

## **SIMULACIÓN DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE MOVILIDAD**

**Ledda I. Larcher, Sebastián Togo, Carlos A. Cattaneo**

*Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Av. Belgrano  
Sur 1912; G4200ABT, Santiago del Estero, Argentina, cacatta@unse.edu.ar  
<http://faa.unse.edu.ar>*

**Palabras clave:** microorganismo virtual, crecimiento de microorganismos, simulación, Monte Carlo.

**Resumen.** La microbiología es una ciencia que se ha desarrollado notablemente en los últimos tiempos dado que realiza aportes a la ecología, la agronomía, la tecnología de los alimentos, entre otras. Existen, sin embargo, ciertas complicaciones que dificultan las actividades experimentales, como la complejidad de reproducir en el laboratorio condiciones ideales de crecimiento, tales como agitación o el movimiento aleatorio de microorganismos. Actualmente, la tendencia al modelar el crecimiento microbiano está fuertemente influenciada por la potencia computacional, donde los principales aportes de la computación son la rapidez, la precisión, la capacidad de mantener y analizar grandes volúmenes de datos y la de establecer a priori las condiciones de la simulación.

Se ha desarrollado un simulador de crecimiento de microorganismos con el objetivo de, no sólo reducir costos y tiempos de laboratorio, sino de obtener resultados más precisos.

Con el propósito de complementar trabajos anteriormente presentados y para estudiar cómo influye la movilidad de microorganismos en el desarrollo de las colonias, se modificaron las rutinas existentes de manera de considerar si los microorganismos están inmóviles, si realizan un movimiento del tipo browniano hacia los sitios vecinos o si están sometidos a un agitado turbulento.

Los algoritmos utilizan el método de Monte Carlo, y se desarrollaron para microorganismos del tipo bacteria. Se tienen en cuenta el tiempo de adaptación de la colonia al medio de cultivo, y el tiempo necesario para iniciar la división de cada individuo.

Las curvas de crecimiento obtenidas para los tres tipos de movimiento considerado, presentan las tres fases características reportadas experimentalmente. Se observa que la colonia de microorganismos se desarrolla más rápidamente bajo condiciones de movimiento turbulento, mientras que bajo condiciones de movimiento browniano el desarrollo es intermedio. Todas las curvas presentan un buen ajuste de acuerdo al modelo de crecimiento Logístico.

## 1 INTRODUCCIÓN

El modelado de crecimiento bacteriano se ha usado para estimar parámetros (tasa específica de crecimiento y tiempo de lag) requeridos para estudiar su crecimiento bajo diferentes condiciones tanto físicas como químicas y así, ser capaces de formular medios microbiológicos apropiados o construir modelos predictivos para usar en microbiología (McMeekin *et al.*, 1993; Whiting y Buchanan, 1997). Este modelado puede aplicarse en varios niveles. Un modelo de nivel primario es una ecuación o función usada para describir la respuesta microbiana a lo largo del tiempo con un conjunto particular de parámetros (Whiting, 1995; McMeekin y Ross, 2002). La respuesta microbiana se representa, la mayoría de las veces, mediante el número de microorganismos (concentración de colonias que forman unidades) o la densidad óptica como una medida indirecta (McMeekin *et al.*, 1993). Los modelos matemáticos pueden ser de tipo empírico o mecanicista (France y Thornley, 1984; McMeekin y Ross, 2002). Suelen preferirse este último tipo de modelos, ya que se derivan de representar los procesos bioquímicos que controlan el crecimiento de microorganismos (López *et al.*, 2004). Sin embargo, si se desconocen las leyes que gobiernan el proceso, las funciones matemáticas deben usarse empíricamente y la adecuación del modelo se evalúa desde su capacidad de ajustar datos experimentales basándose en criterios estadísticos. Los modelos empíricos pueden evolucionar a uno más mecanicista en la medida que se disponga de más información concerniente al sistema (Baranyi y Roberts, 1995).

El creciente interés en generar modelos para poder predecir las consecuencias del crecimiento de microorganismos se fundamenta en los ahorros vinculados a las pruebas de laboratorio, tanto de dinero como de tiempo.

En este trabajo se presenta un modelo primario de crecimiento de bacterias mediante el que se pretende estudiar su comportamiento, en entornos que poseen densidades distintas, con lo que se presentan diferentes condiciones de movilidad.

## 2 MODELO COMPUTACIONAL

El sistema planteado consiste de elementos fundamentales que trabajan en conjunto para modelar un ecosistema artificial. Los más importantes son:

- Entorno artificial
- Recursos artificiales
- Microorganismos artificiales
- Interacción entorno/microorganismo

El sistema que se describe proporciona un entorno en el que organismos artificiales (virtuales) modelan ciertos aspectos de agentes microbiológicos del mundo real. Estos organismos virtuales pueden compararse a bacterias por diversas razones, entre ellas:

- No existe noción de organización celular interna.
- Poseen un pequeño conjunto de comportamientos simples (ingestión, movimiento, reproducción).
- La reproducción es asexual (por fisión binaria).

Existen recursos artificiales de los que los microorganismos se alimentan.

A lo largo de este trabajo, se considerará que cada microorganismo tiene tamaño fijo.

El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos sus individuos. Este crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular.

Las bacterias crecen siguiendo una progresión geométrica en la que el número de individuos se duplica al cabo de un tiempo determinado, denominado tiempo de generación ( $\tau$ ).

De esta forma, podemos calcular el número de bacterias ( $NB$ ) al cabo de un número de generaciones ( $n$ ) usando la ecuación 1:

$$NB = NB_0 2^n \quad (1)$$

siendo  $NB_0$  el número de células en el momento inicial. El número de generaciones se puede calcular de la siguiente forma (ecuación 2):

$$n = t / \tau \quad (2)$$

donde  $t$  es el tiempo transcurrido.

