

Sobrevivencia de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* enterohemorrágica bajo diferentes condiciones de bioconservación y almacenamiento

Caren Brenes Sánchez¹ , Mauricio Redondo-Solano² , Natalia Barboza³ , Rodolfo WingChing-Jones^{1,4} .

Resumen: Introducción: Las dietas frescas para mascotas son populares por su contenido nutricional y menor uso de aditivos. Sin embargo, se debe prestar atención a la inocuidad de estos alimentos, las bacterias ácido lácticas (BAL) podrían ser una opción para mejorar su conservación y reducir el uso de preservantes sintéticos. **Objetivo:** Evaluar la sobrevivencia y el crecimiento de *Salmonella* spp. y *E. coli* enterohemorrágica en carne de res, analizando el efecto de un bioconservante y el almacenamiento a bajas temperaturas. **Materiales y métodos:** Se trabajó con muestras de carne molida (10 g cada una). A todas las muestras se les realizó un análisis proximal con el fin de determinar sus características fisicoquímicas. Asimismo, se efectuó el recuento de coliformes totales, coliformes fecales y bacterias ácido lácticas (BAL). Se evaluó la sobrevivencia de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* enterohemorrágica en carne molida almacenada a -18 °C durante cuatro semanas. Además, se determinó la sobrevivencia de ambos patógenos a 4 °C y 10 °C durante siete días en presencia de *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* I-C1 y *L. paracasei* subsp. *tolerans* II-C2-C, evaluados como bioconservante. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. **Resultados:** Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos de las muestras de carne molida evidenciaron características adecuadas para la evaluación de la sobrevivencia bacteriana. Se encontró que ambos patógenos sobreviven a -18 °C durante cuatro semanas en las muestras inoculadas de carne molida. Cuando se evaluaron en presencia de los bioconservante a 4 °C hay una reducción de *Salmonella* spp. tanto en el control, como en los tratamientos, lo que sugiere que tanto la temperatura (4°C) como las BAL favorecen la reducción del patógeno, el mismo patrón se observó con *E. coli* enterohemorrágica. Sin embargo, a 10 °C los resultados muestran un crecimiento de ambos patógenos de aproximadamente 3 log UFC/g para todos los tratamientos. **Conclusiones:** La aplicación de antimicrobiano podrían contribuir a mejorar la calidad e inocuidad en alimentos frescos para mascotas. Se señala la importancia de mantener la cadena de frío y realizar una adecuada descongelación del producto. **Arch Latinoam Nutr 2026; 76(3): 215-226.**

Palabras clave: Inocuidad, materia prima, bacterias, dietas frescas, mascotas.

Abstract: Survival of *Salmonella* spp. and enterohemorrhagic *Escherichia coli* under different biopreservation and storage conditions. Introduction: Fresh pet food diets are popular due to their nutritional content and reduced use of additives. However, special attention must be given to the safety of these foods, and lactic acid bacteria (LAB) may represent an alternative to improve preservation and reduce the use of synthetic preservatives. **Objective:** To evaluate the survival and growth of *Salmonella* spp. and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in beef, assessing the effect of a biopreservative and low-temperature storage. **Materials and Methods:** Ground beef samples (10 g each) were analyzed. Proximate analysis was performed on all samples in order to determine their physicochemical characteristics. In addition, total coliforms, fecal coliforms, and lactic acid bacteria (LAB) counts were determined. The survival of *Salmonella* spp. and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in ground beef stored at -18 °C for four weeks was evaluated. Furthermore, the survival of both pathogens at 4 °C and 10 °C for seven days was determined in the presence of *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* I-C1 and *L. paracasei* subsp. *tolerans* II-C2-C, evaluated as biopreservatives. All assays were performed in triplicate. **Results:** Physicochemical and microbiological analyses of the ground beef samples showed suitable characteristics for the evaluation of bacterial survival. Both pathogens survived at -18 °C for four weeks in inoculated ground beef samples. When evaluated in the presence of the biopreservatives at 4 °C, a reduction in *Salmonella* spp. was observed in both the control and treatment groups, suggesting that both low temperature (4 °C) and LAB contributed to pathogen reduction. A similar pattern was observed for enterohemorrhagic *E. coli*. However, at 10 °C, the results showed growth of both pathogens of approximately 3 log CFU/g in all treatments. **Conclusions:** The application of antimicrobials may contribute to improving the quality and safety of fresh pet foods. The importance of maintaining the cold chain and performing proper thawing of the product is emphasized. **Arch Latinoam Nutr 2026; 76(3): 215-226.**

Keywords: Safety, raw material, bacteria, fresh diets, pets.

Introducción

En la actualidad el alimento balanceado sigue siendo la opción más común para la alimentación de mascotas; estos productos se diseñan según la especie, la etapa fisiológica y las necesidades nutricionales de cada animal (1). No obstante, cada vez más personas exploran alternativas de alimentación, las dietas frescas son una

¹Escuela de Zootecnia, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

² Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. ³ Escuela de Tecnología de Alimentos, Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

⁴ Centro de Investigación en Nutrición Animal, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Autor para la correspondencia: Rodolfo WingChing-Jones, e-mail: rodolfo.wingching@ucr.ac.cr



propuesta de alimentación no procesada que busca maximizar el valor nutricional de los ingredientes y reducir el uso de aditivos sintéticos (2).

Las dietas frescas han ganado popularidad entre quienes buscan una opción más natural para alimentar a sus perros y gatos, debido a que se elaboran con carne cruda, huesos y órganos de animales cosechados para consumo humano, como los bovinos o pollo (3), y buscan conservar el valor biológico de los nutrientes al evitar procesos industriales que impliquen conservantes o altas temperaturas (2). Dentro de estas opciones se incluyen la dieta BARF (*Biologically Appropriate Raw Food*), compuesta por un 60–80 % de alimentos crudos de origen animal complementados con frutas y vegetales, y la dieta ancestral, que también prioriza ingredientes animales y minimiza el contenido de carbohidratos y vegetales (1, 4).

Sin embargo, uno de los desafíos de las dietas frescas es su inocuidad microbiológica (5). Diversos estudios han demostrado que las fuentes proteicas utilizadas en dietas frescas pueden presentar niveles elevados de contaminación bacteriana. Alternativas como el pollo, la carne de res o el pavo representan un riesgo significativo si no se manipulan correctamente (6). Entre los microorganismos que suelen encontrarse en estas proteínas están los coliformes termotolerantes y bacterias patógenas como *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Salmonella*, y el protozoario *Toxoplasma gondii*, ampliamente reconocidos por su relevancia en la industria alimentaria (7-9).

