



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**INFORME DE SERVICIO SOCIAL : ELABORACION DE MATERIAL
DE APOYO A LA ASIGNATURA DE MICROBIOLOGIA
PARA LA CARRERA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS
"COMPENDIO BASICO DE MICROBIOLOGIA
APLICADA A LOS ALIMENTOS"**

**INFORME DE SERVICIO
SOCIAL - TITULACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MARIA GUADALUPE LIMON PALOMINO**

ASESOR M EN C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INSTITUTO NACIONAL
AVENIDA DE
MÉRICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAINE KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el

Informe de Servicio Social: Elaboración de Material de Apoyo a la
Asignatura de Microbiología para la Carrera de Ingeniería en Alimentos.

" Compendio Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos "

que presenta la pasante: María Guadalupe Limón Palomino,

con número de cuentas: 870P85-6 para obtener el TITULO de:
Ingeniera en Alimentos.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 23 de Agosto de 1996

PRESIDENTE Q. E. I. Andrea Becerra Osnaya
VOCAL M. en C. Clara Inés Álvarez Manrique
SECRETARIO Q. E. B. S. Patricia Miranda Castro
1er. SUPLENTE Q. F. I. Leticia Zúñiga Ramírez
2do. SUPLENTE Q. F. B. Guadalupe Amaya León

Handwritten signatures and initials:
- Handwritten signature
- Handwritten signature
- Handwritten signature
- Handwritten signature

Gracias Dios Mio por ser mi guía
en este camino tan difícil, Gracias por darme
las fuerzas necesarias para llegar a este punto de mi
vida y sobre todo por las bendiciones que
me haz brindado.

Gracias a mi Padre *Francisco Limón Torres*
y a mi Madre *Margarita Palomino Mendoza*.

Es a ellos a quienes dedico este trabajo,
como una muestra de mi agradecimiento
por el cariño y apoyo brindado a lo largo
de mi vida. Este trabajo no es un logro mío,
sino de ustedes, pues ustedes me dieron un
arma esencial para salir adelante " La vida ".
Los quiero Mucho.

A mis hermanas Ma de Jesús, Araceli, Ma. Concepción, Reyna, Lizeth, Carolina y a mi
hermano Francisco Giovanni. Gracias por su cariño, está es una manera de compartir una
etapa de mi vida con ustedes.

Gracias I. Q. Armando Solís por tu amor, tu confianza y apoyo constante, pero sobre todo por enseñarme a ver las cosas de otra manera, principalmente a tener confianza en mí misma y en lo que puede lograr. Te Quiero Mucho.

Un agradecimiento muy especial a la M en C. Clara Inés Álvarez M. por ayudarme a lograr una de mis tantas metas en la vida y sobre todo por haberme brindado su apoyo, no sólo como asesora, sino como amiga.

Gracias a los Sinodales
Andrea Becerril,
Patricia Miranda,
Leticia Zuñiga y
Guadalupe Amaya
por la atención prestada
a la revisión de este trabajo.

A todos y cada uno de mis amigos, así como compañeros de generación que compartieron mi vida estudiantil en la Facultad. Gracias por su amistad.

Gracias a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron en la elaboración de este trabajo, es especial a mis compañeros del Laboratorio de Bacteriología.

INDICE

	Pag
RESUMEN	I
INTRODUCCION	II
OBJETIVOS	IV
1. HISTORIA DE LA MICROBIOLOGIA DE INTERES EN ALIMENTOS	1
1.1 Conservación de alimentos	3
1.2 Alteración de alimentos	6
1.3 Intoxicamiento por alimentos	7
1.4 Legislación de alimentos	9
2. MORFOLOGIA BACTERIANA	11
2.1 Reino protista	12
2.2 Reino monera	13
2.2.1 Comparación entre las células procarionte y eucariote	14
2.3 Principales formas y agrupaciones bacterianas	15
2.4 Principales organelos celulares	18
2.4.1 Flagelos	18
2.4.2 Hímidrias	22
2.4.3 Cilios axial	24
2.4.4 Capsula	24
2.4.5 Pared celular	25
2.4.5.1 Método de tinción de Gram	28
2.4.6 Membrana citoplasmática	35
2.4.7 Mesosomas	37
2.4.8 Ribosoma	38
2.4.9 Plásmidos	40
2.4.10 Gránulos citoplasmáticos	40
2.4.11 Esporas y su proceso de esporulación	41
2.4.12 Región celular	45
3. FISIOLOGIA BACTERIANA	48
3.1 Fotosintéticos	49
3.2 Quimiosintéticos	49
3.2.1 Autótrofos o litotróficos	49
3.2.2 Heterótrofos o organótrofos	50
3.3 Condiciones que influyen en el crecimiento de microorganismos	50
3.3.1 Nutrimiento	51
3.3.2 Temperatura	51
3.3.3 Humedad	53
3.3.4 Oxígeno	55
3.3.5 Concentración de hidrogeniones	56

3.3.6	Minerales	57
3.3.7	Sustancias inhibitorias	58
3.4	Factores de crecimiento	58
3.4.1	Vitaminas	59
3.4.2	Aminoácidos	60
3.4.3	Purinas y pirimidinas	60
3.5	Curva de crecimiento bacteriano	62
3.5.1	Fase de latencia	63
3.5.2	Fase de aceleración	63
3.5.3	Fase logarítmica	63
3.5.4	Fase de aceleración negativa	64
3.5.5	Fase estacionaria	64
3.5.6	Fase de declive o muerte	64
3.5.7	Aplicación de la curva de crecimiento en alimentos	64
3.5.7.1	Aplicación de la curva de conservación de alimentos	66
4.	METABOLISMO BACTERIANO	67
4.1	Transporte de nutrientes a través de la membrana	67
4.1.1	Difusión pasiva	67
4.1.2	Difusión facilitada	68
4.1.3	Transporte activo	68
4.1.4	Translocación de grupo	68
4.2	Metabolismo bacteriano	69
4.2.1	Catabolismo	70
4.2.1.1	Glicólisis	77
4.2.1.2	Ciclo Etner Doudoroff	79
4.2.1.3	Ciclo de ácido cítrico	80
4.2.1.4	Ciclo del gliosilato	82
4.2.1.5	Cadena respiratoria	84
4.2.1.6	Ciclo de las pentosas	87
4.2.1.7	Fermentaciones	89
4.2.1.7.1	Ácido-mista	91
4.2.1.7.2	2,3Butilenglicol	92
4.2.1.7.3	Propiónica	94
4.2.1.7.4	Láctica	95
4.2.1.7.5	Butírica	97
4.2.1.7.6	Alcohólica	98
4.2.1.7.7	Acética	99
4.2.2	Anabolismo	101
4.2.2.1	Síntesis de azúcares	102
4.2.2.2	Síntesis de aminoácidos	103
4.2.2.3	Síntesis proteica	104
4.2.2.4	Síntesis de ácidos grasos	106
4.2.2.5	Síntesis de purinas y pirimidinas	108
4.2.2.6	Síntesis de macromoléculas	109

4.2.3 Resumen de metabolismo bacteriano	110
5. MEDIOS DE CULTIVO	114
5.1 Finalidad de los medios de cultivo	115
5.2 Clasificación de los medios en base a su estado físico	115
5.3 Constituyentes de los medios de cultivo	115
5.3.1 Agar	115
5.3.2 Peptona	116
5.3.3 Extracto de levadura	116
5.3.4 Sangre	116
5.3.5 Plasma	117
5.3.6 Suero	117
5.3.7 Bilis	117
5.3.8 Gelatina	117
5.3.9 Carbohidratos	117
5.3.10 Sales minerales	118
5.3.11 Indicadores	118
5.3.12 Preparación de los medios de cultivo	119
5.4 Clasificación de los medios de cultivo	119
5.4.1 Medios simples	120
5.4.2 Medios de pre-enriquecimiento	120
5.4.3 Medios de cultivo enriquecidos	121
5.4.4 Medios de cultivo selectivos y diferenciales	121
5.4.5 Medios de transporte	122
5.4.6 Medios de cultivo de mantenimiento	122
5.5 Medios de cultivo, usos, formulación y manera de preparar	122
5.5.1 Medios de cultivo simples	122
5.5.1.1 Caldo nutritivo	123
5.5.1.2 Agar nutritivo	123
5.5.2 Medios enriquecidos	123
5.5.2.1 Agar - sangre	123
5.5.2.2 Caldo de suero	124
5.5.2.3 Caldo de triptona y soya	124
5.5.2.4 Caldo de infusión de <i>cerebro y corazón</i>	125
5.5.2.5 Agar de difusión de <i>cerebro y corazón</i>	125
5.5.2.6 Caldo de difusión de <i>corazón</i>	125
5.5.2.7 Agar de extracto de hígado	125
5.5.2.8 Agar de dextrasa Sabouraud	126
5.5.3 Medios selectivos y diferenciales	126
5.5.3.1 Agar Baird Parker	126
5.5.3.2 Agar con Sangre y telurita	127
5.5.3.3 Agar Rojo - Violeta Bilis	127
5.5.3.4 Agar MacConkey	128
5.5.3.5 Agar <i>Salmonella - Shigella</i>	129
5.5.3.6 Agar de eosina y azul de metileno (EMB)	129

5.5.3.7	Agar de sulfito de bismuto	130
5.5.3.8	Caldo F selenita	131
5.5.3.9	Agar X1D (silosa, lactosa, desoxicolato)	131
6.	ESTERILIZACION	133
	6.1. Esterilización de líquidos y sólidos	134
	6.1.1. Esterilización por calor húmedo	137
	6.1.1.1. Esterilización por calor seco	137
	6.1.1.1.1. Flameo	137
	6.1.1.1.2. Incineración	138
	6.1.1.1.3. Hornos de aire caliente	138
	6.1.1.2. Esterilización por calor húmedo	139
	6.1.1.2.1. Ebullición	140
	6.1.1.2.2. Tyndalización o vapor corriente	140
	6.1.1.2.3. Vapor a presión	141
	6.1.1.2.3.1. Preparación del material a esterilizar	141
	6.1.1.3. Filtración	143
	6.1.1.3.1. Filtros de porcelana o lana	144
	6.1.1.3.2. Filtros de asbesto	145
	6.1.1.3.3. Filtros de derivados de celulosa	145
	6.1.2. Radiaciones	145
	6.1.2.1. Radiaciones electromagnéticas	146
	6.1.2.1.1. Rayos ultravioleta	146
	6.1.2.1.2. Rayos infrarrojos	147
	6.1.2.2. Radiaciones ionizantes	147
	6.1.2.2.1. Rayos X	148
	6.1.2.3. Ondas ultrasónicas	148
	6.1.2.4. Ventajas y desventajas del uso de radiaciones	149
	6.1.2.4.1. Aplicaciones prácticas de las radiaciones	149
	6.1.3. Gases	150
	6.1.3.1. Óxido de etileno	150
	6.1.3.2. Formaldehído	151
6.2	Control de la esterilidad	152
	6.2.1. Pruebas microbiológicas	152
	6.2.2. Indicadores químicos	153
	6.2.3. Cintas de autoclave	153
	6.2.4. Termocoplas	153
7.	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS	154
7.1	Muestreo para el análisis de alimentos	154
	7.1.1. Diluyentes más usuales	159
7.2	Control de la higiene	159
	7.2.1. Profundidad probable	160
	7.2.2. Profundidad	164

7.2.3 Superficie	166
7.3 Conteos más usuales de microorganismos	167
7.3.1 Recuento de bacterias mesófilas (35 - 37 C)	167
7.3.2 Recuento de coliformes	168
7.3.3 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	170
7.3.4 Recuento de Mohos y levaduras	171
7.3.4.1 Significado de la contaminación fúngica en alimentos	172
7.3.4.1.1 Efecto sobre alimentos	172
7.3.4.1.2 Efecto en hombres y animales	173
7.3.5 Recuento de <i>Listeriacoccus</i>	173
7.4 Métodos modernos de conteo de microorganismos	175
7.4.1 Portaobjetos sumergido	176
7.4.2 Petrifilm	176
7.4.3 Detección por metabolismo	177
7.4.4 Radiometría	177
7.4.5 Microcalorimetría	178
7.5 Métodos ultrarápidos de conteo de microorganismos	178
7.5.1 Frotis	178
7.5.2 Filtro de epifluorescencia (FETF)	178
7.5.3 Tinción fluorescente	178
8. DESINFECCION	180
8.1 Términos generales relacionados con el tema	180
8.1.1 Bactericida	180
8.1.2 Bacteriostático	181
8.1.3 Fungicida	181
8.1.4 Higienización	181
8.1.5 Higienizante o sanitizante	181
8.1.6 Desinfectante	181
8.2 Mecanismo de acción de una sustancia desinfectante	182
8.3 Selección de una sustancia desinfectante	182
8.4 Características que debe cumplir una sustancia desinfectante	183
8.5 Coeficiente fenólico o valoración de una sustancia desinfectante	184
8.6 Clasificación de agentes desinfectantes	185
8.6.1 Cloro	186
8.6.1.1 Cloruros	187
8.6.1.1.1 Hipocloritos	187
8.6.2 Yodo	187
8.6.2.1 Tintura de yodo	188
8.6.2.2 Yoduro potásico	188
8.6.2.3 Yodoformo	188
8.6.3 Fenol	189
8.6.4 Alcohol	190
8.6.5 Detergentes	192
8.7.1 Detergentes aniónicos	192

8.7.2 Detergentes catiónicos	192
8.7.3 Detergentes no iónicos	193
8.7.4 Detergentes sanitizantes	193
8.7.4.1 Detergentes formulados con yodóforos	194
8.7.4.2 Detergentes formulados con compuestos de amonio cuaternario	195
8.7.4.3 Detergentes formulados con cloraminas	196
8.8 Limpieza	197
8.8.1 Suciedad	199
8.8.2 Superficie limpia	200
8.8.3 Agentes usados como limpiadores	200
8.8.3.1 Limpiadores de naturaleza alcalina	200
8.8.3.1.1 Lejía o sosa caústica	200
8.8.3.1.2 Cal viva	201
8.8.3.1.3 metasilicatos de sodio	201
8.8.3.1.4 Sesquisilicato	201
8.8.3.1.5 Polifosfatos	201
8.8.3.1.6 Polifosfatos	201
8.8.3.2 Limpiadores de naturaleza ácida	202
8.8.3.2.1 Ácidos orgánicos	202
8.8.3.2.1.1 Ácido bórico	202
8.8.3.2.1.2 Ácido benzoico	202
8.8.3.2.2 Ácidos inorgánicos	203
8.8.3.2.2.1 Ácido clorhídrico	203
8.9 Usos de desinfectantes en la industria de alimentos	203
8.10 Sistemas de limpieza en su sitio "CIP"	204
9. ANTIBIÓTICOS	205
10. PRINCIPALES BACTERIAS DE IMPORTANCIA EN ALIMENTOS	206
10.1 Gram +	206
10.1.1 Familia <i>Micromonaceae</i>	206
10.1.1.1 <i>Micromonococcus</i>	206
10.1.1.2 <i>Staphylococcus</i>	207
10.1.2 Familia <i>Lactobacillaceae</i>	207
10.1.2.1 <i>Lactobacillus</i>	207
10.1.2.2 <i>Leuconostoc</i>	208
10.1.2.3 <i>Pediococcus</i>	208
10.1.2.4 <i>Streptococcus</i>	208
10.1.3 Familia <i>Corynebacteriaceae</i>	209
10.1.3.1 <i>Corynebacterium</i>	209
10.1.4 familia <i>Bacillaceae</i>	209
10.1.4.1 <i>Bacillus</i>	209
10.1.4.2 <i>Clostridium</i>	210

10.2 Gram -	210
10.2.1 Familia Enterobacteriaceae	210
10.2.1.1 <i>Enterobacter</i>	211
10.2.1.2 <i>Erwinia</i>	211
10.2.1.3 <i>Escherichia</i>	211
10.2.1.4 <i>Klebsiella</i>	211
10.2.1.5 <i>Proteus</i>	212
10.2.1.6 <i>Salmonella</i>	212
10.2.1.7 <i>Serratia</i>	213
10.2.1.8 <i>Shigella</i>	213
10.2.1.9 <i>Yersinia enterocolitica</i>	214
10.2.2 Familia Vibrionaceae	214
10.2.2.1 <i>Vibrio cholerae</i>	214
10.2.2.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	215
10.2.3 Familia Pseudomonales	215
10.2.3.1 <i>Acetobacter</i>	215
10.2.3.2 <i>Achromobacter</i>	215
10.2.3.3 <i>Alcaligenes</i>	215
10.2.3.4 <i>Flavobacterium</i>	216
10.2.3.5 <i>Pseudomonas</i>	216
10.2.3.6 <i>Halobacterium y Halococcus</i>	216
10.2.4 Bacterias corrosivas	217
10.2.4.1 Ferrobacterias	217
10.2.4.1.1 <i>Gallinella</i>	217
10.2.4.1.2 <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	218
10.2.4.2 Bacterias sulfotransductoras	218
10.2.4.2.1 Sulfobacterias	219
10.2.4.2.2 Bacterias oxidantes del Hidrógeno	219
10.2.4.2.3 Bacterias carbonotductoras	220
10.2.5 Otros generos bacterianos Gram- de importancia en alimentos	220
II. MICROLOGIA	221
II.1 Características fisiológicas de los mohos	221
II.2 Clasificación e identificación de hongos	222
11.2.1 <i>Phycomycetes</i>	225
11.2.1.1 <i>Mucor</i>	225
11.2.1.2 <i>Rhizopus</i>	225
11.2.1.3 <i>Zoanidium</i>	226
11.2.2 <i>Ascomycetes</i>	226
11.2.3 Hongos imperfectos	227
11.2.3.1 <i>Moniliaceae</i>	227
11.2.3.1.1 <i>Aspergillus</i>	227
11.2.3.1.2 <i>Botrytis</i>	228
11.2.3.1.3 <i>Cephalosporium</i>	228

11.2.3.1.4	<i>Geotrichium (Oidium)</i>	229
11.2.3.1.5	<i>Gloesporium</i>	229
11.2.3.1.6	<i>Penicillium</i>	229
11.2.3.1.7	<i>Monillaceae</i>	229
11.2.3.1.8	<i>Sporotrichum</i>	230
11.2.3.1.9	<i>Trichothecium (Cephalothecium)</i>	230
11.2.3.2	<i>Dematiaceae</i>	230
11.2.3.2.1	<i>Alternaria</i>	230
11.2.3.2.2	<i>Cladosporium</i>	230
11.2.3.2.3	<i>Helvethesporium</i>	231
11.2.3.3	<i>Tuberculariaceae</i>	231
11.2.3.3.1	<i>Fusarium</i>	231
11.3	Estudios realizados sobre la utilización de los mohos	231
12.	LEVADURAS	234
12.1	Géneros de levaduras de importancia en alimentos	237
12.1.1	<i>Brettanomyces</i>	237
12.1.2	<i>Candida</i>	237
12.1.3	<i>Debaryomyces</i>	237
12.1.4	<i>Hansenula</i>	237
12.1.5	<i>Mucodentia</i>	238
12.1.6	<i>Rhodotorula</i>	238
12.1.7	<i>Saccharomyces</i>	238
12.1.8	<i>Shizosaccharomyces</i>	239
12.1.9	<i>Torulopsis (Torula)</i>	239
12.1.10	<i>Pichia</i>	239
12.1.11	<i>Hanseniaspora</i>	239
12.1.12	<i>Kloekera</i>	239
12.1.13	<i>Trichosporium</i>	240
12.1.14	<i>Kluveromyces</i>	240
13.	PARASITOLOGIA	241
13.1	Protozoos	242
13.1.1	<i>Entamoeba histolytica</i>	242
13.1.2	<i>Entamoeba coli</i>	244
13.1.3	<i>Giardia lamblia</i>	245
13.2	Helmintos	246
13.2.1	Plantelmintos	247
13.2.1.1	<i>Taenia solium</i>	247
13.2.1.2	<i>Taenia saginata</i>	249
13.2.1.3	<i>Diphyllobothrium latum</i>	250
13.2.1.4	La Teniasis como enfermedad	251
13.2.2	Nematelmintos	251

13.2.2.1 <i>Trichinella spiralis</i>	252
13.2.2.2 <i>Trichinuris trichiura</i>	254
13.2.2.3 <i>Ascaris lumbricoides</i>	255
14. VIROLOGIA	258
14.1 Virus transmitidos por alimentos	259
14.2.1 Hepatitis	260
14.2.2 Poliomielitis	260
14.2.3 Gastroenteritis bacteriana aguda	261
14.2.4 Rotavirus	262
15. ANEXOS	263
15.1 Grupos de bacterias importantes en Microbiología de Alimentos	263
15.2 Tiempo de muerte térmica	267
CONCLUSIONES	272
BIBLIOGRAFIA	273

INDICE DE FIGURAS y TABLAS.

Figuras

1.1	Cuerpos minúsculos vistos por Leewenhock.....	1
1.2	Matraz de cuello de cisne usado por Pasteur.....	2
2.1	Reino protista	13
2.2.1	Estructura celular de una bacteria.....	15
2.3	Diferentes estructuras bacterianas.....	17
2.4.1	Estructura basal de un flagelo.....	20-21
2.4.1.1	Flagelos bacterianos.....	21
2.4.1.2	Géneros bacterianos con flagelos.....	22
2.4.2	Célula bacteriana con flagelos y fimbrias.....	23
2.4.5.1	Pared Gram +.....	28
2.4.5.2	Pared Gram -.....	28
	Membrana celular. Micrografía electrónica de una sección de la misma en la que se puede observar la doble línea claramente.....	36
2.4.6.1	Membrana celular.....	36
2.4.7.	Mesosomas.....	37
2.4.8	Estructura en unidades de una partícula ribosómica.....	39
2.4.11	Ciclo de formación de una espora bacteriana.....	44
2.4.11.1	Espora madurada de <i>Bacillus megaterium</i>	42
2.4.12	Estructura de la cadena polinucleotida del ADN.....	46
2.4.12.1	Bipartición de una célula (División celular).....	47
3.3.3	Efecto de la reducción de la a_w en el crecimiento bacteriano.....	54
3.5	Curva de crecimiento bacteriano.....	62
4.2.1	Oxidación de lípidos.....	76
4.2.1.1	Glucólisis.....	78
4.2.1.2	Ciclo de Entner Doudoroff.....	79
4.2.1.3	Ciclo de Krebs o del Acido cítrico.....	81
4.2.1.4	Ciclo del Glioxilato.....	83
4.2.1.5	Cadena respiratoria.....	85
4.2.1.6	Ciclo de las pentosas.....	88
4.2.1.7	Posibles rutas de utilización del piruvato.....	90
4.2.1.7.1	Fermentación ácido-mixta.....	91
4.2.1.7.2	Fermentación 2-3 Butanodiol.....	93
4.2.1.7.3	Fermentación propionica.....	94

4.2.1.7.4	Fermentación heteroláctica.....	95
4.2.1.7.5	Fermentación butírica.....	97
4.2.1.7.6	Fermentación alcohólica.....	98
4.2.1.7.7	Fermentación acética.....	99
4.2.2.1	Síntesis de azúcares.....	102
4.2.2.2	Síntesis de amino-ácidos.....	103
4.2.2.3	Mecanismo de síntesis proteica.....	105
4.2.2.4	Síntesis de ácidos grasos.....	107
4.2.2.5	Síntesis de purinas y pirimidinas.....	108
4.2.3	Resumen de nutrición y biosíntesis.....	111
4.2.3.2	Metabolismo y anabolismo de la <i>E. coli</i>	113
6.1.1.1.1	Mechero Fisher y asa de inoculación.....	138
7.2.1	Conteo por el número más probable.....	161
7.2.2	Conteo en profundidad.....	165
7.2.3	Conteo en superficie.....	166
8.5	Índice fenólico.....	185
11.1	Estructuras de mohos.....	233
12.1	Estructura celular de una levadura.....	234
12.2	Estructuras de diversas levaduras.....	236
13.1.1	Ciclo biológico de la <i>Entamoeba histolytica</i>	243
13.1.2	Trofozoito y quiste de <i>Entamoeba coli</i>	244
13.1.3	Ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i>	245
13.2.1	<i>Taenia saginata</i> y <i>Taenia solium</i>	248
13.2.1.1	Ciclo biológico de la <i>Taenia solium</i>	249
13.2.2.1	<i>Trichinella spiralis</i>	253
13.2.2.1.1	Ciclo biológico de <i>Trichinella spiralis</i>	253
13.2.2.2	<i>Trichuris trichiura</i>	254
13.2.2.3	Ciclo biológico del <i>Ascaris lumbricoides</i>	257
14.1	Bacteriofago.....	260

Tablas

2.2	Comparación entre una célula procarionte y una eucarionte.....	14
2.4.5.1	Eubacterias Gram +.....	32
2.4.5.2	Eubacterias Gram -.....	33
2.4.11	Principales diferencias entre una célula y una endospora bacteriana.....	43
3.3.2	Relación entre las velocidades de crecimiento de las bacterias	

	y su temperatura de incubación.....	52
3.3.3.1	a_w mínima para el crecimiento de microorganismos en alimentos.....	55
3.4.1	Vitaminas y su función.....	59
4.2.3.1	Intermediarios en la intersección entre catabolismo y biosíntesis.....	112
5.3.11	Indicadores de pH.....	118
6.1	Procedimientos actuales y futuros de tratamiento de los alimentos procesados para asegurar la inocuidad, calidad y aceptabilidad microbiológicas.....	136
6.1.1.2.7	Temperaturas obtenibles por medio de vapor a presión.....	141
7.1	Tabla de números al azar.....	155
7.2.1	Tabla del número más probable.....	162
8.6.4	Acción microbiana de alcoholes.....	191
8.8.1	Tipos de suciedad.....	199
10.2.1.6	Serotipos de <i>Salmonella</i>	212
11.2	Clasificación de hongos.....	224
15.2	Datos correspondientes al tiempo de destrucción térmica.....	271

RESUMEN

Este Compendio Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos, fué elaborado para la carrera de Ingeniería en Alimentos, pretendiendo ser una material didáctico de apoyo y sobre todo actualizado, que refuerce el curso teórico de la materia " Microbiología General " impartida en el 4o. Semestre de la carrera. Este material a su vez pretende despertar el interés de los alumnos por el amplia mundo de la Microbiología por lo cual se proporciona información de los hechos registrados desde los primeros descubrimientos importantes claro que en la rama de los Alimentos.

El compendio da inicio mencionando los avances que se han llevado a partir del año 1632 cuando *Leewenhock* observo con una pequeña lupa distintos cuerpos minúsculos; posteriormente otros de los hechos relevantes y sobre todo dignos de destacar fueron los descubrimientos hechos por *Pasteur* (Pasteurización), y fué apartir de entonces que se han registrado diversos avances en el campo de la Microbiología teniendo hasta la fecha un gran número de familias microorganismos identificados y clasificados.

La descripción de los microorganismos se da en base a su Morfología y Fisiología Bacteriana y el Metabolismo se enfoca principalmente al Catabolismo y su relación con los procesos fermentativos ya sean beneficios o no. También contempla en forma resumida el Anabolismo bacteriano y su repercusión en su crecimiento. Estos procesos se ven influenciados por los nutrientes del medio en el que se encuentran, en la actualidad se encuentran comercialmente Medios de Cultivo en los cuales se tienen los nutrientes necesarios para un desarrollo invitro de los microorganismos, para lo cual es necesario conocer los procedimientos de Esterilización. Tanto en el laboratorio como en la industria es necesario tener las bases para llevar a cabo la Desinfección y Limpieza. Para el Ingeniero en Alimentos es importante conocer los Analisis Microbiológicos de los Alimentos para asegurar que microorganismos han sido eliminados corretamente, con este fin se describen diversas técnicas de Conteo y el uso de las mismas va a depender de si tenemos Bacterias, Levaduras o Mohos, los cuales pueden llegar a ser beneficios o no. Además de la contaminación con Parásitos y Virus que puede pasar desapercibida en el alimento.

INTRODUCCION.

A lo largo de la Carrera de Ingeniería en Alimentos se adquieren los conocimientos necesarios sobre el manejo, elaboración, conservación y procesamientos de los alimentos; por lo cual resulta importante el tener conocimientos básicos sobre los puntos de control antes, durante y después del manejo y procesamiento de los mismos.

Por tal motivo durante la carrera se imparten materias en las cuales se adquieren conocimientos básicos sobre equipo, instalaciones, manejo de personal, control de calidad, análisis de riesgos y puntos críticos, así como del desarrollo de nuevos productos y tecnologías, con el fin de obtener productos de mejor calidad, menor costo y una mayor calidad higiénica, lo cual repercute en un mayor período de la vida de anaquel de los productos alimenticios.

Una de las materias importantes y básicas en la cual se imparte información importante y fundamental para obtener productos de buena calidad es la Asignatura de Microbiología general, en la cual se proporciona información sobre las necesidades del surgimiento de la Microbiología como ciencia y el fin de sus aplicaciones.

En esta asignatura se obtienen conocimientos sobre el comportamiento básico de las bacterias principalmente ya que son el grupo de organismos más importante que se encuentra involucrado en la alteración de productos perecederos por tener todos los nutrientes básicos esenciales para el desarrollo

de ellos, ya que se estudia como el microorganismo utiliza sus nutrientes, como los degrada en su interior a través del estudio de su metabolismo y como se pueden utilizar sus metabolitos de desecho en nuestro beneficio.

También es necesario saber generalidades sobre Hongos, Parásitos y Virus, ya que estos pueden afectar a los alimentos y como consecuencia al hombre.

Otro punto importante en esta asignatura es la información impartida de la forma como se controlan y manejan los microorganismos presentes en alimentos a nivel laboratorio.

OBJETIVO GENERAL:

Describir el comportamiento básico de las bacterias y relacionarlas con su efecto en los alimentos.

OBJETIVO ACADEMICO:

Elaborar material de apoyo que reúna todos los conceptos básicos de la Microbiología y su relación benéfica o alterante con los alimentos.

OBJETIVO SOCIAL:

Una de las funciones de la F E S - C como institución de educación superior del país, es la transmisión de conocimientos, mediante la investigación y la docencia. Para llevar a cabo estas actividades es necesario contar con material de apoyo que facilite al alumno el estudio de la materia y despierte su interés, por lo cual se espera que este Compendio Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos, cumpla con tal fin.

1. BREVE RESEÑA HISTÓRICA DE LOS MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN ALIMENTOS

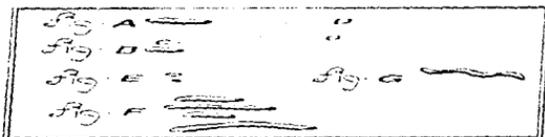
Es difícil precisar los primeros conocimientos acerca de la presencia y acción de los microorganismos en los alimentos. La época precedente al establecimiento de la ciencia bacteriológica se denomina era precientífica.¹⁰

Mikros	pequeño
Bios	vida
Logos	tratado

La Microbiología no surge como una ciencia aislada, sino como una consecuencia de la ya muy esperada Revolución Científica, la cual ve sus orígenes en hechos tan importantes como la invención del Microscopio y muchos hechos que conjuntamente dieron las bases para la cimentación de esta ciencia. Fueron numerosas personas las que contribuyeron al desarrollo de la Microbiología entre las que se distinguen por sus conocimientos:

Antony Leeuwenhoek que en 1632, fué el constructor de uno de los microscopios simples. Leeuwenhoek o tenía ningún título universitario, ni tampoco era estudiante; él era un comerciante con una gran curiosidad. Esta curiosidad estaba enfocada a saber el porqué de los sabores y aromas característicos de las especias, de tal manera que ideó un aparato para poder investigar. Con su lupa observó distintos cuerpos minúsculos. Ver figura 1.1.

FIGURA 1.1 Cuerpos minúsculos vistos por Leeuwenhoek.

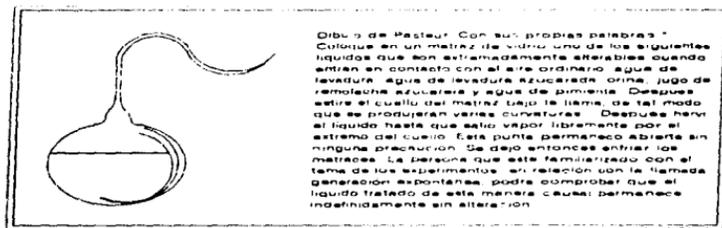


FUENTE: Brock "Microbiología" 1987

Spallanzani (1729 - 1799) fue un opositor de la teoría de la generación espontánea, y para demostrar que esta teoría no era válida, diseñó medios de cultivo para así cuestionar dicha teoría; pero sus estudios no fructificarán, ni se dieron los resultados que él esperaba, esto fue debido a que en su tiempo desconocían la existencia de las esporas que se encuentran dispersas en el aire. Él trató de demostrar que un líquido, tal como la infusión de carne, podría conservarse bien si se hervía y se tapaba bien.

Pasteur enfocó sus experimentos a la búsqueda de datos que le ayudase a demostrar que la tesis de la generación espontánea no era cierta. Diseñó una botella (Ver figura 1.2) donde con toda higiene la materia orgánica permanecía fuera de contacto con los microorganismos y así dejaba de ser un medio de cultivo para los mismos.

FIGURA 1.2. Matraz con cuello de cisne usado por Pasteur.



FUENTE: Brock " Microbiología" 1987

Pasteur logró el establecimiento de la Microbiología como ciencia al descubrir que:

- Algunos microorganismos se desarrollaban en presencia de aire (aerobios).
- Ciertos microorganismos solo se desarrollan en ausencia de aire (anaerobios).
- Los fermentos no se producen espontáneamente.

- Cada fermento es producido por un microorganismos en especial.
- La fermentación prosigue o tiene lugar sin aire.
- El calentamiento a bajas temperaturas impide el futuro deterioro.

Con base en estas conclusiones Pasteur asentó las bases que aún hoy en día se utilizan para el proceso de conservación conocido como Pasteurización. A Pasteur se le atribuye el descubrimiento de la naturaleza de la fermentación.

Moritz Traube quien en 1858 sugirió la existencia de las Enzimas y *Edward Buchner*, por su parte descubrió en 1897 la primera enzima, la Cinasa.

Roberto Koch (1843-1910) contribuyó en forma importante sobre los estudios de Pasteur, principalmente en la teoría inmunológica ya que diseñaron vacunas. Continuando con los estudios de Koch, *Gram* diseñó una técnica de tinción para colorear a las bacterias y así saber su comportamiento y naturaleza. Posteriormente *Petri* diseñó las cajas de cultivo que actualmente llevan su nombre.

Es imposible presentar una relación exacta de todos los progresos históricos importantes; ya que ello escapa a los límites de este compendio. Sin embargo se hace mención de los logros fundamentales para el establecimiento de la Microbiología como ciencia.

Algunos hechos importantes en la historia de la conservación, alteraciones, intoxicaciones, y legislación en materia de alimentos:

1.1 Conservación de alimentos.

- | | |
|------|--|
| 1792 | El químico Swedish utilizó el vinagre en el enlatado de alimentos. |
| 1810 | Appert patentó la conservación de alimentos por medio del enlatado. |
| 1813 | En esta fecha se empleo por primera vez SO_2 como conservador de carne. |
| 1820 | W. Underwood y T. Kensett empezaron en los E.U la producción comercial de |

- alimentos enlatados.
- 1835 Newton obtuvo en Inglaterra la patente para fabricar leche condensada.
- 1837 Winslow fué el primero que conservo el maíz enlatado.
- 1839 Los envases de hojalata son ampliamente usados en los Estados Unidos.
- 1840 El pescado y la fruta se enlatan por primera vez
- 1842 H. Benjamin patento en Inglaterra la congelación de alimentos por inmersión en una mezcla de hielo y sal
- 1843 D. Winslow en Maine ensayo por primera vez la esterilización por vapor fluyente.
- 1853 R. Appert obtiene la patente de la esterilización de alimentos en autoclave.
- 1854 Pasteur dió comienzo a sus investigaciones sobre el vino. En 1867 1867 se introdujo comercialmente el tratamiento térmico para eliminar los microorganismos perjudiciales.
- 1855 En Inglaterra Grinwad obtuvo la leche en polvo.
- 1856 Gail Borden, en los E. U. consiguió una patente para fabricar leche condensada no azucarada.
- 1865 Dió comienzo en los E. U. la congelación artificial del pescado en escala comercial. Más adelante se hizo lo mismo con los huevos.
- 1874 Se extendió el empleo del hielo en el transporte marítimo de la carne. También tubo lugar la introducción de las calderas o cámaras de vapor a presión.
- 1878 Desde Australia llega a Inglaterra el primer cargamento de carne congelada. De Nueva Zelanda a Inglaterra se transporto por primera vez en 1882.
- 1880 En Alemania empezó la pasteurización de la leche.
- 1882 Krukowisch fué el primero que puso de manifiesto los efectos destructivos de Ozono sobre las bacterias.
- 1886 El americano A. F. Spawm desarrollo un procedimiento mecánico para el secado de frutas y verduras.
- 1887 Por primera vez apareció en el mercado la leche maltada.
- 1890 En esta época se extendió la pasteurización comercial de la leche en los E. U.
- 1890 En Chicago alrededor de esta fecha se utilizo la refrigeración mecánica para la conservación de frutas
- 1893 En Nueva Jersey H. L. Cort dió a conocer la certificación de la leche.

- 1895 Russell llevó a cabo el primer estudio bacteriológico del proceso de enlatado.
- 1907 E. Metchnikoff y sus colaboradores aislaron y cultivaron por primera vez la bacteria del yogurth (*Lactobacillus bulgaricus*).
- 1908 En los E. U. el Benzoato de sodio obtiene la aprobación oficial como preservador en determinados alimentos.
- 1916 R. Blanck y K. Reuter llevaron a cabo en Alemania la Congelación rápida de alimentos.
- 1917 En los E.U., Clarence Birdseye, comenzó a trabajar en la congelación rápida de alimentos.
- 1917 Franks registró una patente para conservar las frutas y verduras en atmósferas de CO₂.
- 1920 Bigelow y Esty publicaron por primera vez el estudio sistemático de la resistencia de las esporas al calentamiento a 212 °F. El método general para el cálculo del proceso térmico fue publicado por Bigelow Richardson y Ball. El método fue simplificado por C. O. Ball en 1923.
- 1922 Esty y Meller establecieron el valor Z = 18 °F para las esporas de *C. butulinum* en buffer de fosfato.
- 1923 - 28 En la industria conservera se empezaron a utilizar tratamientos térmicos previamente calculados.
- 1928 En Europa se llevó a cabo a escala comercial la conservación de manzanas en atmósfera controlada.
- 1929 Una patente registrada en Francia, propone la aplicación de radiaciones de alta energía en el proceso de elaboración de alimentos.
- 1929 Birdseye consiguió introducir los alimentos congelados a la venta al por menor.
- 1943 B. E. Proctor, en los E. U., utilizó por primera vez las radiaciones ionizantes para conservar las hamburguesas de carne.
- 1950 El concepto del valor D se introdujo al uso general.
- 1954 En Inglaterra se patentaba el antibiótico Nicina para evitar las alteraciones por Clostridios en la fabricación de ciertos quesos.
- 1955 El ácido ascórbico fue oficialmente admitido como conservador de alimentos.
- 1955 La Clortetraciclina se utilizó en la conservación de pollos frescos (la

oxitetraciclina un año más tarde)

- 1967 En los E. U. se efectuó el primer ensayo comercial sobre planificación y desarrollo de alimentos irradiados.

1.2. Alteraciones de alimentos.

- 1659 Kircher demostró la presencia de bacterias en la leche; Bondea hizo otro tanto en 1847.
- 1680 Leewenhock Fue el primero en observar las células de las levaduras.
- 1780 Scheele identificó el ácido láctico como el principal ácido presente en la leche.
- 1836 Latour descubrió la existencia de las levaduras.
- 1839 Kircher examinando jugo de remolacha encontró organismos que producían viscosidad cuando crecían en soluciones azucaradas.
- 1857 Pasteur demostró que el agriado de la leche obedecía al crecimiento de M. O.
- 1866 Pasteur publicó la obra Estudio del vino.
- 1867 Mantín lanzó la teoría de que el proceso de maduración del queso era análogo al de las fermentaciones alcohólica, láctica, butírica.
- 1873 Gallon hizo el primer estudio acerca de las alteraciones microbianas de los huevos.
- 1876 Tindal observó que siempre es posible aislar las bacterias de productos en descomposición apartur del aire, sustancias adicionadas o de los envases utilizados.
- 1878 Cienkowski publicó el primer estudio microbiológico del limo de azúcar y del *Leuconostoc mesenteroides* aislado en él.
- 1887 Forsier demostró la posibilidad de crecimiento de cultivos puros de bacterias a 0 ° C.
- 1888 Miquel estudio por primera vez las bacterias termofílicas.
- 1895 Von Geuns en Amsterdam, efectuó el recuento de bacterias en la leche.
- 1902 El término de Psicrófilo fue usado por Schmidt - Nielsen para microorganismos que crecen a 10 ° C.
- 1912 Richter inventó el término osmófilo para definir a las levaduras que crecen bien en un ambiente de elevada presión osmótica.

- 1915 *Bacillus coagulans* fué aislado por primera vez de la leche coagulada por B. W. Hammer.
- 1917 *Bacillus stearothermophilus* fué aislado por primera vez de la crema por J. P. Donk.
- 1933 Olliver and Smith en Inglaterra observaron el *Byssoschlamys fulva*; primero fué descrito en los E. U en 1964 por D. Maunder.

1.3. Envenenamiento por alimentos

- 1820 El poeta germano Justinus Kerner describió el envenenamiento con salchicha (que con toda probabilidad fué el botulismo) y es una alta razón de fatalidad.
- 1857 La leche es considerada como el transmisor de la fiebre tifoidea por W. Taylor de Penrith Inglaterra.
- 1870 Francisco Selmi avanza en la teoría del envenenamiento por tomama lo que explica la enfermedad contraída por comer ciertos alimentos.
- 1888 Gaertner fué el primero en aislar *Salmonella enteritidis* de medios que causarón 57 casos de envenenamientos por alimentos.
- 1894 T. Dennis fué el primero en asociar el *Staphylococcus* con el envenenamiento alimentario.
- 1896 Van Ermengem fué el primero en descubrir el *Clostridium botulinum*.
- 1904 La primera cepa de tipo A de *C. botulinum* fue identificada por G. Landman.
- 1906 *Bacillus cereus* fué reconocido en el envenenamiento alimentario. El primer caso de difilobotriasis fué reconocido.
- 1926 El primer reporte de envenenamiento alimentario por *Streptococcus* fué hecho por Linden, Turner y Thom.
- 1937 Una cepa tipo E de *C. botulinum* fué identificada por L. Bier y E. Hazen.
- 1937 El primer envenenamiento de parálisis por aceite de pescado fué reconocido.
- 1938 El primer brote de *Campylobacter enterus* fué detectado en leche en Illinois.
- 1939 La gastroenteritis causada por *Yersinia enterocolitica* fué reconocida por primera vez por Schleifstein y Coleman.
- 1945 Mc Clung fué el primero en probar el estado etológico de *Clostridium perfringens*

- (Welchii) por alimentos envenenados.
- 1951 El *Vibrio parahaemolyticus* fué reconocido como el agente causal del envenenamiento de alimentos por T. Fujino en Japón.
- 1955 Sim Tarides entre el colera y el *Escherichia coli* causando gastroenteritis en infantes fué notado por S. Thompson.
- Residuos de Histamina son asociados con el envenenamiento.
- El primer documento de Anisakiasis ocurrió en los E. U.
- 1960 Una cepa tipo F de *C. botulinum* fue identificada por Moller y Scheibel.
- La producción de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* fué reportada por primera vez.
- 1965 La giardiasis es asociada con los alimentos por primera vez.
- 1969 La enterotoxina de *C. perfringens* fué demostrada por C. L. Duncan y D. H. Strong.
- C. botulinum* tipo G fué aislado por primera vez en Argentina por Gimenez y Ciccarelli.
- 1971 La primera epidemia gastroenterica provocada por alimentos contaminados con *Vibrio parahaemolyticus* ocurre en Mary Land.
- Es documentada por primera vez una epidemia de gastroenteritis por *E. coli* asociada por alimentos contaminados ocurrida en los E. U.
- 1975 La enterotoxina de *Salmonella* fué demostrada por L. R. Koupal y R. H. Deibel.
- 1976 La primera epidemia de gastroenteritis en E. U. causada por alimentos contaminados con *Yersinia enterocolitica* ocurrió en New York.
- El botulismo infantil fué reconocido por primera vez en California.
- 1978 Es documentada una epidemia de gastroenteritis asociada a contaminación alimentaria causada por el virus Norkwalk ocurrido en Australia.
- 1979 La contaminación de alimentos causa gastroenteritis por un *Vibrio cholerae* No 01, ocurrida en Florida. Una primera epidemia ocurrió en Checoslovaquia en 1965 y en Australia en 1973.
- 1981 La contaminación de alimentos con listeria causa una epidemia que fué reconocida en los E. U.