Otra forma de analizar el crecimiento bacteriano, es considerar el desarrollo a tasa de crecimiento constante, con lo que la ecuación de crecimiento queda: (ecuación 3)

$$NB = NB_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

Donde  $\mu$  es la tasa de crecimiento.

De las ecuaciones 2 y 3 se obtiene la relación entre la tasa de crecimiento y el tiempo de generación (ecuación 4).

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau} \quad (4)$$

Si la bacteria crece en un medio líquido, las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente en la mayoría de los casos formando una **suspensión** de células libres.

Cuando una célula aislada comienza a crecer sobre un sustrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una **colonia**.

## 2.1 Entorno artificial

El crecimiento de microorganismos se estudia en un plano, un sistema bidimensional, representado por la matriz CEL, cuadrada, de dimensiones  $M \times M$ , que representa el entorno artificial. La unidad fundamental de vida microbiana es un microorganismo y se representa en una posición de la matriz. El entorno planteado permite simular así, el crecimiento de microorganismos en un cultivo realizado en un volumen finito (cultivo *batch*).

## 2.2 Recursos artificiales

Los recursos disponibles para los microorganismos son importantes en el sistema pues permiten simular su supervivencia o inactivación.

Se representan mediante la matriz AL de dimensiones  $M \times M$ , y se encuentra directamente relacionada con la matriz CEL. El valor contenido en cada  $AL(x,y)$  indica la cantidad de sustrato disponible para la bacteria ubicada en CEL  $(x,y)$ .

## 2.3 Microorganismos artificiales

Cada microorganismo se desarrolla en una posición  $x,y$  a partir del inóculo inicialmente distribuido sobre la matriz CEL.

Existe por otra parte un tiempo asociado al ciclo celular, necesario para la replicación del material de la bacteria, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento para alcanzar un tamaño doble del inicial y su división por fisión binaria para dar lugar a dos células hijas (tiempo de duplicación).

La población de microorganismos tiene asociado un tiempo de adaptación al medio o tiempo de lag, que es el período durante el cual el metabolismo se adapta a las condiciones ambientales, antes de iniciar la fase de crecimiento exponencial.

## 2.4 Interacción entorno/microorganismo

Los microorganismos interactúan con el entorno y estas interacciones les permiten sobrevivir, realizar determinadas acciones y asegurar la reproducción.

Cada microorganismo ocupa un único lugar en el entorno, denotado mediante  $CEL(x,y)$ . El número total de microorganismos en CEL se entiende como tamaño de la población.

Cada microorganismo puede efectuar un número limitado de acciones: alimentación, reproducción y movimiento.

- Para poder alimentarse necesita información acerca del sustrato disponible, en  $AL(x,y)$
- Para su replicación necesita información referente a sustrato disponible así como a las posiciones vecinas.
- Para poder cambiar de lugar, según el tipo de movimiento a realizar, necesita información (a) en caso de tratarse de movimiento browniano, sobre las posiciones vecinas o (b) en caso de tratarse por movimiento provocado por el agitado del medio, necesita información sobre las restantes posiciones del entorno.

## 3 FUNCIONAMIENTO:

El presente algoritmo basa su funcionamiento en el método de Monte Carlo, que es un método estadístico que usa números aleatorios para elegir muestreos representativos de eventos de un conjunto extremadamente grande de posibles eventos. El método resulta apropiado en sistemas que tienen un gran número de grados de libertad, como es el caso de la simulación de crecimiento de microorganismos (Larcher y Cattaneo, 2006; Cattaneo *et al.*, 2007).

Antes de iniciar la ejecución del programa, se establecen los siguientes parámetros:

- Tamaño de las matrices (M)
- Inóculo
- Posición inicial del inóculo
- Sustrato para cada posición de la matriz

La finalidad de estos parámetros es hacerlos variar para ajustar las condiciones a cualquier microorganismo biológico.

La unidad de tiempo de simulación se define como un paso de Monte Carlo (MCS) por posición de la matriz, lo que corresponde a  $M \times M$  microensayos, donde  $M \times M$  indica el tamaño de la matriz (el entorno generado por el sistema)

La matriz  $CEL(M \times M)$  representa el espacio de desarrollo donde evolucionará el microorganismo.

La matriz  $AL(M \times M)$  contiene los valores que representan el sustrato disponible para cada bacteria.

El inóculo es distribuido en la matriz de desarrollo.

A cada posición se le asigna:

- un valor ( $T_a$ ) que corresponde al tiempo de adaptación al medio;

- un valor ( $T_d$ ) correspondiente al período luego del cual la célula inicia la duplicación.

La Figura 1 muestra un inóculo de un solo microorganismo en una matriz de desarrollo de tamaño 10x10.