Se ha encontrado la presencia de *Salmonella* spp. y EHEC en dietas crudas para mascotas y en productos cárnicos bovinos (9-11). Sin embargo, hay vacíos respecto a la sobrevivencia de ambos patógenos en carne molida bovina bajo condiciones de almacenamiento propias de este tipo de alimento. La mayoría de los trabajos disponibles se han centrado en la prevalencia microbiológica o en estrategias generales de conservación (12-14), sin evaluar de manera específica las diferencias en tolerancia y

persistencia entre *Salmonella* spp. y EHEC en matrices cárnicas crudas destinadas al consumo animal.

La carne de res, en particular, es un ingrediente común en estas formulaciones. Se trata de un alimento perecedero que, debido a su composición y a las condiciones de almacenamiento, puede favorecer el crecimiento de microorganismos si no se maneja adecuadamente (4, 15). Su alto contenido de humedad y nutrientes, un valor de actividad de agua (*aw*) cercano a 0,98 y un pH *post mortem* entre 5,5 y 5,8 crean un entorno ideal para la proliferación microbiana (15). Aunque la refrigeración y la congelación son métodos utilizados para extender la vida útil de la carne cruda, estos no siempre logran eliminar la presencia de patógenos (16, 17). El uso de altas temperaturas no es una opción pues la idea es que el producto se mantenga en su estado fresco.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido propuestas como una alternativa debido a su capacidad para producir metabolitos antimicrobianos, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, que pueden inhibir patógenos transmitidos por alimentos (18-20). Diversos estudios han demostrado actividad antagonista de BAL frente a *Escherichia coli* y otros microorganismos de importancia alimentaria (21, 22). Además, algunas especies del género *Lactobacillus* han mostrado potencial para el biocontrol de patógenos en matrices alimentarias mediante producción de péptidos antimicrobianos y acidificación del medio (23). No obstante, la mayoría de las investigaciones disponibles se han enfocado en alimentos fermentados o modelos microbiológicos generales, mientras que existe información limitada sobre la sobrevivencia de *Salmonella* spp. y EHEC en carne molida bovina destinada a dietas crudas para mascotas, así como sobre la eficacia de BAL específicas en este tipo de matrices.

El interés en las BAL radica en su capacidad para competir con la microbiota indeseable y controlar la proliferación de patógenos mediante la producción de compuestos antimicrobianos, sin afectar de manera negativa las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de la carne (24). El uso de las BAL como bioconservantes es relevante dado que las dietas frescas suelen contener carne cruda (como la de res) que, por su alta humedad y valor de actividad de agua, crea condiciones ideales para el crecimiento microbiano si no se maneja adecuadamente (15). Dado lo anterior, la incorporación de BAL puede ser una manera para

mejorar la inocuidad de dietas frescas para animales, extendiendo además su vida útil y reduciendo la necesidad de conservantes sintéticos (25;26).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la sobrevivencia y el crecimiento de *Salmonella* spp. y *E. coli* enterohemorrágica en carne de res destinada a la alimentación de mascotas, analizando el efecto de un bioconservante y el almacenamiento a bajas temperaturas. Esta investigación busca aportar información clave sobre la seguridad microbiológica de las dietas frescas para mascotas y el uso potencial de bioconservante como estrategia de conservación natural.

Materiales y métodos

Obtención de muestras

Se trabajó con muestras de carne molida de origen bovino (5 % de grasa). Se adquirieron un total de nueve lotes en distintos días, entre febrero y julio del año 2024, que fueron adquiridos en un supermercado local, cercano al Campus Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica (9°56'14.33"N 84°02'56.74"). En todos los casos se procuró que cada lote muestreado hubiera sido procesado y empacado el día de la compra. Cada lote se trasladó al laboratorio en hielera para conservar la cadena de frío.

Análisis fisicoquímico

Se realizó la caracterización fisicoquímica de cada lote de carne molida. Se determinó el contenido de proteína, grasa cruda, humedad y ceniza siguiendo los protocolos previamente descritos (27-30).

Análisis microbiológico de las muestras de carne molida

Se realizó el recuento de coliformes totales y termotolerantes de acuerdo con lo descrito por Arias-Echandi et al. (31). Se pesaron 10 g de carne molida, a la cual se le agregó 90 mL de agua peptonada (APE) al 0,1 % y se colocó en el homogenizador por 30 s. A partir del homogenizado se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^5 en tubos con 9 mL de APE al 0,1 % y se agregó 1 mL de cada dilución a placas con agar bilis rojo violeta (ABRV) (Oxoid™, Basingstoke, UK) por vaciado y cuadruplicado. Las diluciones elegidas para los recuentos toman en cuenta las poblaciones esperadas para muestras frescas de carne molida. Seguidamente se aplicó una sobrecapa de 3 mL de ABRV y se procedió

a la incubación. Las placas fueron incubadas a 35°C durante 48 h para la determinación de coliformes totales y para el recuento de coliformes termotolerantes se mantuvieron a 44°C por 24 h. Se contaron las placas que tuvieran entre 25 y 250 colonias y los resultados se reportaron como log UFC/g (Límite de detección = 10 UFC/g).

Recuento de bacterias lácticas

Se pesaron 10 g de carne molida y se le agregó 90 mL de APE 0,1 %. La mezcla fue homogeneizada (30 segundos) y se prepararon diluciones decimales en APE hasta 10^5 . De cada dilución se sembraron 100 µL en placas de agar De Man Rogosa y Sharpe (MRS) (Oxoid™, Basingstoke) por duplicado. Finalmente, se incubaron las placas a 25°C durante 2 días en atmósfera de capnofilia (31). Se contaron las placas que tuvieran entre 25 y 250 colonias y los resultados se reportaron como log UFC/g (Límite de detección = 100 UFC/g).