- 1982 Una primera epidemia de colitis hemorrágica asociada con la contaminación de alimentos ocurre en los E. U.
- 1983 Una enterotoxina de *Campylobacter jejuni* fué descrita por Ruiz - Palacios y otros.

1.4. Legislación de alimentos.

- 1890 La primera inspección federal de la carne fué decretada. Es requerida la inspección de carnes para exportación.
- 1895 La ley de la inspección previa de la carne fué decretada y confirmada provisionalmente.
- 1906 En E. U. la ley de la Federal Food an Drugs fué enviada a los congresos.
- 1910 En la ciudad de New York el consejo de salud edito una orden sobre la pasteurización de la leche.
- 1939 La nueva ley de Food, Drugs and Cosmetics fué convenida por derecho.
- 1954 Los pesticidas químicos Miller enmienda a la Food, Drugs and Cosmetics una ley, la cual fué enviada al congreso.
- 1957 En los E. U. la compulsora de aves de corral y productos derivados decreto una ley.
- 1958 The Food Additives enmienda a la Food, Drugs and Cosmetics una ley que fué aceptada.
- 1962 La ley de The Talmadge - Aiken (se admite la inspección federal de la carne por estado) fué decretada.
- 1963 En E. U. la administración de Food and Drugs aprueba el uso de radiaciones en tocino.
- 1967 En E. U. solamente un decreto sobre la carne fué enviada al congreso y aceptada como ley el 15 de diciembre.
- 1968 La administración de Food and Drugs saca en 1963 la aprobación de la irradiación del tocino.
-El proyecto de ley en la inspección de aves de corral fué significativa dentro del decreto.
- 1969 En los E. U. la administración de Food and Drugs establece un nivel permisible

de 20 ppmt de aflatoxinas para granos comestibles y nueces.

- 1973 El estado de Oregon adopta los estandares microbiológicos para carne fresca y procesada. Esta fué revocada en 1977.
- 1984 Un proyecto de ley fué introducido en los E. U. en las casas representativas para promover la irradiación de alimentos entre otras cosas, definiendo la irradiación como un proceso mismo que se puede usar en los aditivos alimenticios.¹²

2. MORFOLOGIA BACTERIANA.

La Microbiología es el estudio de los microorganismos, en un grupo grande y diverso de seres vivos que, existen como células individuales o como agrupaciones de células. Las células microbianas son distintas de las células animales y vegetales, puesto que estas últimas no son capaces de vivir aisladas en la naturaleza, sino en grupos característicos.²⁷

Microscópicamente se pueden distinguir dos tipos de células las que tienen núcleo y las que no; estos dos tipos de células son los mayoritarios en el mundo. Las células que contienen la información genética encerrada dentro de una membrana nuclear son las células Eucariotes y las células que no tienen núcleo, por lo cual su información genética (hereditaria) en una región celular en el citoplasma.

La célula procarionte y eucarionte tienen diferente organización subcelular, (estas diferencias serán mencionadas más adelante) y la división y clasificación de los reinos se basa en la misma la que nos lleva a conocer los 5 reinos propuestos por R.H. Whittaker.

Reino animal	Reino monera
Reino vegetal	<i>Reino protista</i>
Reino fungi	

Los reinos animal, vegetal y fungi tienen una clasificación aparte ya que la microscopía electrónica revela las diferencias entre estos tres reinos y los reinos monera y protista. Una de las principales diferencias radica en el tipo de célula o agregados de células que conforman los organismos de el reino animal, vegetal y fungi, la cual es de tipo eucarionte.

De los reinos monera y protista se dice que los microorganismos eucarióticos se clasifican dentro del reino protista y los procariontes en el reino monera, de ahí que el reino monera sea considerado o más bien se conozca como reino procarionte. *E.M. Haeckel* (1834 . 1919) propuso que los protozoos, algas bacterias y algunos hongos se deriven del

reino protista.

Este nuevo reino es de interés para nosotros ya que en este reino los microbiólogos proponen se reúnan los microorganismos, por lo cual a continuación hablaremos más a fondo sobre las características de este reino.))

2.1 Reino protista.

El grupo de microorganismos clasificados en el reino protista son los protozoos, algunas algas y hongos flagelados en agua. Los protozoos son microorganismos eucarióticos unicelulares, ellos son usualmente más grandes que las bacterias, muchos de estos protozoos como el *Paramecium* se mueven por cilios y el más común es la *Ameba* el cual se mueve por extensión del citoplasma. Algunos protozoos son inofensivos más sin embargo algunos pueden causar desequilibrios serios a los humanos como por ejemplo la *Giardiasis*, la cual provoca infecciones intestinales causada por la ingestión de agua contaminada.

2.2 Reino Monera (Procarionte).

Las bacterias y las cianobacterias pertenecen a este reino y se diferencian de otros organismos por el hecho de carecer de membrana nuclear y de otros organelos. Estos organismos son conocidos como procariontes. Todos los demás seres vivos son eucariotes; es decir organismos cuyas células tienen un núcleo bien definido, rodeado por una membrana nuclear. Las bacterias son organismos microscópicos que actúan como desintegradores del ecosistema. Las cianobacterias se parecen estructuralmente a las bacterias, pero contienen el pigmento verde " Clorofila ".

La bacteria es un organismo bastante rudimentario y se puede decir que fué la primera forma de vida en el mundo (célula procaríótica), bacterias y algas cianofitas. Existe una gran diversidad en forma, tamaño y manera de gastar su energía, no obstante ellos son organismos unicelulares y solo algunas especies forman agregados de células. La mayor parte de las bacterias se dividen en un proceso asexual por fisión binaria en donde el resultado de esta división celular da como resultado dos células hijas idénticas.

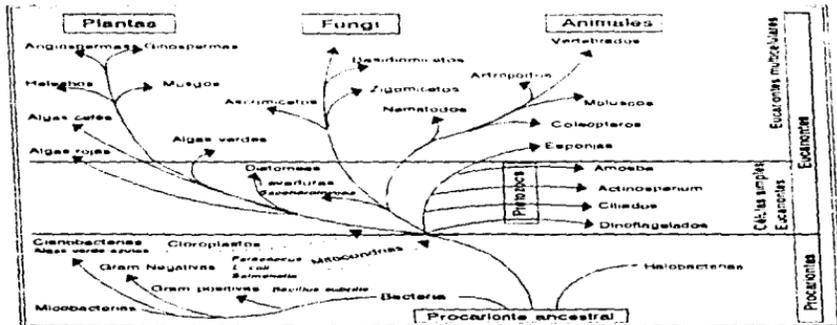
La clasificación general de este reino se basa principalmente en la organización celular.

Célula procaritótica -----> Reino procarota

Las células de todos los organismos superiores, como las plantas y los animales son eucarióticos, hay una gran variedad de células, pero todas tienen en común que sus funciones celulares se localizan en organelos intracelulares.

Los organismos procaritóticos, como grupo son tan diferentes tanto de los animales como de los vegetales que sería absurdo intentar colocarlos en uno u otro grupo por eso se clasifican en otro diferente.

A continuación presentaremos una tabla comparativa de las células eucariote y procarote con el fin de ver las diferencias y entender porque se dice aquí que la célula procaritote es realmente simple. (ver la figura 2.3.1.)



* Compuesto Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos *

TABLA 2.2. Comparación de entre la célula procarionte y la eucarionte.

Estructura y funciones nucleares	Procariontas	Eucariontas
Retículo endoplasmático	Ausente	Presente
Núm de cromosomas	1	> 1
Núcleo	Ausente	Presente
Membrana nuclear	Ausente	Presente
Apurto de Golgi	Ausente	Presente
Lisosomas	Ausente	Presente
Cloroplastos	Ausente	Presente en plantas
Sitio de transporte de electrones	Membrana celular	Organelos
DNA	1 sola molécula	En varios o muchos cromosomas
Pared celular	Pared química compleja (glucopéptidos)	Cuando hay esta compuesta de materiales simples, orgánicos e inorgánicos
Ribosomas	70 S	80 S
Sistema respiratorio	Es parte de la membrana plasmática o de los mesosomas	En las mitocondrias
Flagelos	Tamaño microscópico, compuesto de una fibra de dimensiones moleculares	Flagelos o cilios, tamaño microscópico, compuesto de elementos microtubulares
Reproducción sexual	Proceso fragmentario, no hay meiosis, habitualmente solo se reorganizan porciones de la dotación genética	Proceso regular, meiosis, reorganización de la dotación cromosómica completa
Tamaño	Generalmente pequeño, suele ser de 2µm de diámetro	Generalmente mayor, 2 µm a 100 µm de diámetro

FUENTE: Nerdhart * Physiology * 1990

2.2.1 Comparación entre las células procarionte y eucarionte.

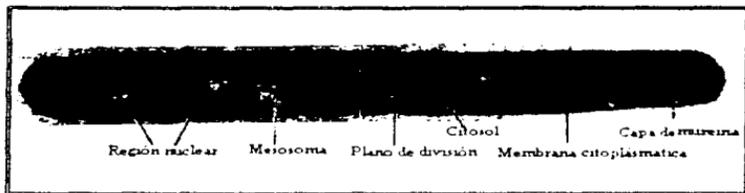
Una de las diferencias entre las dos células y que merece destacarse es el tamaño del ribosoma. Los procariontes tienen ribosoma 70 S, compuesto de dos subunidades una 50 S y una 30 S. Los ribosomas de los eucarióticos son de 80 S y están compuestos por uno

60 S y uno 40 S.

En la tabla se pueden observar que las principales diferencias son estructurales, aunque debemos recordar que ambos grupos de organismos son similares químicamente. Ambos contienen proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos de composición parecida, y ambos utilizan el mismo sistema de maquinaria metabólica. Las principales diferencias químicas encontradas hasta ahora son principalmente

1. La presencia de esteroides en las membranas de los eucariotas pero no de los procariotas. (Excepto *Mycoplasma*.)
2. La química de la pared celular.

FIGURA 2.2.1 Estructura celular de una bacteria.



FUENTE: Neidhart * *Physiology* * 1990

2.3. Principales formas y agrupaciones bacterianas.

Las bacterias son organismos procarióticos unicelulares, cada una de estas células son fisiológicamente independientes, pero quedan bajo influencia de los cambios ambientales provocados por las células vecinas o por productos celulares.¹⁴

Los microorganismos varían no solo en tamaño, sino también en forma, la cual afecta su funcionamiento y su estabilidad, en la actualidad se dividen en dos grandes grupos que son:

- Cocos (griego y latín, granos) son organismos más o menos esféricos
- Bacilos (latín, bastones) son bastoncillos rectos o ligeramente curvados.

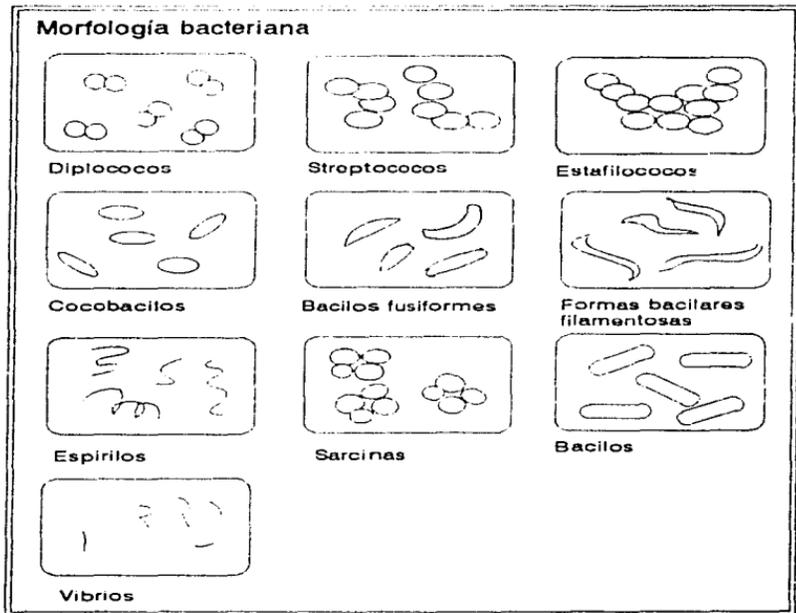
De estos dos grandes grupos el 60 % lo conforman las bacterias.

Los cocos y bacilos pueden presentarse de diversas formas (Ver figura 2.3.1), según los planos en los que se dividan:

- 1) Diplococos (Streptococcus) predominan en pares.
- 2) Streptococos (Streptococcus) se encuentran en cadenas.
- 3) Estafilococos (Staphylococcus, del griego staphyle, racimo de uvas).
- 4) Sarcinas (latín, fardos), son los cocos que permanecen adheridos después de una separación sucesiva en dos o tres direcciones perpendiculares, dando tétradas, cuadradas o aglomeraciones cúbicas.
- 5) Cocobacilos, son bacilos extremadamente cortos.
- 6) Bacilos fusiformes, son bacilos más delgados en sus extremos.
- 7) Vibriones o espirilos, crecen en forma de fibras, formas filamentosas y en formas curvas.

Los cocos al ser redondos se distorsionan menos y por lo tanto resultan más resistentes a la desecación.

FIGURA 2.3 Diferentes estructuras bacterianas.



2.4. Principales organelos bacterianos.

A continuación se estudiarán los principales organelos que conforman una célula procariótica (una bacteria), haciendo referencia a su función y composición , tomando en cuenta la importancia que tienen cada uno de ellos dentro de la célula.

2.4.1 Flagelos.

Los flagelos (latín, flagellum, sing: látigo),son filamentos largos, sinuosos y sin ramificar,que ordinariamente tienen mayor longitud que el diámetro máximo de la célula son de grosor uniforme en toda su longitud y se encuentran situados en el exterior del cuerpo celular.

La longitud promedio de un flagelo es de 24 μ y el diámetro es de 12 μ y son por consiguiente del mismo orden de espesor de una sola molécula de proteína por lo que son demasiado pequeñas para observarlos con un microscopio óptico.

Mediante una agitación prolongada de una suspensión bacteriana seguida de una centrifugación diferencial, se han podido obtener preparaciones puras de flagelos. Su análisis demuestra que los flagelos se componen enteramente por proteínas.¹⁴

La proteína obtenida se llama flagelina y su composición no es muy típica, ya que está compuesta por pequeñas cantidades de amino-ácidos azufrados y aromáticos siendo más abundante el ácido aspártico y glutámico. La forma y longitud del flagelo vienen determinados por la estructura de la proteína flagelina y un cambio en su estructura puede conducir a un cambio en la morfología del flagelo.

Los flagelos no tienen formas estradas sino helicoidales y se originan en cuerpos basales; el cuerpo basal del flagelo se halla unido a la membrana citoplásmatica (Figura 2.4.1).

La movilidad de las bacterias verdaderas se efectúa por el movimiento rítmico de los

¹⁴ Compendio Básico de Microbiología Aplicada a Los Alimentos

flagelos, estos flagelos realizan movimientos de dos tipo:

Quimiotáctico + Para acercarse a sustancias útiles para el Microorganismo.

Quimiotáctico - Para alejarse de sustancias nocivas para el Microorganismo.

Estos movimientos son evidentemente ventajosos para un organismo móvil en su ambiente natural, puesto que capacitan al organismo para abandonar los ambientes desfavorables.

Se desconoce el modo en el que el organismo es capaz de controlar su movimiento flagelar al responder a un estímulo quimiotáctico. Evidentemente, tiene que existir algún sistema de coordinación dentro de la célula para que el movimiento sea posible; parece ser que es por receptores a nivel de membrana que detecta el ambiente beneficioso y el hostil.

Una de las desventajas cuando se tiene un microorganismo flagelado, es que su motilidad deslizante implica de cierta manera una interacción entre la célula y el medio en el que se encuentra. Debido a que los flagelos le confieren motilidad a la célula es más probable que la bacteria detecte los ambientes favorables y los dañinos para su desarrollo provocando así que este responda a los estímulos buscando generalmente los ambientes benéficos para su desarrollo y por supuesto para su proliferación, lo cual conduce a una contaminación rápida del medio en el que se encuentra, tomando en cuenta que este medio puede ser un alimento la contaminación bacteriana de este tipo reducirá de cierta manera la vida útil del mismo.

Según el número presente y la localización de los flagelos en las bacterias se pueden clasificar en :

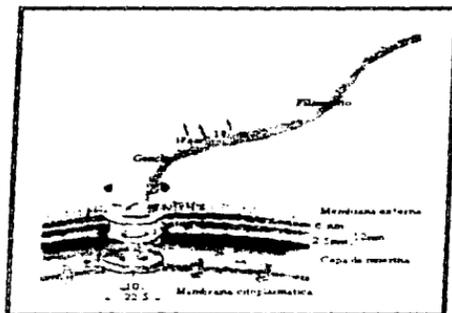
- | | |
|-------------------------|---|
| 1) Monótricos | Con un solo flagelo polar. |
| 2) Anfítricos o polares | Con un flagelo en cada extremo. |
| 3) Lofótricos | Con un mechón de flagelos en ambos polos. |
| 4) Peritricos | Los flagelos están distribuidos al azar |

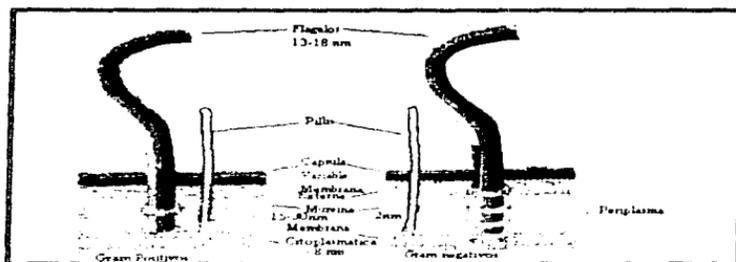
5) Atricos

en la superficie de la célula.
Aquellos que no tienen flagelos.

En la figura 2.4.1.2 se muestran algunos de los géneros bacterianos en los cuales hay flagelación.

FIGURA 2.4.1 Estructura basal de un flagelo.





FUENTE: Neidhart "Fisiología" 1990

FIGURA 2.4.1.1 Flagelos bacterianos

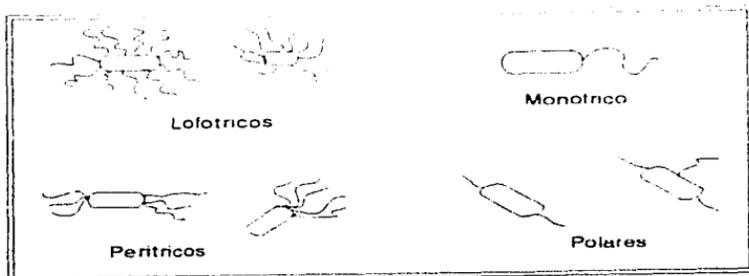
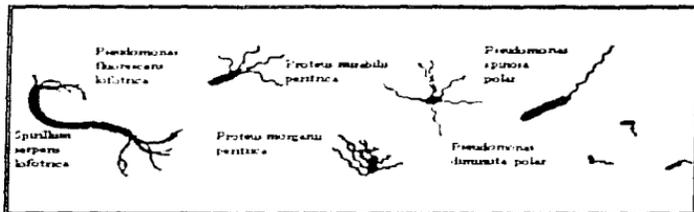


FIGURA 2.4.1.2 Géneros bacterianos con flagelación.



FUENTE: Brock * Microbiología * 1987

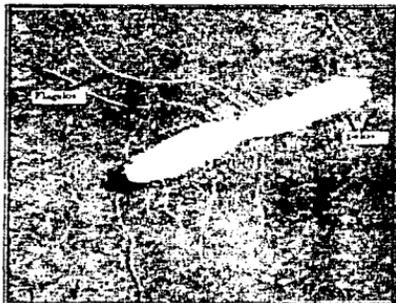
2.4.2 Fimbrias.

El término fimbria significa franja. Son estructuras algo análogas a los flagelos, pero que no están relacionadas con la motilidad. Las fimbrias o pelos son considerablemente más cortos y rígidos que los flagelos y mucho más numerosos en la célula (Ver la figura 2.4.2)

Las fimbrias están constituidas por sustancia proteica llamada pilina. No todos los organismos tienen fimbrias, y la capacidad de producirlos es un carácter hereditario. Las fimbrias se encuentran casi exclusivamente en las bacterias Gram - y solo en unas cuantas Gram +.

Las fimbrias ayudan al organismo a sujetarse o adherirse a superficies de las mucosas así como a superficies inertes para formar películas ó espuma sobre superficie líquida.²⁷

FIGURA 2.4.2 Célula bacteriana con flagelos y fimbrias.



FUENTE: Brock - Microbiología - 1987

Las fimbrias son de dos tipos, sexuales y ordinarias (sosten), las sexuales son mucho más largas que las de sosten. Los pelos *F* se distinguen de los demás tipos de pelos en que tienen un botón terminal, y con frecuencia de mayor espesor y más largos; permitiendo el paso de material genético de una bacteria a otra, pasando información como para la producción de toxinas, o la resistencia a diversos factores como pueden ser los factores ambientales (temperatura, humedad, etc.)

Las funciones de la fimbria no se conocen bien. En algunas bacterias patógenas, los pelos participan en el proceso de invasión facilitando la fijación de las bacterias en las células del organismo huésped o del alimento.

2.4.3. Glicocalix

El glicocalix es una masa de fibras enmarañadas, constituidas por polisacáridos de moléculas ramificadas que se extienden desde la superficie bacteriana y forman un complejo glicocalix que rodea a las células individualmente o a una colonia de ellas. El glicocalix es un determinante crítico para la iniciación y progresión de varias enfermedades producidas por las bacterias, como la caries dental y la neumonía.

El glicocalix se extiende a partir de la envoltura celular externa de la bacteria. El glicocalix está formado por una masa de largas fibras de polisacáridos. Las fibras están constituidas por cadenas de monosacáridos sintetizados por las enzimas bacterianas denominadas Polimerasas, asociadas a los polisacáridos, las fibras del glicocalix se adhieren a la superficie próxima de la célula, en este caso una superficie inerte; además las fibras del glicocalix canalizan varios tipos de nutrientes hacia la célula bacteriana: Estos nutrientes pueden ser azúcares, aminoácidos e iones inorgánicos. Estos nutrientes penetran en el interior de la célula a través de los conductos de la membrana celular, por moléculas proteicas.

2.4.4. Cápsula.

La cápsula protege a las bacterias siendo una característica dada a nivel genético y la presencia de la misma depende del medio en que se encuentre. La mayoría de las cápsulas están formadas por polisacáridos relativamente simples, que contienen secuencias repetidas de dos o tres tipos de azúcares, además de polipéptidos, o complejos de polisacáridos y proteínas.

La capacidad para producir cápsula es una propiedad hereditaria del organismo, pero éstas estructuras no son componentes celulares absolutamente esenciales. Las cápsulas se forman a menudo sólo cuando un organismo se desarrolla en un medio de cultivo determinado. Cuando entra al organismo una bacteria con cápsula es más difícil destruirla.

La cápsula o capa mucosa localizada, capacita a la célula para adherirse a la superficie,

un Gram -, esta Gram - es más compleja en sus estructura y funcionamiento. En la figura 2.4.5.1 y 2.4.5.2 se pueden observar estas diferencias.

Componentes de la pared Gram -

Las paredes celulares de las bacterias Gram - contienen 3 componentes que yacen exteriores a la envoltura de peptidoglucano: lipoproteína, membrana exterior y lipopolisacárido.

- Lipoproteína. Las moléculas de una lipoproteína poco usual sirve para entrecruzar la membrana exterior y las envolturas del peptido glucano.

- Membrana externa. Es una típica capa doble de fosfolípidos en la cual una gran parte de los mismos de la capa externa han sido sustituidos por moléculas de lipopolisacáridos.

- Lipopolisacáridos. Los lipopolisacáridos de las paredes celulares de las bacterias Gram - están conformadas por un lípido denominado lípido A, al cual se ha fijado un polisacárido de unidades repetidoras de azúcares.

El lípido A consiste en una serie de unidades de Glucosaminidisacáridos conectados mediante puentes pirofosfato a los cuales se les han fijado numerosos ácidos grasos de cadena larga.

Componentes de la pared Gram +

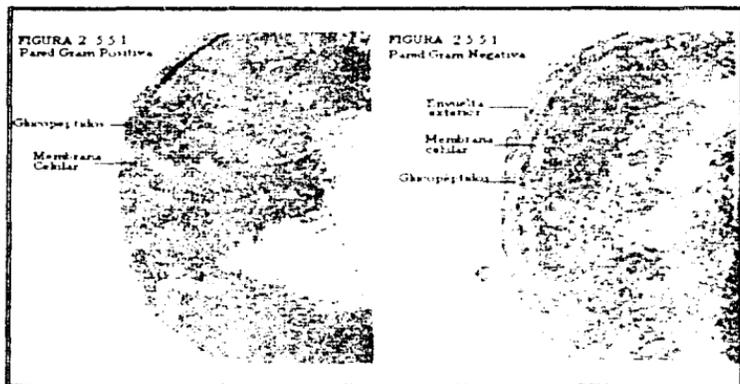
La mayoría de las paredes celulares de las bacterias Gram + contienen cantidades considerables de ácidos teicoicos, además algunas paredes celulares pueden contener algunas moléculas de polisacáridos.

- Peptidoglucanos. Casi el 90 % de la pared Gram + está constituida por peptidoglucanos. La estructura de los peptidoglucanos esta presente únicamente en las

células procariotas

- Ácidos teicoicos. Las bacterias Gram + no tienen una capa externa de lipopolisacáridos unida a su pared celular, generalmente presentan polisacáridos ácidos que reciben el nombre de ácidos teicoicos. Los ácidos teicoicos contienen unidades repetidas ya sea de glicerol o ribitol (ambos - poliols). Las unidades de poliols están conectadas por ésteres de fosfato y usualmente tienen unidos otros - carbohidratos y D-alanina. Los ácidos teicoicos además fija el ión magnesio e intervienen en el suministro de este ión a la célula.

De acuerdo con las diferencias antes marcadas en la composición química entre las bacterias Gram - y Gram + se desarrolló un método para su rápida identificación, el cual consiste en realizar un frotis con los microorganismos a los cuales se quiere identificar el tratamiento que se le da a este frotis inicia cuando con una solución de cristal violeta se anega el portaobjetos, posteriormente se anega con solución de lugol, el cual se decanta posteriormente siguiendo a este paso un lavado y un decolorado rápido con una mezcla de acetona- alcohol, paso seguido se tiñe con safranina la cual se enjuaga. La diferencia entre una bacteria Gram + y una Gram - radica en que los Gram + retienen la combinación de lugol y cristal violeta. Mas adelante se describe el Método de tinción de Gram más detalladamente.



FUENTE: Brock * Microbiología * 1987

2.4.5.1. Método de tinción de Gram.

Fué desarrollado en 1883 por *Christian Gram* en Dinamarca.

Esta técnica da información sobre propiedades estructurales de la bacteria que permiten separarlas en Gram + y Gram - que como se vio anteriormente son diferentes en composición lo cual permite separarlas en estos dos grupos.

Cuando se les tinte con cristal violeta y se les trata con soluciones débiles de yodo, todas las bacterias se tinen de un color muy purpura. Forma un complejo Cristal violeta-Yodo-RNA, que lo hace más estable y al decolorar la célula se deshidrata y el colorante

quedará retenido en la pared. Si se les trata subsecuentemente con alcohol o acetona, las bacterias Gram + retendrán la coloración por más tiempo que las bacterias Gram -. Se les atribuye esta diferencia al contenido de lípidos mucho más elevados de las paredes celulares de las bacterias Gram -. El alcohol elimina casi todos los lípidos de la pared celular de las bacterias Gram - rápidamente, liberando así los complejos cristal violeta - yodo que se han formado, y al adicionar el colorante de contraste (Safranina) es tomado por la bacteria y se observa entonces con un color rosa.

Reactivos.

a) Solución A:

Violeta cristal	2 g.
Alcohol etílico al 95 %	20 ml.
Pueden ser usados la Violeta de metilo y la Violeta de Genciana.	

b) Solución B:

Oxalacetato amónico	0.8 g.
Agua destilada	80 ml.

Se mezclan las soluciones A y B, se almacenan 24 horas y se filtran con papel.

Yodo de Gram.

Disolver 1 g. de yodo potásico en 70 ml. de agua estilada.

Agregar 0.5 g de yodo y completar con agua hasta 100 ml. Agitar hasta que el yodo se disuelva. Almacenar en recipiente opaco.

c) Acetona - Alcohol (para decolorar).

Alcohol etílico al 95 %	250 ml.
-------------------------	---------

Acetona

250 ml.

Se usan partes iguales de acetona y alcohol etílico al 95%. También pueden emplearse a otras proporciones, pero debe recordarse que la mayor cantidad de alcohol retrasará la pérdida de coloración normal, y que mayor cantidad de acetona la adelantará.

d) Safranina (contracoloración).

Safranina en solución al 2.5% en alcohol etílico al 95 %	10 ml.
Agua destilada	100 ml.

Procedimiento.

- 1.- Preparar y fijar un frotis para tinción del microorganismo en estudio.
- 2.- Agregar al portaobjetos una la solución de cristal violeta por un lapso de 30 seg. ó un min.
- 3.- Se enjuaga suavemente con agua destilada.
- 4.- Poner solución de lugol durante 30 seg. ó un min.
- 5.- Decantar la solución de lugol sin lavar.
- 6.- Lavar el frotis con agua y decolorar rápidamente con la mezcla de acetona-alcohol. Recuerdese que este es el paso más crítico en la reacción. Se obtiene una pérdida de color normal, decoloración adecuada, cuando se inclina el portaobjetos y se hace correr la mezcla de acetona-alcohol sobre el frotis hasta que no aparezca más " azul " por 2 minutos.
- 7.- Teñir con safranina que es el colorante de contraste durante 30 seg. ó un min.

8.- Enjuagar y dejar secar.

En el primer paso todos los microorganismos se tiñen de violeta y todos toman un color azulado, después del tratamiento con la solución de yodo. El yodo sirve como mordiente para fijar la tinción de violeta-RNA de ciertos tipos de organismos en forma tal que no se pierde con el decolorador.

El colorante de contraste tiñe a los organismos que han sufrido una decoloración.

Resultados:

Los organismos que retienen la combinación de yodo y cristal violeta, se clasifican dentro de las Gram +, los que sufren pérdida de su color y son contrañeidos son la tinción roja se clasifican dentro de los Gram -,^{2,19}

Nota: El frotis se hace de la siguiente manera:

Se enfría el asa sumergiéndola en el agar, se coge una colonia y se coloca en un portaobjetos; se disuelve en una gota de H₂O. La muestra se fija pasando el portaobjetos 3 veces por el fuego, la muestra se seca al medio ambiente.

El método de Tinción de Gram es importante ya que como paso inicial se puede dar una clasificación general de las bacterias en Gram + o en las Gram -, lo que tiene gran relevancia en el proceso de identificación y clasificación de los diversos géneros

bacterianos por lo cual a continuación se presentan dos tablas donde se puede observar esta clasificación:

TABLA 2.4.5.1 Géneros bacterianos clasificados como Gram +.

I. BACTERIAS GRAMPOSITIVAS				
Forma de la célula	Movilidad	Otras características destacadas	Género	Familia
Cocos	Cis: todas son	Cebras que forman agrupaciones	<i>Staphylococcus</i>	Micrococcales
	permanentemente	cubos	<i>Micrococcus</i>	
	inmóviles	Cebras organizadas irregularmente	<i>Staphylococcus</i>	
		Cébras en cadena fermentación	<i>Streptococcus</i>	Lactobacillales
		cadena de los azúcares	<i>Diphtheria</i>	
			<i>Leuconostoc</i>	
Bastones rectos	Cis: todas son	Fermentación láctica de los azúcares	<i>Lactobacillus</i>	Lactobacillales
	permanentemente	Fermentación propionica de los	<i>Propionibacterium</i>	Propionibacteriales
	inmóviles	azúcares	<i>Corynebacterium</i>	Corinebacteriales
		Cadavérica, débilmente fermentativa	<i>Listeria</i>	Bacillales
			<i>Enteropneustes</i>	
	Móviles, con flagelos	Producción Aerobios	<i>Bacillus</i>	Bacillales
	periféricos y	endosporicos	Aerobios	
	bridas inmóviles		<i>Clostridium</i>	
	reducidas			

FUENTE: Brock " Microbiología " 1987

TABLA 2.4.5.2 Géneros bacterianos clasificados como Gram -.

II. BACTERIAS GRAMNEGATIVAS, EXCLUYENDO LAS FORMAS FOTOSINTÉTICAS

Forma celular	Movilidad	Otras características distintas	Género	Familia	
Cocos	Permanente	Aerobios	<i>Neisseria</i>	Neisseriaceae	
		Anaerobios	<i>Veillonella</i>		
	Móviles	Aerobios	Fermentación láctica mixta de azúcares	<i>Brucella</i>	Brucellaceae
				<i>Pasteurella</i>	
				<i>Haemophilus</i>	
<i>Bordetella</i>					
Bastones rectos	Móviles, con flagelos peritricos y formas inmóviles rearticuladas	Aerobios facultativos	<i>Escherichia</i>	Enterobacteriaceae	
			<i>Erwinia</i>		
			<i>Shigella</i>		
			<i>Salmonella</i>		
			<i>Proteus</i>		
	Aerobios	Fijadores libres de nitrógeno Fijadores simbióticos de nitrógeno	Fermentación de los azúcares por busilengico	<i>Enterobacter</i>	Azetobacteraceae
				<i>Serratia</i>	
				<i>Arthobacter</i>	
				<i>Rhodospirillum rubrum</i>	
				<i>Rhodospirillum rubrum</i>	

TABLA 2.4.5.2 Continuación de la tabla anterior.

II. BACTERIAS GRAMNEGATIVAS, EXCLUYENDO LAS FORMAS FOTOSINTÉTICAS (continuación...)						
Forma celular	Movilidad	Otras características distintas		Género	Familia	
Bastones rectos	Móviles, con flagelos polares	Aerobios	Oxidán compuestos inorgánicos	<i>Nitrosomonas</i>	Nitrobacteriaceas	
					<i>Nitrobacter</i>	
					<i>Thiospirillum</i>	Thiobacteriaceas
			Oxidán compuesto orgánicos	<i>Pseudomonas</i>	Pseudomonaceas	
				<i>Aerobacter</i>		
			Aerobios facultativos		<i>Photobacterium</i>	
				<i>Zymomonas</i>		
				<i>Aeromonas</i>		
Bastones curvos	Móviles, con flagelos polares	En coma	Aerobios	<i>Vibrio</i>	Espiriláceas	
			Anaerobios	<i>Desulfovibrio</i>		
				<i>Spirillum</i>		

2.4.6. Membrana citoplasmática.

La membrana es una capa delgada, estructura que rodea por completo a la célula: mide unos 75 nm. de espesor, emparedada entre dos capas más oscuras, cada una con un espesor entre 2 y 3 nm. (Ver la figura 2.4.6)

La parte externa, separa al medio intracelular del extracelular. Es la principal responsable del control sobre el ingreso y la salida de sustancias de la célula. Al destruir la membrana, se destruye la integridad de la célula.))

La membrana está compuesta de lipoproteínas, de estos complejos; contiene de 60-75 % de proteína y de 25-40 % de lípidos; los lípidos son principalmente fosfogliceráldehidos, fosfolípidos, esfingolípidos y glucolípidos. Los fosfolípidos, forman la estructura base de la membrana. Las moléculas de los fosfolípidos se dispersan en el agua de tal forma que los grupos insolubles de esta (hidrófobos) se asocian de un lado y los grupos iónicos (hidrófilos) se asocian por el otro. Las proteínas son hidrófobas y se asocian quedando embebidas en la matriz fosfolípida. Las moléculas de proteína están ligadas a los grupos iónicos y las moléculas de agua se agregan en una estructura más o menos ordenada alrededor de la parte externa de la hoja bimolecular y muchas de ellas constituyen las llamadas porinas (poros) que abren y cierran según se requiera. Estas porinas están compuestas de proteínas específicas..

La membrana plasmática de acuerdo a su composición posee porinas (poros) que abren y cierran según se requiera.

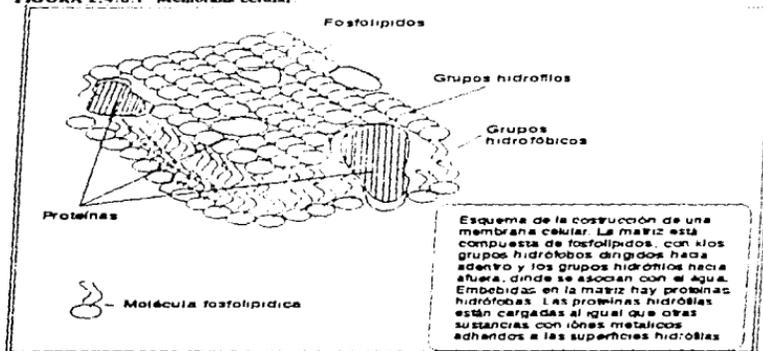
Cuando el poro está abierto, el agua y muchas moléculas no cargadas disueltas en la misma, pueden pasar através de la membrana. El tamaño de los poros es pequeño, unos 0.4 a 0.5 Angstrom ($\text{A}^\circ = 0.1 \text{ nm}$) y por lo tanto sólo pequeñas moléculas pueden penetrar rápidamente. Ver figura 2.4.6.1

FIGURA 2.4.6 Membrana celular. Micrografía electrónica de una sección de la misma en la que se puede observar la doble línea claramente.



FUENTE: Brock * Microbiología * 1987

FIGURA 2.4.6.1 Membrana celular



FUENTE: Brock * Microbiología * 1987.

2.4.7. Mesosomas.

La mayoría de las células procariotas, poseen membranas internas que a menudo pueden ser observadas en micrografías electrónicas. Estas membranas internas pueden ser simplemente extensiones o invaginaciones de la membrana celular, ó pueden ser mucho más complicadas.

Muchas bacterias poseen una estructura membranosa especial denominada mesosoma (cuerpo medio) que, probablemente está asociada con la formación de la pared transversal de la membrana y que además puede tener otras funciones.

Los mesosomas tienen características de una membrana celular, además de citocromos (los citocromos están involucrados en la síntesis de energía, en la formación de moléculas de ATP (Adenosin Trifosfato). Su principal función es la síntesis de energía).

Su composición es similar a la de la membrana , esta compuesta de lípidos y proteínas y generalmente participa en la síntesis de polímeros de la pared; también dirige la síntesis de invaginaciones o repliegues de la membrana. Además intervienen en la reproducción celular, puesto que puede dividirse junto con el ADN y los mesosomas de la descendencia, unidos a la membrana citoplasmática, pueden emigrar en direcciones opuestas. Dirige la división celular facilitando la migración del cromosoma a cada célula hija.

FIGURA 2.4.7. Mesosomas.



FUENTE: Brock " Microbiología " 1987.

2.4.8. Ribosomas.

Los ribosomas se encuentran dentro del citoplasma, estos se encargan de sintetizar proteínas de la célula. Los ribosomas (soma significa cuerpo) son organelos que contienen ácido ribonucleico. Están compuestos aproximadamente por un 60 % de RNA y un 40 % de proteínas, teniendo unos 20 nm. de diámetro.

Los ribosomas pueden aislarse con facilidad a partir de bacterias rotas por centrifugación a alta velocidad, siendo los ribosomas procarióticos un poco más pequeños y ligeros de peso que los eucarióticos.

Los ribosomas tienen constantes de sedimentación características: los procarióticos tienen una constante de sedimentación de 70 S, mientras los eucarióticos tienen una constante de 80 S.

* La constante de sedimentación es un parámetro físico de una partícula medida con una ultracentrifugadora analítica, y es función del tamaño y forma molecular. Las constantes de sedimentación se expresan habitualmente en unidades llamadas Sverberg, abreviado S, denominadas así por el científico sueco que fue pionero de la ultracentrifugación analítica. Si no se especifica otra cosa la constante se mide en agua a 20 °C.⁷⁷

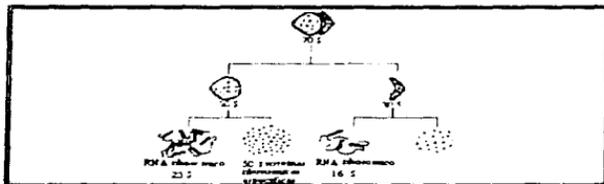
Cada partícula ribosómica está constituida por dos partes de tamaño desigual. Estas partes son entidades distintas separables por medios físicos y que pueden volverse a juntar. La subunidad más pequeña tiene una constante de sedimentación de 30 S y se compone de una molécula de RNA 16 S, a la que están unidas proteínas ribosómicas. La subunidad mayor de 50 S, se compone de un RNA 23 S, un RNA 5 S y unas 50 proteínas específicas. Debido a que es más compacta, toda la partícula ribosómica compuesta de subunidades 50 S y 30 S, tienen una constante de sedimentación de 70 S. Se cree que las proteínas de cada partícula están unidas al RNA y que la subunidad entera está envuelta dentro de una estructura globular.

En la célula intacta los ribosomas se encuentran a menudo agregados de diversos tamaños denominados polirribosomas. La conexión entre estas partículas ribosómicas en el polirribosoma, es una larga molécula de RNA llamado mensajero. Este RNA contiene información para la función de síntesis de proteínas. Las partículas 30 S y 50 S se unen conjuntamente al RNA mensajero para formar el complejo funcional 70 S y una sola molécula de RNA mensajero puede tener adheridas un gran número de partículas ribosómicas.

Según sea su estado de síntesis de proteínas, los ribosomas contienen tres tipos de RNA y 55 proteínas (RNA mensajero, RNA ribosomal y RNA de transferencia). Ver figura 2.4.8

- El RNA ribosomal se asocia con proteínas formando un ribosoma.
- El RNA mensajero sale del núcleo e infiere el mensaje genético del DNA, las cadenas son traducidas por tripletes de nucleótidos llamados codones.
- El RNA de transferencia transporta anticodones y los dirige al ribosoma para formar una nueva proteína. (este RNA es específico para cada tipo de codón)

FIGURA 2.4.8 Estructura en unidades de una partícula ribosómica.



FUENTE: Brock " Microbiología " 1987

2.4.9. Plásmidos.

Son pequeñas moléculas de DNA de doble cadena circular cerrado, los plásmidos son elementos extracromosómicos. Los plásmidos se definen como elementos genéticos que no son esenciales para el crecimiento, de modo que en muchas condiciones pueden ser ganados o perdidos sin perjuicio para la célula. Los plásmidos llevan genes que confieren una ventaja selectiva al huésped bajo ciertas condiciones; son ejemplo, los genes que confieren resistencia a los antibióticos, drogas y otros agentes químicos tóxicos y genes que controlan la síntesis de agentes parecidos a los antibióticos, llamados Bacteriocinas entre otras.

Transporta genes que confieren nuevas propiedades a la célula, una de estas propiedades es la de la conjugación. Lleva información que puede pasar de una bacteria a otra. Existe un plásmido F (factor de fertilidad) fué detectado debido a que provoca la recombinación en la bacteria. Estos plásmidos son los mediadores de la transferencia cromosómica.^{19, 22}

Una bacteria esporulada no replica los plásmidos, pero cuando germina es cuando los produce y causa problemas en los alimentos.

2.4.10. Gránulos citoplasmáticos.

Muchos microorganismos forman agregados o gránulos en el interior de las células que casi siempre tienen que ver con el almacenamiento de energía por la célula o con los bloques estructurales. Los gránulos citoplasmáticos llamados así porque se sitúan en el citoplasma, son gránulos formados de acuerdo al excedente de sustancias que el microorganismo obtiene del medio en el que se encuentra, estos excesos son guardados en estos gránulos que van a variar en composición de acuerdo a la sustancia que el microorganismo almacene para posteriormente metabolizarla.

