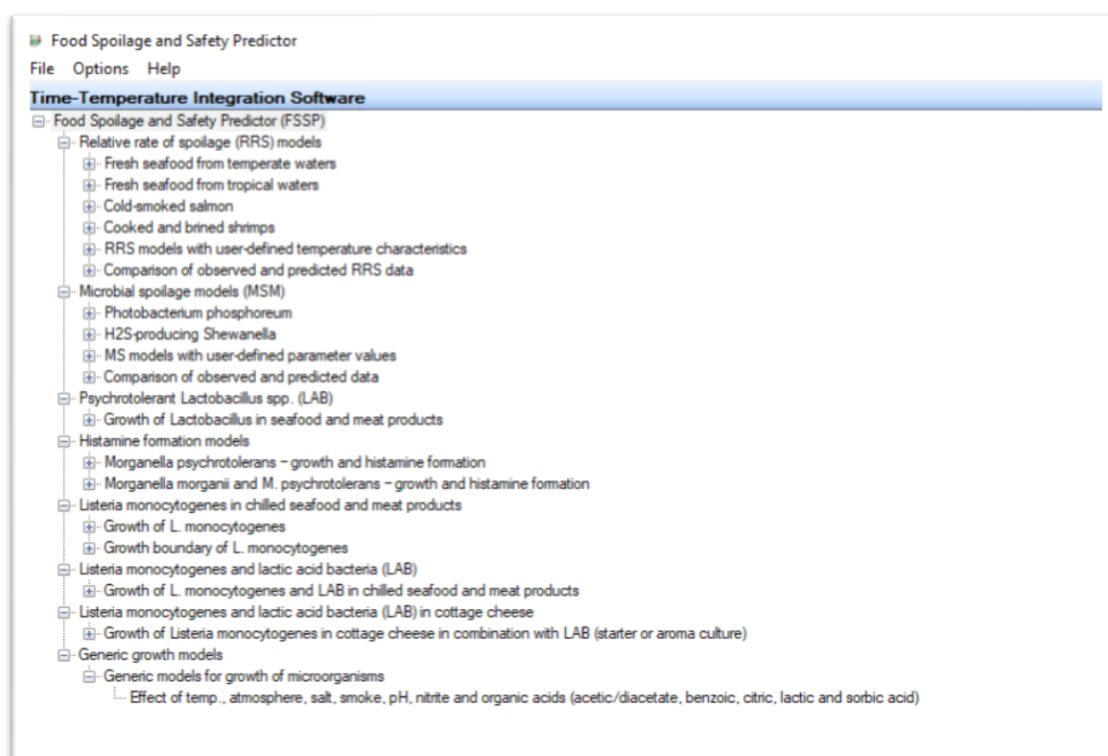


Ilustración 2. Página inicial del Food Spoilage and Safety Predictor

La última versión del modelo incluye varios modelos de tasa relativa de deterioro (TRD) para productos genéricos y específicos; varios modelos de deterioro microbiano para productos específicos; un modelo genérico para predecir el crecimiento microbiano y la vida útil; módulos para comparar predicciones de FSSP con los propios datos de vida útil o crecimiento de bacterias de los usuarios; modelo para predecir el crecimiento de *Lactobacillus spp.* Psicrotolerante en mariscos y productos cárnicos refrigerados; modelos para predecir el crecimiento y la formación de histamina por *Morganella psychrotolerans* y *Morganella morganii*; modelo de límite de crecimiento y crecimiento para *Listeria monocytogenes*; modelos para predecir el crecimiento simultáneo de *Listeria monocytogenes* y bacterias del ácido láctico en productos del mar refrigerados, productos cárnicos y requesón y un modelo genérico extenso para predecir el crecimiento en diversos alimentos para diferentes microorganismos.

7.3. Combase predictor

ComBase Predictor es una herramienta gratuita online que permite predecir la respuesta de diferentes tipos de bacterias a factores ambientales clave en los alimentos (temperatura, pH, concentración de sal, etc.) (Pérez-Rodríguez & Valero, 2013).

El software predice el crecimiento, supervivencia e inactivación térmica de microorganismos en función de nivel de contaminación inicial estimada, temperatura, pH y la concentración de sal, en condiciones estáticas o dinámicas (Ilustración 4). Este software ofrece la posibilidad de realizar predicciones simultaneas para cuatro microorganismos, comparando los parámetros anteriores (www.combase.cc).