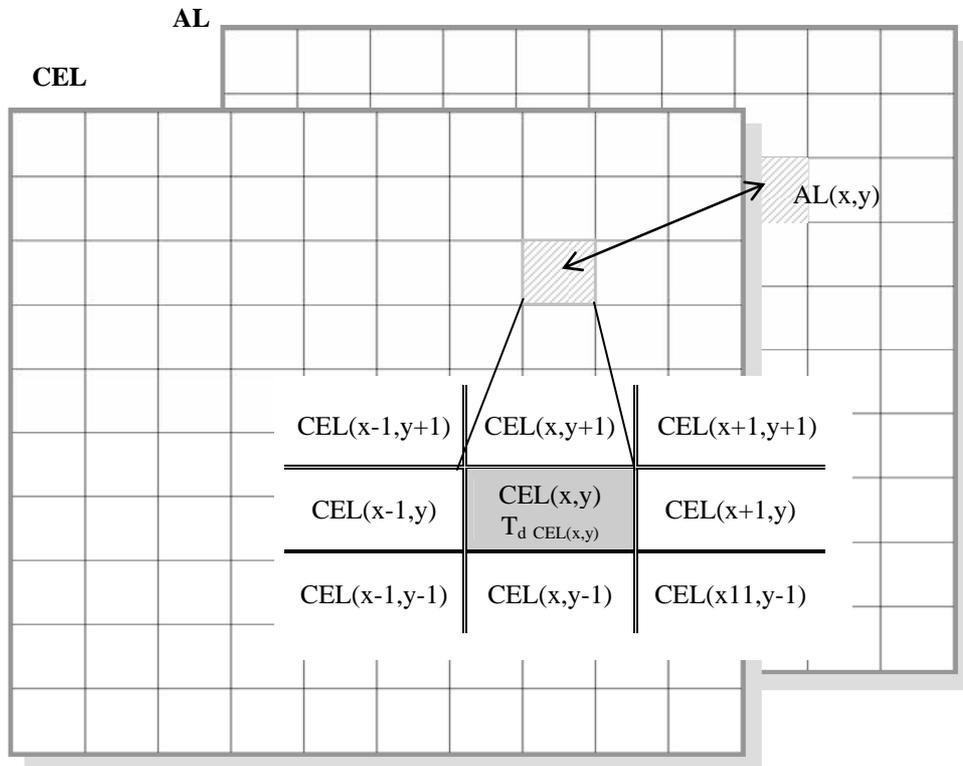


Figura 1. Entorno artificial generado. Pueden observarse el microorganismo virtual ubicado en  $CEL(x,y)$ ; su relación con la matriz de sustrato  $AL(x,y)$ ; el valor asignado como tiempo de adaptación.

Para realizar cada microensayo de Monte Carlo se selecciona una posición al azar en la matriz.

- Si la posición ya se encuentra ocupada por un microorganismo, se verifica la disponibilidad de recursos, en cuyo caso el microorganismo toma la cantidad necesaria de sustrato para sobrevivir y se actualiza la cantidad de sustrato disponible para esa posición de acuerdo a un parámetro. La reproducción depende del tiempo de duplicación (indicando si la célula está lista para dividirse), así como del sustrato disponible. El proceso imita la duplicación generando una posición aleatoria entre las celdas vecinas. Si el lugar está vacío, la célula madre muere y surgen dos nuevas, con período de viabilidad y tiempo de lag establecidos de acuerdo a las condiciones iniciales.  
Si no hay sustrato disponible para la primera posición seleccionada, el microorganismo se inactiva.
- Si la posición inicialmente seleccionada está vacía (no ocupada por ningún microorganismo) se genera una nueva posición al azar y se repite el ciclo.

La Figura 2 muestra las distintas condiciones y acciones consideradas en cada microensayo en un diagrama de bloques.