Algunos microorganismos acumulan grandes reservas de fosfato inorgánico en forma de gránulos de polifosfatos. Muchos organismos almacenan energía y carbono en forma de lípidos. Los lípidos son insolubles en agua y normalmente se reúnen en la célula en forma

de gotículas, que pueden observarse al microscopio de contraste de fases, o que pueden hacerse visibles por la microscopía óptica normal usando un colorante liposoluble, como el negro de Suddán. Las bacterias del azulite producen gránulos de azulite etc.

2.4.11. Esporas.

En condiciones inadecuadas, principalmente de nutrición, ciertas células Gram + , tienen cambios estructurales que ocurren durante la conversión de una célula vegetativa en una espora (del griego semilla) o endosporas; entre estas células se encuentran los bastones aerobios (*Bacillus*), los bastones anaerobios (*Clostridium*) y ciertos cocos (*esporosarcinas*).¹⁰

La formación de la esporas, se lleva a cabo durante la fase estacionaria de crecimiento, generalmente después de que se han agotado los nutrientes. Las endosporas (así llamadas porque la espora se forma dentro de la célula. Ver la figura 2.4.11.1) son muy impermeables a los colorantes, por lo cual para teñir específicamente las esporas, deben usarse técnicas especiales. La estructura de la espora vista al microscopio, muestra que, es muy compleja ya que tiene muchas capas. (Ver figura 2.4.11)

Una sustancia química característica de las esporas, pero no de las células vegetativas, es el ácido Dipicolínico (DPA), esta sustancia se encuentra en todas las esporas que han sido examinadas hasta ahora, las esporas son también ricas en ión calcio, lo que con lleva a creer que la extraordinaria resistencia al calor de las esporas se deba a la asociación entre el calcio y el ácido dipicolínico (Dipicolinato de calcio). Ver tabla 2.4.11

Una espora es capaz de conservarse en estado latente durante años, pero puede convertirse de nuevo en una célula vegetativa (germinación de la espora) en unos minutos. Este proceso consiste en dos pasos: Cese del estado de latencia y crecimiento. El primer paso es inducido por un agente ambiental, que actúa como disparador, como por ejemplo el calor, los cambios de pH, las abrasiones etc..

Las esporas bacterianas son notablemente más resistentes al calor. Su resistencia es importante para el desarrollo de métodos adecuados para la esterilización, no sólo de los medios de cultivo, sino también de los alimentos. La célula esporulante es resistente a diversos agentes tanto físicos como químicos, la resistencia aparece en diversos estadios, juntamente con los cambios en la composición química. La resistencia puede ser al calor, desecación, radiación y a sustancias tóxicas.

Los primeros síntomas de la germinación de la spora, son la pérdida de su capacidad refractaria, mayor facilidad de ser teñida por colorantes, y un acentuado descenso en la resistencia al calor. La spora se hincha visiblemente y su cutícula se rompe. La nueva célula vegetativa empuja hacia afuera de la cutícula de la spora, se desintegran finalmente por la acción de enzimas.

La esterilización por calor de alimentos, es difícil cuando las esporas están presentes y la mayoría de los procedimientos de esterilización se estudia mediante la destrucción de las últimas esporas bacterianas.

FIGURA 2.4.11.1 Espora madurada de *Bacillus megaterium*



FUENTE: Blauk "Microbiología" 1987

TABLA 2.4.11 Principales diferencias entre una célula y una endospora bacteriana.

Estructura	Células vegetativas	Esporas
	Célula Gram positiva típica	Cortejo grueso Cutícula Exosporio (algunas especies) Refringente
Aspecto microscópico	No refringente	
Composición química		
Calcio	Poco	Mucho
Acido dipicolínico	Ausente	Presente
PHB	Presente	Ausente
Polisacárido	Mucha cantidad	Poca cantidad
Proteína	Poca cantidad	Mucha cantidad
Proteína parasporal cristalina (algunas especies)	Ausente	Presente
Aminocidos con azufre	Poca cantidad	Mucha cantidad
Actividad enzimática	Elevada	Baja
Metabolismo (consumo de O ₂)	Elevado	Bajo o ausente
Síntesis macromolecular	Presente	Ausente
RNAm	Presente	Escaso o ausente
Resistencia al calor	Baja	Elevado
Resistencia a las radiaciones	Baja	Elevado
Resistencia a los reactivos químicos, ácidos, etc.	Baja	Elevado
Tinción con colorantes	Puede teñirse	Sólo puede con tnc. especiales
Acción de la lisozima	Sensible	Resistente

FUENTE: Breck "Microbiología" 1987

En la figura 2.4.11 se pueden ver los estadios de formación de una espóra, los cuales dan inicio cuando el medio ambiente no es favorable para el microorganismo; y en la tabla 2.4.11 se analizan las diferencias estructurales y de composición entre una célula vegetativa y una espóra bacteriana.

2.4.12. Región nuclear.

Los organismos procarionóticos no poseen un núcleo verdadero como lo eucarionóticos. En la región citoplasmática se ve un área de débil contraste que contienen un delgado material fibrilar. Estas delgadas fibrillas son de ADN (ácido desoxirribonucleico); el ADN contiene la información genética de la célula, y está presente como una cadena desnuda y no rodeada por una membrana. Cada molécula de ADN consiste en una larga fibra que contienen prácticamente toda la información genética de la célula.

El ADN está compuesto por dos cadenas complementarias una de otra debido al apareamiento específico de la Adenina con la Timina y de la Guanina con la Citosina. Ver figura 2.4.12.

En los procarionotes, la longitud de la molécula de ADN estirada es muchas más veces la longitud de la célula, lo cual indica que el ADN está enrollado dentro de la misma, en ocasiones es posible visualizar una parte de la célula procarionótica que se llama nucleoide donde se concentra el ADN que en estas células se encuentra unido a poliaminas de bajo peso molecular. Por otra parte, la división celular no va acompañada de las reorganizaciones morfológicas características de la mitosis, sino que se efectúa por simple espesamiento y ulterior bipartición de la masa cromatínica.

La división celular da por resultado la formación de 2 células apartir de 1(Ver la figura 2.4.12.1). Las células formadas son esencialmente idénticas a la célula original. Los constituyentes de la célula deben duplicarse y repartirse de manera ordenada entre las dos células hijas. El papel central recae en el ADN aunque los mesosomas son los que dirigen la repartición del mismo en el proceso de división celular.

Durante la división celular tienen lugar 3 acontecimientos clave:

- 1) La duplicación del ADN
- 2) La repartición del ADN
- 3) La formación del septo transversal

La manera como se efectúa este proceso se ilustra en la figura 2.5.12. y 2.5.12.1

Su diámetro es de 20 \AA , la longitud de onda de las espiras es de 34 \AA y la distancia que separa a las bases de la superficie de la molécula es de 3.4 \AA

FIGURA 2.4.12. Estructura de la cadena polinucleotídica del ADN.

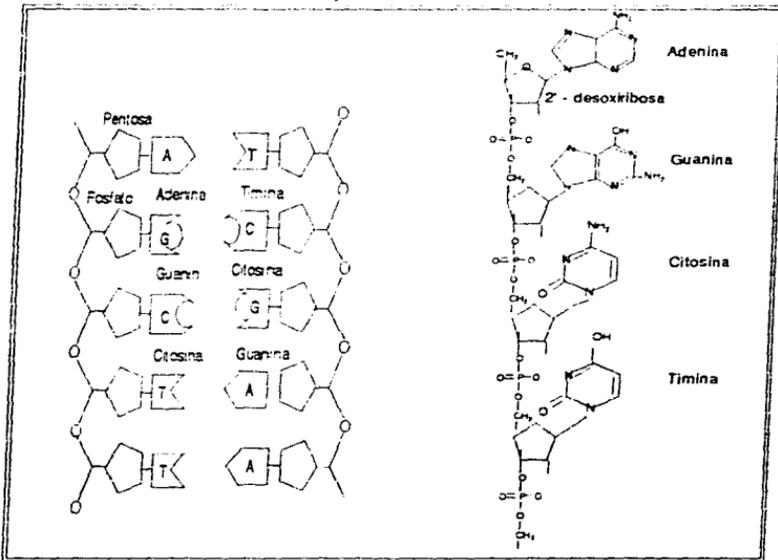
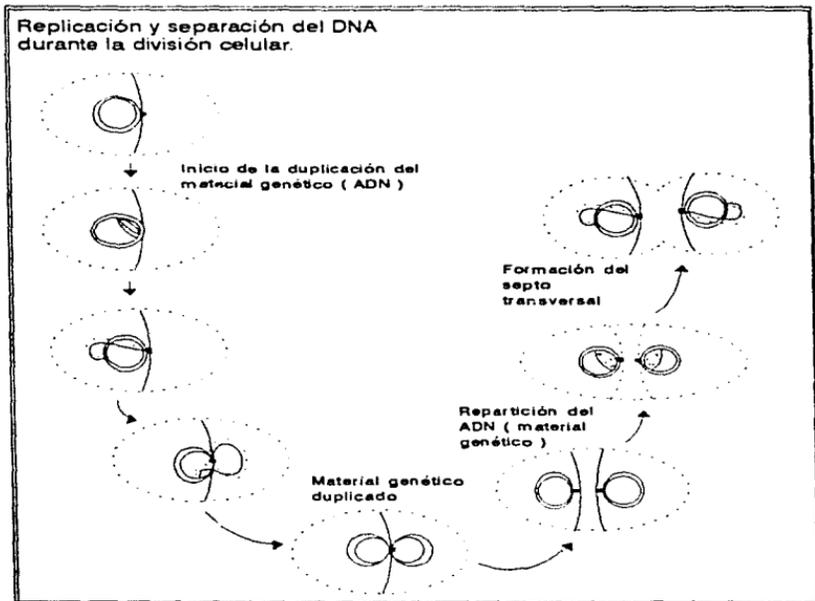


FIGURA 2.4.12.1. Bipartición de una célula (División celular).



FUENTE: Brock "Microbiología" 1987

3. FISILOGIA BACTERIANA.

La fisiología bacteriana se refiere principalmente a los requerimientos de la bacteria para reproducirse.

Los principales factores que influyen en el crecimiento bacteriano dependen de un medio adecuado que proporcione los nutrientes necesarios para el mismo como son :

- Energía
- Carbono
- Temperatura
- Concentración de hidrogeniones.
- Minerales
- Nitrógeno
- Oxígeno
- Humedad

Aunque cada uno de estos factores es importante y puede limitar el crecimiento, son sus efectos combinados los que determinan generalmente si tendrá lugar el crecimiento en las condiciones adecuadas.

Según la fuente de energía de la cual obtengan sus nutrientes se clasifican en dos grandes grupos:

- I) Fotosintéticos
- II) Quimiosintéticos

De los cuales se hablará con mayor detalle dando inicio con:

3.1. Fotosintéticos.

Obtienen energía a partir de la absorción de luz visible y que se desarrolla en las algas y en las bacterias, así como en las plantas superiores.¹⁸

La fotosíntesis es en esencia la conversión de la energía luminosa en energía química, la cual puede ser utilizada después para formar constituyentes celulares a partir del CO₂. La capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis depende de la presencia de pigmentos (las clorofilas).

Se ha encontrado que la reducción fotosintética del CO₂ comprende dos grupos de reacciones más o menos diferentes.

A) Fase luminosa. La luz es convertida en energía química (la luz pasa de energía luminosa a energía en cualquiera ATP o NADPH₂).

B) Fase oscura. La energía química es utilizada para reducir el CO₂ a compuestos orgánicos. (en esta fase se requieren los ATP y los NADPH₂).

Estas dos reacciones se llevan a cabo con el fin de transformar el CO₂ reducido en compuestos orgánicos necesarios para su crecimiento.

3.2. Quimiosintéticos.

Obtienen su energía a partir de compuestos orgánicos e inorgánicos, para realizar toda su síntesis celular, de aquí que existan dos subdivisiones:

3.2.1. Autótrofos o litotróficos.

Obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos tales como el azufre elemental, ión amoníaco (NH₄⁺) o ión ferroso (Fe²⁺). Un ejemplo de este tipo de bacterias son las denominadas corrosivas como la *Thiobacillus ferroxidans*.

3.2.2. Heterótrofos o organótrofos

Se sabe hasta ahora que son organismos que obtienen su carbono de compuestos orgánicos como lo son los azúcares y las proteínas.

Con lo anterior daremos algunos conceptos importantes:

- Heterotrófico. Que se alimenta a expensas de otros organismos.
- Trophos. Que se nutre y sirve de alimento.
- Litotrófico. Significa que come roca.
- Autótrofo. Que se nutre así mismo ;).

NOTA:

Las bacterias fotosintéticas utilizan la luz solo para formar ATP y su poder reductor lo obtienen de constituyentes de su medio tal como el H₂S y compuestos orgánicos.

3.3. Condiciones que influyen en el crecimiento de los Microorganismos.

Las interacciones entre microorganismos, plantas y animales son constantes y naturales. Los alimentos del hombre están constituidos básicamente por vegetales, animales o productos derivados de los mismos, por lo que no se cuestiona que nuestros alimentos contienen microorganismos y están en interacción con ellos.

En la mayor parte de los casos, los microorganismos utilizan alimentos, como fuente de elementos nutritivos para su multiplicación. Este hecho puede dar lugar a la alteración de los alimentos. El deterioro obedece no solo al incremento de microorganismos y a la utilización de sustancias nutritivas, sino también a la producción de cambios enzimáticos que originan modificaciones del sabor, por degradación o síntesis de compuestos.²²

Los principales factores ambientales que influyen en el crecimiento bacteriano,

* Compendio Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos*

son nutrientes, temperatura, humedad, disponibilidad de oxígeno, concentración de hidrogeniones y presencia de sustancias inhibitorias. Aunque cada uno de los factores son importantes, siendo sus efectos combinados los que determinan generalmente si tendrá lugar el crecimiento.

3.3.1. Nutrientes.

Las bacterias necesitan nutrientes, no sólo como fuente de energía, sino también para elaborar su protoplasma y sus materiales estructurales. Las bacterias difieren mucho entre sí en sus necesidades nutritivas, pero determinados componentes de sus alimentos son esenciales para el crecimiento, que no tendría lugar en su ausencia. Los elementos más importantes son Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, Nitrógeno, Azufre y Fósforo.

Las bacterias presentan una gran diversidad en lo que concierne, tanto al tipo, como a la cantidad de compuestos orgánicos que utilizan. Como fuente de energía, se emplean comúnmente los carbohidratos y los amino ácidos; las necesidades de nitrógeno y azufre se satisfacen con los compuestos orgánicos e inorgánicos (sulfato de amonio, nitrato de amonio, etc.) que contienen estos elementos.

3.3.2. Temperatura.

Es un factor de enorme importancia, ya que la temperatura influye mucho en las velocidades de todas las reacciones químicas ligadas a los procesos de crecimiento. Por lo tanto, la temperatura de un medio de cultivo ó de un alimento determina la velocidad de crecimiento de toda bacteria que esta relacionada con él. La temperatura a la que crece con mayor rapidez un microorganismo, es su temperatura óptima de crecimiento, pero también tienen una temperatura máxima y una temperatura mínima que generalmente es solo unos pocos grados por encima o por abajo de la óptima de crecimiento.

Atendiendo a sus relaciones de temperatura se pueden distinguir tres grupos fisiológicos de bacterias:

TABLA 3.3.2 Relación entre las velocidades de crecimiento de las bacterias y temperaturas de incubación.

Grupo	Temperatura mínima °C	Temperatura óptima °C	Temperatura máxima °C
Termófilo	40 - 45	55 - 75	60 - 90
Mesófilo	5 - 15	30 - 45	35 - 45
Psicrófilo	5 - +5	25 - 30	30 - 35
Psicrófilo	5 - -5	12 - 15	15 - 20

Fuente: ICMES / HACCP (Blackwell Scientific Publications) 1988

También se admite un cuarto grupo de microorganismos especializados, los Psicrófilos, que se caracterizan por tener una temperatura óptima de crecimiento baja (5 - 20 °C) y puede crecer bien a 0 °C. Producen sustancias pigmentadas en mayor cantidad a bajas temperaturas y generalmente son bacilos Gram - pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas*, *Acetomobacter*, *Flavobacterium* y *Alcaligenes*, y si bien los géneros *Micrococcus*, *Lactobacillus*.

Psicrótrofos son aquellos microorganismos que crecen a temperatura de congelación; y cuando están presentes pueden indicar un alto potencial de deterioro durante un almacenamiento prolongado de los alimentos. Algunas de estas especies llegan a desarrollarse a temperaturas tan bajas como -5 y -12 °C y su aparición estará condicionada en gran medida a las características bioquímicas de las especies microbianas.⁴⁵

El control de la temperatura es un medio positivo de control del crecimiento de los microorganismos degradantes o alterantes de alimentos. Sin embargo debe recordarse que el crecimiento es retardado pero no detenido.

Debido a que los microorganismos difieren ampliamente en sus temperaturas óptima, mínima y máxima de crecimiento. La temperatura a la cual se almacena el alimento tiene gran influencia sobre el tipo de microorganismo, velocidad y extensión en los cambios que tengan lugar, ya que un pequeño cambio de temperatura puede favorecer el crecimiento de

microorganismos completamente diferentes, lo que da lugar a una alteración completamente distinta a la que se podría esperar.

3.3.3. Humedad.

El agua supone alrededor del 80 - 90 % del peso vivo total de las células vivas y todos los microorganismos, la necesitan para su crecimiento. Los microorganismos varían enormemente en sus necesidades de agua, pero generalmente las bacterias requieren mayor cantidad que los hongos. Es la cantidad de agua disponible y no la total la que determina si ocurrirá o no el crecimiento y en el primer caso, con que velocidad.

El término Actividad de agua determina el grado de interacción del agua con los demás constituyentes de los alimentos, y es una medida indirecta del agua disponible para llevar a cabo las diferentes reacciones a las que están sujetos. Este factor se puede calcular por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Ley de Raoult} \quad a_w = \frac{P}{P_0} = \frac{\% \text{ HR}}{100}$$

Donde:

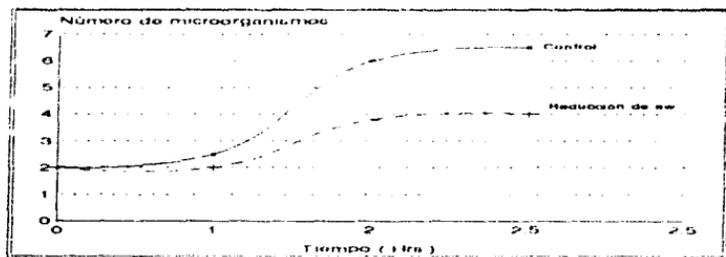
a_w = Actividad de agua.

P = Presión de vapor del agua del alimento a temperatura T.

P_0 = Presión de vapor del agua pura a temperatura T.

% HR = Humedad relativa de equilibrio del alimento a la cual no se pierde ni gana agua.

La actividad de agua de los alimentos desempeña un papel importante en la estabilidad del alimento, ya que muchas reacciones dañinas ocurren de acuerdo con el valor de este factor. ("La a_w de agua pura es 1.00"). Con base en esto se ha vuelto una práctica común controlar el valor de la actividad de agua para aumentar la vida de anaquel, conservar el valor nutricional y las propiedades organolépticas de los alimentos.

FIGURA 3.3.3. Efecto de la reducción de la a_w en el crecimiento bacteriano.

La mayoría de las bacterias crecen bien en medios cuyas a_w están entre 0.9 y 0.98; el crecimiento en agua pura ($a_w = 1.00$) es imposible, por supuesto. Muchas bacterias no crecen a a_w por debajo de 0.91 - 0.88, aunque los *Micrococcus* y *Staphylococcus* corrientes toleran niveles por debajo de 0.96, esto es, resisten concentraciones de solutos más grandes que la mayoría de las bacterias.

Los mohos toleran valores de a_w más bajos que las bacterias, muchos tipos crecen por debajo de 0.85 ó 0.60 atendiendo a sus necesidades de agua, las levaduras ocupan un lugar intermedio entre bacterias y mohos, siendo la a_w el límite para la mayoría de 0.87 - 0.91 aproximadamente.

TABLA 3.3.3.1. aw Mínima para el crecimiento de Microorganismos en alimentos.

Organismo Grupo	aw	Organismo Grupo	aw
Bacterias más estrictas	0.91	Bacterias halófilas	0.75
Levaduras más estrictas	0.88	Mohos estrictos	0.81
Mohos más estrictos	0.80	Levaduras osmófilas	0.61
Organismos específicos		Organismos específicos	
<i>Clostridium botulinum</i> , Tipo I	0.97	<i>Candida utilis</i>	0.92
<i>Pseudomonas</i> spp.	0.97	<i>Trichosporon putidum</i>	0.91
<i>Aerobacter</i> spp.	0.96	<i>Candida Zeylanoides</i>	0.90
<i>Escherichia coli</i>	0.96	<i>Halphydrophobus aureus</i>	0.89
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.95	<i>Alternaria</i> spp.	0.88
<i>Bacillus subtilis</i>	0.95	<i>Penicillium crustulium</i>	0.91
<i>Clostridium botulinum</i> , Tipo A y B	0.94	<i>Aspergillus glaucus</i>	0.79
<i>Candida utilis</i>	0.94	<i>Aspergillus oryzae</i>	0.70
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.94	<i>Aspergillus versicolor</i>	0.68
<i>Bifidus bifidus</i>	0.93	<i>Zygosaccharomyces rouzei</i>	0.62
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0.93	<i>Xeromyces bisporus</i>	0.61
<i>Mucor spinosus</i>	0.93		

La H.R. del ambiente donde se mantienen los alimentos no envasados, ejerce una influencia importante en el crecimiento de los microorganismos superficiales, por el intercambio de humedad entre el ambiente y el alimento, lo que causa modificaciones en la aw, con la correspondiente repercusión en las actividades microbianas. (Ver figura 3.1.3) Este hecho adquiere mayor importancia en los alimentos deshidratados, como la leche en polvo, que precisan envases impermeables a la humedad.⁴

3.3.4. Oxígeno.

Las actividades de las bacterias, como las de los microorganismos en general dependen de sus necesidades de oxígeno.

Aerobias obligadas o aerobias estrictas. Las bacterias que dependen para su actividad de oxígeno libre del aire. Algunas bacterias aerobias obligadas son las *Pseudomonas* y los mohos.

⁴ Compendio Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos.

Anaerobias obligadas Están en el otro extremo de la escala, solo crecen en ausencia de oxígeno libre; de hecho, incluso los vestigios de oxígeno son tóxicos para ellas, entre las bacterias que se encuentran en este grupo están las sulforreductoras y el *Clostridium*.

Anaerobio facultativo Son los microorganismos que se desarrollan en presencia o ausencia de O_2 . La mayoría de las bacterias crecen en estas condiciones, de hecho presentan una preferencia por las condiciones aerobias. Entre estos microorganismos se encuentra la *Escherichia coli* que es una de las bacterias que causa problemas en el caso de que este presente en algún alimento ya que es patógena.

A veces se admite un grupo más de bacterias, las denominadas *microaerófilas*, estas bacterias en las que se incluyen muchos *Lactobacillus*, tienen necesidad de oxígeno, pero en concentraciones considerablemente menores que las del aire.

Hay una relación entre la tensión de oxígeno, que es la concentración de oxígeno elemental (del medio ambiente) y el potencial de oxidación-reducción (O R). El último (O R) es esencialmente una medida de la capacidad oxidación-reducción del medio. Por lo tanto si en el medio hay un potente agente reductor, bajará el potencial O R, lo que favorecerá, por consiguiente el crecimiento de los anaerobios. Por el contrario puesto que el oxígeno es un agente oxidante, su presencia asegura potencial O R relativamente altos, lo que favorece el crecimiento de los microorganismos más aerobios. El potencial O R también aumenta al hacerlo las concentraciones de otros agentes oxidantes, lo que permite a las bacterias " aerobias " desarrollarse en condiciones carentes de oxígeno.

3.3.5. Concentración de hidrogeniones.

La concentración de hidrogeniones tiene un marcado efecto en el crecimiento de las bacterias. Esta concentración se expresa generalmente en términos de pH, que se define como el logaritmo del recíproco de la concentración de hidrógeno. Debe recordarse que las sustancias que producen un exceso de hidrogeniones (H^+) en solución son ácidas, tanto

más ácidas, cuando mayor será el exceso de hidrogeniones. Las sustancias que generan un exceso de iones hidroxilo (OH^-) se denominan bases y son alcalinas.

Para todos los microorganismos hay un pH óptimo, al cual su crecimiento es máximo y un pH mínimo que corresponde a la acidez máxima que permite su crecimiento. La mayoría de las bacterias se ven favorecidas por un pH cercano a la neutralidad o ligeramente alcalino (6.8 - 7.5). Algunas prefieren un pH más bajo (4 - 6), creando generalmente estas condiciones al producir ácidos de los carbohidratos. Se conocen algunas bacterias (por ejemplo, ciertas especies de *Vibrio*) que prefieren condiciones netamente alcalinas (8.5 - 9.0). Las levaduras y los mohos crecen también en ambiente ácido de pH (3.3 - 4.5); los mohos, aunque se ven favorecidos por las condiciones ácidas generalmente crecen en un rango amplio de pH (3.5 - 8.0).²⁴

3.3.6. Minerales.

Para el crecimiento de microorganismos se requieren pequeñas cantidades de un gran número de aniones y cationes inorgánicos. Estos nutrientes inorgánicos pueden ser de dos clases. Algunos de ellos se requieren en concentraciones relativamente altas, estos elementos son Mg^{2+} , K^+ , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- . Cada uno de estos elementos tienen una función en el metabolismo bacteriano.

Los elementos inorgánicos funcionan principalmente en el metabolismo bacteriano como activadores de ciertas enzimas; por ejemplo el hierro que se requiere en las enzimas ferroporfirínicas como la catalasa, mientras que el zinc es esencial para la acción de la alcohol deshidrogenasa. Los iones de sodio se requieren para la actividad de la oxaloacetato descarboxilasa en *Aerobacter aerogenus*. El magnesio es importante para regular el grado de acción de las partículas ribosómicas. No siempre es absolutamente específica la activación de las enzimas por los iones metálicos. La isocitrato liasa presente en ciertas especies de *Pseudomonas* se activan por ejemplo, con el Mg^{2+} , el Mn^{2+} , el Fe^{2+} o el Co^{2+} .

También ha sido observado un antagonismo iónico, que es una acción contraria del

efecto estimulante de un ion ejercida por otro. Así, los iones del sodio inhiben el crecimiento de *Lactobacillus casei*, pero esta inhibición puede contrarrestarse por el K^+ . Posiblemente este efecto se debe a una competencia entre estos dos iones por un sitio único en una enzima o una coenzima.⁴⁹

3.3.7. Sustancias inhibitorias.

Los alimentos contienen una serie de sustancias que afectan el crecimiento microbiano; sustancias que pueden presentarse naturalmente en el alimento, tienen origen microbiano o pueden añadirse artificialmente. Ejemplo de sustancias presentes naturalmente en los alimentos que suprimen el crecimiento microbiano, son la lisozima y la cobalbúmina de los huevos, en la leche se encuentran la lactoperoxidasa, la lactoferrina y las lacteninas, también se encuentran algunos aceites de vegetales que inhiben el crecimiento de microorganismos.

Entre las sustancias inhibitorias que se acumulan como subproductos del crecimiento microbiano, tenemos los ácidos; los lactobacilos degradan los carbohidratos originando ácido láctico, que causa un marcado descenso del pH con el resultado final de inhibir el crecimiento de la mayoría de las bacterias. Finalmente, a los alimentos se les puede añadir deliberadamente durante su procesamiento productos químicos para controlar el crecimiento de los microorganismos nocivos; así los sorbatos se adicionan al pan para controlar el crecimiento de mohos, el dióxido de azufre también se ha usado para inhibir el crecimiento microbiano en vinos, cervezas y jugos de frutas, así como también en productos cárnicos picados.⁴⁹

3.4. Factores de crecimiento.

Son todas aquellas sustancias que el Microorganismo requiere pero no puede sintetizar, generalmente son compuestos orgánicos específicos requeridos en muy pequeñas cantidades, tales como las vitaminas, los aminoácidos, las purinas y las pirimidinas.

3.4.1. Vitaminas.

En los microorganismos la mayoría de las vitaminas funcionan en la formación de coenzimas, por ejemplo: la vitamina ácido nicotínico es una parte de la coenzima NAD. Algunos microorganismos tienen requerimientos vitamínicos muy complejos, como por ejemplo, las bacterias ácido lácticas que comprenden los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*, incluso se dice que sus requerimientos son mayores a los del hombre. En la tabla 3.4.1 se enumeran las vitaminas que requieren los microorganismos y su función.

TABLA 3.4.1 Vitaminas y su función.

Vitamina	Función
Acido p-aminobenzóico	Precursor del ácido fólico
Acido fólico	Metabolismo de los grupos monocarbonados, transferencia del grupo metilo
Biotina	Biosíntesis de ácidos grasos, B-desarboxilaciones, fijación del CO ₂ , transportador de átomos de hidrogeno
Cobalamina (B ₁₂)	Reducción y transferencia de fragmentos de un solo carbono
Acido lipóico	Transferencia de grupos acilo en la descarboxilación del piruvato y del cetoglutarato
Acido nicotínico (niacina)	Precursor del NAD, transferencia de electrones en las reacciones de oxidoreducción
Acido pantoténico	Precursor del CoA, Activación del acetilo y de otros compuestos acílicos
Riboflavina	Precursor del FAD en la flavoproteína implicada en el transporte de electrones
Tiamina (B ₁)	Descarboxilaciones, transacetilasa
Vitamina B ₆ (grupo piridoxalpiridoxamina)	Translocación de aminoácidos y cetosídicos
Grupo de vitaminas k (quinonas) Hidroxamato (factor ferrogénico, copérgeno, etc.)	Compuestos fijadores, transportadores de hierro

FUENTE: Brock "Microbiología" 1987

3.4.2. Aminoácidos

Muchos microorganismos requieren aminoácidos específicos y la capacidad de síntesis de un aminoácido está relacionada con la presencia o ausencia de las enzimas necesarias.

Las enzimas requeridas pueden ser sintetizadas cuando penetran a la célula aminoácidos libres o péptidos pequeños. Al entrar es hidrolizado hasta los aminoácidos que lo componen por medio de una peptidasa. En algunos casos la célula se puede mostrar impermeable a unos aminoácidos libres; más sin embargo el pequeño péptido entra fácilmente y luego se hidroliza hasta un aminoácido libre.

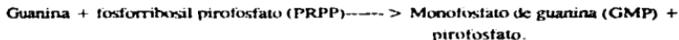
Los requerimientos de aminoácidos son difíciles de determinar y de hecho la presencia de un aminoácido en cantidades mayores conduce a la inhibición de otro aminoácido. El desequilibrio se produce cuando varios amino-ácidos entran a la célula por el mismo sistema de transporte.

3.4.3. Purinas y Pirimidinas.

Son los bloques estructurales para la construcción de los ácidos nucleicos y de las coenzimas. Son aportados como bases libres (simples purinas y pirimidinas) que posteriormente son convertidos dentro de la célula en nucleósidos y nucleótidos, antes de que puedan asumir sus propias funciones.

Existen dos rutas para la formación de nucleótidos:

Directa.



Indirecta.





Si el organismo usa la segunda vía, él puede usar todos los nucleósidos como las bases libres, puede ser considerado como factor de crecimiento añadido, pero si se usa la primera vía solo pueden ser usadas como bases libres.

Los nucleótidos no pueden ser usados como factores de crecimiento, porque la presencia del grupo fosfato los ioniza, por esto tienen menos capacidad de penetrar en la célula.

Una vez que la célula se encuentra en un medio en el que están presentes todos los nutrientes y con los factores de crecimiento antes mencionados, da inicio su división celular la cual, proporciona datos detallados sobre la cinética de crecimiento del microorganismo.

La cinética de crecimiento de los microorganismos se puede registrar gráficamente realizando un conteo de UFC (unidades formadoras de colonias) en función del tiempo. Este gráfico es conocido en la actualidad como Curva de Crecimiento; de la cual se hablará con mayor detalle en el siguiente apartado.

3.5. Curva de crecimiento.

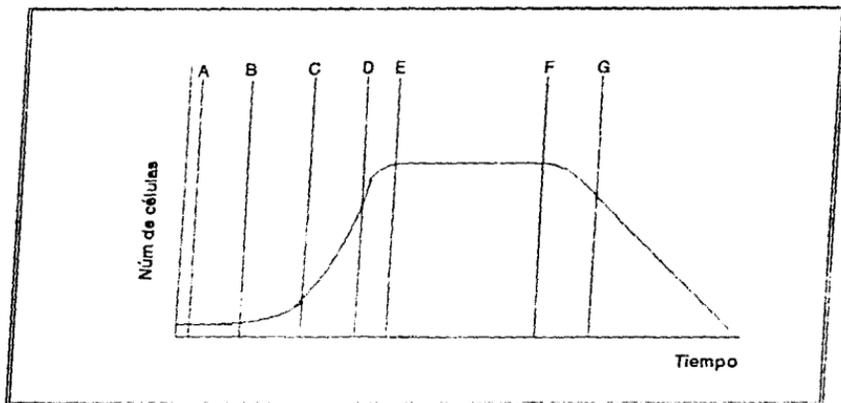


FIGURA 3.5 Curva de crecimiento bacteriano

- A - B Fase de adaptación LAG o de latencia.
- B - C Fase de aceleración positiva.
- C - D Fase logarítmica LOG o exponencial.
- D - E Fase de aceleración negativa.
- E - F Fase estacionaria.
- F - G Fase de destrucción acelerada.
- G - H Muerte.

El crecimiento bacteriano, es un crecimiento exponencial, cuando una bacteria da origen a dos y esas dos dan origen a cuatro, etc.

$$2^n = X$$

A continuación veremos con detalle cada una de estas fases de la curva de crecimiento.

3.5.1. Fase de latencia.

Cuando se inocula una población microbiana en un medio fresco, el crecimiento no es inmediato, sino después de cierto tiempo que puede ser breve o dilatado según las condiciones (fase de adaptación). Para que haya crecimiento en un medio de cultivo particular, las células deben tener una dotación completa de enzimas para la síntesis de los metabolitos esenciales no presentes en el medio. Por lo que empieza a haber una exploración y adaptación al medio, por lo cual se requiere de cierto tiempo para la síntesis de enzimas principalmente.

3.5.2. Fase de aceleración.

En esta fase la bacteria comienza a utilizar sus enzimas y nutrientes para poder degradar algunos componentes del medio y poder empezar a nutrirse con lo cual se inicia el crecimiento de forma acelerada, ya que el microorganismo cuenta con todos los nutrientes que requiere para reproducirse.

3.5.3. Fase logarítmica.

Es la fase de reproducción rápida, cuando cada una de las células de la población se divide en dos. La velocidad de crecimiento varía con las condiciones ambientales y con la composición del medio de cultivo. En esta fase es cuando se alcanza el máximo crecimiento en el mínimo de tiempo.

3.5.4. Fase de aceleración negativa.

Es la fase en la cual empieza a frenar el desarrollo de los microorganismos, se disminuye el ritmo de multiplicación, ya que los nutrientes de medio también van disminuyendo.

3.5.5. Fase estacionaria.

No hay crecimiento bacteriano, los microorganismos solo viven de sus reservas, ya que se agota el suministro de nutrientes esenciales o bien porque hay acumulación de algún producto tóxico. En esta fase el número de microorganismos permanece constante, ya que existe un equilibrio entre el número de microorganismos que se duplican y el de microorganismos que mueren. En esta fase empiezan a automatarse por las toxinas que desprenden.

Las bacterias que sobreviven es porque esporulan.

3.5.6. Muerte.

Si continúa la incubación después de que una población llega a la fase estacionaria, las células pueden permanecer vivas y continúan metabolizando, pero a menudo mueren. Durante esta fase de muerte, el conteo microscópico directo puede permanecer constante, pero el conteo viable decrece lentamente. En algunos casos la muerte va acompañada por lisis celular, que conduce a un descenso en el conteo microscópico directo, juntamente en un descenso en el conteo viable.

3.5.7. Aplicación de la curva de crecimiento en alimentos.

En la fase de adaptación y en la estacionaria cuesta más trabajo destruir a los microorganismos, ya que los más aptos son los que sobreviven, sin embargo, se puede mantener en medio pobre durante la fase estacionaria para que los microorganismos liberen los metabolitos de desecho. En la fase estacionaria es donde hay mayor

probabilidad de que los microorganismos esporulen.

Se tiene un interés particular en que el microorganismo degrade los nutrientes para así poder obtener los metabolitos de desecho entre los que se encuentran principalmente ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos, etc. ¹⁶

Una aplicación de la curva de crecimiento en la industria es por ejemplo, en la producción de la levadura. La levadura del pan crece en melazas como fuente de carbono y energía. Si se añaden las melazas a un ritmo exponencial paralelo al ritmo de crecimiento exponencial de la levadura, se obtiene masa celular más abundante. ¹⁷

En la actualidad se está evaluando el rendimiento de cepas bacterianas como productoras de compuestos volátiles a partir de aminoácidos. ¹⁸

Ultimamente, las modernas técnicas de ingeniería genética o del DNA recombinante ofrecen grandes posibilidades de mejorar las propiedades deseables de las cepas y eliminar las indeseables. Sobre estos conocimientos y experiencia, se trata ahora de dar un paso adelante: utilizando las bacterias para aumentar la vida útil y la inocuidad de los alimentos e identificar y producir, a gran escala, ciertas sustancias o metabolitos con efectos antimicrobianos que generan estos microorganismos y añadirlos a los alimentos en lugar de añadir las propias bacterias.

En la actualidad las modernas técnicas de ingeniería genética son usadas también en la producción de enzimas como las amilasas, proteasas, celulasas, etc. Actualmente se están usando cultivos microbianos para obtener proteínas heterólogas (una proteína de un organismo, la cual va a ser producida por otro organismo). En el caso de requerir proteínas de eucariotes los microorganismos usados son los hongos y levaduras ya que su metabolismo sabe como sintetizar este tipo de proteínas. En el caso de usar estos microorganismos se usan las especies reconocidas como seguras, esto es, que no con conocidas como patógenos y cuya capacidad de no adquirir patogenicidad, como la producción de toxinas es mínima. ¹⁹

3.5.7.1. Aplicación en la conservación de los alimentos.

Para evitar la alteración de los alimentos, se puede prolongar la fase de latencia y la de aceleración positiva, esto se puede lograr de la siguiente manera:

1) Reduciendo el grado de contaminación procurando que llegue al alimento el menor número posible de microorganismos, pues tanto menor es el número, tanto menor es la fase de latencia.

2) Evitando la contaminación por gérmenes en crecimiento activo (fase LOG) , tales microorganismos pueden estar presentes en recipientes, maquinaria, utensilios sucios, etc , que entran en contacto con los alimentos.

3) Creando condiciones desfavorables para los gérmenes en cuanto a , humedad, temperatura, pH o potencial oxido- reducción o adicionando inhibidores microbianos, al existir condiciones desfavorables, mas se tardará en iniciarse el crecimiento microbiano, y por lo tanto la alteración del producto.

4) Por acción directa de ciertos microorganismos a ciertos tratamientos como calor y radiaciones. Las bacterias o sus esporas sometidas a tratamientos térmicos subletales, requieren mejores medios de cultivo para desarrollarse que los microorganismos que no lo son.

Con frecuencia es suficiente el empleo de una combinación de estos métodos para prolongar la conservación de un alimento durante el tiempo deseado.

Cualquier cambio en las condiciones del medio puede hacer que se alargue el período de conservación del alimento, el descenso brusco en la temperatura prolongará el tiempo de generación y por lo tanto el tiempo de conservación .

4. METABOLISMO BACTERIANO.

El metabolismo bacteriano se refiere a reacciones de degradación (Catabolismo) y a reacciones de síntesis (Anabolismo), las cuales se llevan a cabo en la membrana; en la cual se da el transporte de nutrientes a través de la misma de una interfase selectiva entre la membrana y el medio .

4.1. Transporte de nutrientes a través de la membrana.

Las propiedades de permeabilidad de la membrana son importantes en la nutrición celular.;

Para entender el proceso de permeabilidad selectiva es necesario saber alguno de los medios por el cual es llevado a cabo este proceso, ya que las bacterias cubren casi todas sus necesidades por simple difusión y los compuestos pueden atravesar la membrana principalmente de tres maneras.

4.1.1. Difusión pasiva.

La difusión pasiva es cuando los solutos pasan a través de la membrana por simple difusión debido al gradiente de concentración. Además en difusión pasiva no existe acoplamiento a una fuente de energía. La fórmula aplicable a este tipo de comportamiento es una modificada de la ley de Fick:

$$\frac{ds}{dt} = PA (C_0 - C_1)$$

Donde:

- P = Es el coeficiente de permeabilidad.
- A = Área de la membrana en consideración.
- C₀ y C₁ = Son las concentraciones dentro y fuera de la membrana respectivamente.
- $\frac{ds}{dt}$ = Flujo neto del soluto.

En la difusión pasiva el tamaño de las moléculas es un factor determinante en la permeabilidad ya que la membrana cuenta con pequeños poros atravesables por solutos hidrosolubles de tamaño molecular adecuado.

4.1.2. Difusión facilitada.

No es específica y se realiza más rápido que la pasiva, el compuesto suele distribuirse de tal manera que la concentración dentro de la célula es la misma que en el exterior.

Hay gradientes de concentraciones donde se muestran vectores o fuerzas electrostáticas. Aquí si hay un gasto de energía.

4.1.3. Transporte activo.

El transporte mediado por acarreadores es altamente específico, rápido y en muchos casos permite que la célula acumule nutrientes del medio contra grandes gradientes de concentración. A este proceso se le denomina generalmente Transporte Activo.

Muestra una marcada especificidad. Algunas sustancias pueden ser transportadas más rápidamente que otras, mientras otras no pueden serlo en absoluto.

Los mecanismos de transporte activo capacita a la célula para acumular solutos contra el gradiente de concentración. Estos mecanismos de transporte requieren de un suministro continuo de energía. Las células han desarrollado varios mecanismos para extraer nutrientes del medio en que crecen.

4.1.4. Translocación de grupo.

La sustancia es convertida en un derivado como parte del proceso de translocación a través de la membrana.

Los procesos de translocación de grupos son aquellos procesos en los cuales la sustancia

es alterada químicamente en el curso de su paso através de la membrana. Los casos mejor estudiados de translocación de grupo comprenden el transporte de monosacáridos como la glucosa, manosa, fructuosa, N-acetil glucosamina y B glucósidos los cuales son fosforilados durante el transporte por el sistema de la fosfotransferasa.

El sistema de la fosfotransferasa está compuesta por al menos dos enzimas distintas, una de las cuales es específica para cada azúcar y el otra es inespecífica. Un tercer componente proteínico del sistema es una pequeña proteína termoestable, designada como HPr, que actúa como transportador de fosfato de alta energía.



HPr = Proteína de la membrana

a = Enzima inespecífica.



b = Enzima específica para el azúcar.

4.2 Metabolismo bacteriano.

El metabolismo bacteriano consta principalmente de tres fases:

I) **Catabolismo.** Degradación de acuerdo a las necesidades de la célula con el fin de obtener esqueletos de carbono.

II) **Anabolismo 1 Síntesis:** arma esqueletos de carbono para ensamblar pequeñas moléculas (aminoácidos, fosfolípidos etc.)

III) **Anabolismo 2 Ensamblaje de macromoléculas,** (péptido glucano, proteínas, lípidos etc.)

Para entrar un poco en el tema se estudiará cada una de las fases que conforman el metabolismo bacteriano por lo cual se da inicio con el catabolismo.

4.2.1. Catabolismo.

El conjunto de procesos que participan en la degradación de compuestos en la célula, generalmente reciben el nombre de Catabolismo y las reacciones enzimáticas que se toman parte en la degradación se denominan Reacciones Catabólicas. Al llevarse a cabo las reacciones se sintetiza energía (ATP) que posteriormente es usada en el Anabolismo.

El catabolismo bacteriano es algo complejo y difícil de esquematizar ya que este depende de cada uno de los microorganismos que lo estén llevando a cabo puesto que cada uno de ellos pueden utilizar cualquiera de los siguientes nutrientes para obtener sus esqueletos de carbono y obtener energía, además liberan sustancias de desecho que le pueden comunicar características alterantes de la degradación de las proteínas, los lípidos y los azúcares.