Determinación de la sobrevivencia de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* enterohemorrágica a -18 °C durante cuatro semanas

Preparación del inóculo de *Salmonella* spp. Para la inoculación de *Salmonella* spp. se preparó un cóctel bacteriano que consistió en una mezcla de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 93, *S. enterica* 750, *S. enterica* 80, *Salmonella* spp. DA36 y *S. Typhimurium* 612. Estos aislamientos son parte de la colección del Laboratorio de Investigación y Entrenamiento en Microbiología de Alimentos (LIMA) del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

Cada aislamiento fue sembrado por estría en agar sangre e incubado a 35°C durante 48 h. A partir de una colonia de cada cepa, se realizó una inoculación en tubos con 9 mL de caldo Trypticase de Soya (CTS, Merck, Darmstadt). La incubación se llevó a cabo a 35°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se tomaron 3 mL de cada cultivo y se colocaron en un tubo estéril. Los tubos fueron centrifugados durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 15 mL de APE. El proceso de centrifugado y eliminación del líquido se repitió, añadiendo

nuevamente 15 mL de APE, lo que permitió obtener el cóctel final. Los cultivos en fase estacionaria se mezclaron en proporciones iguales. A partir del cóctel inicial de *Salmonella* spp. se realizaron diluciones decimales para obtener una población de 7,0 log UFC/mL. Finalmente, se inocularon 100 µL en 10 g de carne molida, con el objetivo de alcanzar una población inicial del patógeno de 4,0-5,0 log UFC/mL. Se prepararon un total de cinco muestras las cuales se colocaron en bolsas plásticas transparentes y estériles, que luego fueron selladas en atmósfera aerobia. Cada una fue inoculada con el cóctel previamente descrito y la suspensión se distribuyó manualmente de manera uniforme dentro de la bolsa, posteriormente fueron almacenadas a -18 °C (31). El recuento microbiológico de cada muestra se realizó al inicio de la inoculación y en los días 7, 14, 21 y 28. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, considerando cada réplica como una repetición biológica independiente.

Determinación de la carga bacteriana de Salmonella spp. en carne molida. A cada muestra de carne molida inoculada se le agregaron 90 mL de APE y posteriormente se homogenizaron (30 segundos). Se tomó un 1 mL y se prepararon diluciones seriadas (6 diluciones con base en la población inoculada) en tubos de ensayo que contenían 9 mL de APE y se sembraron, por duplicado 100 µL de cada dilución en placas de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD, Oxoid™, Basingstoke). Las placas se incubaron a 35°C por 24 h (32). Las muestras fueron cuantificadas durante cuatro semanas, para ello se descongeló la muestra a temperatura de refrigeración durante 18 h previo al análisis (31).

Preparación del inóculo de E. coli enterohemorrágica. Se utilizó el aislamiento de *Escherichia coli* enterohemorrágica ATCC 35150, que pertenece a la bacterioteca de la Facultad de Microbiología de la UCR. La preparación del inóculo se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito para *Salmonella* spp.; sin embargo, en este caso se utilizó agar MacConkey sorbitol (Oxoid™, Basingstoke)

como medio de cultivo selectivo. El cultivo de EHEC en fase estacionaria alcanzó una concentración de 9,0 log UFC/mL y el mismo se diluyó hasta una concentración de 7,0 log UFC/mL. Posteriormente, se inocularon 100 µL de la suspensión bacteriana en 10 g de carne molida, con el objetivo de obtener una población inicial del patógeno de 5,0 log UFC/mL. Se prepararon cinco muestras de carne molida de 10 g cada una, las cuales se colocaron en bolsas plásticas transparentes y estériles, posteriormente selladas con atmósfera aerobia. Cada muestra fue inoculada con la suspensión bacteriana que fue distribuida manualmente de manera uniforme dentro de la bolsa. Luego, las muestras se almacenaron a -18 °C (31). El recuento microbiológico se realizó al inicio de la inoculación y posteriormente en los días 7, 14, 21 y 28. Todos los ensayos se efectuaron por triplicado, considerando cada réplica como una repetición biológica independiente.

Determinación de la carga bacteriana de E. coli enterohemorrágica en carne molida. Se siguió el protocolo descrito para el caso de *Salmonella* spp. con la diferencia de que las diluciones se sembraron en placas de agar MacConkey Sorbitol (Macs, Oxoid™, Basingstoke).

Determinación de la sobrevivencia de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* enterohemorrágica a 4°C en presencia de un bioconservante durante cuatro días.

Preparación del bioconservante. Se trabajó con los aislamientos *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* I-C1 y *L. paracasei* subsp. *tolerans* II-C2-C, aislados de residuos agroindustriales y disponibles en la bacterioteca del Centro Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA, UCR). Ambos aislamientos fueron previamente evaluados por sus propiedades probióticas y efecto antagónico contra patógenos alimentarios (20); de la misma manera se había demostrado que los aislamientos seleccionados eran los que mostraban mejor perfil de sobrevivencia y replicación bajo condiciones de refrigeración (datos sin publicar). Las muestras fueron sembradas por estría en agar MRS (Oxoid™, Basingstoke). Seguido, las placas se incubaron a 35°C durante 48 h en condiciones de capnofilia. Se seleccionó una colonia de cada aislamiento y se colocó en tubos con 9 mL de caldo MRS, los cuales se incubaron a 35°C durante 48 h. Se añadieron 100 µL de cada suspensión obtenida, con el fin de obtener una concentración final de 10⁶ UFC/mL, en cada muestra de carne molida según corresponda se cuantificó la presencia de ambas bacterias patógenas según lo descrito previamente.

Preparación de los tratamientos evaluados a 4°C. Las bacterias patógenas fueron preparadas según lo descrito previamente. Para cada tratamiento, se utilizaron muestras de 10 g de carne molida, las cuales se colocaron en bolsas plásticas estériles, transparentes y herméticamente cerradas (atmósfera aerobia), y posteriormente se almacenaron a 4 °C. El primer tratamiento consistió en la inoculación de las muestras con 7,0 log UFC/mL del cóctel de *Salmonella* spp. El segundo tratamiento consistió en la inoculación conjunta de 7,0 log UFC/mL de *Salmonella* spp. y 10⁶ UFC/mL de *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* I-C1 y *L. paracasei* subsp. *tolerans* II-C2-C. El tercer tratamiento consistió en la inoculación con 5,0 log UFC/mL de *E. coli* enterohemorrágica ATCC 35150. Mientras que el cuarto tratamiento se realizó utilizando *E. coli* a una concentración de 5,0 log UFC/mL del patógeno y las BAL en las concentraciones previamente descritas. Los recuentos microbiológicos de todos los tratamientos se analizaron el día 1, 2, 3 y 4 siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Cada tratamiento se evaluó por triplicado, considerando tres repeticiones biológicas independientes para cada una de las muestras.