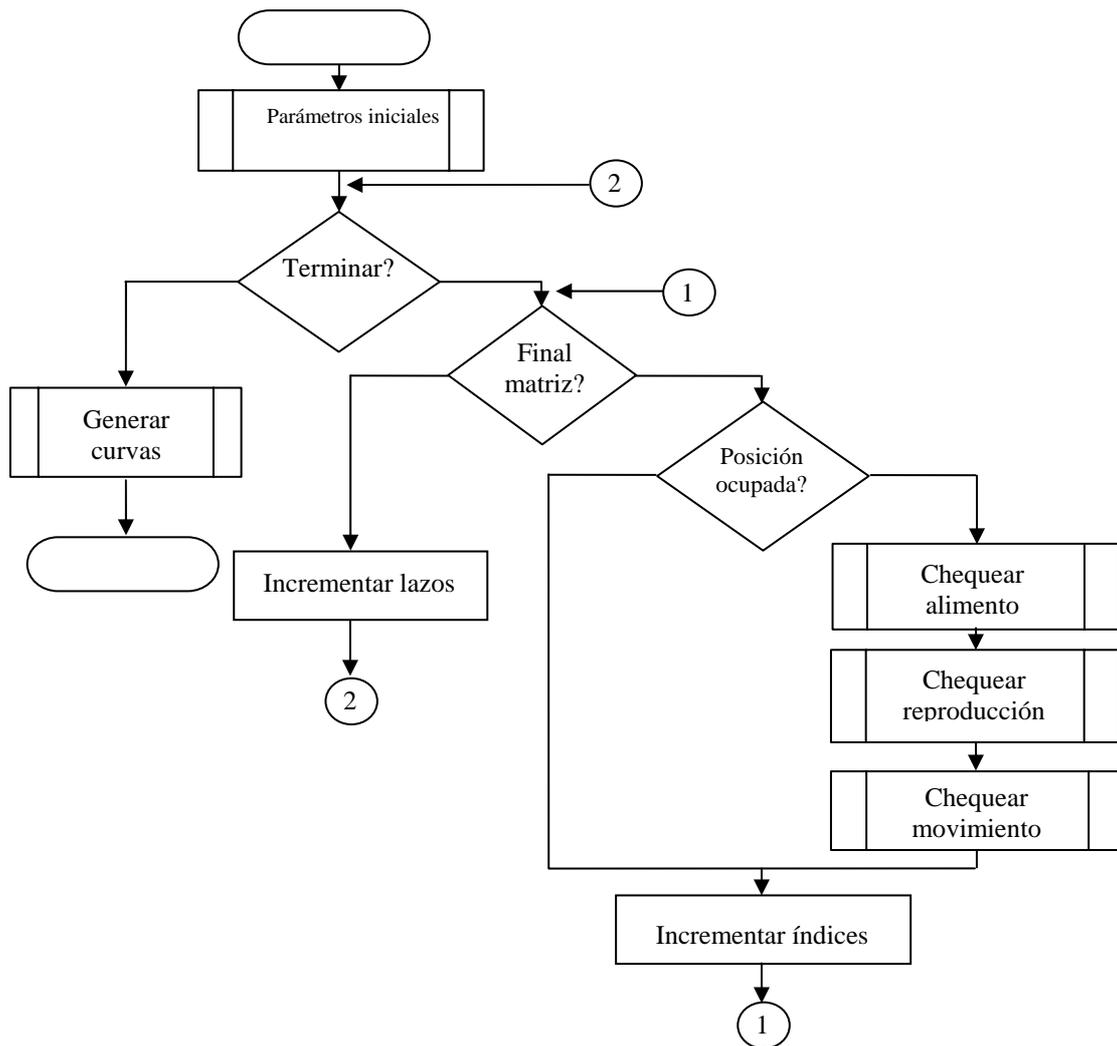


Figura 2. Diagrama de bloques del algoritmo desarrollado

El sistema considera que los microorganismos pueden permanecer inmóviles o moverse, dependiendo de la densidad del medio en que se encuentran.

Si las bacterias se desarrollan en un medio sólido, permanecerán inmóviles formando colonias. Si, en cambio, el medio es líquido, la bacteria formará una suspensión de células libres. Para los casos de medio líquido, se considera la posibilidad de movimiento que podrá ser aleatoriamente a cualquier celda adyacente vecina (movimiento browniano). [Figura 3](#)

Existe asimismo una rutina que simula agitado turbulento donde, luego de un determinado número de MCS, a cada microorganismo se le asigna una nueva posición y se redistribuye el sustrato (homogeneización). [Figura 4](#)

Los resultados obtenidos son la cantidad de microorganismos, sustrato disponible, tasa de crecimiento, curvas de crecimiento considerando que el microorganismo virtual permanece inmóvil, con movimiento browniano o con agitación, en función de los pasos de Monte Carlo.

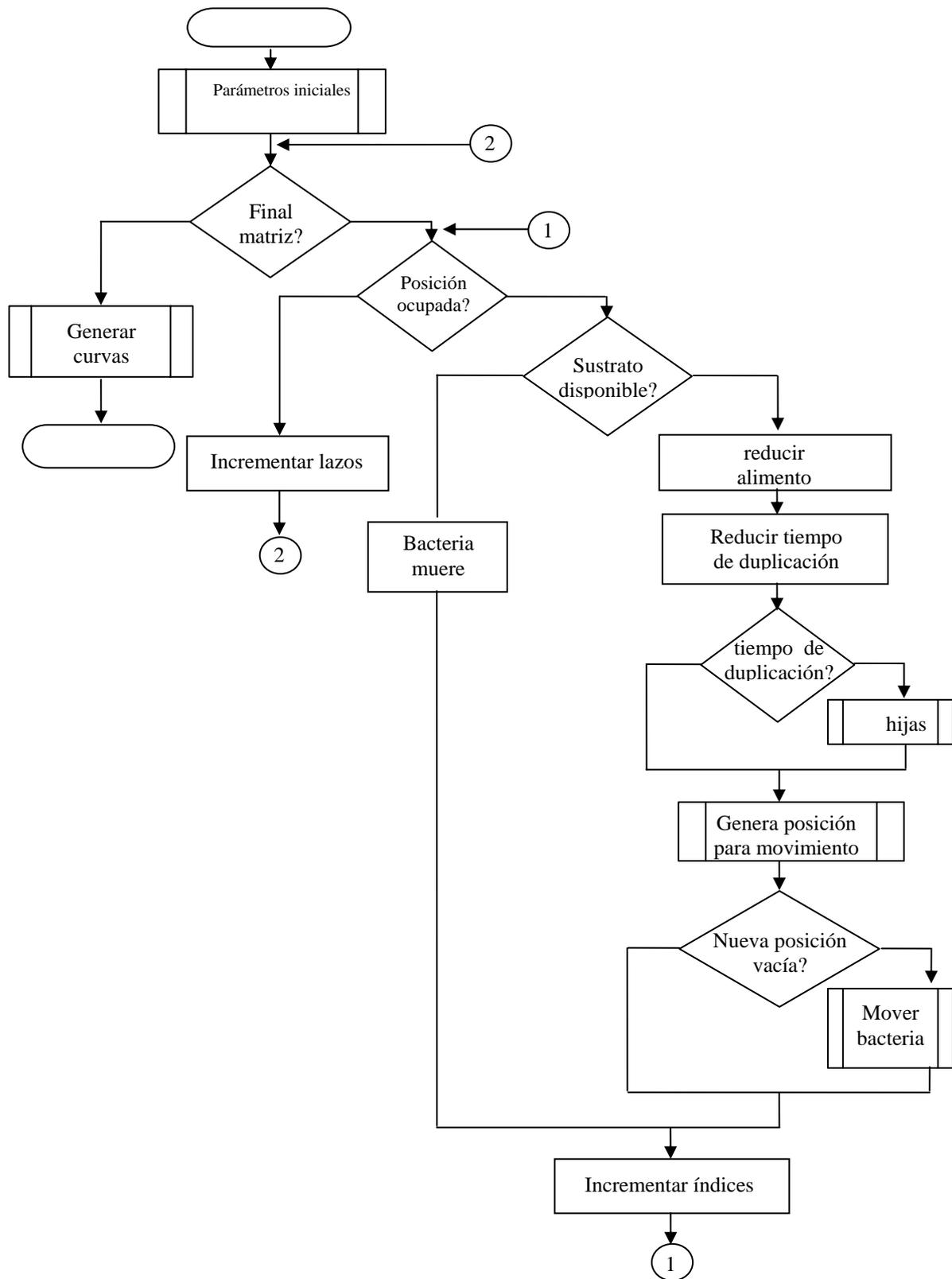


Figura 3 . Diagrama de bloques para el caso de movimiento browniano.