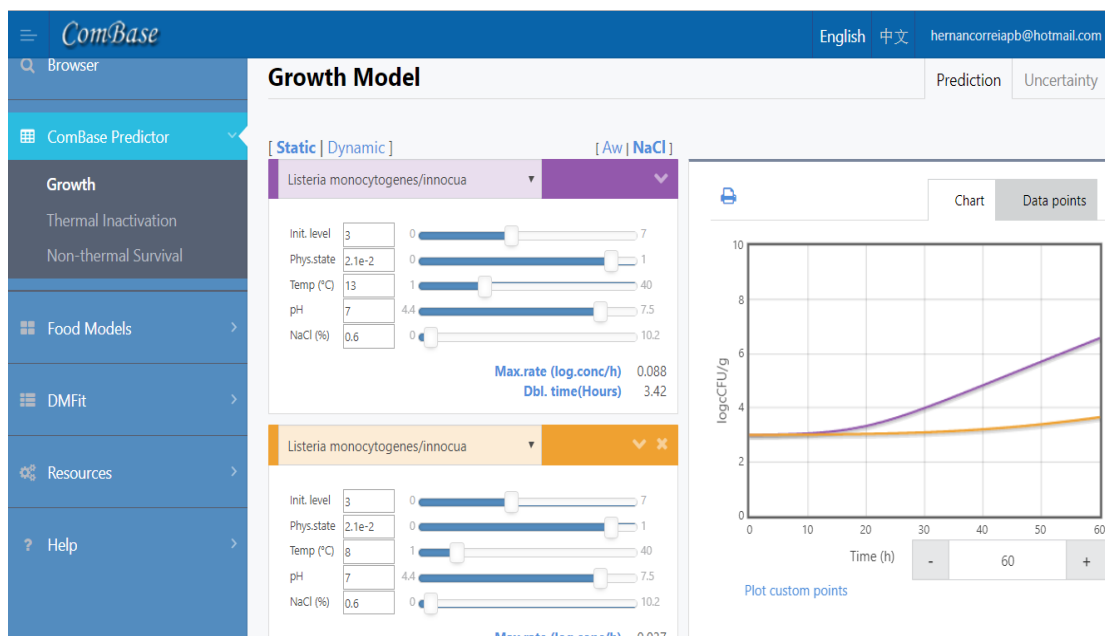


Ilustración 3. ComBase Predictor

7.4. Pathogen Modeling Program (PMP)

El PMP permite analizar datos cinéticos experimentales y ajustarlos a modelos matemáticos conocidos y comúnmente utilizados en microbiología predictiva. Permite predecir el crecimiento/inactivación de bacterias patógenas bajo diversas condiciones ambientales y, aunque el modelo está basado en muchos datos experimentales, no hay garantía de que los valores predichos coincidan con los que se producirían en un alimento específico (USDA, 2018).

Su última versión (PMP 8.0), incluye modelos de crecimiento para 13 patógenos, modelos de supervivencia, modelos de inactivación térmica, refrigeración, irradiación, tiempo para generar turbidez y producción de toxina (<https://pmp.erc.usda.gov>).

Pathogen Modeling Program (PMP) Online

[PMP Home](#) / [PMP Online](#)

SELECT A PATHOGEN MODEL ▶

Growth Model: *Listeria monocytogenes* (Broth Culture, Aerobic)

Input Conditions

Environment:
 aerobic anaerobic

Temperature in:
 °C °F

Temperature
 Range: 4.0 to 37.0 °C

pH
 Range: 4.5 to 7.5

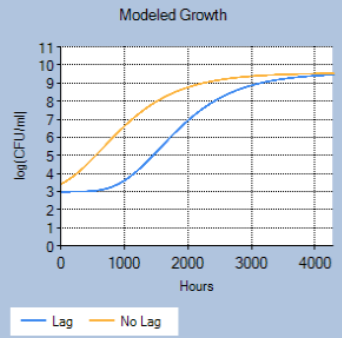
Sodium Chloride
 Range: 0.5 to 10.5 (% [g/dL])