Medición de crecimiento de Salmonella spp. y Escherichia coli enterohemorrágica en presencia de un bioconservante a 10°C durante cuatro días.

Las bacterias se prepararon según el protocolo previamente descrito y se inocularon en porciones de 10 g de carne molida, las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas estériles, transparentes, herméticamente selladas (atmósfera aerobia) y almacenadas a 10 °C. Se evaluaron los mismos cuatro tratamientos previamente descritos. Los recuentos microbiológicos se realizaron los días 1, 2, 3 y 4 siguiendo el procedimiento establecido.

Diseño experimental

Se realizaron tres réplicas (lotes) para todos los experimentos. Para cada temperatura (-18°C, 4°C y 10°C) se empleó un modelo factorial completo con efectos fijos: presencia del bioconservante (BAL o no BAL), tiempo de almacenamiento e interacciones tiempo x presencia del bioconservante, utilizando un análisis de varianza (ANOVA) sobre los datos microbiológicos (log UFC/g de *Salmonella* spp. o EHEC). Los términos aleatorios incluyeron el día de procesamiento (lote). La significancia se determinó al nivel de 0,05. Se utilizó el programa estadístico InfoStat y cuando los efectos fueron significativos se aplicó la prueba LSD de Fisher para separar los tratamientos.

Resultados

Perfil microbiológico y físicoquímico de la carne molida

La carne molida utilizada en este estudio presentó un contenido proteico del 21,3 %, con niveles moderados de grasa (4,6 %) y humedad (73,1 %); estas características hacen de esta matriz un sustrato adecuado para el desarrollo microbiano si no se almacena de manera correcta. En cuanto al recuento microbiológico inicial, se encontraron valores considerables de coliformes totales (5,1 log UFC/g), coliformes termotolerantes (4,5 log UFC/g) y bacterias ácidolácticas (4,8 log UFC/g) (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis físicoquímico y recuento de indicadores microbiológicos en las muestras de carne molida utilizada para la determinación de sobrevivencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* enterohemorrágica en presencia de un bioconservante a distintas temperaturas de almacenamiento

Porcentaje (%) *				Valores (log UFC/g) *		
Proteína	Grasa	Humedad	Cenizas	Coliformes termotolerantes	Coliformes totales	BAL
21,3 ± 0,8	4,6 ± 1,4	73,1 ± 0,9	1,1 ± 0,1	4,5 ± 0,4	5,1 ± 0,4	4,8 ± 0,7

*Valor promedio de 9 muestras

Sobrevivencia de *Salmonella* y *E. coli* durante almacenamiento en congelación

Durante las cuatro semanas de almacenamiento a temperatura de congelación se registraron variaciones en los recuentos microbiológicos. Los resultados para *Salmonella* spp. mostraron algunos cambios, que se deben posiblemente a variación analítica, a la recuperación diferencial de células subletalmente lesionadas, o a efectos metodológicos asociados a la descongelación y al proceso de siembra en medio de cultivo. Aunque se observaron tanto incrementos como disminuciones en los recuentos, hay una ligera tendencia a la reducción de los recuentos durante el período de almacenamiento. En el caso de *E. coli* enterohemorrágica, la carga microbiana se mantuvo más estable, aunque con una tendencia descendente moderada (Tabla 2). Los análisis estadísticos (ANOVA) confirmaron que tanto el tipo de patógeno como el tiempo de almacenamiento influyeron significativamente en su sobrevivencia. Es decir, incluso en congelación, estos microorganismos no solo persisten, sino que pueden mostrar variabilidad en su comportamiento, lo que resalta la importancia de estrategias de control adicionales como los bioconservantes.

Efecto de la temperatura y bioconservante sobre la supervivencia de *Salmonella* spp..

Los recuentos realizados para las muestras almacenadas a 4 °C muestran que los valores de *Salmonella* spp. disminuyeron de forma progresiva, tanto en la carne sin tratamiento como en las muestras inoculadas con BAL. Esta tendencia sugiere que las bajas temperaturas de almacenamiento son el factor más relevante explicando la poca sobrevivencia de *Salmonella* spp. bajo esta condición. Sin embargo, a 10 °C los resultados fueron distintos, ya que se observó un crecimiento de *Salmonella* con el paso de los días, llegando a valores altos (más de 6,6 log UFC/g al cuarto día) (Figura 1). Este resultado también muestra que la aplicación de las BAL como bioconservante no logró atenuar el incremento de la población del patógeno. Esto confirma que la BAL por sí sola no es suficiente si no se mantiene la cadena de frío adecuada.

Crecimiento de *E. coli* enterohemorrágica en función del tiempo, la temperatura y el uso de BAL

Escherichia coli enterohemorrágica mostró una resistencia importante especialmente a temperaturas más altas. A 4 °C, la población se mantuvo estable a lo largo del monitoreo ya que no hubo incrementos ni reducciones significativas. Se evidencia que la presencia del bioconservante tampoco ejerce un efecto

Tabla 2. Datos de recuentos y parámetros estadísticos (valor F y *p*-estadístico asociado para cada factor de interés del ANOVA) de la sobrevivencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* enterohemorrágica en carne congelada durante cuatro semanas

Recuento de <i>Salmonella</i> spp. (log UFC/g)					
Semana	0	1	2	3	4
	3,71 ± 0,19	3,27 ± 0,25	3,15 ± 0,22	4,13 ± 0,15	3,56 ± 0,42
Recuento de <i>E. coli</i> enterohemorrágica (logUFC/g)					
	5,44 ± 0,40	5,10 ± 0,53	4,83 ± 0,31	5,08 ± 0,15	4,94 ± 0,48
Factor	F		<i>p</i> -valor		
Patógeno	56,15		0,0017		
Semana	6,85		0,0021		
Patógeno*Semana	3,84		0,0227		