Los microorganismos pueden utilizar gran cantidad de compuestos orgánicos como fuente energética. Entre estos compuestos se encuentra el grupo de los Carbohidratos, para muchos de los microorganismos los compuestos de preferencia son los CHOS, especialmente la glucosa, que es un azúcar de 6 carbonos y el más ampliamente distribuido en la naturaleza.

La degradación completa de algún carbohidrato se puede llevar a cabo por diferentes vías metabólicas en donde se obtiene un compuesto clave como lo es el ácido pirúvico que generalmente es degradado por medio de las fermentaciones hasta una serie de compuestos orgánicos y/o gases como el CO_2 y el H_2 , lo cual le confiere a los alimentos en los que se lleva a cabo esta degradación un aspecto gaseoso.

Las proteínas se componen de aminoácidos unidos por un enlace peptídico, el cual se puede romper por la adición de agua, por la acción catalizadora de una enzima (proteasas, peptidasas, etc). Dichas enzimas desdoblán las proteínas hasta los aminoácidos que las

conforman.

Hay muchos aminoácidos y por ende muchos productos de desaminación; algunos que se conforman anaeróbicamente, los cuales pueden formar productos que le confieren un olor desagradable; tal es el caso de la Oritina (arginina) la cual produce la Putrescina y la Lisina que tiene como punto final de su desaminación en Cadaverina, que al igual que la Putrescina son compuestos de este género.

Las dos principales reacciones de los microorganismos mediante las cuales degradan las proteínas son la desaminación y la descarboxilación entre las que se encuentran las siguientes reacciones:

1.- Desaminación oxidativa



En este caso se forma un - Cetoácido y amoníaco. El cetoácido formado depende del grupo R; si R es CH₃ se forma ácido pirúvico. Son comunes las reacciones secundarias de los cetoácidos y muy pocas veces son encontrados como los últimos metabolitos.

2.- Desaminación reductiva.



En este caso se forma un ácido orgánico y amoníaco. Esta reacción la llevan cabo los microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos

3.- Desaminación hidrolítica



Se produce un hidroxiácido y amoníaco. La reacción se lleva a cabo en condiciones

normales o ligeramente alcalinas.

4.- Descarboxilación y desaminación hidrolítica.



Se forma alcohol, dióxido de carbono y amoníaco.

5.- Desaminación e insaturación.



Determinantes de un ácido orgánico no saturado y de amoníaco.

6.- Descarboxilación.



Produce una amina y dióxido de carbono.

7.- Oxidación - reducción.



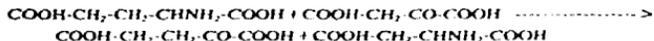
La reacción da como resultado 2 ácidos orgánicos, amoníaco y dióxido de carbono.

8.- Degradación anaeróbica - liberación de hidrógeno.



Se producen ácidos como el glutárico, el acético, el butírico, el dióxido de carbono, el amoníaco y el hidrógeno.

9.- Transaminación.



Aunque los aminoácidos no resultan degradados, la transaminación altera la composición del sustrato, que determinará el producto metabólico final.

10.- Oxidorreducción mutua.

Algunos aminoácidos como la Alanina, Leucina, Fenilalanina y Valina pueden servir como donadores de H₂ y ser oxidados mientras que otros como la Arginina, la Glicina y la Prolina pueden actuar como receptores de hidrógeno y ser reducidos.

Las reacciones de la 1 - 10 explican la mayoría de los procesos de descomposición y putrefacción de los aminoácidos.

El metabolismo de los aminoácidos da productos muy diversos, como CO₂, H₂, NH₃, HSO₃, ácidos orgánicos, alcoholes, aminas, diaminas, etc. La producción de amoníaco y aminas tiende a elevar el pH lo que indica que un alimento rico en proteínas está siendo degradado por microorganismos, la disminución de él, es el resultado de la fermentación de los hidratos de carbono.

Los lípidos abarcan una gama muy amplia cuya clasificación general se hace al dividirlos en varios grupos:

- 1.- Lípidos sencillos: Esteres de ácidos grasos con alcoholes.
- 2.- Lípidos compuestos: Sustancias que además del grupo éster de la unión del ácido graso y el alcohol, poseen otras funciones químicas.
 - a) Fosfolípidos. Contienen ác. grasos, ác. fosforico y otros grupos nitrogenados.
 - b) Glucolípidos. Compuestos carbohidratados, ácidos, también llamados cerebrosidos.

c) Lipoproteínas. Compuestos de lípidos y proteínas.

3.- Compuestos asociados: Compuestos derivados de los lípidos sencillos o de los compuestos, pero que sin embargo mantienen las propiedades generales del grupo.

a) Ácidos grasos

b) Alcoholes (normalmente de cadena larga y esteroides).

c) Vitaminas liposolubles.

Los ácidos grasos son los componentes más abundantes de los lípidos, aunque generalmente no se encuentran en estado libre como tales, sino en forma esterificada como parte constituyente de los diferentes acilglicéridos. Los ácidos grasos a su vez se dividen en dos grandes grupos saturados e insaturados, dependiendo de la presencia de dobles ligaduras en las moléculas.

Las grasas y los aceites representan la fuente más importante de energía procedente de los alimentos, facilitando 9 kcal/g, que es aproximadamente el doble de la energía que aportan las proteínas y los carbohidratos; son además vehículo de las vitaminas liposolubles.

Las grasas y los aceites son susceptibles a diferentes reacciones de deterioro que reducen el valor nutritivo del alimento y además producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables. Esto se debe a que el enlace éster de los acilglicéridos es susceptible a la hidrólisis química o enzimática, y a que los ácidos grasos insaturados son sensibles a reacciones de oxidación.

Las enzimas que hidrolizan a los triglicéridos se denominan lipasas y se consideran verdaderas lipasas aquellas que atacan únicamente sustratos insolubles en agua, tal es el caso de la lipoxigenasa y de la alcohol-deshidrogenasa, las cuales tienen un efecto oxidativo de los lípidos, esta acción es directa sobre la doble ligadura de los ac. grasos con la consecuente producción de hidroperóxidos que no poseen aroma, pero que rápidamente se descomponen en compuestos carbonílicos determinantes de la aparición de sabores y olores distintos a los habituales. Los componentes carbonílicos son mezclas de aldehídos saturados, no saturados y cetonas

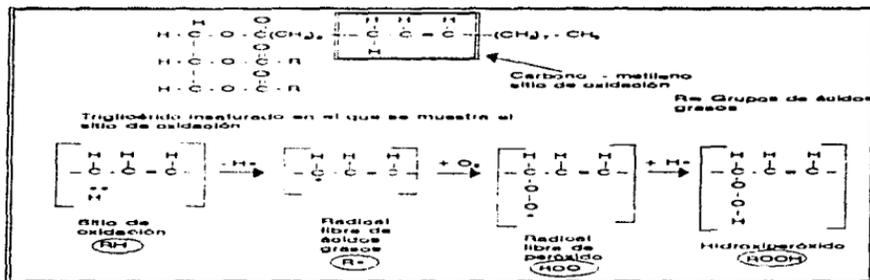
La grasa deteriorada se rancia, la simple liberación de ac. grasos libres se conoce como rancidez hidrolítica, mientras que el deterioro oxidativo es una rancidez oxidativa (Ver la figura 4.2.1 en la que se muestra la oxidación de un triglicérido). La rancidez hidrolítica es importante en las grasas de cadena corta de ac. grasos hidrosolubles (Butírico, Capríico y Caprílico) producen una desagradable ranciedad a la leche.

Al margen de la liberación de los ac. grasos volátiles, los principales cambios de sabor no son debido a la hidrólisis, sino a una oxidación, la cual en el caso de las grasas se debe a la actividad de enzimas o a la autooxidación que a una actividad microbiana. La oxidación se acelera por el calor, la luz y es catalizada por metales pesados y sus sales. Ciertas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* producen enzimas oxidativas que catalizan la oxidación de ac. grasos libres en cetonas metálicas.

La grasa pura no es atacada por los microorganismos, ya que para su desarrollo requieren la presencia de un nutriente que contenga una fase acuosa, que la mayoría de los alimentos grasos la contienen (mantequilla, nata, margarina etc.) Hay muchos M.O. lipofílicos entre los que se encuentran:

Bacterias:	Hongos:
<i>Lactobacillus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Candida</i>

FIGURA 4.2.1 Oxidación de lípidos.



Los nutrientes que se degradan primero son los más sencillos; los azúcares, posteriormente las proteínas y finalmente los lípidos, dependiendo del microorganismo; esto acoplado a ciclos catabólicos, con el fin de obtener sus esqueletos de carbono y/o energía.

Las principales vías metabólicas utilizadas por las bacterias son:

- Glucólisis
- Entner Doudoroff
- Ciclo de Krebs
- Ciclo del glioxilato
- Fosforilación oxidativa
- Vía de las pentosas
- Fermentaciones

A continuación se hará referencia a cada uno de ellos con el fin de denotar su importancia en el metabolismo bacteriano y su relación con alimentos.

4.2.1.1. Glucólisis.

La glucólisis está referida a la degradación de los carbohidratos, se debe de tomar en cuenta que la mayoría de las bacterias inician su ciclo catabólico principalmente con esta vía de utilización de la glucosa, con el fin de obtener energía y esqueletos de carbono, donde todas las reacciones son catalizadas por enzimas.

Se podría decir que la glucosa e incluso otros azúcares pueden ser transformados para introducirse al ciclo. La Glucólisis da inicio cuando la glucosa es transformada en su isomero, luego se fosforila y posteriormente se degrada en dos moléculas, una de Dihidroxiacetona y otra de gliceraldehído-3-fosfato y se hidrolizan dos moléculas de ATP. (Ver figura 4.2.1.1) Esta molécula de gliceraldehído-3-fosfato después de una serie de transformaciones llega a ácido pirúvico durante una segunda etapa en la que se regeneran 4 moléculas de ATP. Las reacciones son reversibles exceptuando aquellas que son catalizadas por la hexocinasa, fosfofructocinasa y la piruvatoquinasa. La reacción neta de la transformación de glucosa en piruvato es :

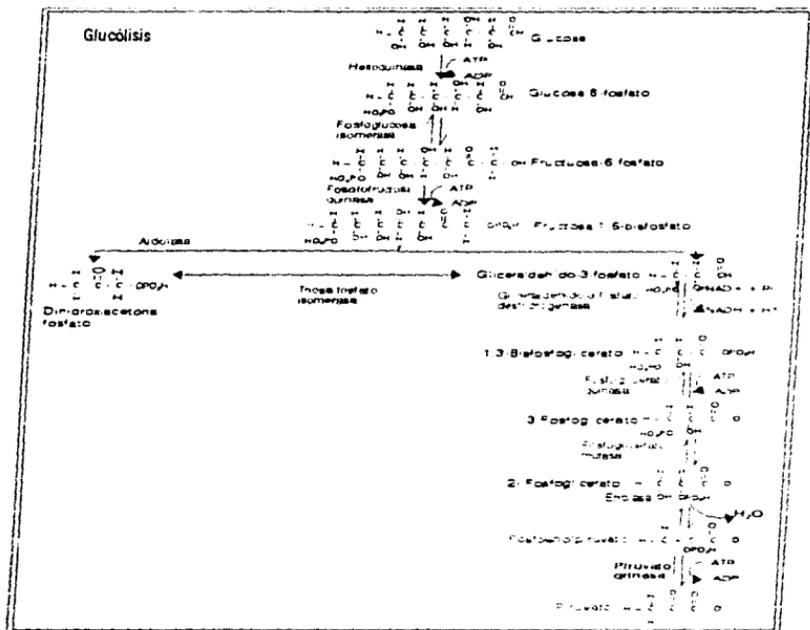


Las reacciones que van desde la glucosa hasta el ácido pirúvico, descritas anteriormente, se producen en una gran variedad de microorganismos, pero el ácido pirúvico resultante puede ser utilizado posteriormente de diversas maneras. Muchas bacterias al igual que animales superiores pueden llevar a cabo la reacción:



Siendo el producto final ácido láctico en vez de alcohol y CO_2 . Este ciclo sirve para obtener energía (8 moléculas de ATP) y compuestos intermedios (Gliceraldehído 3 - fosfato) para la síntesis de aminoácidos que posteriormente formarán las proteínas necesarias para la formación de estructuras celulares como son los flagelos, las membranas o para la formación de esporas.

FIGURA 4.2.1.1 Glucólisis



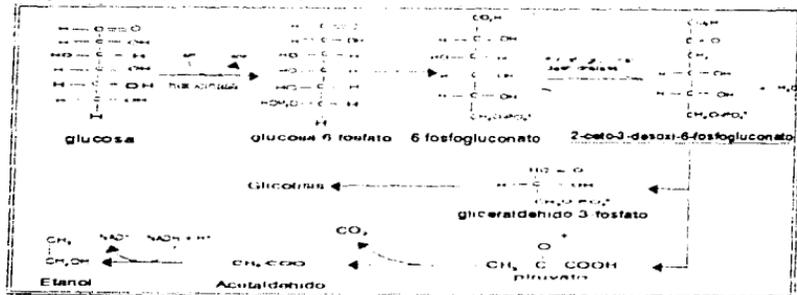
FUENTE: Stryer 1994. Bioquímica.

4.2.1.2. Ciclo de Entner - Doudoroff.

Esta vía glucolítica existe en microorganismos fuertemente aerobios, como las *Pseudomonas* que es la bacteria más alterante en alimentos, ya que lleva a cabo reacciones proteolíticas y lipolíticas principalmente, desarrollándose a una μ de 0.98 y en pH neutro. Se produce 6-Fosfogluconato y 1 mol de NADPH. Sin embargo, el primero no se descarboxila, sino que se deshidrata. La 2-cetosa-3-desoxi-6-fosfogluconato se rompe mediante una aldolasa específica, dando lugar al piruvato y al gliceraldehído 3-P, lo cual se observa en la figura 4.2.1.2.

Cuando el gliceraldehído-3-fosfato entra en la glucólisis se forman dos moléculas de ATP y una mol de NADH. Esta vía es usada por los microorganismos que no cuentan con las enzimas propias del ciclo de la glucólisis, con lo cual también se da un crecimiento rápido por lo corto del ciclo.

FIGURA 4.2.1.2. Ciclo Entner - Doudoroff



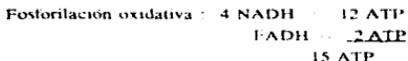
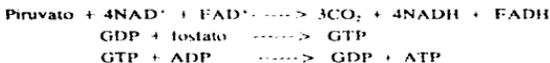
FUENTE: Brock * Microbiología * 1987

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

4.2.1.3. Ciclo del ácido cítrico ó ciclo de Krebs.

Este ciclo es la continuación de la glucólisis, donde el producto de la misma (piruvato) se oxida completamente hasta CO_2 y H_2O . Para que el ciclo sea oxidativo debe estar presente el oxígeno.

La reacción global del ciclo es la siguiente:



En el ciclo de los ácidos tricarbónicos el compuesto de tres carbonos, piruvato, es oxidado formando dos moléculas de CO_2 con la transferencia de electrones (H^+) al NADH y al FADH.

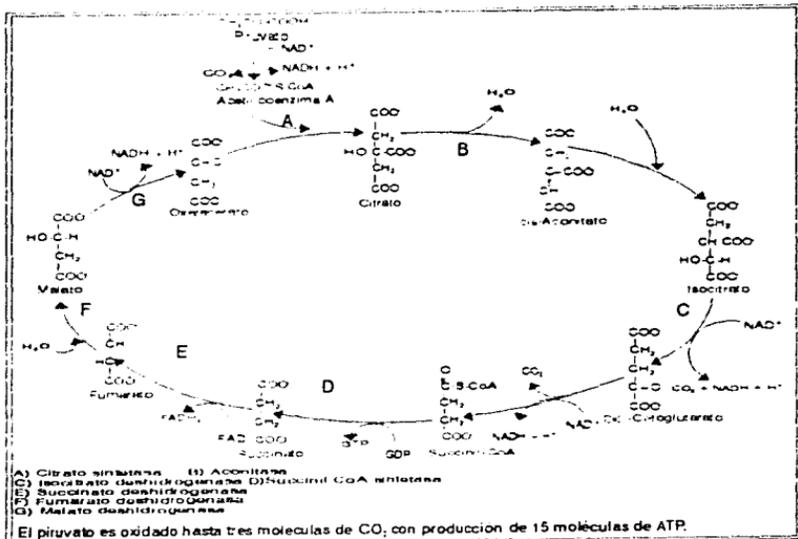
El ciclo principia en realidad cuando el compuesto de dos carbonos, la Acetil-CoA, se condensa con el compuesto de 4 carbonos, el oxalacetato, para formar el compuesto de 6 carbonos llamado Citrato. Mediante una serie de oxidaciones y descarboxilaciones, ese compuesto de 6 carbonos se convierte en un nuevo compuesto de 4 carbonos, Oxalacetato, que conjuntamente con otra molécula de Acetil CoA inician nuevamente el ciclo.

Por cada molécula que entra de piruvato, se liberan 3 moléculas de CO_2 , durante la formación de Acetil-CoA, otra por la descarboxilación del isocitrato y finalmente una por la descarboxilación del α -cetoglutarato.

Este ciclo funciona como un ciclo degradativo (catabolismo) de grasa, proteínas y carbohidratos. En algunos casos también lleva a cabo reacciones de síntesis (anabólicas).

En este ciclo se obtienen precursores de aminoácidos, y luego estos van a formar parte de las proteínas.

FIGURA 4.2.1.3. Ciclo del Acido Citrico.



FUENTE: Devlin - Bioquímica 1988

La principal función del ciclo de Krebs, es servir como vía final común para la degradación de carbohidratos, de los lípidos y de las proteínas; que pueden ser la glucosa, ácidos grasos y muchos aminoácidos los cuales son metabolizados hasta Acetil - CoA. Además suministra H^+ al sistema de citocromos, en donde son oxidados liberando energía en forma de ATP.

Los intermediarios que se forman dan origen a los siguientes aminoácidos:

Pirúvico: Alanina, Leucina, Valina
 Oxaloacético: Metionina, Treonina, Isoleucina, Lisina.
 α - Cetoglutarato: Acido glutámico, Prolina, Lisina, Arginina.
 3 - P - Glucrato: Serina, Glicina, Cisteína, Cistina, Triptofano
 Pentosa - P : Histidina.
 Acido Shikimico: Triptofano, Tirosina, Fenilalanina.

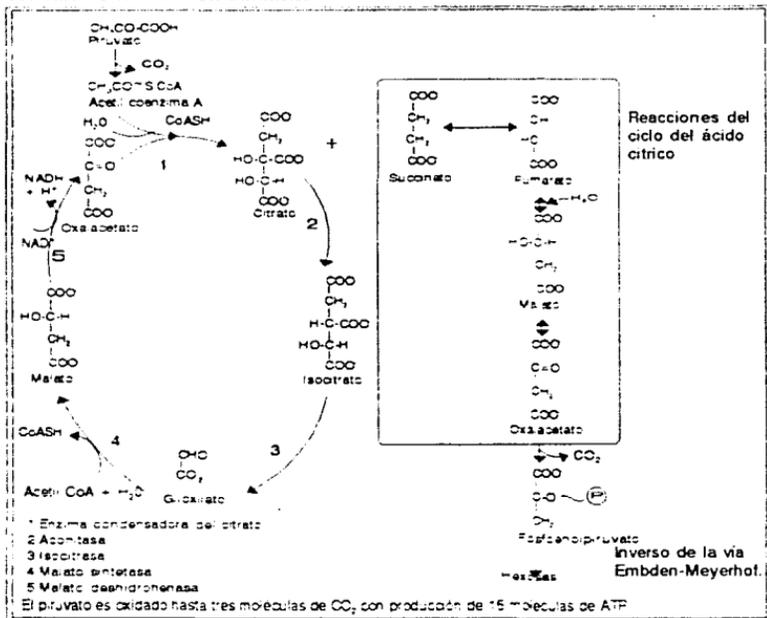
En este ciclo se requiere oxígeno, y funciona en unión con la cadena respiratoria; además la bacteria obtiene suficiente energía para reproducirse aceleradamente.

4.2.1.4. Ciclo del Glioxilato.

Muchos microorganismos pueden utilizar como fuentes de carbono y energía los ácidos orgánicos producidos por medio del ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, algunos que tienen el ciclo del ácido cítrico normal no pueden tomar esos mismos ácidos orgánicos del medio y utilizarlos para el crecimiento, probablemente porque estos no pueden penetrar a la célula.

La utilización de los ácidos de dos ó tres carbonos como fuente de energía no puede tener lugar solo mediante el ciclo de Krebs; el ciclo puede continuar operando solo si se regenera el oxalacetato. Cuando se utiliza el acetato, el oxalacetato necesario para continuar es producido mediante el ciclo del Glioxilato. Este ciclo está formado por la mayoría de las reacciones del ciclo de Krebs más dos enzimas adicionales: La Isocitrato hasa y la Malato sintetasa. Ver figura 4.2.1.4.

FIGURA 4.2.1.4. Ciclo del Glioxilato.



FUENTE Brock " Microbiología "

Algunos microorganismos como la *Pseudomonas* y otros numerosos grupos de *mohos*, *levaduras*, son capaces de desarrollarse a partir de acetato como única fuente de carbono y de energía. Estos microorganismos tienen las enzimas del Ciclo de Krebs más las dos enzimas antes ya mencionadas las células descarboxilan al oxalacetato para producir fosfoenolpiruvato, el cual es punto de partida de la biosíntesis de hexosas y pentosas (gluconeogénesis).

La desviación glicolítica no proporciona nada de energía biológicamente utilizable. Sólo funciona cuando el microorganismo es cultivado sobre acetato, ya que la glucosa sirve como inhibidor de las dos enzimas ya mencionadas.

Al utilizar la vía alterna del glioxilato, las bacterias pueden utilizar acetato como fuente de energía, sino como precursor de una variedad de ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos.³⁹

4.2.1.5. Cadena respiratoria.

Los electrones provenientes del NADH (resultante del ciclo de Krebs), en lugar de transferirse a un intermediario como el piruvato, son transferidos al oxígeno mediante un mecanismo que implica un sistema de transporte de electrones formando NAD⁺ oxidado y agua.

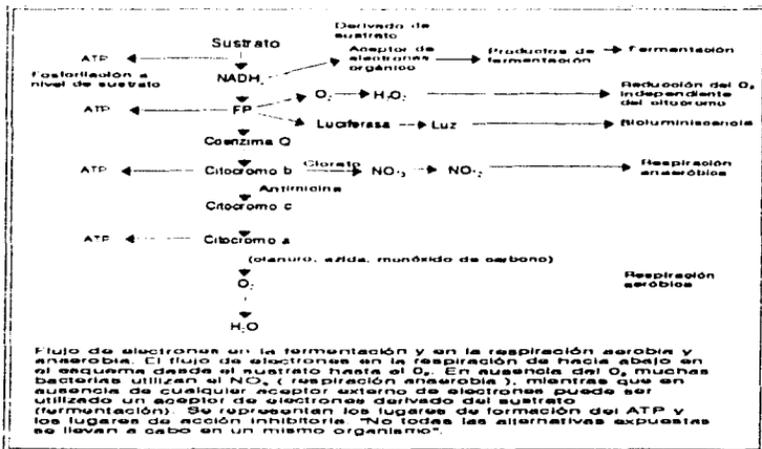
Existen dos formas diferentes mediante las cuales el ATP es sintetizado mediante las reacciones de oxidación - reducción y se llaman fosforilación oxidativa o transporte de electrones.²¹

Gran parte de la energía liberada por la transferencia de electrones NADH, es conservada por medio de la síntesis de ATP dentro de la partícula transportadora de electrones por un proceso denominado fosforilación oxidativa. En la fosforilación oxidativa, la síntesis del ATP está acoplada con el transporte de electrones y el consumo de energía. La velocidad de fosforilación oxidativa, es estudiada experimentalmente

midiendo la velocidad de consumo de oxígeno y la velocidad de conversión del fosfato en ATP.

En los organismos procariotas, el sistema de transporte de electrones se localiza o está asociado con el sistema de la membrana plasmática ya que pueden ser una parte integral de ella, pues cuando se aíslan membranas completas, todos los citocromos se encuentran en esta fracción.²¹

FIGURA 4.2.1.5 Cadena respiratoria



FUENTE: Brock " Microbiología " 1987

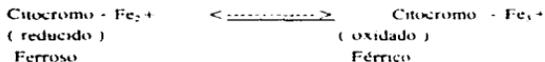
Mediante reacciones que se realizan en esta cadena respiratoria, queda atrapada la energía que deriva de la respiración aerobia en enlaces de alta energía del ATP, para posteriormente ser usada en el resto de las funciones vitales de la célula.

Esta energía se obtiene básicamente de las reacciones a través de las cuales parte del hidrógeno de los compuestos orgánicos es desplazado hasta su aceptor final que es el O_2 . Durante su travesía estos hidrógenos son captados en forma ordenada por diversas sustancias llamadas en general transportadores o aceptores de hidrógeno.

Estos transportadores de electrones son de diferente naturaleza, pero todos presentan un grupo activo que es el que recibe al hidrógeno. La secuencia de estos transportadores es la siguiente:

Los hidrógenos son recibidos como parejas de NAD^+ (Dinucleótido de nicotina - adenina) que los cede a las flavoproteínas y de estas pasan a los diferentes Citocromos, los que únicamente pueden recibir a uno de los dos hidrógenos por lo que se necesita la intervención simultánea de dos Citocromos (a-b-c) a quienes finalmente lo ceden al O_2 para así formar agua.

Los citocromos son anillos de porfirina con hierro unidos a proteínas. Estos sufren oxidación o reducción a través de la pérdida a ganancia de un electrón por el átomo de hierro que va en el centro del citocromo:



Los citocromos y las flavoproteínas están asociados en una estructura celular organizada, en la cual las coenzimas son las transportadoras de electrones a través de la cadena. En la cual al ir realizando el recorrido interior las parejas de hidrógenos, van cediendo en forma progresiva pequeñas cantidades de energía que van a ser recibidas y utilizadas por el ADP para formar el ATP. Durante el recorrido total cada pareja de

hidrógenos logrará la formación de 3 mol. de ATP.

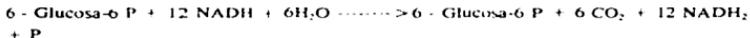
En resumen la fosforilación oxidativa es llamada así porque hay síntesis de ATP, la cual va acoplada con el transporte de electrones y de oxígeno. Gran parte de la

energía liberada por la transferencia de electrones del NADH₂ al O₂ es conservada por medio de la síntesis de ATP antes mencionada.

4.2.1.6. Ciclo de las pentosas.

Por algunos años, la glucólisis, fue considerada el único ciclo catabólico de la glucosa, pero ahora se hace referencia al ciclo de la Pentosa-Fosfato; que se revela es de gran importancia para la subsistencia de algunos organismos incluyendo muchas especies de bacterias.¹⁸

El ciclo completo se puede resumir como:

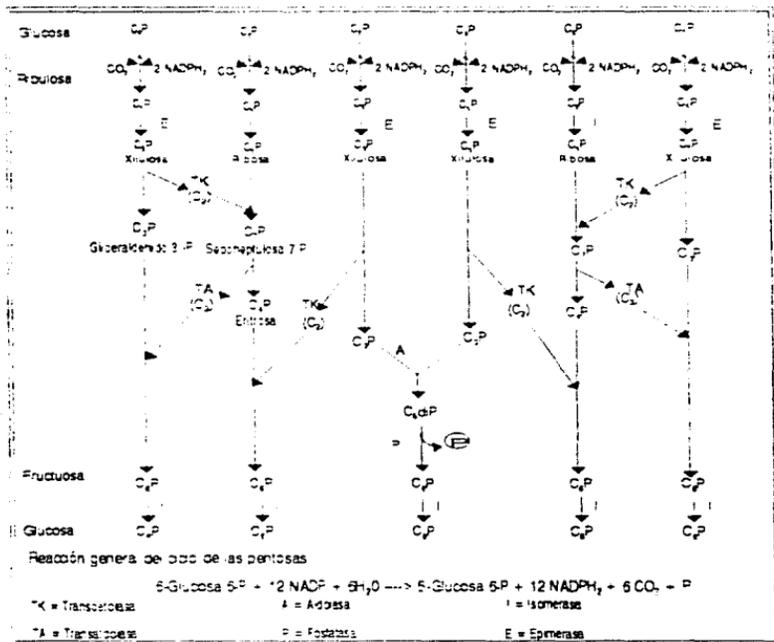


En el ciclo hay participación de 6 moléculas de Glucosa-6P. Durante la formación de Ribulosa-5P a partir de la glucosa se obtienen dos moles de NADPH y se consume una mol de ATP en la activación de la glucosa. El átomo del carbono 1 de la glucosa se pierde en forma de CO₂ y agua, con la regeneración de 5 moléculas de Glucosa-6P.

En resumen es una vía alternativa para la oxidación de la glucosa, es importante para la síntesis de pentosas como precursores de los ácidos nucleicos (DNA y RNA). También es importante porque se regeneran las coenzimas (NADH₂). Importantes en la síntesis de lípidos, ácidos grasos. También se puede decir que cada 6 vueltas del ciclo, el equivalente a 1 molécula se oxida completamente a 6 moléculas de CO₂.^{12, 13}

El Gliceraldehído - 3P P puede seguir el ciclo de la glicólisis.

FIGURA 4.2.1.6 Ciclo de las Pentosas.



4.2.1.7. Fermentaciones.

Pasteur definió la fermentación como la vida sin aire, y reconoció que en este proceso la energía metabólica se obtiene gracias a la propiedad de los organismos " para realizar en una u otra forma las funciones respiratorias con el concurso del oxígeno que existe combinado con el azúcar"

Los microorganismos pueden utilizar como fuente de energía una amplia gama de compuestos orgánicos oxidables.

El catabolismo implica la oxidación de compuestos orgánicos; conduce también a la formación de muchos y distintos compuestos de dos, de tres y cuatro átomos de carbono, los cuales proporcionan materias primas para las reacciones biosintéticas.

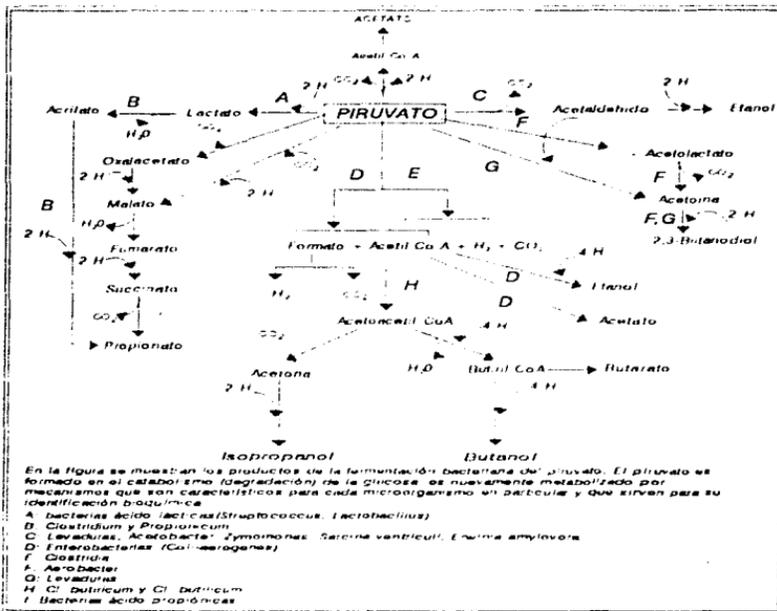
Cuando se habla del metabolismo productor de energía en los microorganismos quimorganótrofos, aparecen la palabra seguida de respiración y fermentación. El término fermentación se debe reservar estrictamente para designar aquellos sistemas productores de energía en los que actúan, tanto dadores como aceptores de electrones y compuestos orgánicos.

Los compuestos de tres carbonos como el piruvato (por ejemplo, lactatos o hidratos de carbono) son el sustrato principal para que los microorganismos lleven a cabo la fermentación. Una gran variedad de fermentaciones que originan diversos productos se basan en la vía metabólica que se esquematiza en la figura 4.2.1.7.

Toda fermentación debe mostrar un equilibrio, es decir, la fermentación se puede interpretar como un reagrupamiento de átomos de H y O para producir grupos carboxilo o para dar lugar al CO₂ (como ocurre en la fermentación alcohólica).

Generalmente las diferencias en la fermentación de carbohidratos, dependiendo del tipo de género y especie de bacterias, es la forma de utilizar el Acido Pirúvico resultante; este ácido es el punto donde desembocan las fermentaciones de los azúcares.

FIGURA 4.2.1.7 Vías de fermentación que puede seguir el piruvato.



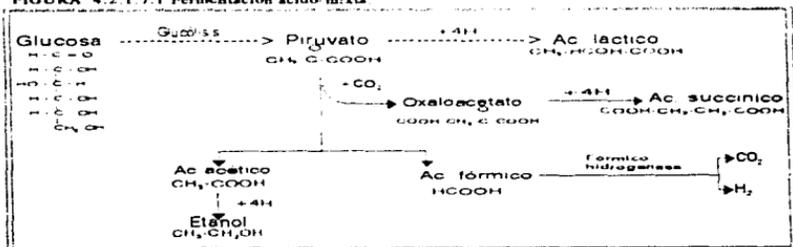
FUENTE: Brock * Microbiología * 1987

4.2.1.7.1. Fermentación ácido mixta ó fórmica.

La forma ácido-mixta de la fermentación, es característica de casi la totalidad de las enterobacterias. Las bacterias entéricas o enterobacterias constituyen uno de los grandes grupos de Bacterias Gram - no fotosintéticas. Estas bacterias se pueden distinguir del resto de las bacterias Gram - de estructura similar por la propiedad de ser anaerobias facultativas. En condiciones anaeróbicas obtienen energía de la fermentación de carbohidratos, mientras que en condiciones aeróbicas pueden utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos para la fermentación. El representante de este grupo y el más conocido de todos es la *Escherichia coli*.

La fermentación ácido mixta (ver figura 4.2.1.7.1) da lugar a los ácidos láctico, acético, succínico, fórmico y al etanol. Esta fermentación es característica de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Yersinia* y *Vibrio* y se da en algunas especies de *Aeromonas*. Las proporciones relativas de productos finales pueden variar considerablemente, tanto de una cepa a otra, como en la misma cepa, según las distintas condiciones ambientales de crecimiento (por ejemplo a diferentes valores de pH).

FIGURA 4.2.1.7.1 Fermentación ácido mixta



FUENTE: Brock - Microbiología - 1987

El ácido fórmico es producido principalmente por los siguientes microorganismos:

Escherichia coli
Aerobacter

Bacillus cereus

Y otros tipos de enterobacterias, ya que estas son microorganismos propios del intestino y desde el punto de vista sanitario es importante distinguirlos, principalmente a *Escherichia coli*. Este tipo de fermentación no es deseable en los alimentos.

Cuando se lleva a cabo la fermentación fórmica o ácido mixta puede haber o no la producción de CO_2 y H_2 . Algunas enterobacterias como la *Salmonella typhi* y la *Shigella* producen gas.

4.2.1.7.2. Fermentación del 2-3 Butanodiol ó Butilenglicolica.

Este tipo de fermentación se observa en del grupo de las enterobacterias, representado principalmente por el *Enterobacter aerogenes*, el cual forma el 2-3 butanodiol como producto principal, mientras que ciertas especies de *Bacillus liberan* " acetaldehído activo ", el cual no es oxidado, sino que se condensa con un piruvato; y aquí se producen radicales diacetilos y otros aromáticos cuando el pH es básico y cuando es muy ácido el producto final de la fermentación es el 2-3 butanodiol.

Los principales productos resultantes de la fermentación del 2-3 Butanodiol de la glucosa y otros azúcares son el ácido láctico, etanol, ácido succínico, ácido acético, CO_2 y H_2 , aparte del 2-3 Butanodiol. Ver la figura 4.2.1.7.2.

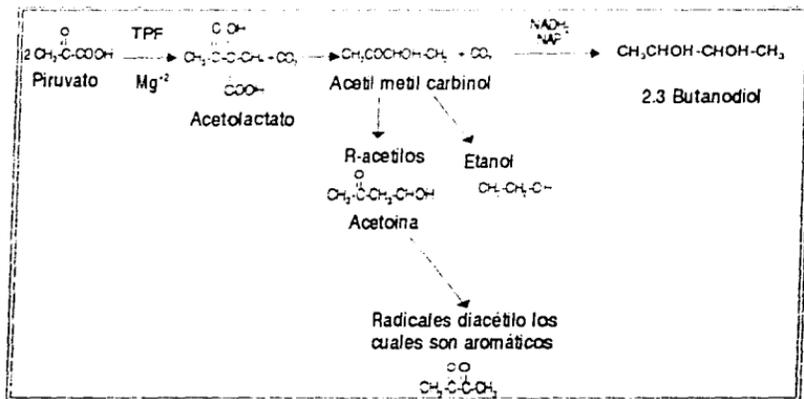
Las bacterias de tipo enterobacter forman pocos ácidos, más sin embargo transforman una parte del ácido pirúvico en 2-3 Butanodiol, mediante una eliminación doble de CO_2 , a través del ácido láctico y la acetofna. La abundante formación de gas en esta fermentación se atribuye al desprendimiento de CO_2 , dependiendo todo de la formación de acetofna.

Aparte de *Enterobacter aerogenes*, también llevan a cabo esta fermentación la *Serratia* y algunas especies de *Bacillus*.

El 2,3, -butilenglicol es una materia prima polivalente para la fabricación de colorantes, aromatizantes y emulsificantes.

Al ácido láctico influye además sobre la génesis de la sustancia aromática diacetilo, motiva la formación de ácido cítrico libre a partir de los citratos desde el momento en el que el pH alcanza un valor aproximado de 5 a 5.2 .

FIGURA 4.2.1.7.2 Fermentación 2-3 Butanodiol.



FUENTE: Brock " Microbiología " 1987.

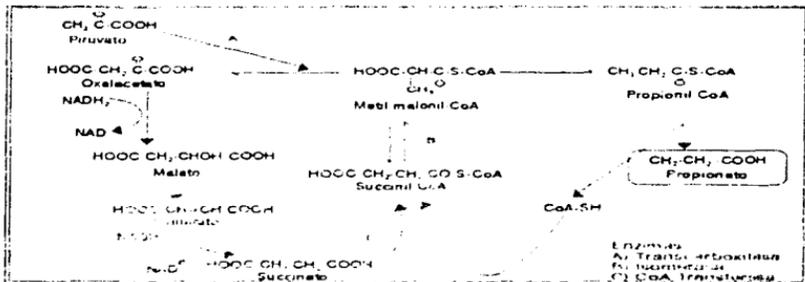
4.2.1.7.3 Fermentación Propiónica.

El ácido propiónico es un producto de la fermentación de los hidratos de carbono por las bacterias ácido propiónicas en especial las especies de *Propionibacterium*.

En este tipo de fermentación produce mucho más energía a partir de una determinada cantidad de sustrato. En la figura 4.2.1.7.3 se muestra el sistema de conversión del piruvato en propionato. El succinil CoA que se forma a partir del piruvato en el ciclo del Ácido tricarbólico, es isomerado a Metil-malonil CoA. El metil-malonil CoA da origen al Propionil CoA y Oxaloacetato en una reacción con el piruvato, catalizada por la metil-malonil carboxitransferasa, dependiente de la presencia de Biotina. Después el propionato se forma a partir de Propionil CoA.

La fermentación propionica es una fermentación beneficiosa, muchas variedades de quesos (suizos) sufren un proceso de maduración, durante el cual cambia su aspecto, textura, aroma y color; los microorganismos que llevan a cabo esta fermentación se pueden encontrar en la superficie o en el interior de los quesos.

FIGURA 4.2.1.7.3 Fermentación propiónica.



* Compuesto Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos

por la temperatura principalmente; además del contenido de azúcar óptimo (varía de un 5-20 % dependiendo de la materia prima que utilice el microorganismo), el pH debe ser ligeramente ácido.

El ácido láctico se utiliza en la acidificación de mermeladas, gelatinas, etc., se añade también a salmueras de encurtidos, olivas, rabanitos picantes y pescados. Las bacterias lácticas contribuyen a la acidificación, coagulación, aroma y sabor de los productos.¹⁷

Un ejemplo clásico de producto donde se lleva a cabo esta fermentación es en la elaboración del yogur, donde se encuentran los microorganismos vivos ayudando de manera benéfica a una mejor asimilación del calcio por el organismo humano, además de que ayudan a equilibrar la flora intestinal, etc., lo cual indica que este tipo de fermentación es una fermentación benéfica cuando se lleva a cabo en forma controlada.¹⁸

FIGURA 4.2.1.7.4 Fermentación heteroláctica.



4.2.1.7.5. Fermentación butírica.

Este tipo de reducción del piruvato se encuentra en algunos anaerobios estrictos de las especies *Clostridium*.

Clostridium butyricum

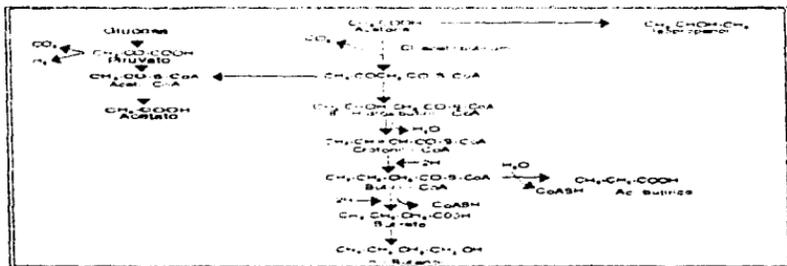
Clostridium acetobutylicum

Clostridium butylicum

Estos pueden activar el H_2 molecular mediante la ferredoxina. La disociación inicial proporciona H_2 , CO_2 y fragmentos de dos carbonos en el nivel de oxidación del acetato. Los fragmentos de dos carbonos, siguiendo una escisión que produce H_2 , se condensan, no en forma frontal, como ocurre en la acetofina (acetil metil carbinol), sino la porción frontal de una con la posterior del otro.

El Acetil-CoA resultante se descarboxila y reduce produciendo acetona, isopropanol, ácido butírico, n-butanol, CO_2 , H_2 , etc. Cuando se lleva a cabo esta fermentación es indicio de la presencia de microorganismos que no son beneficios en alimentos.

FIGURA 4 2 1.7.5 Fermentación Butírica.

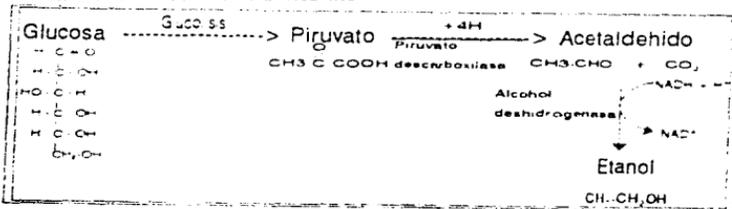


4.2.1.7.6 Fermentación alcohólica.

Este tipo de fermentación la llevan a cabo principalmente las levaduras (especialmente las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*). Este tipo de fermentación es el más viejo que se conoce en la producción de etanol a partir de glucosa. El alcohol surge de una descarboxilación del ácido pirúvico, con formación de acetaldehído y dióxido de carbono. El acetaldehído es reducido entonces a etanol por alcohol deshidrogenasa, y el NADH es vuelto a oxidar.

Las levaduras son anaerobios facultativos (pueden alterar su metabolismo para adaptarse a la presencia o a la ausencia de oxígeno) el punto más importante es que convierten la glucosa en piruvato y posteriormente, si el O_2 está presente, oxidan el piruvato a CO_2 , sino hay oxígeno disponible entra en operación una para la regeneración de NAD^+ . Las levaduras no tienen lactato deshidrogenasa, pero poseen piruvato descarboxilasa, la cual no está en la célula de los mamíferos. Esta enzima cataliza la conversión del piruvato en acetaldehído. El acetaldehído es reducido luego a etanol (alcohol etílico) por vía de la enzima que contiene Zn, la alcohol deshidrogenasa. Este, que es el paso final en la fermentación alcohólica, es análogo a la fermentación del lactato. Ambas reacciones regeneran NAD^+ y originan como productos finales del metabolismo compuestos hidrosolubles. Este tipo de fermentación es característica en la fabricación de pan, de cerveza, vinos, alcohol industrial.