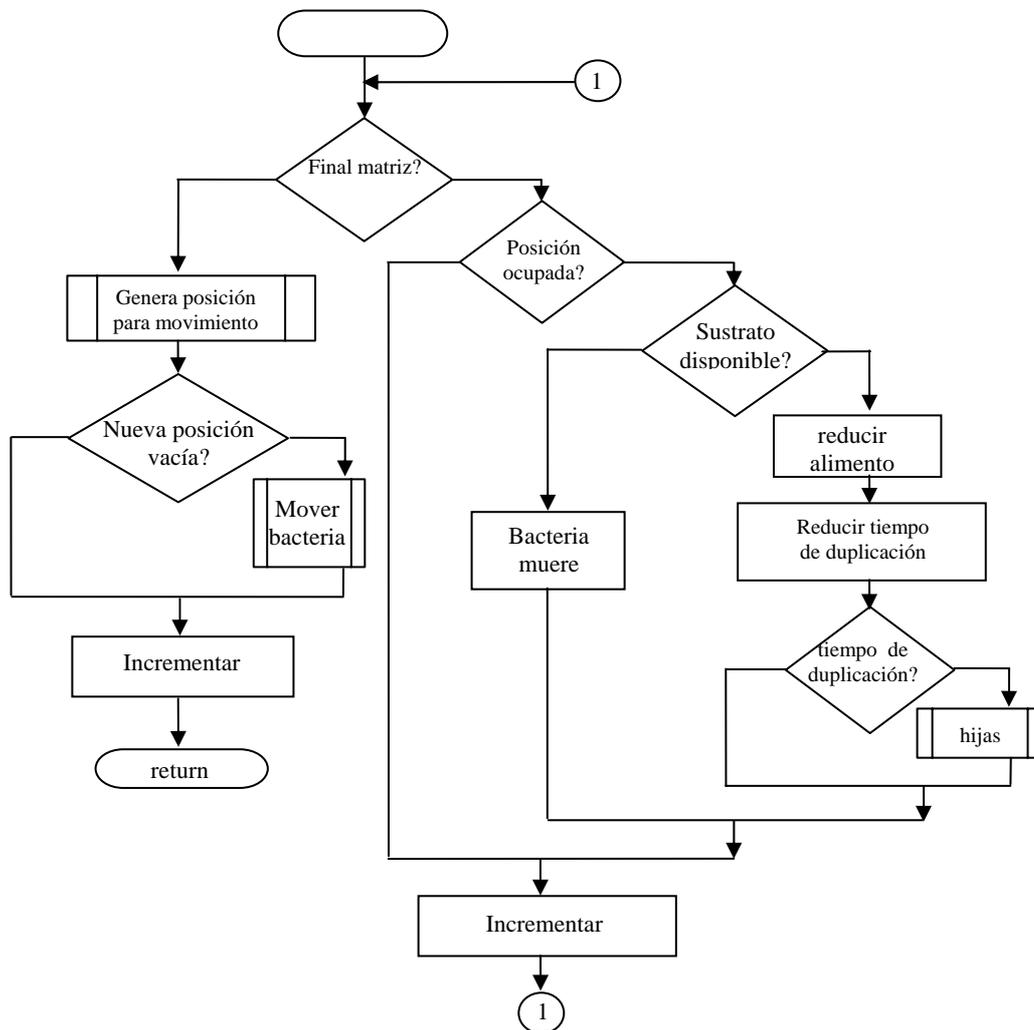


Figura 4 . Diagrama de bloques para el caso de movimiento por agitado turbulento.

#### 4 RESULTADOS

En la [Figura 5](#) se muestran las curvas para el crecimiento de bacterias (logaritmo natural del número de bacterias versus el tiempo de Monte Carlo) con crecimiento estático, con movimiento y con agitado, para las condiciones de tiempo de adaptación  $T_a = 60$ , y para el tiempo de duplicación de  $T_d = 6$

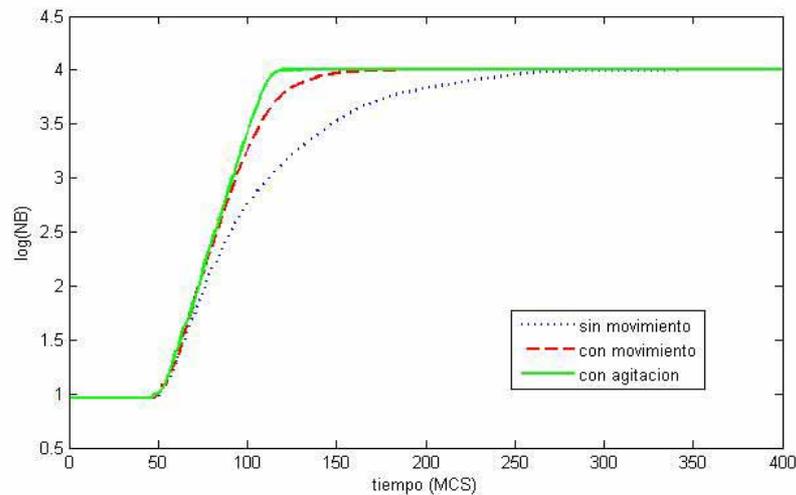


Figura 5. Comparación de curvas de crecimiento estático, con movimiento y con agitado, para tiempo de adaptación  $T_a = 60$  y tiempo de duplicación  $T_d = 6$

Puede observarse que todas las curvas exhiben fase de lag, fase de crecimiento exponencial y fase estacionaria. La curva obtenida para el caso de movimiento por agitado presenta un crecimiento a mayor velocidad, mientras que la curva obtenida para el caso de desarrollo de colonias (bacterias sin movimiento) revela el crecimiento más lento.

A continuación, se analiza el crecimiento de bacterias variando los tiempos de adaptación y los tiempos de duplicación para el caso de agitado.