Sodium Nitrite
 Range: 0 to 150 ppm

Initial Level
 Range: 3.0 to 5.9 log(CFU/ml)

CALCULATE GROWTH DATA

Modeled Growth



Modeled Growth Parameters

- Lag Phase Duration: 903.90 (hours)
- Generation Time: 81.54 (hours)

Ilustración 4. Interface gráfico para el modelo de crecimiento de Pathogen Modeling Program online

8. Conclusión

La seguridad microbiológica de los alimentos no sólo preocupa a las industrias sino, también, a gobiernos y población en general. Obviamente, cada industria propone el suministro de alimentos sanos y seguros como principio básico de una sociedad desarrollada. Es en este contexto, en el que la microbiología predictiva juega un papel fundamental para el cumplimiento de esta aspiración u objetivo que, por otra parte, se ha convertido en un elemento esencial de la microbiología alimentaria moderna.

El desarrollo de softwares predictivos ha sido de gran importancia en la optimización de procesos de fabricación y prevención de riesgos microbiológicos en las industrias lácteas, permitiendo un control aún más riguroso, desde el proceso de producción hasta el consumo. Dado el éxito obtenido en su aplicación, organismos públicos o privados deberían divulgar la aplicabilidad de estos modelos, para que sean usados, principalmente, en pequeñas y medianas industrias para el control de la calidad microbiológica de sus productos. No obstante, algunos softwares específicos para determinados tipos de alimentos no están disponibles de forma gratuita y su adquisición y mantenimiento son demasiados costosos, dificultando su uso por las pequeñas

empresas. Sin embargo, estos pueden siempre usar modelos generales disponibles gratuitamente como Combase predictor y PMP, entre otros.

Dentro de este marco de seguridad, la microbiología predictiva es reconocida como una herramienta esencial para la evaluación de riesgos y su desarrollo se encuentra en pleno auge. En consecuencia, la elaboración de modelos obtenidos utilizando datos cinéticos del crecimiento microbiano, recogidos directamente de productos lácteos contaminados, proporcionarán predicciones, cada vez más exactas, sobre la evolución real de la microbiota presente en un alimento cualquiera.

9. Referencias

- Akkaya, L., Telli, R., & Sagdic, O. (2009). Growth-Death Kinetics of *Listeria Monocytogenes* in Strained Yogurt. *International Journal of Food Properties* , <https://doi.org/10.1080/10942910801995606>.
- Alavi, S., Puri , V., Knabel , S., Mohtar , R., & Whiting, R. (1999). Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk. *Journal of Food Protection*, 62(2):170-6.
- Al-Haddad, K. S. (2003). Survival of salmonellae in bio-yoghurt. *International Journal od Dairy Technology*, <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00118.x>.
- Álvarez-Ordóñez, A., Valdés, L., Bernardo, A., Prieto, M., & López, M. (2013). Survival of acid adapted and non-acid adapted *Salmonella Typhimurium* in pasteurized orange juice and yogurt under different storage temperatures. *Food Science and Technology International*, 19 (5),407–414.
- Bachrouri, M., Quinto, E., & Mora, M. (2006). Survival of *Escherichia Coli* O157:H7 During Storage of Yogurt at Different Temperatures. *Journal of Food Science*, 67 (5) (1989–1903).
- Baranyi , J., & Roberts , T. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiol*, 23:277–294.
- Baty, F., & Delignette-Mulle, M.-L. (2004). Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? *International Journal of Food Microbiology*, (91): 261 - 277.
- Bednarko-Młynarczyk, E., Sztejn, J., Białobrzewski, I., Wiszniewska-Łaszczych, A., & Liedtke, K. (2015). Modeling the kinetics of survival of *Staphylococcus aureus* in regional yogurt from goat's milk. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 39-45.
- Buzru, S., & Alpas , H. (2004). Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. *FEMS Microbiology Letters*, 238: 29–36.
- Chen, H. (2007). Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk. *Food Microbiology*, 24:197-204.
- Chen, H., & G. Hoover, D. (2003). Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* , 25–34.