FIGURA 4.2.1.7.6 Fermentación alcohólica

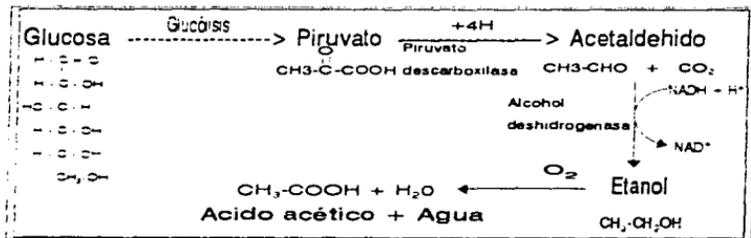


4.2.1.7.7 Fermentación acética.

Los ácidos se usan a menudo para impedir el desarrollo de microorganismos en alimentos, mediante el proceso llamado escabeche. Este proceso generalmente se lleva a cabo por bacterias ácido acéticas, las cuales comprenden un grupo de bacilos Gram - aerobios y móviles que llevan a cabo una oxidación incompleta de los alcoholes, produciéndose la acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Con etanol como sustrato se produce ácido acético; de ahí se deriva el nombre común de estas bacterias un ejemplo claro es el *Acetobacter* y el *Gluconobacter*.

Los cultivos de bacterias del ácido acético se emplean en la producción comercial de vinagre. El vinagre, producto microbiano, se obtiene principalmente sobre los zumos alcohólicos. La conversión del etanol a ácido acético es un proceso aeróbico:

FIGURA 4.2.1.7.7 Fermentación acética.



El vinagre más corriente es el de la sidra, hecho a partir de jugos de manzanas. Este sufre primero una fermentación alcohólica por acción de una levadura y este alcohol después es oxidado en presencia de O_2 a ácido acético por bacterias del género *Acetobacter*. Los métodos comerciales del zumo alcohólico se pasa através de un tanque de viruta de madera aireado desde el fondo. Las bacterias se desarrollan sobre la viruta, cuya gran area superficial proporciona el ambiente altamente aerobio. Conforme el zumo va descendiendo, el alcohol es oxidado rápidamente a ácido acético. Al estrenar un nuevo generador de vinagre *Acetobacter* debe inocularse sobre la viruta transfiriendolo de un tanque previo. El vinagre fermentado generalmente se filtra y clarifica, se pasteuriza para impedir el crecimiento posterior de hongos y se diluye a la acidez requerida, normalmente alrededor del 5 %.¹⁴

4.2.2. Anabolismo

La enorme diversidad en cuanto a requerimientos nutricionales de las bacterias es el resultado de las capacidades biosintéticas de los diferentes grupos bacterianos.

Las bacterias utilizan diversas vías catabólicas para obtener productos que utilizaran posteriormente en la biosíntesis. La glucólisis, la oxidación del piruvato y el ciclo del ácido tricarbóxico son todas vías bidireccionales y son consideradas como vías centrales entre lo que es el anabolismo y el catabolismo.

Para la biosíntesis el primer requerimiento de los constituyentes celulares son los componentes de bajo peso molecular (por ejemplo los monosacáridos, los aminoácidos, etc.) que sirven como precursores o materias primas biosintéticas.

El microorganismo puede hallarse en el medio ambiente y el organismo puede en consecuencia, dirigirlos directamente hasta los sistemas biosintéticos. En el medio ambiente pueden no encontrarse todos los compuestos de bajo peso molecular que son necesarios en las reacciones biosintéticas de los microorganismos, así que, por lo menos algunos compuestos y con frecuencia todos ellos, tienen que ser fabricados a partir de los nutrientes accesibles .⁴⁰

En los organismos quimioorganotrofos, muchas de estas materias primas para la biosíntesis se forman durante el proceso de degradación de los compuestos orgánicos para dar ATP. Las reacciones catabólicas dan una gran variedad de compuestos de dos, tres, cuatro, y cinco átomos de carbono, los cuales pueden ser tomados y utilizados en la biosíntesis.

El anabolismo es la etapa en la que se obtienen los componentes de la pared celular y de los ácidos nucleicos que son parte fundamental del organismo de una bacteria, por lo cual a continuación se hablara sobre la síntesis de algunos de los compuestos que son importantes para la conformación de las estructuras celulares y del material genético.

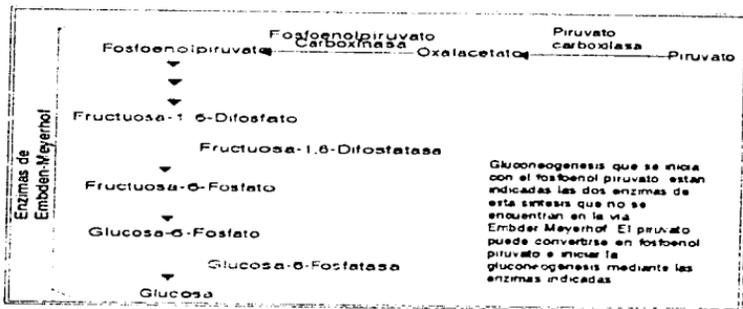
4.2.2.1. Síntesis de azúcares

Las hexosas en general tienen otras funciones celulares importantes; estos azúcares son precursores fundamentales para la síntesis de polisacáridos incluyendo los compuestos de almacenamiento y paredes celulares (peptido glucano).

La síntesis de la glucosa se denomina gluconeogénesis, que quiere decir la creación de glucosa nueva a partir de precursores que no son carbohidratos. El compuesto clave para la síntesis es el fosfoenol piruvato con el cual inicia la gluconeogénesis que emplea reacciones de la vía Embden-Meyerhof.

Los azúcares son importantes para la replicación celular ya que forman parte de la estructura celular de la membrana, pared celular, mesosomas etc., por lo cual el microorganismo los sintetiza.

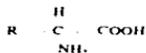
FIGURA 4.2.2.1 Síntesis de azúcares



FUENTE: Brock * Microbiología * 1967

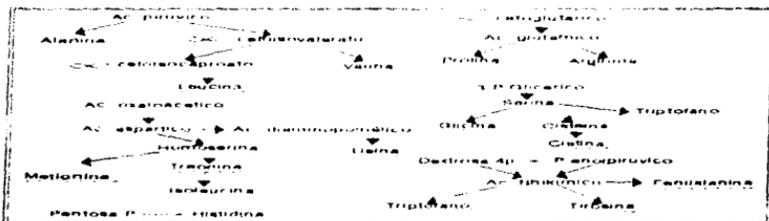
4.2.2.2. Síntesis de Aminoácidos.

En las proteínas existen unos 20 aminoácidos comunes y reunirlos todos puede constituir un problema importante para el microorganismo. Las formas que no pueden obtener del medio alburno o todos los aminoácidos ya formados deben ser sintetizados a partir de fuentes no amínicas. Los aminoácidos de las proteínas son alfa-aminoácidos de configuración L. Un aminoácido puede representarse esquemáticamente como:



Variando el grupo R de uno a otro aminoácido. Los aminoácidos cuyos esqueletos de carbono derivan directamente de intermediarios del ciclo del Acido cítrico son el ácido aspártico (del oxaloacetato) y el ácido glutámico (del α -cetoglutarato). Esos dos aminoácidos son a su vez precursores de algunos otros. En la familia del glutamato están la prolina y la arginina, mientras que en la familia del aspartato están la treonina, metionina, Ixina e isoleucina. Ver la figura 4.2.2.2.

FIGURA 4.2.2.2 Resumen esquemático de la síntesis de aminoácidos



FUENTE: Brock * Microbiología * 1987.

El anillo benzeno de los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina procede del azúcar eritrosa 4-fosfato y del ácido tosoenolpirúvico. El triptófano que tiene un núcleo indólico, deriva del compuesto aromático "ácido antranílico".

Los aminoácidos son importantes para la formación de enzimas, que son fundamentales para que se lleven a cabo las reacciones propias del metabolismo bacteriano y para las proteínas que serán requeridas por el microorganismo como parte de la estructura de sus orgánulos.

4.2.2.3 Mecanismo de síntesis proteica.

Por medio de una enzima activador del aminoácido, el extremo carboxilo de un aminoácido queda unido a un RNA de transferencia específico (tRNA). El tRNA que transporta este aminoácido activado reconoce y se une a un codón sobre el RNA mensajero (mRNA), que está asociado con un ribosoma. En los lugares de formación del péptido del extremo carboxilo de la cadena peptídica es trasladado desde su tRNA al final amino del aminoácido activado adyacente, alargando con ello la cadena peptídica en un aminoácido y liberando un tRNA.

Aunque todo el proceso se produce en un solo ribosoma, muchos ribosomas pueden usar el mRNA al mismo tiempo. La cadena peptídica se mantiene unida a cada tRNA sucesiva al que es transferida, y el tRNA recién liberado puede aceptar nuevamente otro aminoácido y volver a entrar en el ciclo. Ver la figura 4.2.2.3.

Las proteínas son importantes para la replicación celular ya que forman parte de la membrana y demás organelos celulares de aquí que sea importante su síntesis.

Las proteínas constituyen el 55 % de la masa total de la célula, se encuentran en forma de polipeptidos (como parte de las estructuras celulares) o de enzimas (presentes en las reacciones tanto catabólicas como anabólicas que se llevan a cabo en el metabolismo bacteriano)

4.2.2.4. Síntesis de ácidos grasos .

Los lípidos son de gran importancia para un microorganismo, ya que son parte funcional principalmente de las membranas. Muchas bacterias tienden a acumular *B*-hidroxibutiratos, pero no acumula grasas neutras.

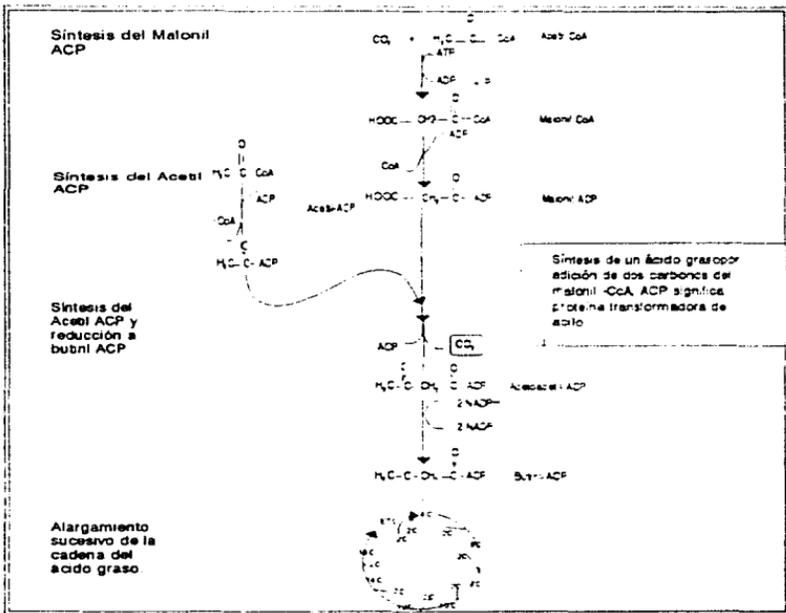
Algunos de los lípidos forman complejos con azúcares, los cuales son llamados lipopolisacáridos, siendo algunos de ellos importantes en la protección de la membrana celular.

Las bacterias los sintetiza cuando se lleva a cabo la duplicación celular y se producirán dos células apartir de una, ya que la célula nueva debe de ser idéntica a la célula madre y por lo tanto deberá contar con todos los constituyentes celulares de la misma.

La síntesis de los ácidos grasos se produce por la construcción escalonada de largas cadenas de fragmentos de dos carbonos apartir del Acetil CoA (Ver la figura 4.2.2.4), pero comprende un equipo enzimático diferente del requerido para la degradación.

Tiene interés destacar que el CO₂ es necesario para la biosíntesis de los ácidos grasos, incluso aunque en el producto final no aparezca carbono procedente del mismo. Los ácidos grasos son importantes para las bacterias, ya que forman parte de la estructura de la pared celular principalmente, de aquí la importancia de ser sintetizados por la misma.

FIGURA 4.2.2.3 Síntesis de ácidos grasos.



FUENTE Brock " Microbiología " 1987.

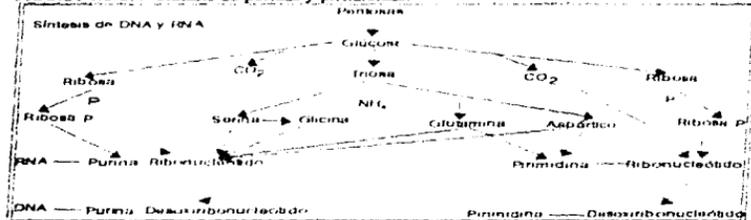
4.2.2.4. Síntesis de Purinas y de Pirimidinas.

La biosíntesis de nucleótidos en las bacterias es idéntica a la que ocurre en los tejidos de animales.

- Los nucleótidos de purina se construyen sobre la cadena de ribosa - P apartir de glicina y adiciones de carbono en una secuencia larga
- Los nucleótidos de pirimidina se forman através de una serie de intermediarios conteniendo carboxilos, comenzando con carbamil tosfato con unidades de ribosa agregadas posteriormente en la secuencia.

Las purinas y pirimidinas son componentes de los ácidos ribonucleicos, así como de muchas vitaminas y coenzimas (por ejemplo, ATP, NAD, tiamina). El anillo purínico es construido casi átomo a átomo, utilizando carbonos y nitrógenos procedentes de aminoácidos, CO_2 y formato, que se añaden al material de partida Ribosa-tosfato. Aunque la mayoría de los animales y el hombre pueden sintetizar ambos anillos, pirínico y pirimidínico, muchos organismos tales como las bacterias ácido lácticas carecen de esta propiedad. Estos organismos que requieren purinas y pirimidinas, obtienen a menudo sus nutrientes de los animales o de sus productos, tales como la leche, por lo cual en las purinas y pirimidinas son consideradas como factores de crecimiento

FIGURA 4.2.2.4 Síntesis de purinas y pirimidinas.



4.2.2.5 Síntesis macromolecular.

La síntesis de macromoléculas principales como : - DNA, RNA y proteínas; son polímeros de los bloques estructurales de los nucleótidos y aminoácidos y son sintetizados a través de un sistema alternante regulado por el citoplasma celular

- El DNA actúa como el molde necesario para su propia síntesis y la del RNA
- El RNA sirve como molde para la síntesis de proteínas y provee el núcleo de ribosomas sobre el cual se sintetizan las proteínas.
- La secuencia de transferencia de la información para la síntesis de macromoléculas implica la duplicación (DNA a DNA), transcripción (DNA a RNA) y traducción (RNA a Proteínas).

Al sintetizar los ácidos nucleicos el microorganismo puede duplicar su material genético lo que implica que se pueda llevar a cabo la replicación celular con la cual podemos obtener en cierto momento una alteración del alimento debido a la proliferación del microorganismo en el medio; esto se puede manejar también de otra manera ya que nosotros podemos manipular al microorganismo de manera que podamos obtener subproductos que se pueden utilizar en el procesamiento de alimentos.

4.2.3. Resumen del metabolismo bacteriano.

Esté capítulo en el que se habla sobre el metabolismo bacteriano se resume en la figura 4.2.3.

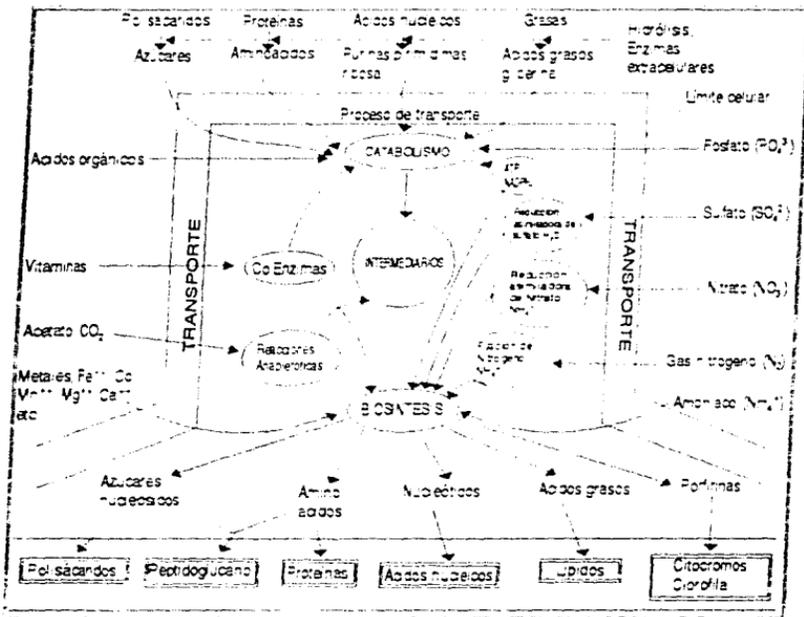
El metabolismo bacteriano empieza cuando el microorganismo comienza a obtener los nutrientes, como lo son las proteínas, los lípidos, los polisacáridos, etc., del medio ambiente en el que se encuentra. Las moléculas pueden ser absorbidas directamente y pasar a través de la membrana de la bacteria sin ningún problema, pero las macromoléculas son primeramente hidrolizadas por enzimas extracelulares, para posteriormente ser metabolizadas.

Los procesos catabólicos convierten un vasto conjunto de materias en un pequeño grupo de intermediarios que sirven como materiales de partida para las reacciones biosintéticas (anabólicas). En el catabolismo se conduce también a la formación de ATP (transportador de energía para las reacciones biosintéticas) y el NADPH₂ (transportador de poder reductor para llevar a cabo este proceso).

Las sustancias inorgánicas son o bien asimiladas directamente y utilizadas en las reacciones anabólicas como los metales representados en el esquema.

La biosíntesis conduce a la producción de los constituyentes celulares implicados en el crecimiento y en la síntesis macromolecular. En la tabla 4.2.3.1 se observan los intermediarios clave situados en la intersección entre el catabolismo y el anabolismo.

FIGURA 4.2.3. Resumen nutricional y biosíntesis.



FUENTE: Brock * Microbiología * 1987

TABLA 4.2.3.1 Intermediarios entre la interacción entre el catabolismo y el anabolismo.

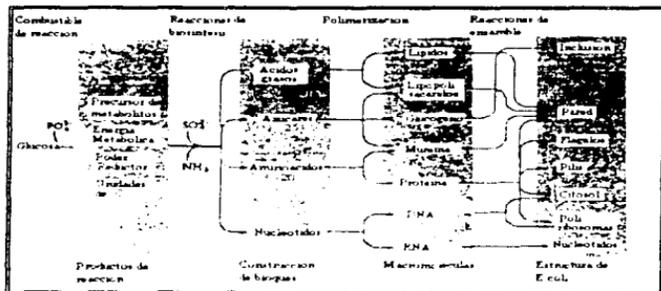
Intermediarios	Origen catalítico	Papel en la biosíntesis
Glucosa - 1 fosfato	Glucosa, galactosa, polisacáridos	Azúcares nucleósidos
Glucosa - 6 fosfato	Glicólisis	Pentosa, polisacáridos de reserva
Ribosa - 5 fosfato	Vía de la pentosa fosfato	Aminoácidos aromáticos
Fosfoenol piruvato	Glicólisis	Sistema de la fosfotrans-ferasa (transporte de azúcar) aminoácidos aromáticos, gluconeogénesis, reacciones anapleróticas (fijación del CO ₂), síntesis del ácido murámico
Piruvato	Glicólisis, fosfoacetilasa (fermentación de la pentosa)	Alanina, Valina, Leucina, reacciones anapleróticas (fijación del CO ₂)
Acido - 3 - fosfoglicérico - Cetoglutarato	Glicólisis	Serina, Glucina, Cisteína
Succinil CoA	Ciclo del ácido cítrico	Glutamato, Prolina, Arginina,
Oxalacetato	Ciclo del ácido cítrico y reacciones anapleróticas	Lasina, Metionina, Porfirinas
Fosfato de dehidroacetona	Glicólisis	Acido aspártico, Lasina, metionina, Tirosina, Isoleucina
Acetil CoA	Descarboxilación del piruvato, oxidación de los ácidos grasos, degradación de la pirimidina	Glicerina (grasas) Ácidos grasos, esteroides, Lasina y Leucina (dos carbonos)

FUENTE: Brock * Microbiología * 1987

Aproximadamente 2000 reacciones metabólicas distintas participan en la síntesis ordinaria de una célula bacteriana. Sobre las bases de la función primaria del crecimiento de la célula están las reacciones metabólicas que pueden ser catalogadas como reacciones de ensamble, reacciones de polimerización, reacciones biosintéticas y energía de reacción.

Ver figura 4.2.3.2 donde se muestra la síntesis química de la glucosa para los quimioheterótrofos como la *E. coli*.

FIGURA 4.2.3.2 Metabolismo y Anabolismo de la *E. Coli*.



FUENTE: Neidhart " Physiology of the bacterial cell" 1990

5. MEDIOS DE CULTIVO.

Medio de cultivo se denomina a un conjunto de sustancias que contiene los nutrientes necesarios y que sirva de sustrato favorable (artificial) para el desarrollo , crecimiento o identificación de los microorganismos.

Todos los microorganismos en general, las bacterias y hongos se cultivan sobre sustratos nutritivos para poder estudiar sus propiedades o la utilización de ellas en condiciones controladas.

La proliferación de bacterias es el resultado de una interacción compleja de diversas sustancias alimenticias y principios activos, en la cual intervienen factores físicos como son la temperatura, pH, factor redox, etc.

Para su crecimiento todos los microorganismos requieren agua, carbono, oxígeno, nitrógeno, calcio, fósforo y hierro de forma utilizable, además muchos microorganismos dependen de oligoelementos como manganeso, molibdeno, zinc, cobre, etc.

En los medios de cultivo pueden estar presentes colorantes e indicadores cuyo cambio de color será característico para un determinado intervalo de pH.

La clasificación de los medios de cultivo, como es obvio no todos los medios de cultivo son utilizados para el aislamiento de todas las cepas bacterianas, en ocasiones algunas poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de algunos microorganismos o de impedir el crecimiento de otros.

Los medios de cultivo no deben contener agentes químicos que dificulten el desarrollo de las bacterias, solo en el caso de que se ocupen como medios selectivos para aislar un grupo determinado de microorganismos.

En general la clasificación se basa en el propósito para el cual se hacen los medios de cultivo.⁵⁴

⁵⁴ Compendio Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos*

5.1. Finalidad del uso de los medios de cultivo.

A) Fomentar el crecimiento microbiano en forma que pueden comprobarse las características del cultivo.

b) Facilitar algunas reacciones bioquímicas, que luego puedan ser demostrables por observación directa o bien indirectamente, por subsecuente reacción en presencia de algunos aditivos adicionales.¹⁹

5.2. Clasificación de los medios de cultivo en base a su estado físico.

Los medios se pueden clasificar de acuerdo a su estado físico en:

- Estado sólido. Contiene el 1.5 % de agar bacteriológico.
- Estado semisólido. Contiene 1.0 % de agar bacteriológico, lo que le da una consistencia pastosa.
- Estado líquido. Carece de agar.

5.3. Los constituyentes de los medios pueden ser los siguientes:

Cada uno de los medios de cultivo puede estar constituido por diversos elementos como lo son el agar, sueros, peptona, etc., esta composición va a depender del uso que se le vaya a dar y de los microorganismos que se vayan a cultivar. A continuación se presenta una lista de los constituyentes más usuales.

5.3.1 Agar bacteriológico.

Se encuentra en forma de rama, hojuelas, gránulos o polvo, se obtiene apartir de algas marinas (verde-azules), tiene propiedades gelificantes, cuando se mezcla con agua fría no forma la solución por lo cual puede lavarse para eliminar impurezas. La concentración en que se utilice depende del origen geográfico de las especies de algas y del propósito que se

persiga, como se menciona en el punto 5.2. Otro factor que afecta la consistencia del gel es la esterilización a bajo pH, lo que favorece la hincufacción del medio.

5.3.2. Peptona.

Preparado por hidrólisis ácida o enzimática de proteína vegetal ó animal, (de músculo, hígado, cerebro o corazón de ternera, caseína, lactoalbúmina, gelatina y frijol soya).

La composición exacta dependerá del material crudo y del método de manufactura. Debido a estas variantes antes de ser utilizada una peptona deberá ser probada ya que algunos lotes pueden ser inadecuados para un fin específico.

Los diferentes tipos de peptona que se manejan en el laboratorio dependen del grado de hidrólisis que haya sufrido la proteína (leche, carne, etc). Las peptonas procedentes de la caseína son las más enriquecidas así como las de cerebro, corazón y carne, generalmente se emplean cuando se quiere que el medio de cultivo sea enriquecido para favorecer el desarrollo de las bacterias más eficientemente. La peptona derivada de la soya (Trypticase soya) es una peptona rica en azúcares. Generalmente en el análisis microbiológico de alimentos se requiere el empleo de peptonas enriquecidas.

5.3.3. Extracto de levadura.

Se prepará apartir de levadura de pan o cerveza, es una fuente rica de aminoácidos y vitaminas del complejo B. Se utiliza para suplementar o reemplazar extractos de carne en el caldo nutritivo en algunos casos.

5.3.4. Sangre

Habitualmente se recomienda la sangre desfibrinada de caballo o de oveja, debe de ser fresca y no será utilizada si la hemólisis es evidente

5.3.5. Plasma.

Se emplea para demostrar la actividad de la coagulasa. Se suele usar el de humano o de conejo. Debido a que algunas bacterias utilizan el citrato, es mejor emplear plasma oxalatoado. El plasma puede obtenerse por la separación del sobrenadante de la sangre con anticoagulante en el cual se sedimentan los glóbulos rojos. Comercialmente existe plasma deshidratado.

5.3.6. Suero.

Se preparaf apartir de sangre colectada sin anticoagulante

5.3.7. Bilis.

Contiene gran cantidad de sustancias que dificultan su uso (ácidos biliares, pigmentos, etc) por tal motivo se prefiere utilizar productos derivados como el extracto de bilis, bilis deshidratada o sales biliares. Se puede encontrar el producto comercial deshidratado y una solución al 10 % de esta misma equivale a la bilis fresca.

5.3.8. Gelatina.

Es la proteína obtenida por extracción del material colágeno y se encuentra en el mercado en forma de hojas, ramas, gránulos o polvo. Cuando se sumerge en agua abajo de 20 °C, la gelatina no se disuelve, se hincha y se hidrata 5 o 10 veces su peso de agua. La solución se obtiene por calentamiento y los geles de la solución por entriamiento a 25 °C.

5.3.9. Carbohidratos.

Se utilizan para enriquecer los medios de crecimiento, , proveen una fuente de energía accesible para el microorganismo, además de que puede servir como sustrato en pruebas

5.3.10. Sales minerales.

Se utilizan en la preparación de medios de cultivo definidos para estudios de nutrición bacteriana y pruebas de utilización de fuentes de carbono.

5.3.11. Indicadores.

Los colorantes y los indicadores son muy importantes en la preparación de medios de cultivo y pueden actuar como inhibidores o como bacteriostáticos. También pueden ser indicadores del cambio de acidez o de alcalinidad dependiendo del indicador que se emplee. Actualmente como indicadores redox en ciertos medios de cultivo se usan la resarzurina y el azul de metileno, son los más usados por su color e indican la presencia o ausencia de oxígeno en algunos medios utilizados en el estudio de bacterias anaerobias. A continuación se proporciona una lista de los indicadores de pH más usuales en las formulas de los medios de cultivo.

TABLA 5.3.11. Indicadores de pH

Indicador	Valor de pH y color que adquiere	
	Acido	Alcalino
R rojo de metilo	4.2 rojo	6.3 incoloro
R rojo neutro	6.8 rojo	8.0 amarillo
R rojo de fenol	6.8 amarillo	8.4 rojo
A azul de bromotolol	6.0 amarillo	7.6 azul
P púrpura de bromocresol	5.2 amarillo	6.8 púrpura
T tornasol	5.0 rosa	8.0 azul
R rojo de cresol (ácido)	0.2 rojo	1.8 amarillo
R rojo de cresol (alcalino)	7.2 amarillo	8.8 rojo
F fenolftaleína	8.3 incoloro	10.0 rojo

FUENTE: Alvarez "Manual básico de Bacteriología" 1994

5.3.12. Preparación de los medios de cultivo.

Para la preparación de los medios de cultivo, se deben emplear recipientes limpios con una capacidad doble de la cantidad que se va preparar, para evitar que los medios de cultivo se derramen en el momento de su esterilización, se debe emplear agua destilada o desmineralizada, cuyo pH sea lo más cercano a la neutralidad. Al medio de cultivo se le añade la mitad del agua necesaria para poder agitar y hacer una mezcla homogénea. Después se adiciona la cantidad de agua restante, aprovechando para desprender las partículas de medio que pudiesen quedar adheridas a la pared del recipiente.

Los medios de cultivo que contengan agar o gelatina deben ser calentados para obtener su disolución, que se logra cuando al agitar no se adhiere ninguna partícula a la pared interna del recipiente, pero sin calentar en exceso para evitar la desnaturalización de los componentes. El pH se ajusta al valor indicado para cada medio de cultivo.

Si las normas de preparación de los medios de cultivo no indican otra cosa, la esterilización se lleva a cabo en autoclave, a 121 °C durante 15 min. Posteriormente se vierten los medios de cultivo en las cajas de Petri a una temperatura de 45-50 °C. Las burbujas de aire en la superficie se eliminan pasando por la superficie, en forma rápida la flama del mechero Bunsen. Antes de sembrar las cajas puede secarse la superficie húmeda del agar en la estufa a 30 - 40 °C. Para ello se coloca la parte inferior de la caja de Petri, hacia abajo, el secado se logra de 20 - 30 min.

5.4. Clasificación química de los medios de cultivo.

Estos son algunos de los constituyentes que pueden ser usados en la preparación de los medios de cultivo, y es en base a estos constituyentes que se podría dar una clasificación más, que es la clasificación química la cual se divide en cinco grupos principalmente que son:

- 1.- Medios de cultivo simples.
- 2.- Medios de cultivo enriquecidos.

- 3.- Medios selectivos y diferenciales.
- 4.- Medios de cultivo para transporte.
- 5.- Medios de cultivo para mantenimiento.

Teniendo en cuenta esta clasificación a continuación se estudiarán más profundamente cada una de las diferentes categorías ya mencionadas.

5.4.1. Medios de cultivo simples.

Tienen el mínimo de requerimientos, estos son los medios más simples que solo contienen algún extracto de carne u otra infusión simple, como peptona, sal y agua. El extracto o la infusión proporciona al microorganismo los aminoácidos, vitaminas, sales y pequeñas cantidades de carbono, nitrógeno, hidrógeno y otros elementos.

El agua a usarse debe ser destilada ya que el agua normal, contiene grandes cantidades de sales minerales que son dañinas para el microorganismo y afectan la calidad del medio de cultivo.

Son medios que por lo general contienen los nutrientes esenciales para promover el desarrollo de microorganismos poco exigentes nutricionalmente. Más adelante se mencionan algunos de estos medios, sus componentes y la forma de su preparación.

5.4.2. Medios de pre-enriquecimiento.

Tienen la función de reanimar e iniciar la proliferación de microorganismos potencialmente afectados en su viabilidad, permitiendo su recuperación a partir de productos que han sido sometidos a tratamientos como la desecación, congelación, procesos caloríficos, etc., que pueden dañar alguna o algunas de las estructuras celulares. Estos medios no tienen agentes bacteriostáticos y se utilizan en productos con baja carga microbiana.

5.4.3. Medios de cultivo enriquecidos.

Los medios enriquecidos son aquellos medios básicos que han sido complementados, con líquidos corporales, vitaminas específicas, aminoácidos, proteínas y otros nutrientes claramente definidos. Entre algunas sustancias que se usan para enriquecer el medio se usa sangre, suero, y yema de huevo, además peptonas de buena calidad que son derivadas de la caseína o los productos derivados de la soya, etc.

Son medios con otros nutrientes que proporcionan factores de crecimiento y cuya finalidad es el promover el crecimiento de microorganismos exigentes.

5.4.4. Medios de cultivo selectivos y diferenciales.

Los medios diferenciales, son medios básicos o enriquecidos a los cuales se han agregado ciertos reactivos que reaccionan con algunos tipos específicos de bacterias en cierta forma observable, algunos de estos reactivos son colorantes como el Cristal violeta o la Violeta de genciana entre otros que ayudan a diferenciar unos microorganismos de otros.

Los medios de cultivo que solo contienen extracto de carne, peptona, sal y agua, son líquidos; para el estudio de las características de las colonias es indispensable el uso de los medios sólidos. La solidificación se consigue agregando agar, gelatina, albúmina de suero o de huevo, a los otros ingredientes. Es preferible usar el agar que es un polisacárido obtenido de las algas marinas. A la concentración del 15 - 20 % pocas bacterias pueden hidrolizar el agar, tienen un punto de fusión de 92 °C y el de solidificación es de aproximadamente 45 °C.

En concentraciones de 1.5 - 3 %, el agar es un medio sólido que no se desintegra por los medios físicos empleados en el cultivo de la mayoría de los microorganismos.

5.4.5. Medios para transporte.

Se usan para mantener los microorganismos durante su envío a laboratorios. En estos medios se pueden usar sustancias estabilizadoras de pH, sin hidratos de carbono, sustancias reductoras o nutrientes que permiten a los microorganismos conservarse hasta que llegan al lugar donde se procesan. Uno de estos medios es el medio Stuart o caldo nutritivo.

5.4.6. Medios de cultivo de mantenimiento.

Sirven para preservar satisfactoriamente las características fisiológicas y la viabilidad de un cultivo, requieren características diferentes a las óptimas para el crecimiento. Estos medios no deben de estimular el crecimiento abundante. Se puede emplear el agar nutritivo, aunque hay bacterias de difícil desarrollo que se mueren rápidamente cuando se mantienen en medios de cultivo de este tipo. En estos casos recurre a métodos como la liofilización o la congelación empleando crioprotectores adecuados ;

A continuación se da una lista de los medios existentes en el mercad tomando como en cuenta la clasificación anterior teniendo primeramente:

5.5 Medios de cultivo, usos, formulación y manera de preparar.

5.5.1 Medios de cultivo simples

5.5.1.1. Caldo nutritivo.

Extracto de carne	3 g.
Peptona	5 g.
Agua destilada	1000 ml.

Disuélvase los ingredientes en el agua mediante calor. Ajustar el pH a 7.4 . Colóquese en caldo en recipientes adecuados. Esterilizar por autoclave a 121 °C durante 15

minutos, enfríese, incúbase a 37 °C durante 18 horas, descartar los tubos contaminados, y almacenar el resto a 4 °C.

El caldo nutritivo proporciona un medio que mantendrá el crecimiento de una gran variedad de microorganismos pero no el de los más exigentes.

5.5.1.2. Agar nutritivo.

Extracto de carne	3 g.
Peptona	5 g.
Cloruro sódico	8 g.
Agar	1000 ml.

Disuélvase los ingredientes por ebullición lenta, ajustar el pH a 7.4; esterilizar en el autoclave a 120 °C durante 15 minutos, enfriar hasta aproximadamente 60 °C.

Viertanse aproximadamente 15 ml. asépticamente en placas o discos de Petri estériles de tamaño estándar. Dejense aproximadamente 1 hora para que se solidifique completamente el medio y almacenarlo después en la oscuridad, con el medio en la parte superior, para impedir que el agua de condensación caiga sobre la superficie.

Los medios puestos así (invertidos), en placas o discos deben ser usados a más tardar en el curso de una semana, o un plazo muy aproximado a este, ya que la evaporación altera la concentración de los ingredientes con bastante rapidez.

5.5.2. Medios de cultivo enriquecidos.

5.5.2.1. Agar - Sangre.

El agar-sangre, es uno de los medios más comúnmente usados en el laboratorio médico microbiológico. Pueden agregarse del 5 al 10 % de sangre desfibrinada estéril a cualquier

medio de agar básico. Debe asegurarse que el medio este estéril y también que se entrie justamente por abajo de 56 °C antes de poner la sangre y verterlo en las placas, inmediatamente, tal como se indica para el agar nutritivo.

Frecuentemente se usa el agar nutritivo como base para el agar-sangre, pero se recomienda el agar con infusión de corazón. El nivel de NaCl de la base debe ser el mínimo de 0.5 % y su isotonicidad óptima de 0.9 %.

5.5.2.2. Caldo de suero.

Pueden agregarse distintas concentraciones de suero, tomadas de diferentes especies, a cualquiera de los caldos básicos. Hay que agregar suero estéril, asépticamente, el caldo que se haya enfriado a menos de 65 °C para impedir que la proteína se coagule. El caldo de suero con soya tréptica al 20 % es particularmente útil para conseguir la preservación de cultivos deshidratados de organismos exigentes.

5.5.2.3. Caldo de Triptona y soya.

Triptona	17 g.
Soytona	3 g.
Dextrosa	2.5 g.
Cloruro sódico	5 g.
Fosfato dipotásico	2.5 g.
Agua destilada	1000 ml.

Preparase como se haría con el caldo nutritivo. Este medio constituye un medio de cultivo algo más rico que el caldo nutritivo y permite el crecimiento de un número más amplio de distintas bacterias. La dextrosa proporciona una fuente inmediata y fácil de utilizar, pero será rápidamente convertida en productos finales ácidos. Estos productos finales serán parcialmente amortiguados por el fosfato.

5.5.2.4. Caldo de infusión de cerebro y corazón.

Infusión de cerebro de ternera	200 g de cerebro
Infusión de carne y corazón	250 g de corazón
Peptona	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Fosfato disódico	2.5 g.
Dextrosa	2 g.
Agua destilada	1000 ml.

Preparar como el caldo nutritivo.

5.5.1.5. Agar de infusión de cerebro y corazón.

Agregar 15 g. de agar al caldo de infusión de corazón y cerebro. Prepárese como el agar nutritivo.

5.5.2.6. Caldo de infusión de corazón.

Infusión de corazón de res	500 g. de corazón
Triptona	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Agua destilada	1000 ml.

Preparar como caldo nutritivo.

5.5.2.7. Agar de extracto de hígado.

Caldo de hígado de res	500 g. de hígado.
Peptona proteosa	10 g.
Cloruro sódico	5 g.
Agar	20 g.

Agua destilada 1000 ml.

Prepárese como el agar nutritivo, ajustándose el pH a 6.9. Este medio permite la detección de H₂S por *Brucella* cuando se usa inclinando tubos. Se detecta el sulfuro de hidrógeno colgando una tira de papel filtro, mojada en una solución al 10 % de acetato de plomo y secada, al borde del tubo.

5.5.2.8. Agar Dextrosa de Sabourand.

Peptona	10 g.
Dextrosa	40 g.
Agar	25 g.
Agua destilada	1000 ml.

Disuélvase por ebullición, ajustar el pH a 7.6, colocarlo en tubos en volúmenes de 20 ml. Los tubos se tapan con algodón y se esterilizan en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Inclinan los tubos para conseguir el plano inclinado máximo, dejar enfriar y guardar en refrigeración a 4 °C.

5.5.3. Medios de cultivo selectivos y diferenciales.

5.5.3.1. Agar Baird Parker

Triptona	10 g.
Agar	20 g.
Agua destilada	950 ml.
Extracto de carne	5 g.
Extracto de levadura	1 g.
Piruvato sódico	10 g.
Cloruro de litio	5 g.

Preparar una suspensión son 63 g. de la formulación en 950 ml de agua destilada y

calentar hasta que se disuelva completamente. Esterilizar en autoclave por 15 min. a 118 - 121 °C. Enfriar a 50 - 55 ° en agua y aseptícamente poner 50 ml. de telurito y una solución de yema de huevo para enriquecer el medio, mezclar uniformemente y poner de 15 - 17 ml. en cada caja de Petri estéril.

5.5.3.2. Agar con sangre y telurito.

Peptona proteasa num. 3	20 g.
Dextrosa	2 g.
NaCl	5 g.
Agar	13 g.
Agua destilada	1000 ml.

Preparar como agar nutritivo, enfriar la base estéril hasta justamente abajo de 80 °C, agregar entonces 20 ml. de telurito de potasio al 1 % y al 5 % de sangre; calentar **hasta** justamente arriba de 80 °C, hasta que el medio tome color parduzco, enfriar y verter en las placas.

Este medio inhibe casi todas las bacterias, pero persiste el crecimiento de *Corynebacteriaceae*. La reducción del inhibidor, el telurito, ayuda aún más a la diferenciación de *C. diphtheriae* y de *Enterococcus faecalis*, ya que ésta se demostrará por un ennegrecimiento, característico.

5.5.3.3. Agar rojo - violeta bilis.

Extracto de levadura	3 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Peptona de gelatina	7 g.
Agar	15 g.
Lactosa	10 g.
Rojo neutro	0.03 g.

Cristal violeta	0.002 g.
Agua destilada	1000 ml.

Hacer una suspensión con 41.5 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar bien y posteriormente calentar agitando dejando que hierva 1 min.; el pH final de la solución es de 7.4 ± 0.2 . Posteriormente dejar enfriar a $44 - 46^\circ\text{C}$ y usar inmediatamente. También se puede distribuir y esterilizar en autoclave de $118 - 121^\circ\text{C}$ durante 15 min.

5.5.3.4. Agar MacConkey.

Peptona	17 g.
Peptona proteasa	3 g.
Lactosa	10 g.
Sales biliares núm. 3	1.5 g.
Cloruro sódico	5 g.
Agar	13.5 g.
Rojo neutro	0.03 g.
Cristal violeta	0.001 g.
Agua destilada	1000 ml.

Preparar con agar nutritivo; se tendrá un pH final de 7.1 ± 0.1 ; no debe prolongarse el período de ebullición más allá del punto requerido para disolver todos los ingredientes. El agar MacConkey ha sido diseñado específicamente para el aislamiento de organismos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, y permite diferenciar a los fermentadores de lactosa de los no fermentadores de los miembros de esta familia. La fermentación de lactosa quedará demostrada por un cambio en el color del rojo neutro a color rosa púrpuro. Las colonias observarán esta coloración, y las sales biliares, en un pH ácido, se precipitarán para mostrar este color aún más intensamente. Los no fermentadores de lactosa se presentan como colonias pálidas, lisas, opacas. Las sales biliares en combinación con el cristal violeta también inhibirá a casi todos los organismos Gram +, especialmente a los no entéricos.

5.5.3.5. Agar Salmonella - Shigella.

Extracto de carne	5 g.
Peptona proteasa	5 g.
Lactosa	10 g.
Sales biliares núm. 3	8.5 g.
Citrato sódico	8.5 g.
Tiosulfato sódico	8.5 g.
Citrato férrico	1 g.
Agar	13.5 g.
Verde brillante	0.00033 g.
Rojo neutro	0.025 g.
Agua destilada	1000 ml.

Preparar como agar MacConkey, pero no pasar por autoclave. La lactosa, las sales biliares y el rojo neutro, sirven básicamente para los mismos fines aquí que en el agar MacConkey.

Sin embargo este medio es altamente selectivo para especies *Salmonella* y razonable para las de *Shigella*, ya que inhibiran a casi todos los coliformes la adición del citrato y el verde brillante. El tiosulfato sódico sirve como sustrato la producción de H_2S por muchas *Salmonella*. En la mayoría se detecta por el ennegrecimiento de las colonias cuando reaccionan el H_2S con el citrato férrico para producir sulfuro ferroso.

5.5.3.6. Agar de Eosina y Azul de metileno (EMB).

Peptona	10 g.
Lactosa	5 g.
Sacarosa	5 g.
Fosfato dipotásico	2 g.
Agar	13.5 g.

Eosina Y	0.4 g.
Azul de metileno	0.065 g.
Agua destilada	1000 ml.

Preparar como el agar MacConkey, si se le va a usar de inmediato. El azul de metileno, cuando ha sido reducido por su autoclave, puede ser reoxidado si se agita en el medio antes de verterlo en las placas. El agar EMB es otro medio diferencial para *Enterobacteriaceae*, mostrando a los fermentadores de lactosa como colonias negras y algunas con brillo metálico porque conjugan la Eosina y el azul de metileno y se precipita; los no fermentadores de lactosa se presentan incoloros.