En la Figura 6 se compara el crecimiento para distintos tiempos de adaptación manteniendo el tiempo de duplicación  $T_d = 6$ .

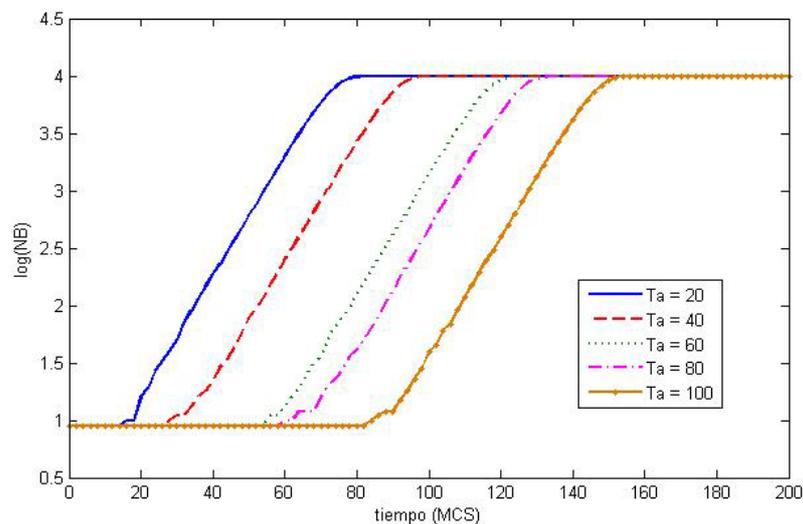


Figura 6. Crecimiento para distintos tiempos de adaptación ( $T_a$ ) manteniendo  $T_d = 6$

Se observa que a mayores tiempos de adaptación, mayores son los tiempos para el desarrollo de los microorganismos, también se distingue que todas las curvas tiene la misma pendiente de crecimiento.

En la Figura 7 se compara el crecimiento considerando distintos tiempo de duplicación, manteniendo el tiempo de adaptación  $T_a = 60$

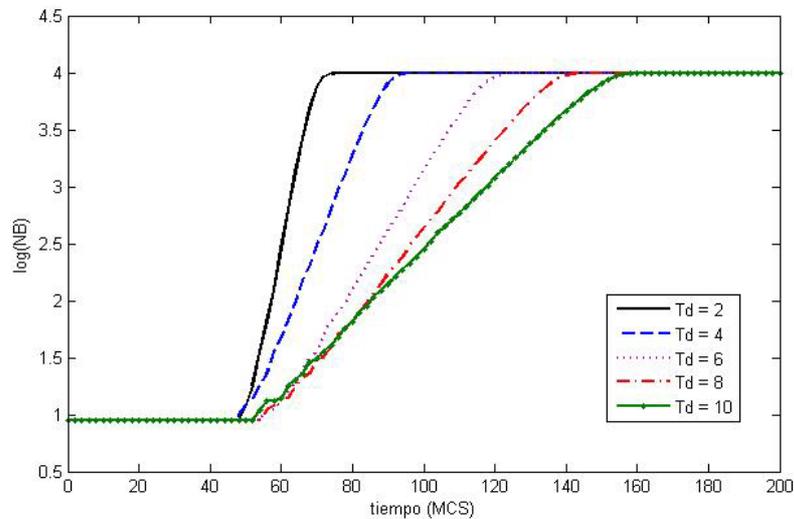


Figura 7. Curvas de crecimiento para distintos tiempo de duplicación ( $T_d$ ), manteniendo el tiempo de adaptación  $T_a = 60$

En ella se observa que, a medida que aumenta el tiempo de duplicación, disminuye la pendiente de la curva de crecimiento, también se advierte un incremento en el tiempo para el desarrollo de las bacterias. Todas las curvas presentan una fase de adaptación, seguida por la fase de crecimiento exponencial hasta alcanzar la fase de crecimiento estacionario. Se realizó un ajuste lineal de la fase exponencial para obtener la tasa de crecimiento ( $\mu$ ), los resultados obtenidos se muestran en la [tabla 1](#); en la misma tabla se muestra el producto de la tasa de crecimiento por el tiempo de duplicación, y el coeficiente de regresión de los ajustes ( $R^2$ ).

	$\mu$	$\mu * T_d$	$R^2$
$T_d = 2$	0,298	0,596	0,998
$T_d = 4$	0,150	0,600	0,998
$T_d = 6$	0,100	0,600	0,999
$T_d = 8$	0,077	0,616	0,999
$T_d = 10$	0,062	0,620	0,999

Tabla 1. Ajuste lineal de la fase exponencial para obtener la tasa de crecimiento ( $\mu$ ),

En la [Figura 8](#) se compara el crecimiento para distintos tiempo de duplicación, manteniendo el tiempo de adaptación  $T_a = 60$ , para el sistema con movimiento de tipo browniano.

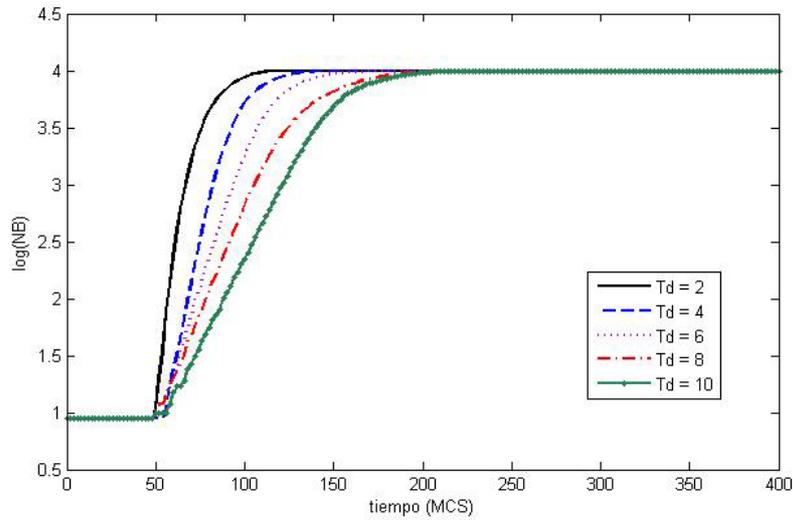


Figura 8. Comparación del crecimiento con movimiento de tipo browniano para distintos tiempo de duplicación, manteniendo el tiempo de adaptación  $T_a = 60$