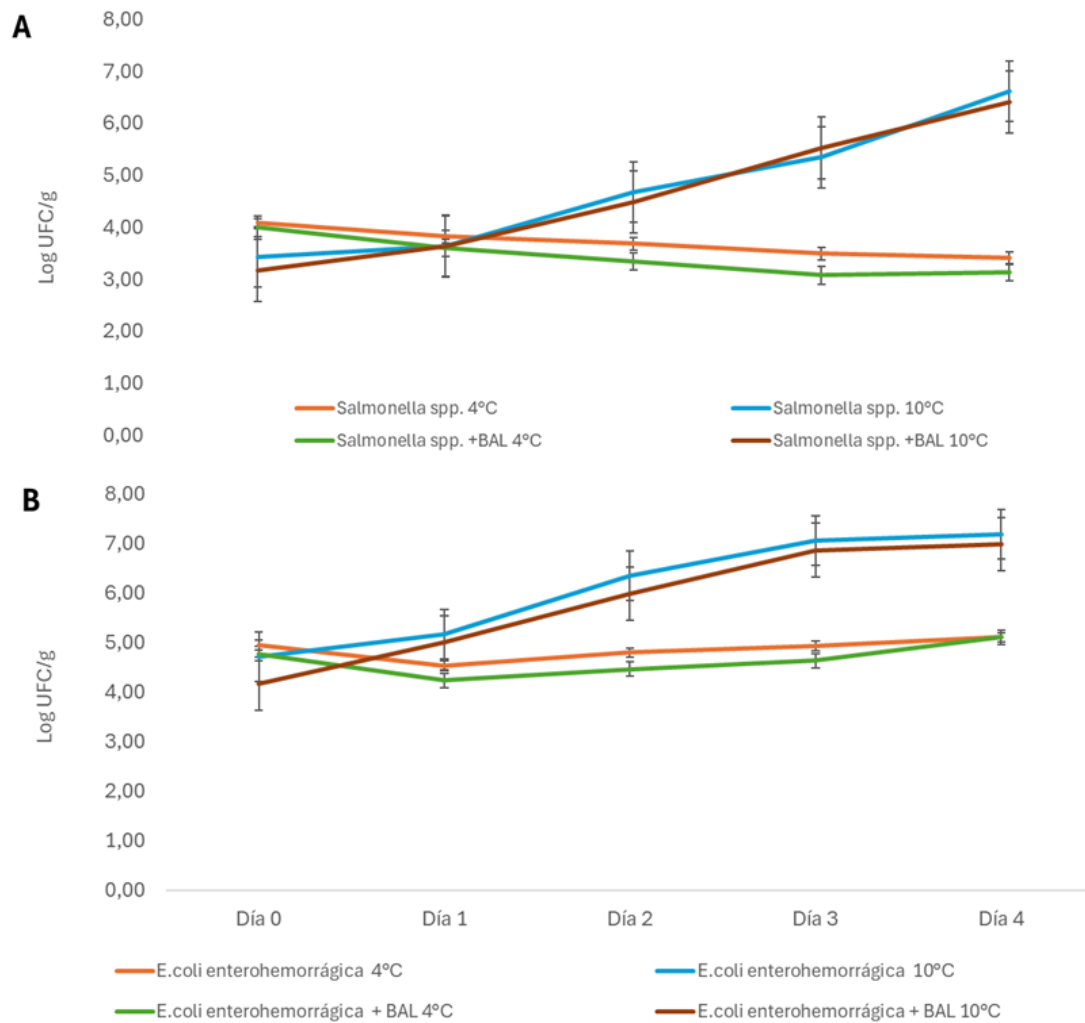


Figura 1. Sobrevivencia y crecimiento de *Salmonella* spp. (A) y *Escherichia coli* enterohemorrágica (B) en carne molida almacenada a dos temperaturas y en presencia del bioconservante.

importante sobre *E. coli*. De la misma forma, a 10 °C se muestra una proliferación acelerada, alcanzando más de 7 log UFC/g en el día 4, tanto en las muestras con cómo sin bioconservante. Aunque la adición de la BAL redujo levemente los recuentos, el impacto no fue suficiente para detener el crecimiento de manera efectiva bajo condiciones de temperatura de abuso (Figura 1). Este resultado refuerza la idea de que la eficacia del bioconservante es limitada y puede estar ligada a otros factores y la presencia de otros métodos de conservación.

Impacto de las BAL como estrategia de biopreservación

Las BAL estudiadas no demostraron poseer un efecto inhibitorio significativo frente a ninguno de

los patógenos, independientemente de la temperatura de almacenamiento de la carne. Sin embargo, en algunos tramos de tiempo hay tendencias que sugieren una reducción, sobretodo cuando la temperatura se mantuvo a 4 °C. El ANOVA muestra que el patógeno, la temperatura y el tiempo fueron factores significativos en la evolución de la carga microbiana. Aunque el bioconservante presentó una tendencia favorable, su efecto no fue estadísticamente significativo ($p=0,0556$), lo cual podría atribuirse a variabilidad biológica o requerir dosis más altas. Aun así, se destaca la importancia del control de temperatura, que sí demostró una

influencia directa sobre el crecimiento de los patógenos.

Discusión

La evaluación química y microbiológica de las muestras de carne molida que se analizaron en esta investigación muestra que los resultados son consistentes con los valores reportados en la literatura para esta materia prima, que se caracterizó por tener valores promedio cercanos al 20 % de proteína, alrededor del 5 % de grasa y una alta humedad, resultados que son habituales en esta matriz y además son importantes para la calidad, estabilidad y comportamiento del producto durante el almacenamiento (33). Es importante señalar que los recuentos de coliformes totales y fecales fueron similares entre todos los lotes evaluados. Los recuentos de coliformes fecales superaron los límites recomendados por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 (34), que establece un límite máximo de 460 NMP/g (1 NMP $\approx$ 1 UFC) de coliformes fecales para productos cárnicos crudos, lo cual evidencia deficiencias higiénico-sanitarias durante el procesamiento o la manipulación de la carne, que también pueden incrementar el riesgo de contaminación cruzada, así como la presencia de patógenos como *E. coli* y *Salmonella* spp. (35).