Se agrega sacarosa porque algunos coliformes fermentan este azúcar más fácilmente que la lactosa. La inclusión de azúcar adicional debe ponerlos en guardia naturalmente, ya que algunos de los no fermentadores de lactosa podrían fermentar el azúcar adicional y confundirseles irónicamente por fermentadores de la lactosa.

5.5.3.7. Agar de sulfito de bismuto.

Extracto de carne de buey	5 g.
Peptona	10 g.
Dextrosa	5 g.
Dosfato disódico	4 g.
Sulfito de bismuto	8 g.
Sulfato ferroso	0.3 g.
Sulfito de bismuto	8 g.
Agar	20 g.
Verde brillante	0.025 g.
Agua destilada	1000 ml.

Preparar como Agar MacConkey, ajustando el pH a 7.7 pero no se esteriliza.

Este medio es particularmente útil en el aislamiento de *S. typhi*, que reducirá el sulfito

de bismuto y se mostrará negro. El sulfito de bismuto también inhibe a casi todos los organismos Gram +; el verde brillante, naturalmente limita el crecimiento de los coliformes. El fosfato disódico puede actuar como amortiguador.

5.5.3.8. Caldo F de Selenita.

Triptona	5 g.
Lactosa	4 g.
Fosfato disódico	10 g.
Selenita sódica	4 g.
Agua destilada	1000 ml.

Disolver, ajustar el pH a 7.0, hacer que entre en ebullición, pero no esterilizar. Poner en tubos estériles, hasta una profundidad de menos de 5 cm. La selenita sódica en este pH es tóxica para los coliformes, con lo que proporciona a Salmonella una mejor probabilidad de crecimiento. La selenita será reducida lentamente, formando productos alcalinos, los que son contra balanceados por los productos finales ácidos de la fermentación de la lactosa. El fosfato disódico ayuda más aún a mantener el pH en 7.0, pero no puede mantenerse un pH estable por mucho más de 12 horas.

5.5.3.9. Agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato).

Extracto de levadura	3 g.
L-lisina	5 g.
Xilosa	3.75 g.
Lactosa	7.5 g.
Sacarosa	7.5 g.
Desoxicolato sódico	2.5 g.
Citrato férrico de amonio	0.8 g.
Tiosulfato sódico	6.8 g.
Cloruro sódico	5 g.
Agar	15 g.

Rojo de tenol 0.08 g.

Disolver por medio de calor, pero no hacer que ebullla, ajustar a un pH de 7.4 y verter en las placas o discos.

El agar XLD es otro medio diferencial y selectivo para los bacillos Gram-. Los fermentadores de lactosa o los fermentadores de sacarosa producirán colonias amarillas, y los no fermentadores de la lactosa serán rojos. La producción de sulfuro de hidrógeno se ve por la aparición de centros negros en las colonias. Este medio es más selectivo para *Shigella* que para otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae*.

6. ESTERILIZACIÓN.

En Microbiología, esterilización, implica la eliminación o destrucción de todo organismo vivo. Por tanto un objeto estéril está libre de todo organismo viable (vivo). Un microorganismo está vivo cuando es capaz de reproducirse.

Hay que tomar en cuenta que destruir no es lo mismo que eliminar. Especialmente cuando se esterilizan líquidos, debemos tener en cuenta que algunos métodos de esterilización dejan organismos muertos u otros productos después del proceso. Aunque un líquido puede ser estéril, estos productos remanentes con frecuencia interfieren con la finalidad a la que se destina el líquido. Un ejemplo es cuando se esteriliza leche y se elimina el *Clostridium botulinum*, pero queda presente su toxina que es muy perjudicial para el hombre. Teóricamente es imposible alcanzar la esterilidad absoluta (100 %). Mientras más pequeña sea la cuenta de gérmenes inicial, menor será el riesgo de sobrevivencia de las células bacterianas viables y de las esporas, después del procesamiento.

Modernamente la tecnología de los alimentos hace uso muy frecuente de productos inhibidores (microbiostáticos), generalmente de varios de ellos a la vez (factores combinados), de tal suerte que con pequeñas modificaciones de cada uno, que no inciden desfavorablemente en los caracteres organolépticos de los productos, puede conseguirse el objetivo perseguido: inhibir el crecimiento microbiano.

La demanda hecha en la industria de alimentos es de diversos tipos, principalmente:

- Los productos alimenticios deben de ser estables en anaquel, deben de ser seguros y de ninguna manera peligrosos para la salud del consumidor.
- Deben de ser nutritivos al mismo tiempo que deben de saber bien.
- Finalmente, en orden pero no en importancia, deben tener un precio razonable.

La esterilización debe diseñarse para lograr dichas demandas. La prioridad inicial por supuesto, es la seguridad del producto, pero la retención de calidad es casi igualmente importante.

Únicamente los descubrimientos hechos por *Pasteur* aportaron el fundamento científico para los inventos de *Appert*. No fue sino hasta el inicio del siglo XX, que se efectuó una gran investigación en este campo y casi toda la investigación se llevó a cabo en los E.U.⁶⁴

Hay varios métodos de esterilización posibles. En términos generales puede clasificarseles así:

A) Métodos químicos. Por cuyo medio se lleva a cabo la destrucción de organismos por aplicación de un agente químico.

B) Métodos físicos. En los cuales se lleva a cabo la destrucción por calor o por radiación, o bien eliminando los microorganismos por filtración ó por centrifugación.

Algunos métodos de esterilización naturalmente utilizan una combinación de estos métodos generales.

6.1. Clasificación de los agentes esterilizantes.

Físicos

Calor húmedo

Ebullición

Vapor a presión atmosférico

Vapor con alta presión.

Calor seco

Flameado

Incrustación

Aire caliente

Filtración **Bujías (tierras de diatomeas, porcelanas),**
Filtros de asbesto
Discos de membrana de acetato de celulosa.

Radiaciones.

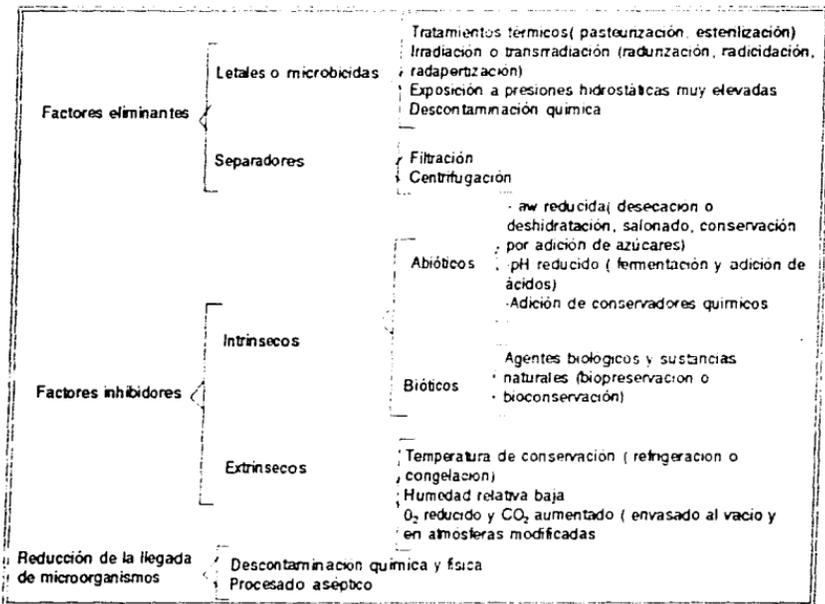
Tipo no ionizante **Rayos ultravioleta**
Rayos infrarrojos

Tipo ionizante **Rayos gama (cobalto 60)**
Electrodos de alta energía

Gases

Oxido de etileno
Formaldehído.

TABLA 6.1. Procedimientos actuales y futuros de tratamiento (procesoado) de los alimentos, para asegurar la inocuidad, calidad y aceptabilidad microbiológicas.



6.1.1. Esterilización por agentes físicos.

En este tipo de esterilización se agrupan la esterilización por calor húmedo, por calor seco y filtración, de los cuales se hablará posteriormente.

6.1.1.1 Esterilización por calor seco

Los primitivos egipcios fueron los primeros (señal registrada) que esterilizaron térmicamente. Utilizaron el calor para esterilizar térmicamente; ellos esterilizaron instrumentos quirúrgicos a la flama directa. Soló podemos hablar de métodos realmente científicos de esterilización después de que *Koch en 1821*, estudio las propiedades del vapor y el aire caliente aplicadas a la esterilización.

Koch, junto con sus asociados, demostró que el calor seco a 100 °C podía destruir todas las bacterias vegetativas en un término de 60 - 90 min. además el y sus colaboradores utilizaron el calor húmedo en lugar del calor seco y encontraron que aumentaba grandemente la eficacia de la esterilización.

Aunque la esterilización por medio de calor es uno de los mejores métodos de los que disponemos, debemos aclarar que aún a temperaturas extremas, no todos los microorganismos serán destruidos al mismo tiempo.

El calor seco mata a los microorganismos por oxidación de las proteínas celulares vitales; se necesitan temperaturas relativamente altas para hacer eficaz la esterilización por este medio.

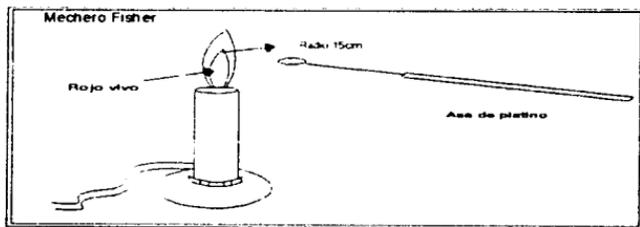
A mayor Temperatura ----> Menor Tiempo

6.1.1.1.1. Flameado.

La flama roja de un mechero Fisher es especialmente adecuada para esterilizar y descontaminar los instrumentos metálicos tales como las asas de inoculación, las agujas,

espatúlas, etc. Para este fin es mejor emplear una flama protegida ya que el material infeccioso puede difundirse mediante los aerosoles que se desprenden y por lo tanto ser causa de contaminación del operador. La flama de este mechero proporciona 15 cm. de radio de espacio estéril

FIGURA 6.1.1.1.1 Mechero Fisher y asa de inoculación.



6.1.1.1.2. Incineración.

Aunque está recomendada para deshacerse de apósitos contaminados, como artículos de papel y restos animales. Para descontaminar se deben pasar por el autoclave en los laboratorios y después desecharse como basura ordinaria. Los incineradores debe de tener corriente de aire a presión.

6.1.1.1.3. Hornos de aire caliente.

Se usa principalmente para esterilizar artículos de vidrio, y otros semejantes que

pueden resistir el calor se esterilizan mejor con aire seco tal como el que proporciona un horno de aire caliente.

Para esterilizar el material se requiere de 60 a 90 min. a una temperatura de 180 °C, ya que se asegura con esto que las esporas altamente resistentes serán destruidas al momento. Como indicador de una buena esterilización se usan esporas de *Clostridium tetani*.

Para esterilizar en el horno se deben de tomar en cuenta varios factores como:

- 1) El tiempo de precalentamiento para el horno y los materiales.
- 2) La conductividad del calor através de los objetos que se están esterilizando.
- 3) La corriente de aire en el interior del horno.

El horno es un simple gabinete provisto de un calentador interconstruído que nos permite obtener temperaturas elevadas superiores a 100 °C, la cual puede controlarse mediante un termostato.

6.1.1.2. Esterilización por calor húmedo.

El calor húmedo es el medio más eficaz para esterilizar, ya que con temperaturas relativamente bajas se asegura la esterilización.

Cuando las bacterias quedan expuestas al calor húmedo, este rápido aumento de temperatura provoca la coagulación de la proteínas celulares vitales y este proceso se favorece con la presencia de agua. Durante la esterilización debe de tenerse especial cuidado ya que se deben destruir las esporas que puedan estar presentes durante el proceso.⁶¹

⁶¹ Al condensarse vapor sobre las superficies frías, esa cantidad de energía térmica es liberada instantáneamente y pasa al ambiente más frío. La temperatura de los artículos

calentados por calor húmedo elevarán con mucho mayor rapidez la temperatura que la de los artículos calentados con calor seco¹¹.

Existen varios métodos de esterilización por calor húmedo entre los que se encuentra la ebullición, la tindalización y la aplicación de vapor a presión, de los cuales se hablará posteriormente.

6.1.1.2.1. Ebullición.

Esta es un poco más eficaz que el calor seco a 100 °C, empero es más fácil regular la temperatura de un baño de agua hirviendo que la de un horno caliente. Por otra parte el baño de agua hirviendo es más eficiente que el horno de aire caliente, en cuanto es menor el período de precalentamiento de los objetos que van a esterilizarse. Por último es más práctico ya que puede hacerse hervir agua en un recipiente casi en cualquier sitio.

Este método se recomienda siempre y cuando no haya bacterias formadoras de esporas, ya que estas no mueren con la ebullición, y el material que se va a esterilizar permita emplear este método, ya que hay que sumergir los objetos en el agua.

6.1.1.2.2. Tindalización o vapor corriente.

Muchos productos biológicos tales como los medios de cultivo y algunas otras soluciones pueden descomponerse cuando se les somete a temperaturas superiores a 100 °C por un período prolongado. Sin embargo, estos productos con frecuencia contienen numerosas bacterias formadoras de esporas que se necesitan destruir antes de que se pueda usar el producto. Si se les sujeta a una corriente de vapor por períodos de 20 a 30 min. durante 3 días sucesivos por lo general se esterilizan estos productos.

Las esporas germinarán durante los períodos de calentamiento y luego morirán en su forma vegetativa durante el siguiente calentamiento. Este método propuesto por Tyndall

¹¹ Compendio Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos.

es válido para la destrucción de casi todas las esporas .

6.1.1.2.3. Vapor a presión.

El vapor saturado a presión (en autoclave), es el método más confiable de esterilización. Debemos especificar que el calor esté saturado, ya que una mezcla de aire-vapor reduce grandemente la utilidad del autoclave, por muy grande que sea la presión aplicada. Ya hemos visto lo que sucede al calor absorbido por el vapor, cuando este vapor se condensa sobre objetos fríos. Mientras mayor cantidad de calor sea absorbida por el vapor, más calor será transferido al objeto más frío. De ahí que sea mucho mayor el efecto del vapor saturado a presión, en comparación con el vapor corriente.

TABLA 6.1.1.2.3 Temperaturas obtenibles por medio de vapor a presión

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Presión (Kg/cm ²)
15	115	0.72
15	121	1.0546
15	126	1.4061
15	134	2.1

Estos datos son los más comúnmente aplicables a la esterilización

6.1.1.2.3.1. Preparación del material a esterilizar.

Cuando se va ha esterilizar material de vidrio (pipetas o cajas de Petri), se protege envuelto y sin tapas, cuidando que la carga este floja. En el caso de las pipetas se les coloca algodón en el extremo superior y posteriormente se envuelven en papel de estrasa o Kraft, al igual que las cajas de Petri; de tal forma se protegen de la contaminación externa (esto en el caso de que el material perteneciera a un laboratorio de docencia, ya que en investigación las cajas se ponen en lateros y las pipetas en pipeteros debido a que las cantidades de material son mucho mayores). En el caso de tubos, se cubrirán con papel

aluminio. Los matraces de igual manera, o se les puede colocar un tapón de algodón, cubriendo la entrada con papel. Mientras más grande y grueso sea el material a esterilizar, se requerirá más tiempo para la penetración de calor.

En el autoclave se puede esterilizar todo tipo de material y medios de cultivo.

Al someter a las bacterias al calentamiento por calor húmedo se obtiene la desnaturalización de las proteínas de origen microbiano debido a la aplicación de altas temperaturas, ya que la interacción de las proteínas con el agua provoca una gelificación de las mismas al reducir la temperatura del medio que se sometió a la esterilización por la aplicación de calor húmedo; lo cual provoca la muerte del microorganismo.

En el caso de los alimentos no sucede lo mismo ya que al someterlos a una esterilización por calor puede resultar en cierto momento benéfica ya que al desnaturalizarse las proteínas en los aminoácidos que las componen estos son más fáciles de asimilar por el organismo, es decir son aminoácidos biodisponibles. Solo se tendrá algo de problema en el caso de que se afecte la digestibilidad de algún aminoácido que sea esencial como la metionina, la cisteína, la lisina y el triptófano por lo cual debe de tenerse especial cuidado en el alimento que se someterá al tratamiento térmico, ya que influye mucho su composición química para que se defina el tratamiento al cual será sometido en caso de que requiera hacerlo ya que uno de los objetivos principales de la esterilización en alimentos es eliminar los microorganismos y sus esporas mientras se minimizan las pérdidas de nutrientes.

En alimentos se permite la esterilización comercial, donde pueden haber microorganismos, pero en un número limitado, que no son capaces de reproducirse en las condiciones normales de almacenamiento. En el anexo número 2 se habla más ampliamente sobre este tema.

Un punto que se debe de tomar en cuenta y que es importante ya que el fin de la esterilización se enfoca a la destrucción de los microorganismos; es que si algún

microorganismo o sus esporas llegase a resistir las temperaturas de calentamiento al aplicar un mecanismo de enfriamiento estos microorganismos mueren finalmente.⁶¹

6.1.1.3. Filtración.

La remoción de los microorganismos de los líquidos se lleva a cabo por medio de la filtración. La filtración es útil para recuperar filtrados libres de bacterias que contengan toxinas y bacteriófagos, también para soluciones de antibióticos, líquidos termolábiles como sueros sanguíneos y algunas soluciones de carbohidratos.

Pueden eliminarse microorganismos de los líquidos y del aire por diversos métodos. Cuando todos los organismos vivos presentes en un medio han sido eliminados, este medio queda estéril, sea un líquido o aire. Los sueros, las soluciones antibióticas y otros líquidos, que perderían su utilidad si se les someterá a calor aun por un período breve de tiempo son esterilizadas más comúnmente por filtración.⁶²

Esta tecnología es utilizada en alimentos por las industrias de zumos de frutas y cervezas para eliminar la flora microbiana inicial de los productos. Para evitar la recontaminación a partir del ambiente del lugar de procesado, la filtración debe ir seguida de un envasado aséptico.⁶³

La eficiencia en la filtración va a depender del tamaño del poro, mientras el poro sea más pequeño, más eficiente y costoso va a ser el método. " Debe tomarse en cuenta que los filtros llamados de grado esterilización, están diseñados para retener a las bacterias pero dejan pasar a los virus."⁶⁴

0.22 μ -----> Acetato de celulosa(a nivel de investigación es uniforme)

0.45 μ -----> Asbesto (son más o menos uniformes)

En algunas ocasiones se emplea una bomba generadora de vacío que facilite la filtración.⁶⁵

6.1.1.3.1. Filtros de porcelana o losa.

Los más comunes son hechos de tierras de diatomeáceas como el *Berkefeld* que son hechos de tierra de infusorios, tierras de diatomeáceas fosilizadas, estos son fabricados en tres grados:

V ---	Viel	Aspero
N ---	Normal	Normal
W ---	Wenig	Fino

El grado es determinado por la cantidad de agua que pasa por el filtro. Los filtros de tierras de diatomeáceas son fabricados habitualmente en forma de velas huecas abiertas en uno de los extremos; se les inserta y cementa una boquilla de metal.

Si los filtros están contaminados con material infeccioso, se esterilizan en el autoclave para su uso. Luego deben de ser bien lavados con agua y jabón y tallados con un escobillón. Luego se pasa por el filtro una solución de hidróxido de sodio al 2 %, en sentido contrario a como fué usado la última vez. Esto es seguido de una solución de 1 N de HCl, hasta que el filtrado tenga un pH aproximado de 7.4 y normalmente se enjuaga con agua destilada, después de secarlo se envuelve en papel Kraft, se esteriliza en autoclave y se guarda para que esté listo para nuevo uso.

El filtro *Chamberland* es un filtro que está hecho de caolín y arena. Estos filtros se fabrican de muchos calibres, de acuerdo su porosidad están graduados en:

L1, L2, L3, L4, L7, L9, Y L11.

Estos filtros solo son usados para la clarificación de sustancias y no para esterilizar. Para limpiar estos filtros se usa el mismo método que para el Berkefeld.

6.1.1.3.2. Filtros de asbesto o filtros Seitz.

Son filtros de discos de asbesto, también llamados filtros Seitz, son fabricados de crisolita, un tipo de asbesto. Este de asbesto es de los más adecuados para la filtración y químicamente está constituido por Sulfato de magnesio. Los filtros se desechan a cada uso. Comercialmente se encuentran en diferentes graduaciones:

- HP/PYR Para remoción de pirógenos
- HP/EKS2 Para remoción de pequeños microorganismos de líquidos muy contaminados.
- HP/EKS Para esterilidad absoluta, utilizando condiciones estándar regulares.
- HP/EK Para esterilizar.

Existen también filtros de vidrio incrustado. Están fabricados con vidrio finamente molido que se funde para hacer que se adhieran las partículas. El tamaño de los poros puede variar desde 500 hasta 0.7 micrones. El microorganismo que se usa como indicador es la *Serratia marcescens*.

6.1.1.3.3. Filtros derivados de celulosa (discos de membrana)

Están constituidos por membrana porosa compuestas de ésteres puros de celulosa, biológicamente inertes. Pueden hacerse por nitrato de celulosa o con nitrato acetato de celulosa y tienen porosidades que fluctúan desde 5 milimicrones hasta 10 micrones. Estas membranas se esterilizan a 121°C , cuidando de no sobrepasar esta temperatura ya que la membrana no tolera calentamiento arriba de 125°C .¹⁰

6.1.2. Esterilización mediante radiaciones

De las diversas clases de radiación, aquellas que se emplean con propósitos de esterilización caen en dos grupos diferentes entre sí, tanto en su naturaleza como en su magnitud de energía.

6.1.2.1. Radiaciones electromagnéticas o no ionizantes.

Las radiaciones electromagnéticas tienen efectos sobre los organismos vivos, tienen también bajo poder de penetración, pero un alto grado de transmisión en el aire y en el agua, son de longitud de onda más larga que la de la luz visible y en gran medida son absorbidas como calor. Las radiaciones electromagnéticas son principalmente:

6.1.2.1.1 Rayos Ultravioleta

Toda clase de bacterias, virus y la mayoría de los mohos son vulnerables a los rayos ultravioleta con longitud de onda menor a 3000 U.Å. Las radiaciones son absorbidas por la proteínas, principalmente por los aminoácidos aromáticos, las bases púricas y pirimidínicas de los ácidos nucleicos lo cual mata a la célula y en otros casos causa diferentes grados de mutación, estas radiaciones tienen efecto principalmente sobre el DNA de los microorganismos.

La radiación ultravioleta germicida no atraviesa materiales opacos, por lo cual su uso es restringido para eliminar microorganismos del aire, o de diversas superficies donde no hay problema de penetración. El intervalo de acción bactericida es de 1400 a 2800 UA. La luz UV de las lámparas germicidas es muy perjudicial para los ojos, por lo cual debe usarse con extrema precaución.

No se alcanza a esterilizar al 100 % y cabe la posibilidad de la Fotoactivación, donde se reactivan algunos microorganismos que fueron tratados, ya que las bacterias reparan su daño y viven, esto solo en caso de que la dosis de radiación administrada sea baja.

Dosis = intensidad x el tiempo de exposición.

La principal aplicación de los rayos U.V. es en las plantas de procesamiento de alimentos cárnicos en los sectores de envasado.

Este tipo de radiación tiene el inconveniente de alterar las propiedades organolépticas de los alimentos, principalmente de las grasas, debido a que estos compuestos son fácilmente degradables por acción de las radiaciones.⁴¹

6.1.2.1.2 Rayos infrarrojos.

Este tipo de radiaciones se usa para reducir la contaminación de los alimentos principalmente durante su preparación, pero es un tratamiento caro, este tipo de radiación esteriliza provocando la oxidación de los microorganismos.

6.1.2.2. Radiaciones ionizantes.

Son producidas por partículas de alta energía. La radiación ionizante se mide en rads (unidad arbitraria que corresponde a la absorción de 100 ergios de energía por gramo de materia irradiada).

Se usa para esterilizar grandes volúmenes o elementos de gran grosor, principalmente para alimentos empacados. También se usa para esterilizar hules, excepto el PTFE (Politetrafluoretileno) ó el hule butírico. También se esterilizan metales muy delgados, papel, aceites y grasas con dosis de 2.5 megarads. Al esterilizar vidriería está toma color opaco o pardo por eso no se recomienda para este tipo de material.

Como fuentes de radiación gama son usadas dos fuentes, principalmente productos de radiaciones atómicas:

	Energía de fotón	Vida media
Cobalto 60	1.3 MeV	5 años
Cesio 137	0.6 MeV	menor
		1 MeV = 10 ⁶ eV ⁴²

Según la dosis es la inactivación de las enzimas, la mutación genética (cuando se altera el DNA) y la muerte; para esto es realmente importante el tomar en cuenta la longitud de onda y el tiempo. Puede eliminar casi todas las salmonelas presentes en productos alimenticios (carne, huevo, pescado), aunque no es definitivo, se requieren de 0.8 a 1.0 Mrad. El tratamiento con radiaciones ionizantes, principalmente rayos gama, es un proceso tecnológico suficientemente comprobado. (1)

6.1.2.2.1 Rayos X.

Es un haz de electrones microbicidas, tiene una amplia capacidad de penetración y a velocidad muy alta. Se emplea con frecuencia en la elaboración de alimentos en una dosis de 2.5 megarrads logrando una reducción de 10^6 microorganismos.

6.1.2.3. Ondas ultrasónicas.

Es usado como uno de los métodos modernos de lavado. Un generador electrónico con frecuencia de 15 - 20 mil ciclos por segundo o dentro de los límites de los supersonidos (ultrasonidos, con varios centenares de miles de vibraciones por segundo), se conecta a un transductor que convierte la energía eléctrica en mecánica y las ondas ultrasónicas crean presión negativa en la superficie de los instrumentos, eliminando toda la suciedad. Las ondas sónicas desnaturalizan las proteínas, dispersan diversos materiales y destruyen las bacterias. (2)

Este tipo de radiación combinada con tratamiento térmico produce efectos letales en los microorganismos.

Las ondas sónicas audibles de intensidad suficiente tienen también una acción bactericida. Este efecto no tiene valor práctico para la esterilización, pero si resulta útil para la destrucción de las células con fines experimentales (sonicación), además, los equipos suelen ser muy costosos y no es muy común su empleo. (3)

6.1.2.4 Ventajas y desventajas del uso de las radiaciones.

Entre las ventajas y desventajas de la irradiación pueden mencionarse las siguientes:

- A) Durante el tratamiento, apenas se modifica la temperatura de los alimentos.
- B) Cuando se aplica a niveles bajos, no tienen lugar las reacciones radiolíticas y , consiguientemente, modificaciones en los caracteres organolépticos, sobre todo si la irradiación se lleva cabo con la ausencia de oxígeno y / o en alimentos congelados.
- C) Puede llevarse a cabo en los alimentos ya envasados en recipientes herméticos, con lo que se evita la recontaminación post tratamiento.
- D) Con dosis $< 10 \text{ KGy}$ ($> 1 \text{ Mrad}$), no existen riesgos de toxicidad por radiactividad inducida o como consecuencia de las reacciones radiolíticas.

y como inconvenientes :

- A) La elevada resistencia de los virus y las enzimas.
- B) La remota posibilidad de desarrollar cepas mutantes radioresistentes.

6.1.2.4.1. Aplicaciones prácticas de las radiaciones.

Radicación. Eliminación de Salmonellas y otras bacterias enteropatógenas en la carne fresca de mamíferos y de aves, con dosis del orden de 0.3 Mrad.

Radurización. Retraso en la alteración de las frutas por mohos y levaduras y aumento de la vida útil de la carne refrigerada y del pescado en dosis de (0.1 y 0.3 Mrad).

Higienización. Tratamiento de especias y hierbas aromáticas secas con dosis de (1 Mrad)

Radapertización. La radiación en la actualidad se usa con fines de eliminar los microorganismos presentes en los alimentos y uno de estos casos prácticos es en la irradiación de frutas y vegetales, además de la irradiación de carne de aves, esto tiene aplicación porque se reduce el número de microorganismos patógenos como *la Salmonella spp.*, *el Campylobacter jejuni* y *la Listeria monocytogenes*.⁴¹

6.1.3. Esterilización por gases.

Ciertos gases ejercen una acción letal sobre las bacterias, destruyen varias enzimas esenciales y estructuras bioquímicas vitales para los organismos. La utilidad de algunos de ellos como el cloro, el formaldehído, el dióxido de azufre y el óxido de etileno, se ha reconocido desde hace tiempo, es por eso que a continuación hablaremos de algunos de estos gases.

6.1.3.1 Óxido de etileno.

El óxido de etileno es un éter cíclico. Es gaseoso a temperatura y presión normales. Tiene un punto de ebullición de 10,7 °C y se congela a -111 °C. Es sumamente inflamable en aire, por lo cual se recomienda se mezcle con diclorofluorometano, dióxido de carbono o con un éster metílico de ácido fórmico para mejorar su uso.

La acción esterilizadora del óxido de etileno se lleva a cabo en tres horas o más, pero es efectiva contra las esporas y las formas vegetativas, levaduras, hongos miceliares y virus. El microorganismo que se usa como indicador en la aplicación de este compuesto es el *Bacillus pumilus*.

El mecanismo por el que el óxido de etileno inactiva los microorganismos no es del todo conocido. Una hipótesis comúnmente aceptada es que la acción antimicrobiana está directamente relacionada con la actividad alquilante. Las enzimas y otras proteínas esenciales para el metabolismo celular contienen grupos carboxilo, amino, sulfidilo y fenólico; el óxido de etileno reacciona con ellos sustituyendo un átomo de hidrógeno por

el grupo. La célula no puede usar la nueva sustancia y muere. Biológicamente la reacción crítica tiene lugar en el RNA y DNA, dentro de las células. La capacidad de penetración del gas es importante en la efectividad de la acción contra las esporas.

En alimentos, las especies presentan elevados recuentos bacterianos. Cuando se usan en alimentos causan el deterioro de los mismos. El tratamiento con el óxido de etileno puede reducir la presencia microbiana en un 90 - 100 %, pero es bastante costoso, además puede causar efectos desfavorables en los alimentos. También se usa en coco deshidratado, nueces y almidón.

6.1.3.2. Formaldehído.

El formaldehído (HCHO) se vende como solución. Reacciona con los grupos amino libres de las proteínas y los ácidos nucleicos, en concentraciones elevadas precipita y coagula las proteínas. También reacciona con los $-\text{OH}$.

El formaldehído es soluble en alcohol y agua, generalmente se usa para esterilizar instrumentos y material de laboratorios ya que es eficaz en la eliminación de esporas. Se usa en concentraciones de 1-2 mg/litro a 20°C y una HR de 80-90 % mata en 6 hrs. los microorganismos aun en su forma vegetativa o esporulada.

El formaldehído puede usarse como gas, comercialmente se vende como formalina 38-40% peso/volumen en agua. A 500 ml. de formalina se le adicionan 170 gr. de KmnO_4 y cada 0.283 m^3 de espacio a una temperatura de 20°C x 10 horas y con una humedad relativa del 50%.

Puede usarse formaldehído de melamina para esterilizar productos empacados, esto se hace incorporando una tira de papel impregnada con la sustancia. Posteriormente estos se calientan a temperaturas superiores de 50°C para eliminar los restos del formaldehído, posteriormente se deben almacenar de 3-2 días para eliminar todos los restos posibles ya que el formaldehído es muy irritante y tóxico.

6.2. Control de la esterilidad.

6.2.1. Pruebas microbiológicas.

Los bio- indicadores son preparados biológicos que contienen microorganismos vivos; generalmente están basados en una sola especie formadora de esporas y con resistencia conocida principalmente frente a un agente esterilizante. Estos se usan para registrar directamente la eficacia destructiva de los agentes esterilizantes sobre los microorganismos.²³

Para determinar la eficiencia de la esterilización con calor húmedo se usan las esporas del género *Bacillus* y la especie *B. stearothermophilus*, que es el microorganismo de prueba. Este bacilo es termófilo y al aplicar una temperatura de 121 °C durante 12 min. es eliminado por completo.

Se impregnan tiras de papel con 10⁶ esporas y se ponen en ampolletas, estas tiras de papel suspendidas en medios de cultivo, se secan a la temperatura del cuarto y se colocan en sobres de papel. Estos sobres se acomodan en distintas partes de una carga y después de esterilizar, las tiras se siembran en un medio de cultivo adecuado para el desarrollo de esporas y luego se incuban para comprobar la esterilidad a 55 °C durante 5 días.

En la actualidad se venden las ampolletas ya preparadas con el número de esporas (células viables) establecido, estas ampolletas se ponen en e con el material a esterilizar, al finalizar el proceso se observa la ampolleta, en el caso de que el líquido que contenga se torne transparente, se sabe que la esterilización se llevo a cabo de manera correcta, en el caso de que el líquido de la ampolleta este turbio, se realiza una siembra en el medio de cultivo adecuado para el desarrollo de las esporas y se incuba para comprobar la esterilidad a 55 °C durante 5 días.

6.2.2. Indicadores químicos.

Estos son muy convenientes y proporcionan una indicación rápida del grado de eficiencia de la esterilización, al cambiar de color, basado en la segura combinación de tiempo - temperatura que se requiere para que ocurra la reacción. Los tubos que contienen estos indicadores son los tubos de Brown y los cambios de color simulan la sucesión de luces de los semáforos, rojo - peligro, amarillo - precaución, y verde - satisfactorio. Hay varios tipos de tubos disponibles para cubrir diferentes ciclos de esterilización y los que se emplean en el autoclave son:

1) (Punto negro) para emplearse en esterilización comúnmente a temperaturas de 126 °C o inferiores.

2) (Punto amarillo) para emplearse en esterilizadores de temperatura con alto vacío, arriba de 126 °C.

6.2.3. Cintas de autoclave.

Es una cinta adhesiva que resulta conveniente para sellar cajas o bultos y está impregnada con un colorante que cambia de blanca a varias tonalidades, desde pardo hasta negro, dependiendo del grado de calentamiento sufrido. Es útil para indicar que un objeto ha sido sometido a un proceso de calentamiento, pero no puede decirse propiamente que sea un indicador de la esterilidad.

6.2.4. Termocoplas.

Estos proporcionan un medio satisfactorio para regular los ciclos de la esterilización. Las sondas de los termocoplas se introducen con el objeto testigo, que puede ser un bulto o un recipiente con líquido, y así se registran los tiempos de penetración del calor y el sostén por medio de un potenciómetro. En alimentos los que más se usan son los termopares.¹³

7. ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS.

Es importante realizar un análisis microbiológico a los alimentos que llegarán de una manera u otra hasta el consumidor ya que con esto estamos asegurando que nuestro alimentos cumple con las características nutricias y de higiene que el consumidor demanda por lo cual se puede decir que el alimento es de buena calidad y que el consumidor no correrá ningún riesgo al ingerir este alimento.

7.1. Muestreo para el análisis de los alimentos.

El muestreo para de alimentos para el análisis microbiológico es la operación que consiste en separar un número determinado de muestras de una lote, remesa o partida, con el fin de obtener resultados analíticos confiables por lo cual se debe obtener una muestra representativa del total.

Esto es igualmente necesario para saber si una remesa de productos alimentarios cumple o no con las normas microbiológicas legales establecidas para cada producto. Para hacer una posterior comparación con los resultados de las proximas remesas.⁴⁵

Para que el muestreo tenga utilidad estadística, se debe realizar sobre un número apreciable de unidades de un lote o cualquiera otra porción. El número de muestras destinadas a un análisis microbiológico, esta relación con la precisión que se desee obtener en los resultados. El análisis microbiológico debe informar la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos destacando la presencia de salmonelas en los productos, ya que es indicativo de la mala calidad del alimento.⁴⁶

Se suele sugerir que el número de muestras se tome en forma aleatoria teniendo en cuenta el volumen del lote, el 1 % del total cuando el lote es grande y el 10 % cuando el lote es pequeño. El método de muestreo usado es el "Aleatorio", este método consiste en separar del lote un número de muestras calculado previamente utilizando la tabla de números al azar. Tabla 7.1.

TABLA 7.1 Tabla de números al azar.

	COLUMNAS										
	1 2 3	4 5 6	7 8 9	10 11 12	13 14 15	16 17 18	19 20 21	22 23 24	25 26 27	28 29 30	
1	074	034	170	199	120	138	052	123	144	084	
2	013	020	185	168	007	161	114	043	182	055	
3	024	195	044	026	057	033	075	002	196	053	
4	048	110	127	189	098	088	077	132	128	045	
5	111	051	073	134	084	040	079	105	047	014	
6	171	105	191	042	066	008	158	104	178	018	
7	022	118	151	015	092	011	054	001	158	035	
8	005	124	147	199	158	138	062	115	143	089	
9	058	107	133	088	027	131	148	004	080	117	
10	041	083	009	103	018	016	150	188	170	003	
11	180	138	180	188	060	038	163	008	100	112	
12	085	083	120	050	061	108	058	030	184	125	
13	065	155	085	153	046	058	032	197	068	190	
14	165	145	200	097	025	187	021	175	072	017	
15	071	157	174	144	181	099	039	086	193	028	
16	101	010	141	078	023	061	177	178	192	032	
17	087	070	088	152	128	031	012	137	184	116	
18	132	029	197	067	113	135	076	036	121	186	
19	064	183	194	119	148	140	049	154	162	129	
20	091	142	080	102	173	063	178	007	108	168	

Dicha tabla como se vió anteriormente esta integrada por columnas y filas de dígitos obtenidos mediante calculos estadísticos. Si por ejemplo, el lote esta integrado por 200 unidades, su numeración se marcará del 1 al 200, correlativamente. Con un lápiz se señalará un lugar cualquiera en la tabla de núm al azar, coincidiendo con un dígito o su proximidad. Este dígito sirve de punto de partida para la separación del número de muestras destinadas al análisis.

Suponiendo que se marca con el lápiz el lugar que corresponde a la fila 15 y a la columna 10. Este núm. es el número 1 y los que le siguen en las columnas 11 y 12 son el 4 y el 6. En este caso, la unidad que se tiene que separar del lote es la marcada con el número 146. A continuación se pasa a la fila 16 y a los mismas columnas 10, 11, 12, y a las que corresponde el número 078, una nueva unidad que se separa del lote. Pasando a la fila 17, columnas 10, 11, 12, figura el número 152 que será también separado del lote. Se procede de la misma forma hasta obtener el número de muestras señalado previamente (en base al tamaño del lote). El muestreo en Microbiología alimentaria, es con el fin de obtener una muestra representativa del alimento para su análisis y conseguir resultados fiables sobre su estado higiénico sanitario.

El material usado en el muestreo generalmente es el siguiente:

- Envases para toma de muestras (plástico o vidrio)
- Instrumentos para la apertura de envases.
- Etiquetas y material para marcar
- Equipo de esterilización.
- Equipo de refrigeración.
- Líquido desinfectante
- Control de temperatura (termómetro) etc.

El material de toma de muestras para el análisis microbiológico debe de ser estéril; es necesario que se haya sometido previamente a los métodos de esterilización por calor seco (horno) o calor húmedo (autoclave).

Para obtener la muestra representativa que se va a analizar posteriormente en el laboratorio se deben de cumplir ciertas condiciones de las cuales la principal es:

" La persona destinada a hacer el muestreo debe conocer perfectamente su finalidad e importancia, por lo que estará bien entrenada para actuar como corresponda en cada caso. Una práctica correcta de toma de muestras influirá muy positivamente en la valoración objetiva de los resultados del análisis ".

Una vez tomadas las muestras, se empaquetan de forma adecuada, según su naturaleza, para evitar su rotura o su deterioro. Los paquetes se etiquetarán y marcarán correctamente, cuidando de que la etiqueta quede bien fija, la cual irá numerada y adecuadamente identificada para que concuerde con el informe de muestreo. Este informe de muestreo se identificará con los datos del envase y recopilará todos los datos que puedan ser útiles.

- Nombre y dirección de la persona que toma la muestra.
- Nombre y dirección de la empresa, donde se toman las muestras.
- Fecha, lugar y hora.
- Clase de alimentos que integran la muestra
- Nombre del fabricante, importador, vendedor; comprador, etc
- Razón por la cual se ha procedido el muestreo.
- Número, tamaño y marca de las unidades que forman el lote.
- Forma de transporte.
- Punto de origen y lugar de destino.
- Fecha de embarque y llegada del lote.
- Método de muestreo utilizado.
- Temperatura del producto en el momento de tomar la muestra.
- Temperatura ambiental de almacenamiento.
- Forma de transporte y condiciones de envío de las muestras al laboratorio.

Todos los datos y otros que se consideren oportunos en cada caso, contribuirán a obtener resultados analíticos y coherentes.

Para el análisis de la muestra no debe de transcurrir un espacio de tiempo largo, el análisis debe ser realizado lo más rápido posible, para que en los análisis quede reflejada, con mayor fidelidad, la flora que cualitativa y cuantitativamente, está presente en el alimento en el momento del muestreo.

Llegadas las muestras al laboratorio, es necesario seguir unos pasos dentro de la sistemática analítica. La operación de preparación de muestras para el análisis exige unas reglas de manipulación aseptica muy estrictas, así como la utilización de material y diluyentes estériles, para evitar la contaminación exterior del alimento.

Las muestras usadas para el análisis pueden ser :

Líquidas Sólidas Semisólidas

En el caso de que las muestras sean aguas cloradas, se debe neutralizar el cloro presente con 0,1 % de Tiosulfato de sodio.

Todo el equipo debe de estar estéril y la toma de muestra se hará en condiciones asepticas y con material estéril.

En el caso de que la muestra requiera ser refrigerada, o en su defecto congelada (0-4 °C) con ayuda de hielo seco para facilitar su manejo y en su caso su transporte.

El tiempo máximo entre la toma de muestra y la realización del análisis es de 36 hr. También se debe tomar en cuenta que el microorganismo (sospechoso) presente sea sensible a la temperatura como el *Vibrio parahaemolyticus*, en el caso de que se quiera congelar el alimento.

Una vez ya tomada la muestra según del alimento de que se trate se usan o no diluyentes, de los cuales los más usuales son a base de soluciones fosfatadas principalmente.

7.1.1. Diluyentes más usuales.

Los diluyentes de muestra más usados en la industria para llevar a cabo el análisis microbiológico de los alimentos son los siguientes:

Buffer de fosfatos pH 7.2
 Agua peptonada tamponada al 0.1 %
 Agua de triptona con sal
 NaCl 0.85 %

Las características principales de un buen diluyente, es que no produzcan modificaciones cualitativas ni cuantitativas en la flora de los alimentos que van a ser analizados, es decir que mantenga lo más fielmente posible la flora de la muestra, sin suprimir ni favorecer su desarrollo.

Generalmente se parte de 10 gr de muestra que se homogenizan con 90 ml. del diluyente, preparando diluciones precisas...

El diluyente utilizado para la preparación de la suspensión madre suele emplearse, posteriormente, para efectuar las diluciones decimales.

7.2. Conteos microbianos.

Se realizan con el fin de determinar la cantidad de microorganismo presentes en un alimento, sin que sea relevante el tipo de microorganismo existente en él; al mismo tiempo es importante para ver cual será la vida útil (de anaquel) del producto.

Hay conteos microbianos para los diversos tipos de microorganismos siendo de real importancia los subrayados.

Conteos de :

Staphylococcus aureus

Mesófilos

Coliformes totales

Sacarófilicos

Anaerobios

Enterococcus

Levaduras**Coliformes fecales**

Halófilos

Esporulados

Hongos

Lipófilicos.

Los métodos más usuales para la cuantificación de microorganismos, son el conteo en profundidad, superficie (conteo en placa) y en tubo por el número más probable, aunque también son usadas las técnicas de reducción de colorantes y la cuenta microscópica directa.

Con ninguno de estos métodos es posible determinar el número exacto de microorganismos en una muestra, ya que influyen diversos factores como; el tipo de nutrientes del medio de cultivo, su pH, su actividad acuosa, el potencial oxido-reducción, temperatura y tiempo de incubación, el número relativo de microorganismos en la muestra y la presencia de los fenómenos de competencia o antagonismo, el tipo de colorante usado para teñir y de interferencias por partículas de alimento.¹⁰

El conteo de microorganismos se basa en el principio de contar colonias, suponiendo que cada una de las mismas proviene de un agregado de células. El conteo de microorganismos se realiza para saber cuantas bacterias hay en un alimento, ya que éste es un factor importante que influye en la calidad de los mismos.