- Cole, M., Davies, K., Munro, G., Holyoak, C., & Kilsby, D. (1993). A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology*, 232-239.
- Dalton, C., Austin, C., Sobel, J., Hayes, P., Bibb, W., Graves, L., . . . Griffin, P. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med*. 1997, 336(2):100-5.
- Esty, J., & Meyer, K. (1922). The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. XI. *The Journal of Infectious Diseases*, 650–663.
- Food Safety Authority of Ireland. (2015). Predictive Microbiology and Shelf-life. Disponible en: https://www.fsai.ie/faq/shelf_life/predictive_microbiology.html.
- Forsythe, S. (2002). *The microbiological risk assessment of food*. Oxford, UK: Blackwell.
- Fujikawa, H., Munakata, K., & Z. Sakha, M. (2014). Development of a Competition Model for Microbial Growth in Mixed Culture. *Biocontrol Science*, 61-71.
- Geeraerd, A., Valdramidis, V., & Van Impe, J. (2005). GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 95 – 105.
- Gibson, A., Bratchell, N., & Roberts, T. (1987). The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J Appl Bacteriol*, 62(6):479-90.
- Giménez, B., & Dalgaard, P. (2004). Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.*, 96, 96–109.
- Gougouli, M., & Koutsoumanis, K. (2010). Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2-3):254-62.
- Gougouli, M., Kalantzi, K., Beletsiotis, E., & Koutsoumanis, K. P. (2011). Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production. *Food Microbiology*, 28: 1453e1462.
- Hrnjez, D., Vaštag, Ž., Milanovic, S., Vukic, V., Ilicic, M., & Popovic, L. (2014). The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. *journal of functional foods*, 10:336–345.
- Koutsoumanis, K., Pavlis, A., Nychas, G.-J., & Xanthiakos, K. (2010). Probabilistic Model for *Listeria monocytogenes* Growth during Distribution, Retail Storage, and Domestic Storage of Pasteurized Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 2181–2191.

- Le Marc, Y., Valík, L., & Medved'ová, A. (2009). Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 306–311.
- Lee, S. C., Billmyre, R. B., Li, A., Carson, S., Sykes, S. M., Huh, E. Y., . . . Heitman, J. (2014). Analysis of a Food-Borne Fungal Pathogen Outbreak: Virulence and Genome of a *Mucor circinelloides* Isolate from Yogurt. *mBio* 5(4):e01390-14. doi:10.1128/mBio.01390-14.
- Lobacz, A., Kowalik, J., & Tarczynska, A. (2013). modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in mold-ripened cheeses. *Journal of Dairy Science*, 96 :3449–3460.
- Martinus , A., & van Boeke. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 139 – 159.
- Mataragas, M., Dimitriou, V., Skandamis, P., & Drosinos, E. (2011). Quantifying the spoilage and shelf-life of yoghurt with fruits. *Food Microbiology* , 28:611e616.
- McClure, P., de W. Blackburn, C., Cole, M., Curtis, P., Jones, J., Legan, J., . . . Walker, S. (1994). Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. *International Journal of Food Microbiology*, 265-275.
- McMeekin, T., Olley, J., Ratkowsky, D., & Ross, T. (2002). Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology* , 73:395 – 407.
- McMeekin, T., & Ross, T. (2002) Predictive Microbiology: Providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 133-153
- Membré, J.-M., & Lambert, R. (2008). Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 10–15.
- Mishra, N., & Puri, V. M. (2013). Modeling the Inactivation of *Listeria monocytogenes* by Combined High Pressure and Temperature Using Weibull Model. *Journal of Food Process Engennering*, 598-607.
- Murphy, P., Rea, M., & Harrington, O. (1996). Development of a predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in a skim milk medium and validation studies in a range of dairy products. *J. Appl. Bacteriol.*, 80:557–564.
- Ogwaro, B. A., Gibson, H., Whitehead, M., & Hill, D. J. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 105-112.