Los recuentos de bacterias lácticas encontrados en las muestras de carne molida analizadas al inicio del ensayo fueron elevados (4,8 log UFC/g). Aunque estos microorganismos podrían limitar el crecimiento de bacterias patógenas mediante mecanismos de antagonismo microbiano (36, 37). También debe considerarse su función como agentes de deterioro en productos cárnicos, ya que pueden afectar negativamente la calidad sensorial y la vida útil de los productos derivados (38, 39). Estos factores adquieren especial relevancia en el contexto de dietas frescas para animales de compañía, donde la carne molida de res constituye una materia prima de uso frecuente. Los valores de BAL reportados en este estudio, denotan que el producto se encuentra con un perfil aceptable dentro de

su vida de anaquel, ya que el nivel crítico de bacterias asociadas con deterioro de la carne se ha establecido entre 6,0 y 7,0 log UFC/g (39).

En cuanto a la sobrevivencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* enterohemorrágica durante el almacenamiento en congelación, los resultados muestran que hay una disminución en la población viable durante las primeras dos semanas, seguido por un aumento leve durante la tercera semana, sobre todo para *Salmonella* spp.. Este aparente incremento puede ser explicado por el proceso de descongelación prolongado, que puede permitir la recuperación de células en estado de estrés subletal y la activación de mecanismos de adaptación osmótica, como la biosíntesis de trehalosa en *Salmonella* spp. (40); otra posibilidad es que la variación se deba a diferencias inherentes a cada muestra o la técnica utilizada. Los resultados de *E. coli* enterohemorrágica frente a las condiciones de congelación coinciden con estudios previos que señalan que la congelación no garantiza la eliminación completa de estos patógenos y puede inducir daños subletales que facilitan su persistencia y posible proliferación posterior (41). Por ejemplo, Ro et al. (2015) (42) demostraron que las poblaciones de EHEC se mantienen estables después de 180 días de almacenamiento en congelación y con ciclos intermitentes de congelación-descongelación. Estos resultados enfatizan la necesidad de considerar no solo el almacenamiento a bajas temperaturas, sino también otras medidas de conservación para el control microbiológico en productos cárnicos frescos destinados para mascotas.

Cuando se analizó la sobrevivencia de *Salmonella* spp. a 4 °C se encontró que la bacteria presenta una reducción en su población a lo largo del tiempo, mientras que *E. coli* enterohemorrágica, por el contrario, al parecer se adapta y sobrevive bajo estas condiciones de refrigeración. La aplicación de BAL como bioconservante no mostró un efecto estadísticamente significativo en la reducción de ambos patógenos, dado lo anterior, su eficacia puede estar condicionada por factores como la concentración y la temperatura de almacenamiento (43, 44). Esto podría explicarse por distintos motivos, como una dosis no adecuada de las BAL seleccionadas, la aplicación de dos aislamientos que no son óptimos para la matriz analizada, la adaptación insuficiente de las BAL a la microbiota existente o a los componentes de la carne molida, a un error en el empaque utilizado que no permitiera una correcta acumulación de metabolitos antimicrobianos o una producción reducida de

compuestos inhibidores por las condiciones de temperatura utilizadas. Posiblemente la aplicación de BAL como bioconservantes en productos cárnicos frescos requiera estudios de optimización que tomen en cuenta las variables mencionadas.

En un estudio similar, Smith y colaboradores (22) reportaron reducciones de hasta 3 logaritmos en las poblaciones de *Salmonella* spp. y *E. coli* enterohemorrágica presentes en carne molida de res inoculada con un cocktail de cuatro cepas de *Lactobacillus acidophilus* (22); sin embargo, los autores emplearon carne molida empacada al vacío, condición no empleada en el presente estudio y que podría favorecer el crecimiento y antagonismo desplegado por las BAL. A temperaturas de abuso, como 10 °C, se observó un crecimiento acelerado para ambas bacterias patógenas, por lo que se señala la importancia crítica de mantener la cadena de frío a lo largo de todas las etapas de manejo y almacenamiento para prevenir el crecimiento de otros microorganismos (45). Existen métodos de conservación cuyo efecto se favorece cuando las poblaciones de patógenos encuentran condiciones favorables de crecimiento (46), por lo que existía la posibilidad de que los bio conservantes empleados tuvieran mayor efecto a 10°C que a 4°C, sin embargo esto no se observó. Sobre esto, Barcenilla et al. (2023) (36) consideran que el uso de BAL como conservantes en carnes deben considerarse solamente como un mecanismo adicional a otros métodos de preservación como es el caso de sustancias antimicrobianas. Existen métodos de conservación cuyo efecto se favorece cuando las poblaciones de patógenos encuentran condiciones favorables de crecimiento (46).

Existen diferencias en los mecanismos de virulencia y adaptación de *Salmonella* spp. y *E. coli* enterohemorrágica, lo cual complica su control microbiológico. *Salmonella* spp. se caracteriza por su capacidad de adhesión e invasión celular, mientras que *E. coli* posee una gran diversidad de cepas, entre ellas la *E. coli* O157:H7 que tiene capacidad para producir toxinas que afectan la homeostasis celular y dificultan las respuestas inmunes (35). Estas adaptaciones biológicas presentan un desafío para la industria alimentaria, sobre todo en productos con alta manipulación como la carne molida, donde existe elevado riesgo de contaminación cruzada.

Para Costa Rica, no existe una normativa específica para los niveles permisibles de *Salmonella* spp. y *E. coli* enterohemorrágica en alimentos crudos

destinados a mascotas, aunque la normativa para productos cárnicos humanos establece la ausencia de *Salmonella* spp. y límites estrictos para *E. coli* (RTCA 67.04.50:08) (34). Considerando que las dietas frescas para mascotas pueden manejarse en entornos domésticos, el riesgo de contaminación zoonótica se incrementa, lo que subraya la necesidad de mantener buenas prácticas de manipulación y almacenamiento seguro para proteger la salud tanto de los animales como de sus cuidadores.

Conclusiones

Aunque las BAL presentan potencial como bioconservante, su eficacia para inhibir el crecimiento de *Salmonella* spp. y *E. coli* enterohemorrágica en carne molida requiere investigación adicional. En el caso de los dos aislamientos evaluados en esta investigación se sugiere probar distintas concentraciones, formulaciones y combinaciones de tratamientos. El análisis microbiológico realizado en este trabajo refuerza que existe riesgo asociado al uso de carne fresca como materia prima para la fabricación de alimentos para mascotas. Es esencial diseñar y aplicar estrategias de conservación que mitiguen los riesgos para la salud de los animales y de sus cuidadores, centradas en el control riguroso de la temperatura, buenas prácticas de manipulación y el uso estratégico de tratamientos antimicrobianos previamente evaluados.