Los resultados del ajuste lineal de la fase exponencial, para obtener la tasa de crecimiento se muestran en la [tabla 2](#)

	$\mu$	$\mu * T_d$	$R^2$
$T_d = 2$	0,224	0,448	0,99155
$T_d = 4$	0,147	0,588	0,99883
$T_d = 6$	0,098	0,588	0,99912
$T_d = 8$	0,074	0,592	0,99906
$T_d = 10$	0,061	0,610	0,99969

Tabla 2. Resultados del ajuste lineal de la fase exponencial para obtener la tasa de crecimiento

En la [Figura 9](#) se compara el crecimiento para distintos tiempos de duplicación, manteniendo el tiempo de adaptación  $T_a = 60$ , para el sistema sin movimiento.

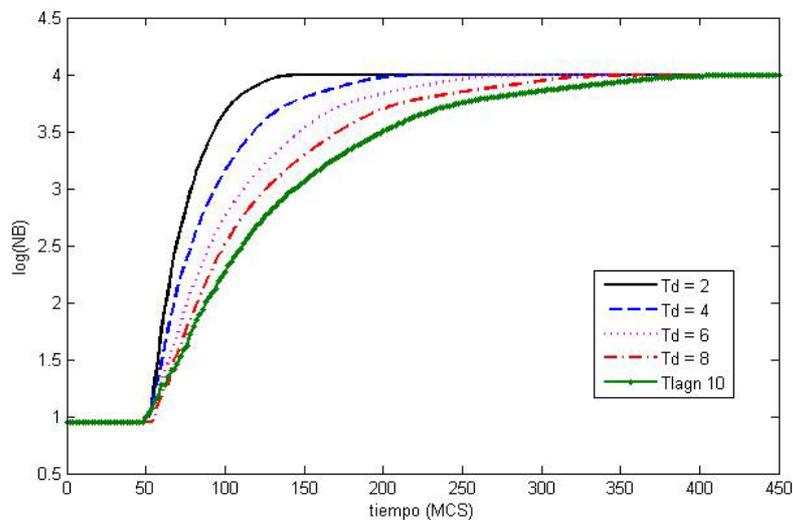


Figura 9. Comparación de crecimiento tomando distintos tiempos de duplicación, manteniendo el tiempo de adaptación  $T_a = 60$  para el sistema sin movimiento

Los resultados del ajuste lineal de la fase exponencial, para obtener la tasa de crecimiento se muestran en la [tabla 3](#).

	$\mu$	$\mu * T_d$	R
$T_d = 2$	0,174	0.346	0,99417
$T_d = 4$	0,121	0,484	0,99775
$T_d = 6$	0,081	0,486	0,99821
$T_d = 8$	0,072	0,576	0,99846
$T_d = 10$	0,052	0,515	0,99859

Tabla 3. Ajuste lineal de la fase exponencial para obtener la tasa de crecimiento

Si tenemos en cuenta la ecuación 4 que relaciona la tasa de crecimiento con el tiempo de generación,  $\mu\tau = \ln 2 = 0,69$ , y comparamos este valor teórico con los resultados presentados en las tablas 1, 2 y 3 para las diferentes condiciones de movilidad, se observa que tanto para los casos de agitado como de movimiento browniano, los valores obtenidos son próximos al teórico, no así para el caso de crecimiento sin movimiento.

También se estudió el ajuste de las curvas obtenidas por las simulaciones, aplicando diferentes modelos para curvas de crecimiento. Se utilizaron los modelos de Boltzmann y Logístico, ambos de cuatro parámetros de ajuste, correspondientes a las ecuaciones 5 y 6 y el modelo de Gompertz de tres parámetros (ecuación 7).

Modelo de Boltzmann:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (5)$$

Modelo Logístico:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2 \quad (6)$$

Modelo de Gompertz:

$$y = ae^{-\exp(-k(x-x_c))} \quad (7)$$

En la [Figura 10](#) y la [tabla 4](#), se presentan las curvas de ajuste y los parámetros de los mismos, para la curva de simulación del sistema con agitado t, con tiempo de adaptación de 60 y tiempo de duplicación  $T_d = 6$ . Se puede observar que los ajustes de Boltzmann y Logístico son muy buenos, ambos con coeficientes de regresión  $R^2$  mayores a 0,99 y coeficiente  $\text{Chi}^2$  menores a 0,005, mientras que el modelo de Gompertz produce un ajuste más pobre.

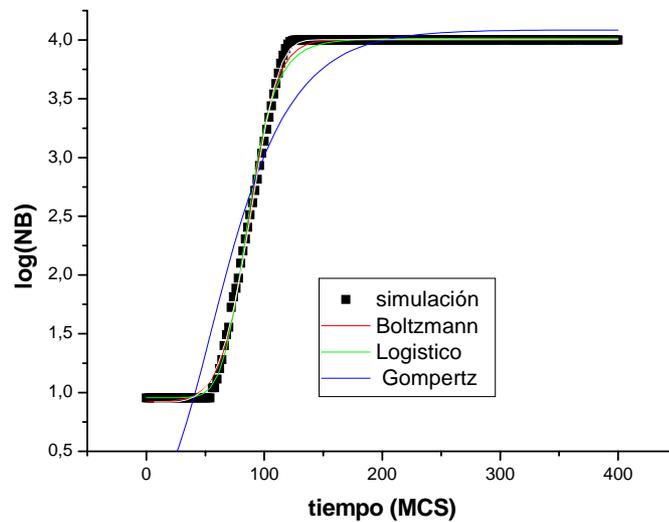


Figura 10. Curvas de ajuste para la curva de simulación del sistema con agitado  $t$ , tiempo de adaptación  $T_a = 60$  y tiempo de duplicación  $T_d = 6$ .