- O'Mahony, M., Mitchell, E., Gilbert, R., & Morris, J. (1990). An outbreak of foodborne botulism associated with contaminated hazelnut yoghurt. *Epidemiology and Infection*, (3):389-95.
- Østergaard, N. B., Eklöv, A., & Dalgaard, P. (2014). Modelling the effect of lactic acid bacteria from starter- and aroma culture on growth of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology* , 188: 15-25.
- Pérez-Rodríguez, F., & Valero, A. (2013). *Predictive Microbiology in Food*. New York Heidelberg Dordrecht London: Springer.
- Presser, K. A., Ross, T., & Ratkowsky, D. A. (1998). Modelling the Growth Limits (Growth/No Growth Interface) of *Escherichia coli* as a Function of Temperature, pH, Lactic Acid Concentration, and Water Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 1773–1779.
- Rasooly, A., & Herold, K. (2008). Food Microbial Pathogen Detection and Analysis Using DNA Microarray Technologies. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(4):531-50.
- Ratkowsky, D., Olley, J., McMeekin, T., & Ball, A. (1982). Relationship Between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures. *Journal of Bacteriology*, 1-5.
- Ross, T., Dalgaard, P., & Tienungoon, S. (2000). Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology* , 62: 231–245.
- Rosso, L., Lobry, J., Bajard, S., & Flandrois, J. (1995). Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 610–616.
- Roupas, P. (2008). Review: Predictive modelling of dairy manufacturing processes. *International Dairy Journal* , 741– 753.
- Santesteban-López, N., & López-Malo, A. (2008). Descripción e importancia de algunos modelos predictivos utilizados como herramienta para la conservación de los alimentos. 14-26.
- Savran, D., Pérez-Rodríguez, F., & Halkman, A. (2018). Modelling survival of *Salmonella* Enteritidis during storage of yoghurt at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* , 67–76.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., . . . Griffin, P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7-15.

- Sfakianakis, P., & Tzia, C. (2014). Conventional and Innovative Processing of Milk for Yogurt Manufacture; Development of Texture and Flavor: A Review. *Foods* 3, 176-193.
- Siddiqui, M. S., & Nadeem, S. F. (2007). Epidemiological investigation of an outbreak of food poisoning traced to yogurt among personnel of a military training center. *Pakistan Armed Forces Medicaal Journal*, 57(3).
- Stewart, C., Cole, M., Legan, J., Slade, L., Vandeven, M., & Schaffner, D. (2002). Staphylococcus aureus growth boundaries: moving towards mechanistic predictive models based on solute-specific effects. *Appl. Environ. Microbiol.* , 68, 1864-1871.
- Szczawińska, M., & Szczawiński, J. (2011). Effect of storage temperature on survival rate of Salmonella Enteritidis in yoghurt. *Analele Universității din Craiova, seria Agricultură – Montanologie – Cadastru*, 243-246.
- Szczawiński , J., Szczawińska, M., Łobacz , A., & Jackowska-Tracz , A. (2016). Modeling the effect of temperature on survival rate of Listeria monocytogenes in yogurt. *Pol J Vet Sci.*, 19(2):317-24.
- Szczawiński, J., Szczawińska, M., Łobacz, A., & Jackowska-Tracz, A. (2014). Modeling the effect of temperature on survival rate of Salmonella Enteritidis in yogurt. *Pol J Vet Sci.*, 17(3):479-85.
- Tenenhaus-Aziza, F., & Ellouze, M. (2015). Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. *Food Microbiology* , 290 - 299.
- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, L., & Lozo, J. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* , 112, 230–235.
- USDA. (2018). Pathogen Modeling Program (PMP) Online. en <https://pmp.errc.ars.usda.gov/aboutPMP.aspx>.
- Valík, L., Acai, P., & Alzbeta Medvedová. (2018). Application of competitive models in predicting the simultaneous growth of Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria in milk. *Food Control*, 87:145-152.
- Wijtes, T., McClure, P., Zwietering, M., & Roberts, T. (1993). Modelling bacterial growth of Listeria monocytogenes as a function of water activity, pH and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 139-149.
- Xanthiakos, K., Simos, D., Angelidis, A., Nychas, G.-E., & Koutsoumanis, K. (2006). Dynamic modeling of Listeria monocytogenes growth in pasteurized milk. *Journal of Applied Microbiology*, 1289-1298.

- Zurera-Cosano, G., García-Gimeno, R., Rodríguez-Pérez, R., & Hervás-Martínez, C. (2006). Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. *Food Control*, 429–438.
- Zwietering, M., de Wit, J., & Notermansb, S. (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption . *International Journal of Food Microbiology*, 55-70 .
- Zwietering, M., Wiltzes, T., Rombouts, F., & van't Riet, K. (1993). A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods. *Journal of Industrial Microbiology*, 324–329.