Agradecimientos

Este proyecto fue ejecutado con financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación (Proyecto B8-457). También se agradece al Laboratorio de Investigación y Entrenamiento en Microbiología de Alimentos (LIMA) del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) y a la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica por su apoyo para ejecutar los ensayos.

Conflictos de intereses

Los autores declaramos que no tenemos conflictos de interés en la publicación del presente estudio.

Contribución de los autores

CB: Diseño de estudio y recolección de datos.
MRS: Diseño de estudio, recolección y análisis de datos.

NB: Diseño de estudio, recolección y análisis de datos.

RWJ: Diseño de estudio, recolección y análisis de datos.

Referencias

- Sheffield S., Fiorotto M. L., Davis T. A. Nutritional importance of animal-sourced foods in a healthy diet. *Front. Nutr.* 2024; 11, 1424912. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1424912>
- Główny D., Sowińska N., Cieślak A., Gogulski M., Konieczny K., Szumacher-Strabel M. Raw diets for dogs and cats: Potential health benefits and threats. *Pol J Vet Sci.* 2024; 151-159. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2024.149344>
- Ahmed F, Grazia C M, Morrone S, Cavallo L, Berlinguer F, Dessi G, Tamponi C, Scala A, Varcasia A. Raw meat-based diet (RMBD) for household pets as potential door opener to parasitic load of domestic and urban environment. Revival of understated zoonotic hazards? A review. *One Health*, 2021; 13: 100327. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100327>
- Lyu Y, Wu C, Li L, Pu J. Current evidence on raw meat diets in pets: a natural symbol, but a nutritional controversy. *Animals* 2025; 15(3): 293. <https://doi.org/10.3390/ani15030293>
- Butowski CF, Moon CD, Thomas DG, Young W, Bermingham EN. The effects of raw-meat diets on the gastrointestinal microbiota of the cat and dog: a review. *N Z Vet J* 2022; 70(1): 1-9. <https://doi.org/10.1080/00480169.2021.1975586>
- Wang J, Vaddu S, Bhumanapalli S, Mishra A, Applegate T, Singh M., Thippareddi H. A systematic review and meta-analysis of the sources of Salmonella in poultry production (pre-harvest) and their relative contributions to the microbial risk of poultry meat. *Poult. Sci.* 2023; 102:102566. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102566>
- Freeman L, Chandler M, Hamper B, Weeth L. Current knowledge about the risks and benefits of raw meat-based diets for dog and cats. *J Am Vet Med Assoc* 2013; 243(1): 1549-1558. <https://doi.org/10.2460/javma.243.11.1549>
- Solis D, Toro M, Navarrete P, Faúndez P, Reyes-Jara A. Microbiological quality and presence of foodborne pathogens in raw and extruded canine diets and canine fecal samples. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9:799710. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.799710>
- Leonard EK, Pearl DL, Finley RL, Janecko N, Peregrine AS, Reid-Smith R.J, Weese JS. Evaluation of pet-related management factors and the risk of *Salmonella* spp. carriage in pet dogs from volunteer households in Ontario (2005-2006). *Zoonoses Public Health*, 2011, 58(2): 140-149. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01320.x>
- Nilsson O. Hygiene quality and presence of ESBL-producing *Escherichia coli* in raw food diets for dogs. *Infect Ecol Epidemiol* 2015; 5(1): 28758. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.28758>
- Hellgren J, Hästö LS, Wikström C, Fernström LL, Hansson I. Occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* and *Enterobacteriaceae* in raw meat-based diets for dogs. *Vet Rec* 2019; 184(14): 442. <https://doi.org/10.1136/vr.105199>
- van Bree FPJ, Bokken GCAM, Mineur R, Franssen F, Opsteegh M, van der Giessen JWB, Lipman LJA, Overgaauw PAM. Zoonotic bacteria and parasites found in raw meat-based diets for cats and dogs. *Vet Rec* 2018; 182(2): 50. <https://doi.org/10.1136/vr.104535>
- Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF. Survival of *Clostridium difficile* and its toxins in equine feces: Implications for diagnostic test selection and interpretation. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12(4):332-336. <https://doi.org/10.1177/104063870001200406>
- Powell DJ, Li D, Smith B, Chen WN. Cultivated meat microbiological safety considerations and practices. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2025; 24(1): e70077. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.70077>
- Kiprotich S., Aldrich Ch. A review of food additives to control the proliferation and transmission of pathogenic microorganisms with emphasis on applications to raw meat-based diets for companion animals. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9:1049731. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1049731>
- Xu Z, Li Y, Liu Z, Soteyome T, Li X, Liu J. Current knowledge on cryogenic microorganisms and food safety in refrigerators. *Trends Food Sci Technol* 2024; 146: 104382. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104382>
- Kim H, Jang A. Evaluation of the microbiological status of raw pork meat in Korea: Modification of the microbial guideline levels for meat. *Food Sci Biotechnol* 2018; 27(6): 1745-1752. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0356-7>
- Ayala DI, Cook PW, Franco JG, Bugarel M, Kottapalli KR, Loneragan GH., Brashears MM, Nightingale KK. A systematic approach to identify and characterize the effectiveness and safety of novel probiotic strains to control foodborne pathogens. *Front Microbiol* 2019; 10:1108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01108>
- Arrijoa-Bretón D, Mani-López E, Palou E, López-Malo A. Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control* 2020; 115, 107286. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107286>