Aunque los métodos mencionados anteriormente presentan las ventajas de requerir poca inversión de capital, requieren de una gran cantidad de material, trabajo y sobre todo tiempo (4 - 5 días).

7.2.1. Método de conteo por el Número Más Probable (NMP).

Es un método estadístico, que se basa en diluciones de alimentos en series de tres alicuotas o diluciones que son puestas en 9 ó 15 tubos con un medio apropiado para llevar a cabo este método.

El número original de microorganismos siempre será determinado con ayuda de las tablas de NMP y generalmente los resultados son más confiables que los obtenidos por el conteo en placa. Este método nos da un margen de confiabilidad del 95 % y fue usado primeramente por Mc Crady en el año de 1915 ya en la actualidad es uno de los más usados por sus múltiples ventajas:

- 1) Es relativamente simple.
- 2) Los resultados obtenidos en el laboratorio son más confiables que los obtenidos por el conteo en placa.
- 3) Los grupos específicos de microorganismos pueden ser determinados con el uso de medios selectivos o diferenciales.
- 4) Este es un método usado de preferencia para determinar el número de coliformes fecales ó totales en agua principalmente.

FIGURA 7.2.1 Conteo por el Número Más Probable.

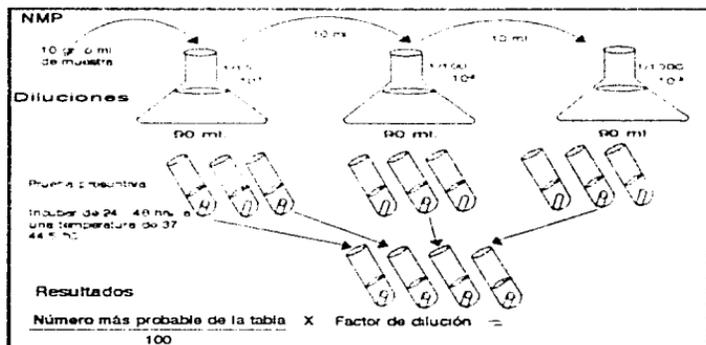


TABLA 7.2.1. Tabla del Número Más Probable.

Tabla de número más probable (NMP) de bacilos coliformes por 100 ml de muestra (usando 5 tubos con volúmenes de 10, 1 y 0.1).

| Positivo a
10 1 0.1 NMPs |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 0 0 0 | 1 0 0 | 2 0 0 | 4 5 | 3 0 0 | 7 8 |
| 0 0 1 | 1 0 1 | 4 0 1 | 6 8 | 1 0 1 | 11 |
| 0 0 2 | 1 0 2 | 6 0 2 | 9 1 | 1 0 2 | 13 |
| 0 0 3 | 1 0 3 | 8 0 3 | 12 | 1 0 3 | 16 |
| 0 0 4 | 1 0 4 | 10 0 4 | 14 | 1 0 4 | 20 |
| 0 0 5 | 1 0 5 | 12 0 5 | 16 | 1 0 5 | 24 |
| 0 1 0 | 1 1 0 | 2 1 0 | 6 8 | 1 1 0 | 11 |
| 0 1 1 | 1 1 1 | 2 1 1 | 9 2 | 1 1 1 | 14 |
| 0 1 2 | 1 1 2 | 2 1 2 | 12 | 1 1 2 | 17 |
| 0 1 3 | 1 1 3 | 2 1 3 | 14 | 1 1 3 | 20 |
| 0 1 4 | 1 1 4 | 2 1 4 | 17 | 1 1 4 | 24 |
| 0 1 5 | 1 1 5 | 2 1 5 | 19 | 1 1 5 | 27 |
| 0 2 0 | 1 2 0 | 2 2 0 | 9 3 | 1 2 0 | 14 |
| 0 2 1 | 1 2 1 | 2 2 1 | 12 | 1 2 1 | 17 |
| 0 2 2 | 1 2 2 | 2 2 2 | 14 | 1 2 2 | 20 |
| 0 2 3 | 1 2 3 | 2 2 3 | 17 | 1 2 3 | 24 |
| 0 2 4 | 1 2 4 | 2 2 4 | 19 | 1 2 4 | 27 |
| 0 2 5 | 1 2 5 | 2 2 5 | 22 | 1 2 5 | 31 |
| 0 3 0 | 1 3 0 | 2 3 0 | 12 | 1 3 0 | 17 |
| 0 3 1 | 1 3 1 | 2 3 1 | 14 | 1 3 1 | 21 |
| 0 3 2 | 1 3 2 | 2 3 2 | 17 | 1 3 2 | 24 |
| 0 3 3 | 1 3 3 | 2 3 3 | 20 | 1 3 3 | 28 |
| 0 3 4 | 1 3 4 | 2 3 4 | 23 | 1 3 4 | 31 |
| 0 3 5 | 1 3 5 | 2 3 5 | 26 | 1 3 5 | 35 |
| 0 4 0 | 1 4 0 | 2 4 0 | 15 | 1 4 0 | 21 |
| 0 4 1 | 1 4 1 | 2 4 1 | 17 | 1 4 1 | 24 |
| 0 4 2 | 1 4 2 | 2 4 2 | 20 | 1 4 2 | 28 |
| 0 4 3 | 1 4 3 | 2 4 3 | 23 | 1 4 3 | 32 |
| 0 4 4 | 1 4 4 | 2 4 4 | 26 | 1 4 4 | 36 |
| 0 4 5 | 1 4 5 | 2 4 5 | 28 | 1 4 5 | 40 |
| 0 5 0 | 1 5 0 | 2 5 0 | 17 | 1 5 0 | 25 |
| 0 5 1 | 1 5 1 | 2 5 1 | 20 | 1 5 1 | 29 |
| 0 5 2 | 1 5 2 | 2 5 2 | 24 | 1 5 2 | 32 |
| 0 5 3 | 1 5 3 | 2 5 3 | 26 | 1 5 3 | 37 |
| 0 5 4 | 1 5 4 | 2 5 4 | 29 | 1 5 4 | 41 |
| 0 5 5 | 1 5 5 | 2 5 5 | 32 | 1 5 5 | 45 |

a. Número de tubos positivos con cada uno de los tres volúmenes usados.
 b. Todas las cifras usadas bajo NMP se pueden dividir por 100 para obtener el NMP por mililitro (o por gramo).

Para el cálculo de los valores del NMP se darán a continuación dos ejemplos de la manera como se debe utilizar la tabla y dar los resultados.

Ejemplo 1.

Una alícuota de 1 ml. de muestra de leche pasteurizada fué inoculada en diluciones de 10^1 , 10^2 y 10^3 . Después de la incubación 5 tubos de 10^0 (muestra original) presentaron crecimiento, 3 tubos de 10^1 y ningún tubo a 10^2 .

Posteriormente se conjuntan los valores 5 3 0 de los tubos en los que se presentó crecimiento y en la tabla 7.3.1 se busca esta combinación obteniendo como resultado el valor para el NMP de 79 células viables por mililitro de leche.

Ejemplo 2.

Una alícuotas de 1 ml. de muestra de jugo fué inoculada en diluciones de 10^1 , 10^4 y 10^5 . Después de la inoculación, cuatro tubos presentaron crecimiento a 10^1 , 2 tubos a 10^4 y 1 tubo a 10^5 . El NMP registrado en la tabla para esta combinación es de 26 células viables por mililitro de jugo, pero como se manejarán diluciones mayores a las de 10^2 los resultados se manejan de la siguiente forma. El NMP por mililitro de jugo es por tanto 26×10^3 .

7.2.2. Método de conteo en profundidad.

Esta técnica parte de una serie de diluciones decimales, en las cuales el equipo y material necesario para efectuar esta técnica de recuento comprende:

- Frascos de 90 ó 99 ml.
- Tubos de 9 ml.
- Diluyente
- Homogenizador de alta velocidad para alimentos sólidos
- Pipetas de 10, 1.0 y 0.1 ml.
- Cajas de Petri de cristal o plástico
- Medio de cultivo
- Estufa capaz de mantener sin variación la temperatura

Todo el material que va a entrar en contacto con la muestra debe de estar exento de microorganismo alguno, por lo tanto debe ser estéril.

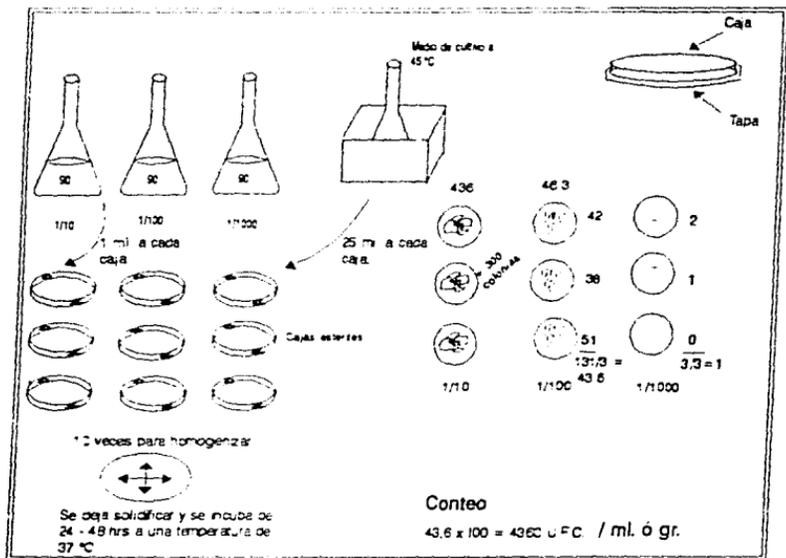
Como normalmente el número de bacterias en alimentos es tan elevado que, para obtener colonias aisladas en las placas, es necesario efectuar diluciones del alimento.

La primera dilución, generalmente es de 1:10; se prepara mezclando 10 ml. del alimento con 90 ml. de diluyente. Apartir de la dilución 1:10 se realiza la serie de diluciones decimales añadiendo 10 ml. de la disolución 1:10 a 90 ml. de diluyente con lo que obtendremos como resultados un dilución de 1:100, de esta última se toma nuevamente 10 ml. y se agregan a 90 ml de diluyente para obtener la dilución de 1:1000 y así sucesivamente.

En cada una de las cajas de Petri se coloca 1 ml. de cada dilución, esto se hace por triplicado y, a continuación se colocan unos 15 ml. de agar a cada caja que posteriormente será agitada para que la muestra se mezcle con el agar y la siembra sea en profundidad. En esta técnica la muestra queda mezclada con el agar. Ya que la muestra queda cuidadosamente mezclada con el agar, se deja que el agar solidifique. Más tarde las cajas

se invierten para evitar la condensación de la humedad en la superficie del agar durante la incubación.

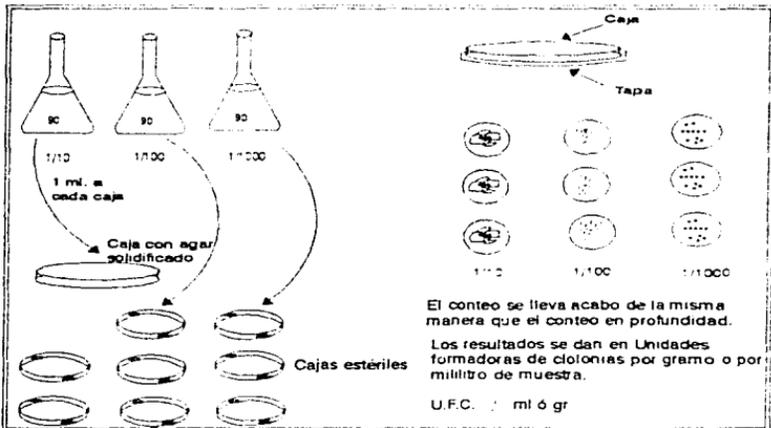
FIGURA 7.2.2 Cuento en Profundidad.



7.2.3. Método de conteo en superficie.

Para este método se requiere más o menos el mismo material, la única diferencia es que aquí se requiere menos cantidad de muestra (1 ml. o 1 gr.), ya que todo se maneja de igual manera con diluciones realizadas de igual forma que para el conteo de microorganismos en profundidad; la única diferencia es que aquí la muestra se coloca en la superficie de la caja de Petri que con anterioridad ya debe de estar preparada con el agar (este ya debe de estar sólido). Este tipo de conteo se llama de superficie porque la muestra queda en la superficie del agar, no mezclada con el mismo.

FIGURA 7.2.3 Conteo en Superficie.



7.3. Conteos más usuales de microorganismos

En la actualidad se sabe que hay una gran variedad de Microorganismos que pueden estar presentes en los alimentos y de aquí que sea importante el conteo de los mismos, ya que algunos de estos microorganismos en determinado momento, no solo alterarán el alimento, sino que pueden producir intoxicaciones, ya sea por su consumo o por el de sus toxinas y de aquí la importancia de identificarlos como un grupo más específico.

7.3.1. Recuento de bacterias mesófilas (30 - 45 °C)

En el recuento de microorganismos aerobios mesófilos se estima la flora total, pero sin especificar tipo de gérmenes.

Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración.

Tiene un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas. Un recuento total de aerobios mesófilos bajo no asegura que un alimento esté exento de patógenos o sus toxinas, tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de flora patógena

Excepto en productos que elaboran por fermentación, altos recuentos microbianos se consideran poco aconsejables para la mayor parte de los alimentos. Su significado es diverso:

- Materia prima excesivamente contaminada
- Deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos.
- La posibilidad, por tratarse de microorganismos mesófilos, de que entre ellos pueda haber patógenos, dado que esta flora suele ser mesófila.
- Altos recuentos suelen ser signo de inmediata alteración del producto. Tasas superiores a $10^6 - 10^7$ gérmenes por gramo suelen ser ya inicio de descomposición.

También es muy usado para saber o tener conocimiento sobre la alteración incipiente de los alimentos de su probable vida útil de la descongelación no controlada de productos congelados, ó en las fallas del mantenimiento de la temperatura de refrigeración en los alimentos refrigerados.

En general el recuento de la flora aerobia mesófila es una prueba para conocer las condiciones de salubridad de algunos alimentos.

El recuento en placa tiene especial aplicación en alimentos importados principalmente, ya que en estos casos el país importador no puede controlar el grado de limpieza y desinfección practicados en las industrias productoras.

El conteo de microorganismos mesófilos se realiza principalmente por las siguientes técnicas:

- 1) Recuento en placa por siembra en profundidad.
- 2) Recuento en placa de siembra por extensión en superficie.

7.3.2. Recuento de coliformes.

La familia *Enterobacteriaceae* lactosa-positiva o el grupo coli-aerogenes constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, más o menos rápidamente, en un período de 48 hrs. y con una temperatura de incubación comprendida entre 30 - 37 °C.

Son bacilos gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Del grupo " coliformes " forman parte de varios géneros:

Escherichia *Enterobacter* *Klebsiella*

Generalmente se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes como el suelo, plantas, cáscara de huevo, etc.

Aunque su especificidad como indicadores no es buena, se suelen usar como índice de contaminación fecal.

Dentro de este grupo, son los coliformes fecales los que suelen tener significado sanitario importante en el análisis microbiológico de alimentos.

Características importantes en la alteración de los alimentos por microorganismos coliformes:

- 1) Su capacidad de síntesis de vitaminas.
- 2) Crecen en un amplio margen de temperatura.
- 3) Suelen dar sabores anormales.
- 4) Capacidad de producción a partir de azúcares (lactosa) de ácidos y gases.

Se considera a los coliformes fecales como *Escherichia coli*. Sus principales características son:

- Aptitud para desarrollarse entre 43.5 - 45.5 °C
- Capacidad para crecer en presencia de sales biliares.
- Facultad para producir indol en agua de peptona.

En general, niveles altos de coliformes indican una manipulación y elaboración deficientes de los alimentos. Para la detección de *Enterobacterias* lactosa-positivo (coliformes) se aprovechan ciertas características que las diferencian de otras como, por ejemplo, su capacidad para fermentar la lactosa con producción de gas y ácido en presencia de sales biliares.

El conteo de coliformes fecales se realiza principalmente en tubo por el NMP (ver Figura 7.2.1) y de los coliformes totales se realiza en placa en profundidad (Figura 7.2.2) y su presencia nos indica riesgo ya que puede ser indicativo de la presencia de microorganismos patógenos como la *Salmonella*.

7.3.3. Recuento de *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus es una especie bacteriana integrada por formas coccáceas de 0.8-1.0 μm de diámetro, que se dividen en más de un plano, por lo que se agrupan irregularmente en racimos, son inmóviles y carecen de esporos. Es una especie sensible a la acción del calor y presenta cierta resistencia a los desinfectantes. Su presencia o la de su toxina en alimentos es signo evidente de falta de higiene. Su hábitat o localización en fosas nasales, garganta, piel y heridas infectadas. Una característica muy importante de este germen es que sus toxinas altamente estables al calor, pueden ser causa de intoxicación cuando se ingieren con los alimentos.

En general la presencia de un número elevado de *Staphylococcus aureus* en un alimento refleja higiene defectuosa por mala manipulación.

Puede ocurrir que no se detecte *S. aureus* en un alimento o que el número detectado sea pequeño y que, sin embargo, exista cantidad detectable suficiente de enterotoxina estafilocócica. En este caso, los germenos que originaron la toxina han ido descendiendo en número e incluso, desapareciendo, mientras que la toxina, por su mayor resistencia permanece en el alimento.

De *Staphylococcus* se permiten pocos en alimentos, en contraste con la "*Salmonella*" que no se permite ninguna, estos microorganismos se encuentran generalmente en productos embutidos, quesos, etc. La técnica que se emplea para el conteo es la de conteo en superficie (Ver la figura 7.2.3), en el cual se usa como medio selectivo el de Baird Parker (BP)

Baird Parker
 +
Yema de huevo = Lipasa
 +
Piruvato = Neutraliza el H₂O₂.
 +
Telurito de K.

— Después de incubar en estufa a 37 °C durante 18 - 24 hrs. Se consideran positivos los que presentan punto negro. El telurito de K inhibe el crecimiento del microorganismo gram + y el piruvato favorece el crecimiento del *Staphylococcus aureus*.

7.3.4. Recuento de Mohos y Levaduras.

A los hongos se les conceptúa como vegetales pertenecientes al grupo de las talofitas y por consiguiente, carentes de clorofila, con la estructura que puede ser unicelular o pluricelular, caracterizados por la falta absoluta de clorofila y por ser típicamente filamentosos.

Las levaduras son hongos que crecen generalmente en agregados sueltos de células independientes que pueden ser globosas, ovoides, piriformes, alargadas o casi cilíndricas. Muchas de ellas presentan reproducción sexual por medio de ascosporas y, a diferencia de los mohos, las levaduras no pueden identificarse solamente por sus caracteres morfológicos; se precisa la ayuda de pruebas bioquímicas para la identificación específica.

Método por el cual se realiza el conteo de hongos.

Los métodos de muestreo para los hongos se basan principalmente en la toma de muestra bien homogenizada. Posteriormente se emplean métodos de recuento total en placa a partir de las series de diluciones decimales preparadas con el producto.

Estas diluciones se pueden sembrar en un medio de cultivo considerado idóneo para la enumeración de hongos y levaduras, aunque no existe un consenso entre los micólogos de tal medio. Antes que nada se recomienda el uso de medios acidificados para inhibir el crecimiento de bacterias. Los medios más comúnmente usados son "Agar Patata Glucosado", "Agar Sabouraud glucosado", "Agar Extracto de Levadura Glucosa", aunque también existen medios selectivos para permitir el desarrollo de ciertos hongos como por el ejemplo para el desarrollo de xerófilos se usa "Agar diclorantemcol peptona" que inhibe el crecimiento de la mayoría de los hongos facilitando el aislamiento de *Fusarium* y otros hongos.⁶⁰

La temperatura y los tiempos de incubación recomendados son de 25 °C por 5-7 días.⁶¹

7.3.4.1. Significado de la contaminación fúngica en alimentos.

El significado de la contaminación fúngica de los alimentos, especialmente por los mohos, viene no solo por el potencial de los hongos para deteriorarlos, sino también del potencial de muchos de ellos para producir una gran variedad de Micotoxinas a las que el hombre tiene susceptibilidad, así como su capacidad para provocar infecciones, e incluso, reacciones alérgicas en personas hipersensibles a los antígenos fúngicos.

En resumen, la contaminación fúngica de los alimentos puede considerarse desde un doble aspecto:

7.3.4.1.1 Efecto sobre los alimentos.

El efecto de los hongos sobre los alimentos es múltiple porque influye en defectos de aspecto, o en modificaciones químicas las cuales se pueden presentar a nivel de proteínas, grasas, humedad, lo cual nos altera el valor nutricional de nuestro alimento, no siendo el único aspecto que nos puede alterar, también modifican las características organolépticas lo que implica que se presenten cambios de olor, color, sabor y textura principalmente, lo cual implica que los alimentos contaminados con hongos no sean aptos para ser almacenados, lo que implica que se tengan dificultades en su conservación.

7.3.4.1.2 Efecto en hombre y animales.

En algunos casos la presencia de hongos puede ser patógena como en el caso de la micosis que se presenta principalmente en personas que manejan productos secos como lo son el maíz, el trigo, chiles secos, etc. En otros casos su presencia puede ser alérgica (alergias) esto principalmente en manipuladores que respiran aire contaminado con hongos.

Otra forma en la que se manifiesta la contaminación de hongos causando problemas es cuando se detecta la micotoxicosis, que en algunos casos además de alterar el alimento causa problemas al ser humano que lo consume causando alteraciones en el organismo, siendo uno de estos problemas el cáncer de hígado. En el caso de los animales, cuando se alimentan con granos contaminados se pueden presentar problemas de inmunosupresión, es decir que todo el sistema inmunológico del animal no funciona lo que se resume en el ataque de virus, bacterias etc, causantes de enfermedades y de infecciones en los mismos.

De todo lo expuesto anteriormente se deduce que puede existir un riesgo potencial en la contaminación fúngica de los alimentos y, por ello para conocer la calidad microbiológica de diversos productos, se procede a la evaluación de su tasa de contaminación por mohos y levaduras.

Los mohos alteran generalmente los alimentos ácidos y bajos en contenido de humedad, tal es el caso de las frutas y los cereales, que son los alimentos en los que se detecta más frecuentemente la presencia de los hongos.

7.3.5. Recuento de Enterococos.

Dentro del grupo de cocos grampositivos, se encuentran los Streptococcus. Los miembros de este grupo se caracterizan por su forma cocode y por su agrupación en parejas o en cadenas. Son generalmente inmóviles, no esporulados, microaerófilos o anaerobios facultativos.

Su hábitat normal es el tubo digestivo de animales de sangre caliente, por lo cual su

presencia se considera como indicativo de contaminación fecal. Crecen a temperatura de 45 °C. Su presencia en alimentos indica falta de higiene o condiciones de conservación defectuosas, excepto en alimentos en los que interviene como flora habitual de procesos fermentativos.

Los más comunes son:

Streptococcus faecium
Streptococcus faecalis etc.

Son muy resistentes a las condiciones adversas (congelación, desecación, tratamiento térmico, etc.) por lo que se consideran buenos indicadores para valorar, precisamente, las condiciones higiénicas y de conservación de alimentos congelados y desecados cuando aparecen unas cifras elevadas. Se a utilizado como indice de contaminación fecal de agua, su valor como indicador en los alimentos es más discutido.

Para su identificación es necesario usar un medio especial, enriquecido con sangre y telurito de K que hace que nuestras colonias se vean negras, debido a su reacción a nivel de cadena respiratoria.

7.4. Métodos modernos de conteo de microorganismos

Los métodos anteriormente descritos, además del trabajo que involucran y el tiempo que se requiere para obtener resultados (mínimo 5 días) de un análisis, causa inconvenientes, ya que los productos y materias primas deben almacenarse mientras se conoce el resultado y puede ser demasiado tarde para tomar una medida correctiva.

Para resolver los problemas anteriores se han ideado una gran variedad de métodos rápidos cuyos objetos es disminuir la labor y la cantidad de material a utilizar y en consecuencia optimizar la economía con una obtención rápida de resultados que a su vez permita la retroalimentación oportuna y facilite la generación de reportes.

En los últimos 20 años se han desarrollado una amplia gama de métodos miniaturizados con el fin de reducir el volumen de reactivos y de medios de cultivo y han sido utilizados con éxito para bacterias, levaduras y hongos. Las ventajas de estos han sido su sencillez, exactitud, eficiencia, el ahorro de espacio, de trabajo y sus bajos costos en reactivos en comparación con métodos convencionales.

Se encuentran disponibles en el mercado " kits " de identificación bacteriana como son: "Enterobuo", "RIB", "Minitek", "Spectrum 10", los cuales presentan de un 90 a un 95 % de exactitud en comparación con los métodos tradicionales.¹⁰⁰

Existen métodos que se basan en principios diferentes a los tradicionales y que estimulan la población microbiana a través de la detección de alguna función del metabolismo. Estos, que se basan en mediar cambios de impedancia, conductancia, generación de calor, concentración de bióxido de carbono, son muy sensibles, altamente automatizados permitiendo ahorro en la labor y de tiempo, de tal suerte que un análisis en el que utilizando metodologías tradicionales se obtendrían resultados en días, el tiempo se reduce a horas.

Los métodos modernos son tan rápidos como se requiera ya que hay de diversa duración según las necesidades.

Rápidos 1 -12 hr.

Muy rápidos menos de 1 hr.

A continuación se hará un breve resumen de los métodos más usuales en el mercado para tener información sobre los mismos y sus usos.

7.4.1. Portaobjetos sumergido.

Consiste en poner en un portaobjetos con medio de cultivo (Mac Conkey, el cual se pondrá en contacto con una ligera presión sobre el alimento o superficie a analizar, y luego se pondrá a incubar protegido del medio exterior. La muestra del alimento que nos interesa analizar, posteriormente se coloca en un tubo de ensayo tapado y se incuba de 18 - 24 hrs. a una temperatura de 35 °C. Con este método se pueden hacer recuento de los microorganismos que sean (pueden estar presentes enterobacterias, levaduras, etc), solo se cambia el medio de cultivo dependiendo del M.O. que se quiera determinar. 22

7.4.2. Petrifilm.

El petrifilm es un método que consiste en poner un par de películas plásticas de polietileno, en una caja de Petri que contenga agar con otros ingredientes solubles en agua fría con un agente gelificante.

Se pone un mililitro de dilución preparada con muestra entre las dos películas plásticas. Después de la incubación las colonias aparecen de color rojo debido a la presencia de Tetrazolium el cual da un matiz en la fase nutritiva.

La misma película restringe el crecimiento bacteriano y permite ver la producción de gas de la colonia. Este método puede ser usado para detectar grupos específicos de microorganismos por lo cual se puede decir que es un medio selectivo; aunque también puede ser usado para detectar coliformes en leche y en otros alimentos. 23

7.4.3. Detección del Metabolismo.

Este es un método que se basa en principios diferentes a los tradicionales y que estima la población microbiana a través de la detección de alguna función del metabolismo.

Estos, se basan principalmente en medir cambios de impedancia, conductancia (la actividad metabólica debida al crecimiento de microorganismos, provoca cambios en la conductancia y capacitancia de los medios de cultivo), generación de calor, concentración de CO_2 , etc. Estos son muy sensibles y altamente automatizados, permitiendo el ahorro del tiempo y trabajo, obteniendo resultados del análisis en horas, y no en días. Los métodos pueden ser altamente computarizado. Un ejemplo de estos equipos son el Bactometer 120 SC y el Malthus 128 que detectan los cambios en el metabolismo (absorción de nutrientes, producción de gases, etc.) los cuales se usan en Microbiología de Alimentos.

7.4.4. Radiometría.

La radiometría se basa en la detección de microorganismos por medio de la incorporación de compuestos radioactivos en su medio de crecimiento. Estos compuestos radiactivos pueden ser el C^{14} , el P^{32} , y el S^{35} . Cuando los microorganismos utilizan el C^{14} , liberan como metabolito el $^{14}\text{CO}_2$, el cual se mide con ayuda de un cuantificador de la radioactividad.;;

El uso de la radiometría se enfocó primeramente para la Microbiología Clínica, pero posteriormente se aplicó a los alimentos y al agua, teniendo especial aplicación en la detección de Coliformes en agua.

Este método se usa también para la identificación de *Salmonella* y de *E. coli*, incubando a 45 °C. Se usa para contar microorganismos en jugos de naranja concentrados.

Los resultados de estos análisis se obtienen en horas comparado con otra que se tardan de 4 - 5 días.

7.4.5. Microcalorimetría.

Este es un método automatizado y computarizado y se basa en la producción de calor durante el catabolismo (actividad catabólica de las células).

Se basa en el estudio de pequeños cambios de calor (cambios de entalpia) en los que se involucra la reducción de los sustratos. La microcalorimetría es el resultado de cambios acordes en la historia de los microorganismos inoculados midiendo la fermentación de los sustratos. Se lleva a cabo haciendo un seguimiento de las corridas definiendo bien los sustratos utilizados. Se pueden usar 7 azúcares diferentes para la identificación de bacterias ácido lácticas como *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*. Los resultados se obtienen en un lapso de 24 hrs. Este método es altamente automatizado y computarizado resulta ser un método rápido, eficiente y confiable, por lo cual es usado en algunas empresas de alimentos.

7.5. Ultrarápidos.

Existen métodos todavía más rápidos y directos de los cuales mencionaremos a continuación algunos:

7.5.1. Frotis.

Este se realiza haciendo una impronta con presión en un portaobjetos de la materia que se quiera analizar, se despegar, se seca y se tiñe. Se utiliza principalmente para analizar frutas y los resultados se reportan en bacterias por cm^2 . Se necesita una platina de microscopía graduada.

7.5.2. Filtro de epifluorescencia (DEFT)

Existen métodos ultrarápidos en los que se hace uso de la Microscopía o de principios bioquímicos como la prueba de epifluorescencia directa.¹²

Este es un método rápido usado en y su nombre se deriva de (Direct Epifluorescent Filter Technique) de los cuales se derivan las siglas DEFT. Se basa en hacer pasar por un filtro de policarbonato una solución de material a examinar previamente homogenizado, teñido con tinte de fluorescencia y posteriormente se examina con un microscopio de epifluorescencia. 12

El tiempo requerido para la incubación de las bacterias Gram - es de aproximadamente 3 hr. y para las bacterias Gram + de 6 hrs. Se pueden identificar coliformes, Pseudomonas, Staphylococcus etc, en un lapso máximo de 8 hrs.

Este conteo se usa para el análisis de bacterias viables en carne, leche, y bebidas.

7.5.3. Tinción Fluorescente.

Se realiza un impronta en un portaobjetos al cual se le añade un colorante que puede ser:

Naranja de acridina.

En el portaobjetos se visualizan las bacterias fluorescentes y se realiza el conteo de las mismas. Este método es preciso para la identificación de *Salmonella spp.* esta prueba para estos microorganismos tiene una alta especificidad. 12

8. DESINFECCION

Comprende los procesos implicados en la destrucción de los microorganismos de las superficies y del equipo, pero no necesariamente las esporas bacterianas.

La desinfección se refiere a la eliminación de microorganismos y es el conjunto de medidas dirigidas a esta operación. Consiste en destruir la mayor parte de los microorganismos de las superficies, y la eficacia de esta operación dependerá de diversos factores como el tipo y concentración del producto utilizado, su temperatura y el procedimiento de aplicación, y estos factores varían con el tipo de desinfectante empleado, condiciones en que se aplica, tipo de materia a tratar y microorganismos a destruir.

Entre los agentes de uso más frecuente se encuentran, el agua caliente, el vapor a presión o fluyente, los halógenos (cloro y yodo) y derivados de los demás compuestos de amonio cuaternario¹⁵.

Cabe mencionar que la remoción de microorganismos a nivel casero, principalmente de los vegetales, se vería beneficiada por la adición de hipocloritos y de compuestos yodados al agua de lavado (recomendando una solución de 50 - 100 ppm de cloro)¹⁶.

8.1 Términos generales relacionados con el tema.

Antes de entrar en la discusión de cualquiera de estos métodos específicos, debemos entender ciertos términos generales:

8.1.1 Bactericida.

Sustancia química que bajo condiciones definidas, destruye las formas vegetativas bacterianas, pero no necesariamente las esporuladas. De manera similar los términos fungicida, virucida y esporicida se refiere a agentes que matan, hongos, virus y esporas respectivamente.

¹⁵ Compendio Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos *

8.1.2 Bacteriostático.

Sustancia química, que bajo condiciones específicas, previene el desarrollo bacteriano (muchos agentes bactericidas, actúan como bacteriostáticos a diluciones bajas). No mata las bacterias solo las inactiva.

8.1.3. Fungicida.

Agente químico que bajo condiciones definidas destruye los mohos y sus esporas.

8.1.4. Higienización.

Término que incluye todas aquellas actividades que ayudan a mantener el bienestar físico humano, incluidas la limpieza general de su entorno y la conservación de su salud.

8.1.5. Higienizante o sanitizante.

Sustancia que reduce el núm. de microorganismos a un nivel aceptable desde el punto de vista de salud pública. (está palabra, es muy utilizada en E.U., es virtualmente sinónima de desinfectante). El microbiólogo hace uso frecuentemente del término **bacteriostático**, que significa que detiene el crecimiento de bacterias y de **bactericida**, que destruye o mata a las bacterias.

8.1.6. Desinfectante

Sustancia química que destruye a los microorganismos pero no necesariamente a sus esporas. El desinfectante es por lo general es un producto químico, capaz de matar las formas en desarrollo de los microorganismos, pero no necesariamente a sus esporas ya que estas son más resistentes. El término se aplica comúnmente a sustancias que se aplican a objetos inanimados, ya que pueden resultar nocivos cuando entran en contacto con formas que tienen vida.

8.2 Mecanismo de acción de la sustancia desinfectante.

La acción de los desinfectante está dada por la capacidad de reaccionar con las proteínas y, en particular, con las enzimas de los microorganismos.

Cualquier agente puede actuar como desinfectante ya sea coagulando precipitando o desnaturizando proteínas.

Un fenómeno común que ocurre con los desinfectantes es que a concentraciones progresivas su efectividad letal llega a bajar y es menos efectivo, hasta que se inhibe. El rango de concentración sobre el cual toma lugar la acción difiere considerablemente según el tipo de agente empleado. La acción no puede ser claramente definida. Esto es debido a que cada célula en una población bacteriana es una entidad individual y por lo tanto se comporta diferente al resto. Entonces a concentraciones selectivas de un desinfectante, una célula mostrará sensibilidad mientras otras serán más resistentes. (3)

8.3 Selección de la sustancia desinfectante.

Para seleccionar los productos de limpieza (desinfectantes) se debe tener especial cuidado tomando en cuenta:

- El tipo de microorganismo que se va a eliminar
- Clase de suciedad a eliminar, ya que varía de acuerdo a la naturaleza de los alimentos y del proceso al que se ha sometido.
- Tipo de metal empleado en la construcción del equipo; en alimentos el equipo es principalmente de Acero inoxidable con acabado espejo.

Es importante la selección de los desinfectantes, pero se debe de tomar en cuenta que cada desinfectante se vende con sus especificaciones ya bien definidas.

8.4 Características que debe cumplir una sustancia desinfectante.

Los productos de limpieza (sustancia desinfectante) debe cumplir con las siguientes características:

- 1) Tener actividad antimicrobiana.
- 2) No ser tóxico, irritante, corrosivo.
- 3) No teñir, dañar telas.
- 4) Soluble en agua y alcohol.
- 5) Estable al calor y a pH diferentes.
- 6) No alterarse, no inactivarse en presencia de sustancias proteicas o de otras de origen orgánico.
- 7) Inodoro.
- 8) Tener buenas propiedades humectantes.
- 9) No dejar capas conductivas.
- 10) Actuar rápidamente y no perder su actividad durante el almacenamiento.
- 11) Tener efecto desodorante y buena capacidad limpiadora.
- 12) Fácil manipulación y adquisición.
- 13) Económico.

Para lograr un efecto óptimo es necesario tomar en cuenta la temperatura, la concentración y el tiempo de acción de cada desinfectante.

Uno de los métodos más eficaces en la desinfección de equipo es el empleo de vapor a presión, que solo se puede usar en sistemas cerrados capaces de resistir la presión.

También se pueden emplear chorros de vapor y vapor fluyente, al igual que el agua caliente. Con un tratamiento de vapor a presión adecuado pueden destruirse todos los microorganismos y sus esporas. La corriente de vapor y el agua hirviendo, si se aplican convenientemente, son capaces de destruir también todos los microorganismos menos las esporas bacterianas más resistentes. Cuanto menor sea la temperatura, menor será la eficacia.

8.5 Coeficiente fenólico o valoración de una sustancia desinfectante.

Para determinar la potencia de la desinfección de una sustancia que será empleada en este proceso se toma en cuenta:

* El coeficiente fenólico *

Ya que el fenol es considerado como el desinfectante estándar, aunque debe ser empleado en concentraciones superiores a casi todos los demás desinfectantes (0.9 para destruir una suspensión de *Salmonella typhi*, en condiciones normales en 10 min.)

* El coeficiente fenólico es una forma de comparar la acción desinfectante de un compuesto con el fenol *

Como organismos indicadores se emplean

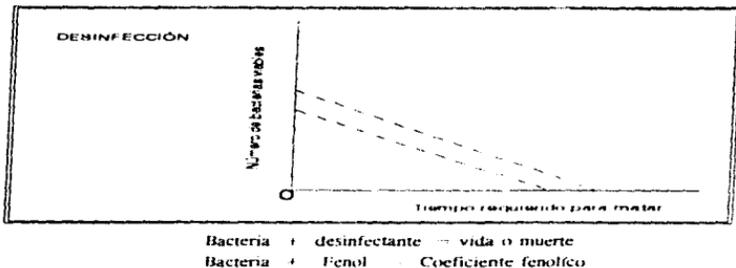
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>
Gram -	<i>Salmonella typhi</i>

Índice Fenólico 5, 10, 15 min. (la máxima dilución que mata en 10 min. pero no en 5 min.)

IF -----
 La máxima dilución del fenol que mate en 10 min. pero no en 5 min.

La sensibilidad de un organismo frente a un desinfectante determinado puede expresarse en forma mucho más precisa através de una curva semilogarítmica que indica la capacidad de destrucción en función del tiempo . Ver figura 8.5.

Figura 8.5 Índice fenólico.



Con base en la comparación entre estos resultados se determina la eficacia del desinfectante, para así posteriormente seleccionar el desinfectante más adecuado, tomando en cuenta que cada uno de los desinfectantes ya tienen sus especificaciones bien detalladas para así aplicarlo correctamente y no tener problemas con su uso.

8.6 Clasificación de agentes desinfectantes

Son de gran importancia en las industrias, siendo de nuestro interés las industrias como la alimentaria y de aquí que se deba de tener especial cuidado sobre la superficie en la que se va a aplicar

Son compuestos que no se pueden aplicar en ninguna superficie que entre en contacto con el organismo humano o con productos alimenticios, ya que resultarían tóxicas para el ser humano, incluso algunos (como el fenol) son tóxicos tan solo al estar en contacto con la piel, causando en algunas ocasiones adormecimiento u otros síntomas que pueden ser aun más graves.

Algunos de estos productos son halógenos como el cloro y el yodo y otro tipo de productos como el fenol. A continuación se hablará brevemente de cada uno de ellos, mencionando algunas de sus características principales:

8.6.1. Cloro.

Los compuestos clorados fueron los primeros en ser usados comercialmente en el año de 1785, usándose principalmente en la desinfección en hospitales; después se usaron los hipocloritos para purificar el agua y en el año de 1946 el cloro fué usado por primera vez en equipo usado para la elaboración de alimentos, el cual se refiere principalmente a la reducción de microorganismos en el equipo usado para su elaboración (una concentración de 0.25 ppm. de cloro basta para comenzar a actuar sobre las bacterias), favoreciendo así el tiempo de operación del equipo y reduciendo el tiempo de limpieza del mismo. El uso del cloro no trae consigo una corrosión aparente, más sin embargo no se recomienda el uso indiscriminado de este producto en los alimentos ya que por si mismo es muy corrosivo.

El conteo de microorganismos de la superficie se reduce cuando se realiza una desinfección con productos clorados. Se supone que el cloro actúa a nivel membrana celular formando un compuesto N-cloro, que interfiere en el metabolismo sugiriendo que el cloro penetra en la célula bacteriana a nivel de protoplasma. Este compuesto N-Cloro es un compuesto tóxico que cuando se encuentra en cantidades suficiente inhibe las reacciones enzimáticas del microorganismo. En la industria de alimentos se usa en concentraciones de 100 - 200 ppm. en vegetales y fruta de 1-5 ppm y en alimentos esterilizados con calor 1-2 ppm.

El cloro puede ser usado como gas en el caso que se sugiera. Para su uso se debe tomar en cuenta que puede reaccionar con muchos compuestos orgánicos presentes en el agua. También cuando el cloro se incorpora con las moléculas de ácidos orgánicos la hidrofobicidad y la lipofobicidad natural se incrementa haciéndolo más tóxico y bioacumulable.⁴¹

8.6.1.1 Cloruros.

El cloro tiene una buena eficiencia germicida, no es tóxico en dilución, su acción es rápida, fácil de evaluar y usar, activo contra los microorganismos, no se ve afectado por el contenido de sales de las aguas duras, activo contra esporas a altas temperaturas y mayor tiempo, activo contra bacteriófagos y virus. Resulta ser tóxico cuando se encuentra concentrado.

Los compuestos clorados representan unos de los desinfectantes de uso más común, entre ellos se puede citar:

8.6.1.1.1. Hipocloritos.

El hipoclorito de sodio (NaOCl) y el hipoclorito de calcio (Ca(OCl)_2), son usados también como agentes sanitizantes y su mecanismo de acción es igual que las cloraminas, son efectivos contra una gran variedad de microorganismos, esporas y bacteriófagos.

Su actividad se neutraliza en presencia de materia orgánica, también se emplean en la purificación de agua y su uso es limitado ya que este tipo de compuestos son muy corrosivos y caros.

Cuando se aplican los hipocloritos, el cloro reacciona con el agua formando ácido hipocloroso, el cual es una solución neutral o ácida, es un agente fuertemente oxidante y efectivo como desinfectante.

La disociación del ácido hipocloroso depende del pH, el cual es un factor importante, el cual determina la eficacia de la desinfección.

8.6.2 Yodo.

El yodo es oxidante y algo corrosivo como el cloro, cuando entra en contacto con las superficies y con los alimentos le proporciona cierto color característico, mata las bacterias

vegetativas y esporuladas, la desventaja de usarlos en alimentos es que además de cambiar el color del mismo, le proporciona un olor diferente y sobre todo un mal sabor.

Es un bactericida potente, una solución de 1-20,000 de yodo mata a las bacterias, incluso esporuladas en 15 min. Su modo de acción no se conoce con certeza, pero se sabe que se combina con la Tirosina de las proteínas, lo cual lo resulta tóxico para los microorganismos, se considera entre los desinfectantes más activos, aunque puede ser usado también como antiséptico.

Algunas sustancias derivadas del yodo que son aplicadas como desinfectantes son las siguientes:

8.6.2.1 Tintura de yodo.

Es una solución de 2 % de yodo libre con 2-4 % de yoduro sódico en alcohol etílico al 50 %, pudiéndose sustituir por alcohol isopropílico. Generalmente se usa para la desinfección de la piel o como tratamiento de infecciones causadas por bacterias, hongos, parásitos o virus.

8.6.2.2 Yoduro potásico.

Se presenta en forma de cristales transparentes, en algunas ocasiones con aspecto opaco o como un polvo blanco, inodoro; en solución tiene un pH alcalino, debe de tener no menos del 99 % de yoduro potásico (IK), calculado en base seca, soluble a 20 °C a menos de una parte de agua, 23 partes de alcohol y en 2 de glicerina.

El efecto de este producto es por la capacidad de precipitar las proteínas, parcialmente ligado o convertido en iones.

8.6.2.3 Yodoformo.

Es un polvo cristalino de color amarillo limón intenso, de olor característico penetrante

y persistente, es casi insoluble en agua, ligeramente soluble en alcohol, pero soluble en éter o cloroformo.

El yodoformo contiene 0.75 a 1.6 de yodo y puede ser usado para la elaboración de detergentes no iónicos, por lo general no irrita y puede ser muy efectivo a largo tiempo, generalmente se usa para la desinfección a concentraciones de 75 a 150 ppm de yodo. Cuando se encuentra en presencia de materia orgánica se lleva a cabo la liberación del yodo.