Modelo	Boltzmann	Logístico	Gompertz
$\text{Chi}^2$	0.0018	0.00266	0.08858
$R^2$	0.99871	0.99809	0.93627
Parámetros	$A_1 = 0.91726$ $A_2 = 4.00701$ $x_0 = 86.9622$ $dx = 11.72489$	$A_1 = 0.95535$ $A_2 = 4.01496$ $x_0 = 86.36217$ $p = 7.61066$	$a = 4.08639$ $x_c = 54.50844$ $k = 0.02613$

Tabla 4. Parámetros de ajuste para la curva de simulación del sistema con agitado  $t$ , tiempo de adaptación  $T_a = 60$  y tiempo de duplicación  $T_d = 6$ .

Los mismos ajustes se realizaron a todas las curvas obtenidas por simulación y, en todos los casos, los mejores ajustes corresponden a los modelos de Boltzmann y Logístico.

## 5 CONCLUSIONES

El modelo de simulación presentado estudia el crecimiento de bacterias en un entorno artificial conformado por matrices bidimensionales. Se considera que los microorganismos tienen tamaño fijo. El algoritmo usa el método de Monte Carlo para seleccionar muestras representativas de cada evento.

Las curvas de crecimiento obtenidas mediante simulación son similares a otras obtenidas de manera experimental así como a las obtenidas por otros modelos de simulación. (Amézquita *et al.*, 2005; Cayré *et al.*, 2005; Ginovart *et al.*, 2002; Grijspeerd *et al.*, 1999; Perni *et al.*, 2005).

El modelo de simulación presentado permite obtener curvas de crecimiento de bacterias donde pueden observarse las principales fases consideradas para estudio: (1) fase de adaptación o de lag (2) fase de crecimiento exponencial y (3) fase de crecimiento estacionario. (Buchanan *et al.*, 1997).

El algoritmo permite trabajar bajo diferentes condiciones: bacterias inmóviles, con movimiento browniano y con agitado turbulento. La Figura 5 muestra un crecimiento bacteriano más veloz bajo condiciones de agitado, con velocidad intermedia para el caso de movimiento browniano y de menor velocidad en caso de bacterias inmóviles, indicando que el movimiento favorece las condiciones de desarrollo.

Valores diferentes para el parámetro  $T_a$ , que representa el tiempo necesario para que la bacteria se adapte al medio, resultan en variaciones en la fase de crecimiento estacionario.

Por otra parte, los valores del parámetro  $T_a$ , que representa el período de tiempo que debe transcurrir antes que se pueda iniciar la duplicación, influyen sobre la fase de crecimiento exponencial. Además, según los resultados presentados en las tablas 1 y 2, los tiempos de duplicación se aproximan a los tiempos de generación propuestos por los modelos teóricos, se considera que la diferencia se puede deber a que las simulaciones se realizan en un sistema bidimensional.

Los modelos de crecimiento Logístico y de Boltzmann presentan un buen ajuste para las curvas obtenidas mediante simulación.

## REFERENCIAS

- Amézquita, A., Weller, C. L., Wang, L., Thippareddi, H., Burson, D. E., Development of an integrated model for heat transfers and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. *International Journal of Food Microbiology*, 101:123-144, 2005.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 26:199-218, 1995.
- Buchanan, R. L., Whiting, R. C., Damert, W. C. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology* 14:313-326, 1997.
- Cattaneo, C., Larcher, L., Togo, S. y Chaillou, L. Aplicación de método de Monte Carlo para el estudio de crecimiento de bacterias y levaduras. *Mecánica Computacional* XXVI:3380-3393, 2007.
- Cayré, M. E., Vignolo, G., Garro, O. A., Crecimiento e inhibición de *Brochothrix thermophacta* en productos cárnicos. *Comunicación Científica y Tecnológica*. Universidad Nacional del Nordeste, Resumen E054, 2005.
- France, J., Thornley, J.H.M. *Mathematical models in agriculture*. Butterworths, London, 1984.
- Ginovart, M., López, D., Valls, J., Silbert, M. Simulation modelling of bacterial growth in yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, 73:415-425, 2002.
- Grijpspeerd, K., Vanrolleghem, P. Estimating the parameters of the Baranyi model for bacterial growth. *Food Microbiology*, 16:593-605, 1999.
- Larcher, L. y Cattaneo, C. Simulación de crecimiento de microorganismos utilizando el método de Monte Carlo. *Mecánica Computacional*, XXV:2505-2518, 2006.
- S. López, M. Prieto, J. Dijkstra, M.S. Dhanoa, J. France. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology*, 96:289-300, 2004.
- T. McMeekin, J. Olley, T. Ross, D. Ratkowsky. *Predictive Microbiology: Theory and application*. John Wiley & Sons, Chichester, UK. 1993.
- McMeekin, T.A., Ross, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 78:133-153, 2002.

- Perni, S., Andrew, P. W., Shama, G. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. *Food Microbiology*, 22:491-495, 2005.
- Whiting, R. C. Microbial modeling in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35:467-494, 1995.
- Whiting, R.C., Buchanan, R.L.B., Predictive modelling. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, pp. 728– 739. 1997.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo percibe subsidio de la SECYT-UNSE, Argentina.