20. Piedra V, Usaga J, Redondo-Solano M, Uribe-Lorío L, Valenzuela-Martínez C, Barboza N. Inhibiting potential of selected lactic acid bacteria isolated from Costa Rican agro-industrial waste against *Salmonella* spp. in yogurt. *Ital J Food Saf* 2024;14(1): 12494. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2024.12494>
21. Koo OK, Kim SM, Kang SH. Antimicrobial potential of *Leuconostoc* species against *E. coli* O157:H7 in ground meat. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2015; 58(5): 713-720. <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0112-0>
22. Smith L, Mann JE, Harris K, Miller MF, Brashears MM. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* in ground beef using lactic acid bacteria and the impact on sensory properties. *J Food Prot* 2005; 68(8):1587-1592. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.8.1587>
23. Ruby JR, Ingham SC. Inhibition of growth of *Escherichia coli* O157:H7 and multidrug-resistant *Salmonella* serovars in raw beef by addition of a presumptive *Lactobacillus sakei* ground beef isolate. *J Food Prot* 2022; 85(6): 916-924. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.2.251>
24. Fadda S, Castellano P, Terán L, Raya R, Vignolo G. Lactic acid bacteria in meat fermentations: role of autochthonous starter cultures on quality, safety, and health. In Vinderola G., Ouwehand A, Salminen S, von Wright A. (eds) *Lactic Acid Bacteria* 2024, pp. 228-246. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003352075>
25. Smaoui S, Echegaray N, Kumar M, Chaari M, D'Amore T, Shariati MA, et al. Beyond conventional meat preservation: saddling the control of bacteriocin and lactic acid bacteria for clean label and functional meat products. *Appl Biochem Biotechnol* 2024; 196(6): 3604-3635. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04680-x>
26. Sionek B, Szydłowska A, Kołożyn-Krajewska D. The role of microorganisms and their antibacterial compounds in food biopreservation. *Appl Sci* 2024; 14(13): 5557. <https://doi.org/10.3390/app14135557>
27. Cortés-Herrera C, Quirós-Fallas S, Calderón-Calvo E, Cordero-Madriral R, Jiménez L, Granados-Chinchilla F, Artavia G. Nitrogen/protein and one-step moisture and ash examination in foodstuffs: Validation case analysis using automated combustion and thermogravimetry determination under ISO/IEC 17025 guidelines. *Curr Res Food Sci* 2021; 4: 900-909. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2021.11.015>
28. AOAC International. (s. f.). AOAC Official Method 960.39: Crude Protein. In AOAC Official Methods of Analysis. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
29. AOAC International. 2006a. AOAC Official Method 950.46B: Moisture in meat. AOAC Official Methods of Analysis. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
30. AOAC International. (s. f.). AOAC Official Method 920.153: Ash of meat. AOAC Official Methods of Analysis. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
31. Arias Echandi ML, Antillón Guerrero FM, Chaves Ulate C, Villalobos Soto L. Microbiología de aguas y alimentos. San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica, 2008, pp:141.
32. Granados F, Valenzuela C, García B, Aguilar D, Redondo M, Molina A. Microbiological safety and presence of major mycotoxins in animal feed for laboratory animals in a developing country: The case of Costa Rica. *Animals* 2021;11(8):2389 <https://doi.org/10.3390/ani11082389>
33. Geletu US, Usmael MA, Mummed YY, Ibrahim AM. Quality of cattle meat and its compositional constituents. *Vet Med Int* 2021; 2021(1), 7340495. <https://doi.org/10.1155/2021/7340495>
34. Ministerio de Comercio Exterior de Costa Rica. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 - Carne y productos cárnicos: especificaciones sanitarias. 2009; Disponible en: https://www.comex.go.cr/media/3480/279_anex-243-rtca-67-04-50-08-microbio-may-09.pdf
35. Rodríguez FP, Campos D, Ryser ET, Buchholz AL, Posada-Izquierdo GD, Marks BP, Zurera G, Todd E. A mathematical risk model for *Escherichia coli* O157:H7 cross-contamination of lettuce during processing. *Food Microbiol*, 2011; 28(4), 694-701. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.008>
36. Barcenilla C, Puente A, Cobo-Díaz J, Alexa EA, García-Gutiérrez E, O'Connor P, et al. Selection of lactic acid bacteria as biopreservations agents and optimization of their mode of application for the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol*, 2023; 403, 110341. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110341>
37. Sánchez-Martín J, Botella-Martínez C, García-Béjar B., López-Gómez A. Evaluation of the antimicrobial effect of bioprotective lactic acid bacteria cultures against *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged cold-smoked rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different Temperatures Foods 2025; 14(11): 1951. <https://doi.org/10.3390/foods14111951>
38. Bolívar A, Martín González L, Rodríguez Romero R, Pérez-Rodríguez F. Predictive modeling and calibration for process control in meat industry: A *Staphylococcus aureus*. Case study. In: Pérez-Rodríguez F, Valero A, Bolivar A. (eds). Basic protocols in predictive microbiology software. Methods and protocols in food Science, Humana, New York, 2025. p. 241-252. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4112-5_12
39. Redondo-Solano M, Guzmán-Saborío P., Ramírez-Chavarría F, Chaves-Ulate C, Araya-Quesada Y, Araya-Morice A. Effect of the type of packaging on the shelf life of ground rabbit meat. *Food Sci Technol Int* 2022; 28(2):190-199. <https://doi.org/10.1177/10820132211003705>
40. Howells AM, Bullifent HL, Dhaliwal K, Griffin K, de Castro A., Frith G, Tunnacliffe A, Titball RW. Role of trehalose biosynthesis in environmental survival and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Res Microbiol*, 2002; 153(5), 281-287. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)01321-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(02)01321-9)
41. Cheng Y, Wang X., Liu Y, Qin X, Li Z, Dong Q. Growth and survival characteristics of *Listeria monocytogenes* of different sources and subtype. *LWT* 2023;184:115114. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115114>

42. Ro E. Y, Ko Y. M, Yoon K. S.. Survival of pathogenic enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and control with calcium oxide in frozen meat products. Food microbiol, 2015, 49, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.010>
43. Jarret D, Panagiotis N, Ifigenia G, John N. Acid tolerance of acid-adapted and nonacid-adapted *Escherichia coli* O157:H7 strains in beef decontamination runoff fluids or on beef tissue. Food Microbiol, 2007; 24(5).530-538. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.05.007>
44. Wiktorczyk-Kapischke N, Skowron K., Walecka-Zacharska E, Grudlewska-Buda K, Wnuk K., Buszko K, Gospodarek-Komkowska E. Assessment of the influence of selected stress factors on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. BMC Microbiol, 2023; 23, 27. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02766-4>
45. Mercier S., Villeneuve S., Mondor M., Uysal I. Time-temperature management along the -food cold chain: a review of recent developments. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2017; 16(4), 647-667. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12269>
46. Leistner L. Basic aspects of Food preservation by hurdle technology. Int J Food Microbiol, 2000, 55(1-3), 181-186. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00161-6)

Recibido: 11/10/2025
Aceptado: 15/05/2026