Reciente mente se usa en la sanitización en hospitales, equipo y utensilios usados en la elaboración de comida.

8.6.3 Fenol

El fenol también llamado ácido carbólico o ácido fénico, es muy buen desinfectante, tiene buen poder de penetración, los residuos de fenol son tóxicos por lo cual no se puede usar par desinfectar superficies que entren en contacto con alimentos.

Los compuestos fenólicos son bactericidas o bacteriostáticos, dependiendo de la concentración en que se usen, tomando en cuenta que los virus y las esporas bacterianas son más resistentes que las células vegetativas. Estos compuestos actúan desnaturando las proteínas de las células.

La actividad de los compuestos fenólicos contra los microorganismos dependen del tipo de compuesto empleado. Si hay presente materia orgánica, tiende a absorber el fenol y a disminuir la concentración disponible para matar a los microorganismos. El fenol, en si mismo es una sustancia altamente tóxica para los tejidos vivos ya que es fácilmente absorbido por la vía cutánea, digestiva y serosas. Actúa sobre la célula bacteriana desnaturando y coagulando proteínas. Tiene excelentes propiedades preservativas y se usa como tal en preparaciones biológicas y de laboratorio a la concentración del 0.5 %.

A altas concentraciones, los compuestos fenólicos actúan sobre los microorganismos

desnaturalizando sus proteínas celulares, pero a concentraciones más bajas provocan la ruptura de la membrana celular con escurrimiento de los constituyentes de la célula. Con altas concentraciones son rápidamente bactericidas, las oxidasas y deshidrogenasas unidas a la membrana se inactivan de manera irreversible.

El fenol a temperatura ambiente es sólido y se funde cuando se llega a los 40 °C, es muy soluble en alcohol y éter, es soluble en agua en una proporción de 1 : 10. Se puede usar al 3 ó 4 % para desinfectar instrumentos, aunque a una concentración del 5 % en solución se usa para desinfectar objetos, locales y equipo contaminado. El fenol es un buen desinfectante aunque es demasiado caro para usarse con este fin.

No se recomienda su aplicación en objetos que entran en contacto con alimentos ya que su olor es rápidamente absorbido por los mismos, generalmente se recomienda su uso para incubadoras, gallineros, equipo, etc.

8.6.4 Alcohol.

Los alcoholes alifáticos son buenos desinfectantes. El alcohol que se usa con mayor frecuencia es el alcohol etílico diluido al 70 % en peso y 79 % en volumen, el cual es efectivo contra células vegetativas; generalmente es usado para la desinfección de la piel. El alcohol propílico e isopropílico se ha usado al 50 ó 60 % como antiseptico de la piel y desinfectante de instrumentos quirúrgicos.

Los alcoholes no tienen poder esporicida, por lo cual se utilizan en combinaciones con otros desinfectantes para formar las llamadas tinturas, logrando así una mayor efectividad. Son efectivos contra microorganismos patógenos menos resistente, siempre que tengan una adecuada exposición.

El agua es esencial para la acción potencial del alcohol, el cual actúa desnaturalizando las proteínas bacterianas. (Los microorganismos Gram +, Gram - y los ácido-alcohol resistentes son sensibles a los alcoholes.

El alcohol tiene afinidad por la parte lipóidea del germen, destruyendo la cubierta lipídica de la membrana celular. Inhibe sistemas enzimáticos esenciales en el interior de las bacterias y en concentraciones elevada coagula las proteínas.

Tienen poder deshidratante por lo cual se recomienda dejar que se evapore, para tener la seguridad de que ha desempeñado su acción. A mayor número de carbonos es mejor desinfectante, pero disminuye su solubilidad. Para usarlo debe estar diluido al 75 %. Un alcohol puede ser usado como desinfectante o como antiséptico, para que actúe de manera eficaz se debe dejar actuar por lo menos un tiempo de 5 min. Los alcoholes superiores (propílico, amílico y otros) poseen un poder germicida mayor que el alcohol etílico. De hecho el poder germicida aumenta a medida que aumenta su peso molecular. En la siguiente tabla se muestra la acción microbiana de algunos alcoholes en base a su coeficiente fenólico.

TABLA 8.6.4 Acción microbiana de alcoholes

Alcohol	Contra	
	<i>Salmonella s.</i>	<i>Staphylococcus a.</i>
Metílico CH_3OH	0.076	0.03
Etilico CH_3CH_2OH	0.08	0.039
n Propílico $CH_3CH_2CH_2OH$	0.102	0.062
Isopropílico $CH_3CH(OH)CH_3$	0.094	0.054
n Butílico $CH_3CH_2CH_2CH_2OH$	0.273	0.22
n Amílico $CH_3(CH_2)_4CH_2OH$	0.28	0.63
n Hexílico $CH_3(CH_2)_5CH_2OH$	2.3	

En general los alcoholes reducen la flora microbiana de la piel y son usados para la desinfección de material usado en clínicas principalmente.

8.7. Detergentes.

Producto químico, que se añade al agua con el fin de mejorar la limpieza, ya que ayuda a remover más fácilmente la suciedad. Ayuda a reforzar la capacidad de limpieza del agua. El detergente ablanda o acondiciona el agua y aumenta la capacidad humectante de la solución empleada en la limpieza, emulsifican o saponifican las grasas, solubilizan los minerales, dispersan los materiales suspendidos y disuelven tanta materia como sea posible.

Estos agentes se clasifican principalmente con base a su carga iónica presente en la porción oleofílica del agente, una vez que este se disuelve principalmente en agua, se clasifican en:

Aniónicos
Catiónicos
No iónicos

8.7.1 Detergentes aniónicos

El grupo hidrofóbico (que tiende a agregarse en el H_2O) consta de una cadena de hidrocarburos y la porción hidrofílica (que permanece en contacto con el agua), está constituida por un grupo sulfato ($-O-SO_3^-$), o n grupo sulfonato ($-SO_3^-$). Los cationes son por lo general iones inorgánicos de sodio Na^+ .

Son considerados como jabones altamente biodegradables, su principal acción es por emulsificación de las grasa, teniendo un poder humectante y dispersante.

8.7.2 Detergentes catiónicos

Productos que se ionizan con la propiedad detergente localizada en el catión. La mayor parte de los detergentes catiónicos son germicidas formulados a base de sales de amonio cuaternario.

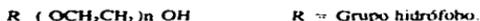
El grupo hidrofílico es el nitrógeno cabeza de una sal de amonio cuaternario, que tienen una carga positiva (catión) ($- N^+ (R_4)$), mientras el grupo oleofílico está constituido por radicales orgánicos de distinta longitud adosados a él. El ión negativo que equilibra a la carga en la molécula es un anión Cloruro (Cl^-) o Bromuro (Br^-).

Los agentes catiónicos inhiben la respiración o la producción ácida de los microorganismos Gram + y Gram -, por lo que inhiben su metabolismo; actúan sobre algunas enzimas .

Para su aplicación se requieren aguas blandas (es decir con bajo contenido de sales), son estables al calor.

8.7.3 Detergentes no iónicos.

Los grupos hidrofóbicos de estos compuestos tensoactivos son los mismos que los usados para los aniónicos y catiónicos, en la porción hidrofílica son generalmente glicoles de polietileno o propileno con sustitución en el extremo de la cadena.



un ejemplo:

Povidona (polivinilpirrolidona). Es un polímero sintético en forma de polvo, de color blanco o crema, incoloro, higroscópico, soluble en agua, alcohol y cloroformo. Sus soluciones al 10 % o menos poseen una viscosidad similar a la del plasma, y a mayor concentración, mayor viscosidad.

8.7.4 Detergentes sanitizantes.

Debe de tenerse especial cuidado en la aplicación de las sustancias que pueden ser usadas sobre superficies animadas o que entran en contacto con alimentos, ya que en algunos casos los restos de estas sustancias pueden ser tóxicas para el ser humano causando graves problemas. Las sustancias que se emplean en este tipo de superficies generalmente

son agentes humectantes o depresores de la tensión superficial, que se emplean en la limpieza y sanitización de las superficies, generalmente son productos biodegradables, que no contaminan las aguas ni con Fósforo, ni con Nitrógeno.

La sanitización es el mecanismo mediante el cual, se reduce la carga microbiana en las superficies que entran en contacto con alimentos, manteniendo los niveles que son permitidos (es decir que no causan alteración a los alimentos y sus restos no son tóxicos). Entonces un sanitizante puede ser cualquier agente químico acompañado ya sea del cloro, yodo, o compuestos de amonio cuaternario. Algunos de estos detergentes usados como higienizantes (sustancia que reduce el número de microorganismos a un nivel aceptable desde el punto de vista de salud pública) y sanitizantes. Son agentes con baja tensión superficial, los cuales aumentan la permeabilidad de la membrana, facilitando de este modo que el agua penetre al interior de la bacteria, hasta que esta estalla.

Como se mencionó anteriormente los detergentes son aquellos que poseen un alto efecto bactericida, tiene una capacidad moderada de formar espuma, no son corrosivos y cumplen con los requerimientos legales; para que un detergente sea sanitizante en su formulación se pueden emplear yodoforos, cloraminas etc, con el fin de aumentar su efecto.

8.7.4.1 Detergentes formulados con yodofóros.

El yodo tiene una buena penetración, es fácil de usar y de cuantificar, no afecta la piel, no corroe el acero inoxidable, es estable cuando se almacena por largo tiempo, es activo contra los microorganismos pero no contra sus esporas es efectivo contra algunos virus, no se ve afectado por las sales presente en las aguas duras. Una de las desventajas de su aplicación es que queda sabor y olor residual. No se puede usar a temperaturas superiores de 50 °C ya que se provoca la evaporación el yodo, no se puede aplicar en superficies porosas y plásticas ya que éstas se ven afectadas. Los yodofóros son compuestos que consisten en la unión del yodo elemental con agentes humectantes no tóxicos o agentes tensioactivos que solubilizan al yodo mezclados en una solución ácida. Los yodofóros (combinación de yodo con diversas sustancias), se usa como desinfectantes.

Yodo + detergentes**Yodo + humectantes**

El yodo disponible en los yodofóros está en el orden del 70 a 80 %. El uso de estos compuestos representa ciertas ventajas:

Los yodofóros cuando se aplica a una temperatura de 48-8 °C ejercen un poderoso papel germicida, tienen la ventaja de ser menor irritantes y corrosivos que los agentes clorados. Tienen la desventaja de que su efecto bactericida está ligado al pH, a pH de 3 a 5 se nota una gran actividad, pero a pH de 7 disminuye considerablemente.

Los yodofóros son letales para varios tipos de microorganismos, incluyendo las micobacterias, hongos y algunos protozoarios. Tienen gran aplicación en la desinfección de envases y utensilios que entren en contacto con la preparación y manejo de alimentos.

8.7.4.2. Detergentes formulados con compuestos de amonio cuaternario.

Son derivados de hidróxido de amonio $NH_4^+(OH^-)$. Se usa comúnmente en la elaboración de detergentes, obtiene su actividad del grupo catiónico tiene gran actividad sobre los germen Gram + y los Gram -, así como en los vibriones. No tienen gran actividad sobre las bacterias esporuladas.

Tienen un excelente poder de penetración, son estables cuando se usan, son rápidos de aplicar, poco afectados por la presencia de materia orgánica, son odorosos e insaboros, fácil de evaluar, no son corrosivos, no afectan a la piel, son estables a cambios de temperaturas, tienen gran poder germicida, ya que son activos contra muchos microorganismos. Por todas estas características son ampliamente aplicados en la elaboración de detergentes, ya que mezclándolos con ácidos como el ácido fosfórico obtengo detergentes de tipo sanitarios de buena calidad.

Estos compuestos derivados del amonio cuaternario resultan tóxicos cuando se encuentran en soluciones concentradas, produce mucha espuma y no es muy efectivo en la destrucción de esporas, virus y bacteriofagos.

El poder bactericida de los compuestos de amonio cuaternario es excepcionalmente alto contra las bacterias Gram +, e incluso muy energético contra los microorganismos Gram negativos; igualmente ha demostrado ser un buen fungicida. La combinación de las propiedades como la actividad microbiana, acción detergente y otros factores como la toxicidad, solubilidad, el no ser corrosivo y su estabilidad, ha dado a estos compuestos muchas aplicaciones en el saneamiento y la desinfección.

El mecanismo de acción no se ha explicado con precisión, se han supuesto diversos modos de acción antimicrobiana como la inhibición enzimática, la desnaturación de las proteínas y la ruptura de la membrana celular con la posterior pérdida de los constituyentes celulares vitales.

Al parecer la inhibición o muerte de las células se debe a la combinación de varias de estas acciones.

8.7.4.3 Detergentes formulados con cloraminas.

Químicamente se caracterizan porque uno o más de los átomos de hidrógeno de los grupos amino de estos compuestos están sustituidos por el cloro. El más sencillo de estos es la Monocloramina (NH_2Cl), es un agente oxidante además, sirve como saneador en equipo que se emplea en la elaboración de alimentos y productos lácteos, afecta principalmente las membranas celulares y las enzimas, tiene una acción desinfectante más lenta que la que tienen el cloro; es por eso que es necesario no sólo proporcionar un residuo elevado, sino también permitir un período de contacto mayor para asegurar la acción bactericida.

Son derivados del NH_2Cl , todos los que derivan del cloro son agentes oxidantes, se usa como desinfectante general en la industria, ya que sirve para clorar y esterilizar, se usa como desinfectante en la industria de alimentos y productos lácteos. Estos compuestos no pueden usarse en exceso ya que en el organismo son cancerígenos.

8.8 Limpieza.

En las diferentes industrias dedicadas a la elaboración de alimentos es de gran importancia el llevar a cabo un proceso de limpieza, con la finalidad de evitar la contaminación de los alimentos, ya que existen diversos microorganismos que se pueden desarrollar y causar alteraciones ya sea en el alimento o en el consumidor.

El proceso de limpieza cubre todos aquellos procesos implicados en la eliminación de todo tipo de suciedad que se adhiere a las superficies.

Para realizar la limpieza se requiere una energía ya sea térmica o mecánica, con el fin de eliminar la suciedad que se adhiere a las superficies. La suciedad y las bacterias se adhieren a la superficie por diversas interacciones moleculares entre los que se encuentran:

- 1) Puentes de Vander Walls
- 2) Atracción mecánica
- 3) Atracción electrostática
- 4) Puentes de hidrógeno

El proceso de limpieza a seguir para eliminar la suciedad consta principalmente de los siguientes pasos:

- 1) Humedecer (la sustancia que se va a emplear como limpiador tiene que ser capaz de reducir la tensión superficial de la superficie a limpiar).
- 2) Desplazar la suciedad, por saponificación de las grasas, peptonización de las proteínas y disolución de las sales)
- 3) Dispersar la suciedad en solución .
- 4) Prevenir que la suciedad se redeposite en la superficie mediante un enjuague.

Para llevar a cabo la limpieza es importante contar con abundante agua, ya que esta sirve de medio dispersante, principalmente de los detergentes con los que se lleva a cabo la limpieza. Una de las características que debe de cumplir el agua, es que debe ser agua blanda (baja en sales de calcio, magnesio y hierro). sino es así puede provocar problemas como son la sedimentación y acumulación de sales en equipo y tuberías principalmente.

Los agentes limpiadores deben de ser:

- 1.- Adecuados para ser usados con agua.
- 2.- No corrosivos
- 3.- No tóxicos
- 4.- De bajo costo
- 5.- Estable a los cambios
- 6.- Fácil de remover, etc.

La adición de las funciones de los agentes limpiadores depende de varios factores, entre los que se encuentra la naturaleza de la superficie a ser limpiada, las características de agua usada como vehículo de los compuestos limpiadores y los métodos de aplicación de los limpiadores.

Los agentes limpiadores pueden ser combinados con el fin de completar las funciones requeridas.

Otro punto importante y que no se debe dejar pasar es la periodicidad con que se realiza la limpieza, ya que la variabilidad reseñada está en función de la capacidad y el volumen de trabajo de las industrias y de su equipo.⁴

Las operaciones de limpieza y desinfección son partes esenciales de la producción de alimentos y la eficiencia con que estas operaciones se llevan a cabo, ejerce una enorme influencia en la calidad final del producto. La condición previa para un programa de limpieza eficaz es que la factoría y su equipo se hayan diseñado teniendo presentes los estándares higiénicos; el programa de limpieza más eficiente puede ser inaplicable si en la

⁴ Compendio Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos.

fábrica o en el equipo hay graves deficiencias básicas (depósitos calcificados, malas uniones, etc) y si en el diseño existen fallas, la higiene nunca será totalmente efectiva.²⁴

8.8.1 Suciedad.

Es importante para llevar a cabo el proceso de limpieza el saber que todo residuo alimenticio indeseable, tanto de naturaleza orgánica, como inorgánica, que permanece en el equipo y en otras superficies son considerados o catalogados como suciedad, los cuales pueden servir de sustratos para la reproducción de microorganismos, trayendo consigo la contaminación de los alimentos elaborados en el equipo donde estuvo presente la suciedad. Los constituyentes de los alimentos tienen una marcada diferencia en su solubilidad y en la susceptibilidad de ser limpiados (removidos) de la superficie. En la siguiente tabla se muestran algunas características dependiendo del tipo de suciedad.

TABLA 8.8.1 Tipos de suciedad

Componentes	Solubilidad	Facilidad de ser removido	Cambios inducidos por el calentamiento
Azúcar	Agua	Facil	Caramelización, lo que dificulta la limpieza
Grasa	Insoluble en agua, soluble en alcali	Difícil	Polymerización, lo que lo hace mas difícil de limpiar
Proteínas	Insolubles en agua, soluble en ácido y alcali	Muy difícil	Desnaturalización, es muy difícil de limpiar
Sales			
Monovalente	Soluble en agua y ácido	Facil	Generalmente no significativo
Poliivalente (CaPO ₄)	Insoluble en agua, soluble en ácido	Difícil	Interacción con otros constituyentes, lo que dificulta la limpieza

8.8.2 Superficie limpia.

La que está libre de suciedad de todo tipo y no desprende ningún tipo de olor. Por lo tanto, es aquella de la que se han eliminado restos alimenticios, detergentes, desinfectantes y por lo que no contaminarán los alimentos que contacten con ella y los microorganismos que posee, si es que tienen alguno, no afectarán la calidad del producto durante su elaboración. Una superficie limpia no es necesariamente estéril.

8.8.3 Agentes usados como limpiadores.

Algunos productos químicos, se añade al agua con el fin de mejorar la limpieza, ya que ayudan a remover más fácilmente la suciedad. Ayudan a reforzar la capacidad de limpieza del agua. Los detergentes tienen la propiedad de que aumentan la difusión o penetración de algún desinfectante empleado, y eliminan las barreras entre el agente y el microorganismo por lo cual se usan como agentes limpiadores.

Entre los limpiadores usados solos ó en mezclas se encuentran:

8.8.3.1 Limpiadores de naturaleza alcalina.

La efectividad de estos productos radica en su capacidad de liberar iones OH- (hidroxilo), de alto poder germicida, en soluciones acuosas y su mayor o menor poder depende precisamente de la facilidad con que se liberen estos iones. Se debe limitar el uso de los álcalis ya que un uso excesivo puede causar una irritación cutánea. A continuación se hablará sobre los detergentes de naturaleza alcalina más usados.

8.8.3.1.1 Lejía o sosa caústica.

Es una sustancia blanca, cristalina, soluble en agua. Posee un mínimo del 94 % de hidroxido de sodio o más, su efectividad depende la cantidad de materia orgánica presente, ya que está la hace perder su efectividad. El NaOH al 94 % es efectivo para combatir bacterias, parásitos y virus. Su poder se concentra en la desnaturalización de las proteínas.

Uno de los inconvenientes de su uso es que corroe superficies de aluminio, afecta la ropa y es tóxica para la piel, por lo cual no se recomienda cuando se lleva cabo una limpieza manual, siendo más efectivo cuando se lleva a cabo una limpieza por medios mecánicos. Se utiliza principalmente en las industrias lácteas. Es muy efectiva en soluciones calientes ($70 - 80 ^\circ\text{C}$) y en concentraciones al 10 % el efecto esporicida se aumenta; al 2 % bactericida frente a los microorganismos de mayor resistencia, siempre y cuando se le de un tiempo de exposición de 12 horas.

Se usa para eliminar grasas, residuos de alimentos desecados o parcialmente carbonizados y de pinturas de aceite.

8.8.3.1.2 Cal viva.

Se denomina cal rápida u óxido de calcio. Se necesita una concentración mínima del 95 % de óxido de calcio (CaO) en combinación con el agua para que sea un desinfectante efectivo ya que se obtiene como producto final el hidróxido de calcio. Se emplea como lechada o en polvo para la desinfección de patios y locales principalmente.

8.8.3.1.3 Metasilicatos de sodio.

No son corrosivos, no se utilizan a temperaturas altas, se usa en bajas concentraciones tienen un buen poder floculante y emulsificante, su aplicación debe ser en aguas blandas, ya que en aguas duras tiende a precipitar. Este es un producto tóxico para el operador.

8.8.3.1.4 Sesquisulfato.

Es poco corrosivo cuando se usa en concentraciones bajas, generalmente es usado cuando hay que saponificar material en grandes cantidades.

8.8.3.1.5 Pirofosfatos.

Ayudan a ablandar las aguas duras, es decir secuestran las sales de Na^+ y Mg^{2+} , son

estables a bajas temperaturas, son de bajo costo aunque no son tan buenos como los polifosfatos.

8.8.3.1.6 Polifosfatos.

Son buenos hablandores del agua, ya que ayudan a precipitar las sales que estan presentes en el agua (como los iones calcio, magnesio y fierro). Los polifosfatos forman complejos solubles con estos iones. Los polifosfatos son solubles solamente en agua tibia solamente, son muy buenos pero un poco caros.

8.8.3.2 Limpiadores de naturaleza ácida.

Los de naturaleza ácida, generalmente son ácidos orgánicos e inorgánicos como:

8.8.3.2.1 Acidos orgánicos.

El ácido acético, hidroxiaético, cítrico, levulínico, tartarico y glucónico; Estos ácidos disuelven los depósitos minerales, especialmente alcalino térreos, de calcio y de magnesio. Los ácidos orgánicos tienen la desventaja de que producen una ligera corrosión a los metales.

8.8.3.1.2.1 Acido Bórico.

Un 2 % de ácido bórico en solución al 5 % en agua o en polvo es un germicida contra bacterias menos resistentes. Cuando se emplea en altas concentraciones es sumamente tóxico.

8.8.3.1.2.2 Acido benzóico.

Al 10 % se usa en la conservación de alimentos y productos medicinales debiéndose encontrar en medios ácidos para que resulte efectivo. Se usa en la fabricación de colorantes.

8.8.3.2.2 Ácidos inorgánicos.

Los ácidos inorgánicos como el clorhídrico, nítrico, sulfúrico y fosfórico son demasiado corrosivos para ser usados en forma práctica. Se debe evitar el contacto con la piel y con los ojos. Disuelven los depósitos minerales resistentes. Se requiere un lavado final con agua o con una solución ligeramente alcalina.

8.8.3.2.2.1 Ácido clorhídrico.

Es de los ácidos más fuertes. A concentraciones elevadas puede destruir esporas bacterianas y puede ser usado en la desinfección de desperdicios. En solución al 4 % de 1 : 1000 se usa en brotes de salmonelosis, aunque su empleo no es muy generalizado debido a su difícil aplicación y su alta toxicidad.

8.9. Usos de los desinfectantes en la industria de alimentos

Obsérvese la útil diferenciación entre un antiséptico y un desinfectante. En la práctica, un antiséptico puede considerarse como un desinfectante más débil, que puede emplearse para reducir el número de microorganismo existentes sobre una superficie animada. Un desinfectante es útil para eliminar o destruir materia séptica en los instrumentos, en los pisos, en la superficie de las mesas y en los bancos de trabajo.

El microbiólogo hace uso frecuentemente del término bacteriostático, que significa que detiene el crecimiento de bacterias y de bactericida, que destruye o mata a las bacterias.

En las industrias alimentarias todo el equipo que tiene contacto con alimentos (mesas, cacerolas, cuchillos, cintas transportadoras, tolvas, embudos, marmitas y demás utillaje) se deberá limpiar y desinfectar por lo menos dos veces cada 8 horas. Los suelos y paredes de las zonas donde son elaboran los alimentos, se limpiarán mínimo una vez al día.

Debe existir personal responsable de la limpieza, el cual deberá inspeccionar diariamente el utillaje y las zonas de fabricación para controlar que se ha realizado el trabajo

de limpieza y desinfección satisfactoriamente. La inspección se realizará preferentemente antes de empezar cada turno de trabajo.

8.10 Sistemas de limpieza en su sitio " CIP ".

Algunas industrias y muy especialmente las lácteas, dejan las tuberías de conducción permanentemente conectadas y las limpian y desinfectan sin desmontar; hay aparatos que realizan estas funciones de un modo automático. Los distintos sistemas de limpieza " in situ " utiliza diferentes secuencias de tratamientos. Las tuberías por las que circula la leche; por ejemplo, se limpian primero con agua templada, después con una solución detergente caliente a 71 °C, una solución de cloro (200 ppm) o un compuesto de amonio cuaternario a una concentración de 200 ppm. A veces, este proceso se realiza antes de la utilización de la línea de proceso.

9. ANTIBIÓTICOS.

Se trata de sustancias producidas por Microorganismos con capacidad de inhibición sobre otros tipos de organismos y que tienen un empleo potencial como conservadores de alimentos. Algunos de estos compuestos habían sido autorizados por la " United States Food and Drug Administration " como aditivos de los alimentos, pero actualmente no están permitidos, al haber sido retirada en 1966 la correspondiente aprobación.

Está aprobación fué retirada principalmente por dos motivos:

A) Creación y posterior difusión de resistencias de los microorganismos, sobre todo de los patógenos, ya que el que los microorganismo sobrevivan posiblemente se deba a la tolerancia o adherencia generada por los mismos al antibiótico.^{47,50}

B) Constitución de alérgias a los antibióticos en el hombre. En este caso se podría dar un ejemplo clave como es el hecho de los residuos de penicilina en la leche de vaca, generalmente procedentes del tratamiento de la mastitis de las vacas. Estos residuos provocan manifestaciones alérgicas en personas sensibles, además de que estos residuos de antibióticos presentes en la leche también motivan considerables pérdidas económicas al inhibir los cultivos en la fabricación de productos lácteos.

En la actualidad se siguen realizando estudios sobre la aplicación de antibióticos en los alimentos, con lo cual se pretende establecer el grado de resistencia generado por los microorganismos al aplicarse antibióticos a los mismos.⁵¹

10. PRINCIPALES GRUPOS BACTERIANOS DE IMPORTANCIA EN ALIMENTOS.

Las bacterias son organismos diminutos; unicelulares de forma y actividad variables. Las bacterias se encuentran en todas partes, en el suelo, en el aire, en el agua y en el polvo. Existen miles de tipos y algunas realizan funciones útiles. Algunas transforman la materia vegetal en abono, otras favorecen en el interior del cuerpo humano o animal, la formación de ciertos compuestos esenciales para la salud (por ejemplo las vitaminas); otras pueden intervenir en los procesos de la fermentación tales como la producción de cerveza o vino y en la elaboración de queso; otras se emplean en la producción de antibióticos usados para el tratamiento de algunas enfermedades.

A continuación se hace una breve descripción de cada uno de los géneros BACTERIANOS de importancia en alimentos tomando en cuenta las dos grandes subdivisiones que existen en Gram + y Gram -.

10.1. Gram +.

10.1.1. Familia Micrococaceae

Son cocos esféricos, Gram +, agrupados en masas irregulares, tetradas o paquetes; saprofitos, microorganismos generalmente patógenos.

10.1.1.1. Micrococcus.

Los micrococcus son aerobios inmóviles que crecen mejor entre 35 y 40 °C. Los micrococcos alteran a alimentos altamente salados, ya que son halotolerantes y son microorganismos proteolíticos. Algunos no producen colonias pigmentadas, mientras que otros presentan pigmentos rosa, anaranjados o rojizos en los medios de cultivo. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, en la piel del hombre y de los animales, así como en el polvo, suelo, agua y muchos alimentos. Aunque hay algunas especies capaces de crecer en la gama de psicrófilos, la mayoría son mesófilos o termófilos. Ciertas

especies están relacionadas con productos cárnicos, apartir de los cuales llegan a carnes elaboradas, como pueden ser las salchichas Frankfurt.

10.1.1.2. *Staphylococcus*

Los estafilococos son anaerobios facultativos y cuando mejor crecen es entre 35 y 40 °C. Se agrupan como racimos de uvas. Comúnmente se encuentran ambos en las fosas nasales del hombre y animales, así como en la piel y en heridas infectadas, además de otras partes del cuerpo. Algunas especies pueden producir una enterotóxina altamente estable al calor, la cual es causante de deshidrataciones severas en humanos.

10.1.2. Familia *Lactobacillaceae*

Son bacilos cortos, Gram (+). Se dividen en un plano para formar cadenas; fermentan los hidratos de carbono, esencialmente para su desarrollo dando como productos de la fermentación ácido láctico además de otros compuestos. Son microaerófilos (es decir que su crecimiento esta a bajas tensiones de O_2) o en su defecto anaerobios.

10.1.2.1. *Lactobacillus*.

Comprende unas 15 especies. Son bacilos largos, no esporulados, son bacilos inmóviles que se presentan a menudo en cadenas los cuales pueden ser anaeróbicos, anaerobios facultativos o microaerófilos. Hay lactobacilos homo y heterofermentativos.

Están ampliamente distribuidos en los alimentos (por ejemplo; bacon, carnes enlatadas al vacío y bebidas alcohólicas). Algunas especies se utilizan en la producción de bebidas fermentadas, como las producidas por *L. acidophilus* y *L. bulgaricus*. Otras tienen importancia en la elaboración de quesos. También se emplean en las determinaciones microbiológicas de aminoácidos y vitaminas del grupo B, por el carácter estricto en cuanto a sus necesidades de estos elementos. *L. thermophilus* resiste las temperaturas de

pasteurización de la leche. Son frecuentes en productos cárnicos curados como los embutidos.⁴⁶

10.1.2.2. *Leuconostoc*.

Son organismos heterofermentativos. Se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. Ciertas especies causan problemas en las refineras de azúcar, pues son capaces de producir limo en las tuberías. Otras se emplean en los cultivos lácteos como iniciadores y algunas que se encuentran con frecuencia en productos cárnicos curados causando fermentaciones. Ciertas especies sintetizan dextrano que causa viscosidad o limo.

10.1.2.3. *Pediococcus*.

Es homofermentativo, se utiliza principalmente como iniciador de fermentaciones. Originan ácido láctico por fermentación de la glucosa. Los pediococos tienen forma esférica, disponiéndose en pares o tetradas, debido a que la división tiene lugar en dos planos.

10.1.2.4. *Streptococcus*.

Al igual que los lactobacilos, son cocos que frecuentemente presentan formas esféricas u ovales. Como los lactobacilos producen pequeñas colonias en los medios de cultivo. En la naturaleza son microaerófilos y no forman pigmentos. Algunas especies están relacionadas con las vías respiratorias altas del hombre y los animales, donde causan enfermedades como la escarlatina, anginas, etc. Otras se encuentran en el tracto intestinal del hombre y animales, contaminando extensamente a las plantas y productos lácteos. Aunque la mayor parte son mesófilos, algunos son termóduricos o ligeramente termófilos. Hay algunas bacterias que causan mastitis en las vacas, mientras otras son importantes en cultivos lácteos iniciadores. *St. lactis* es el más frecuente en productos del agrado de la leche y es el de mayor interés en la elaboración de quesos o en general para la acidificación de productos lácteos, así como el *St. thermophilus* en la elaboración del yogurt. La

presencia de algunas especies como el *St. fecalis* y *St. faecium*, en cantidades elevadas puede ser índice de contaminación fecal en alimentos.

10.1.3. Familia Corynebacteriaceae

Bacilos Gram +, contienen gránulos metacromáticos; en su mayor parte son aerobios, se pueden encontrar en los productos lácteos, en el suelo y como parásitos patógenos de animales y plantas.

10.1.3.1. *Corynebacterium*.

Son bacilos aerobios, que frecuentemente presentan gránulos. No son esporulados. En este grupo se incluye el agente productor de la difteria. Algunas son psicrófilas, pero la mayor parte de ellas son mesófilas. Están estrechamente distribuidas entre ciertas plantas, como el trigo, judías, tomates y otras. También en el intestino del hombre y animales.

10.1.4. Familia Bacillaceae

La principal familia productora de endosporas; son bacilos grandes Gram +, a veces se encuentran en cadenas; con frecuencia son móviles; aerobio o anaerobios; activos en la descomposición de tejidos animales y de residuos alimenticios; muchos son patógenos para los animales y para el hombre (*Clostridium*).

10.1.4.1. *Bacillus*.

La mayoría son anaerobios y están constituidas por bacilos con endosporas. La mayor parte son mesófilos, aunque hay algunos psicrófilos y termófilos, algunos son sacarolíticos y proteolíticos. Estos últimos son de gran interés en la industria por la extrema resistencia al calor de sus esporas. Ciertas especies son patógenas para los insectos. Las muy patógenas no están extensamente difundidas ya que se encuentran tanto en alimentos crudos como cocinados. De hecho y debido a su extraordinaria resistencia de las esporas de muchas

especies, se asocian corrientemente al deterioro de los alimentos enlatados subprocesados, pero también otros muchos alimentos se alteran por la acción de miembros de este género; hay algunas variedades de *B. cereus* que produce en el hombre una toxoinfección alimentaria.

10.1.4.2. Clostridium.

Corresponde a un grupo importante de bacterias anaeróbicas. Son bacilos esporulados y anaeróbicos. El género contiene algunas especies termófilas que son importantes en la industria de alimentos por la extrema resistencia al calor de sus endosporas. Son miembros de este género los agentes etiológicos del tétanos y gangrena gaseosa, así como *C. botulinum* y *C. perfringens*, productores de intoxicaciones alimentarias, ambos implicados en la alteración de alimentos enlatados por ser proteolíticas y sacarolíticas.

La toxina del *C. botulinum*, otro bacilo esporulado, es una sustancia sumamente venenosa cuando el germen se multiplica en el alimento. La toxina es termolábil y resulta letal en dosis muy pequeñas para el ser humano afectando el sistema nervioso central, produciendo una parálisis de los músculos torácicos. La vida puede salvarse administrando una antitoxina lo antes posible.⁶⁰

10.2. Gram -

10.2.1. Familia Enterobacteriaceae.

Bacilos aerobios Gram -, fermentadores activos de los hidratos de carbono, produciendo a menudo CO₂ y H₂, como productos de la fermentación; muchos géneros están emparentados serológicamente; muchas especies son saprófitas habitantes del intestino humano y animal, ocasionando con frecuencia trastornos intestinales. Algunas de ellas son patógenas. Dentro del grupo de las enterobacterias se encuentran las siguientes:

10.2.1.1. *Enterobacter*.

Son bacilos que crecen bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Todos los M.O. de la familia enterobacteriáceas son fermentadoras y algunas especies producen toxinas patógenas causantes de diarreas en el hombre.

10.2.1.2. *Erwinia*.

Son bacilos móviles. Muchas especies crecen en la gama de los psicrófilos y pueden producir, cuando se desarrollan sobre medios de cultivo o ciertos alimentos, pigmentos de varias tonalidades rojizas. bacterias más importantes que intervienen en la producción de alteraciones de frutas y verduras, causando ablandamiento de tejidos y la producción de pectinasas.

10.2.1.3. *Escherichia*.

Son bacilos cortos. Esta especie aparece casi exclusivamente y en gran número en las heces del hombre y de los animales y en consecuencia se ha descrito como coliforme fecal. En los alimentos produce una fermentación fórmica y algunas especies ocasionan toxoinfecciones alimentarias como la *E. coli*, ya que produce produce un tóxina termolábil, y varias tipos Shiga- like que puede causar diversos problemas intestinales y urinarias en el hombre y en animales.

10.2.1.4. *Klebsiella*.

Tiene un comportamiento similar a la *E. coli*, es decir que produce diarrea en el hombre y animales. algunas especies producen tóxicas igual que está. Puede estar en el intestino humano, además de los pulmones y el riñón. Su presencia es indicativo de una higiene deficiente, pero no es indicativo seguro de contaminación fecal. Esta bacteria lleva a cabo una fermentación ácido- mixta.

10.2.1.5. *Proteus*.

Son bacilos anaeróbilos facultativos. Todos son móviles e hidrolizan la urea. Se hallan en el intestino humano y de los animales, así como en las materias en descomposición. Se pueden aislar de huevos, carnes, principalmente cuando se han mantenido a temperaturas superiores a las de refrigeración, es proteolítico y psicrófilo.

10.2.1.6. *Salmonella*.

Este importante género de bacterias aproximadamente comprende 44 000 serotipos diferentes, a los que anualmente se añaden otros nuevos, las especies que cuentan con más serotipos son:)

Especie	No. de serotipos
<i>Salmonella typhimurium</i>	9611
<i>S. enteritidis</i>	6952
<i>S. heidelberg</i>	4950
<i>S. newport</i>	2628
<i>S. hadar</i>	2369
<i>S. agona</i>	1042
<i>S. infantis</i>	958
<i>S. thompson</i>	921
<i>S. muencheim</i>	749
<i>S. braenderup</i>	624
<i>S. typhi</i>	443
<i>S. paratyphi A</i>	77
<i>S. paratyphi B</i>	121
<i>S. paratyphi C</i>	2
<i>S. choleraesuis</i>	57

FUENTE: Manual of Clinical Microbiology (199)

De este género bacteriano se sabe que las *Salmonellas* son bacilos cortos y anaerobios facultativos, que no producen pigmentos sobre los medios de cultivo. Esta bacteria no

esporula. La mayoría fermenta la glucosa y otros azúcares sencillos produciendo gas y ácido. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. A este género pertenecen los agentes productores de la fiebre tifoidea y la paratifoidea, así como son los causantes de la salmonelosis humana transmitida por alimentos, tomando en cuenta que los brotes originados por *Salmonella* en productos cárnicos ocupan un lugar importante en las estadísticas de toxoinfecciones alimentarias (35).

La *Salmonella* no se permite en los alimentos ya que es un microorganismo patógeno y difícil de aislar, sólo se sospecha su presencia en los alimentos en forma indirecta. Se detectan por conteo de coliformes fecales (como indicador) para saber de su existencia en los alimentos.

Especie	Enfermedad
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea
<i>Salmonella paratyphi</i>	Fiebre paratifoidea

Esta bacteria se esconde en la vesícula biliar y produce vómitos y diarreas producidas por las diversas especies anteriormente mencionadas. Una persona que padece la enfermedad puede quedar como portador sano y seguir diseminando la infección sino se tienen buenas prácticas higiénicas y si este manipula alimentos.

10.1.2.7. *Serratia*.

Son bacilos aerobios facultativos, proteolíticos y mesófilos, que generalmente producen pigmentos rojos en los medios de cultivo y ciertos alimentos. La mayoría de las especies se encuentran ampliamente extendidas en la naturaleza, en aguas, suelos y materias animales y vegetales en descomposición.

10.1.2.8. *Shigella*.

Son bacilos cortos e inmóviles. En la naturaleza son aeróbicos y mesófilos y se hallan en aguas contaminadas y en el intestino del hombre, donde produce la disentería bacilar y

otros trastornos intestinales. La contaminación primaria de los alimentos se origina a partir del agua y de portadores humanos. No se admite su presencia en alimentos.

10.1.2.9. *Yersinia enterocolitica*.

Esta bacteria es un bacilo Gram -, es considerada como patógena ya que produce gastroenteritis. En el intestino puede crecer a una temperatura de 44.5 °C y en el medio ambiente a una temperatura de 4 °C; su presencia en los alimentos se debe principalmente al mal manejo de los productos perecederos.

10.2.2. Familia *Vibrionaceae*.

La familia de las vibrionáceas es el 2º grupo mayoritario de Gram -. Son anaerobios facultativos. Esta familia cuenta con un mechón de flagelos polar que sirven como medio de motilidad. Las especies más patógenas para el género humano de la familia vibrionáceas son el *Vibrio cholerae* y el *Vibrio parahaemolyticus* de los cuales se hablara posteriormente. ,,

10.2.2.1 *Vibrio cholerae*.

Es un bacilo Gram -, se considera aerobio facultativo, requiere un pH de 9.0 para crecer, en medio ácido muere, produce endotoxinas. Esta bacteria se puede destruir por medio de la pasteurización ya que los Gram - son sensibles al calor.

No es importante por la alteración que puede causar a los alimentos sino por ser una bacteria patógena, se adquiere por el consumo de alimentos contaminados por ejemplo: los pescados y mariscos. Las manifestaciones de su presencia son: náuseas, vómitos, contracciones, cólicos, etc. En pocas horas se pueden perder hasta 15 litros de líquido corporal, lo que puede provocar la muerte, por eso se recomienda la ingestión de suero a la persona en la cual se ha detectado la presencia de esta bacteria.

10.2.2.2. *Vibrio parahaemolyticus*.

Este bacilo crece entre 30 y 40 °C, es Gram - y halófilo. Se puede encontrar en productos del mar. Tiene un periodo de reproducción de 10 min. Es causante de toxoinfecciones por alimentos, produce daño intestinal (diarreas), es considerado patógeno por las toxinas (parahemolíticas) que produce lisis en glóbulos rojos) que produce. Causa daño en el tejido intestinal causando diarrea con sangre.

10.2.3. Familia Pseudomonales.

Bacterias bacilares, rígidas, rectas, curvas o helicoidales, generalmente con flagelos polares en uno o en ambos extremos de la célula. Todas son Gram -.

10.2.3.1. *Acetobacter*.

Comprende 7 especies, son bacilos aerobios estrictos. Se encuentran en la masa fermentada de granos y cereales, "madre de vinagre", cerveza, vinos y algunas frutas y verduras deterioradas. Algunas especies, como *A. aceti*, oxidan el etanol convirtiéndolo en ácido acético para producir vinagre, que quizás constituye su más importante aplicación industrial.

10.2.3.2. *Achromobacter*.

Comprende unas 15 especies y pertenece a la familia Achromobacteraceae. Son bacilos cortos. Bastantes especies fermentan la glucosa y otros azúcares, pero no producen gas, son proteolíticas y sacarolíticas. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y juegan importantes papeles en la alteración de carnes, aves, pescados y mariscos conservados a bajas temperaturas. Puede producir pigmento rojo y algunas especies pueden ser halófilas.

10.2.3.3. *Alcaligenes*.

Pertenece a la familia Achromobacteraceae, y dentro del mismo se conocen 6 especies.

No fermentan los azúcares dando una marcada reacción alcalina en la leche. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en cualquier materia en descomposición, en leche cruda, productos avícolas, tracto intestinal, etc.

10.2.3.4. *Flavobacterium*.

Son bacilos que generalmente producen en el agar pigmentos que varían desde amarillo al rojo. Y se encuentran en carnes y pescados frescos. Es una bacteria lipofítica y psicrófila.

10.2.3.5. *Pseudomonas*.

Son bacilos cortos y aeróbicos estrictos, que generalmente presentan un flagelo polar único. En este género existen muchas especies o cepas psicrófilas y mesófilas, proteolíticas y lipofíticas. Se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, agua, plantas y en el tubo intestinal del hombre y de los animales. Muchas especies crecen a temperaturas inferiores a las de refrigeración. Entre estas cabe distinguir las que producen pigmentos verdes difusibles e hidrosolubles (*Pseudomonas fluorescens*). La mayor parte de la pseudomonas son capaces de oxidar la glucosa a ácido glicónico. Muchas de ellas son patógenas para las plantas, causando manchas o pudredumbre húmeda. Las *Pseudomonas* pueden sintetizar los factores de crecimiento y se desarrollan a una actividad de agua mayor al 0.98 a excepción de la *Pseudomonas salina* que crece en concentraciones elevadas de sal.

Las pseudomonas tienen especial resistencia al Amonio cuaternario, al ácido acético y al dióxido de cloro, también resiste los antibióticos. Es sensible a la temperatura y muere con la pasteurización.

10.2.3.6. *Halobacterium* y *Halococcus*.

Se distinguen porque necesitan para crecer una concentración de sal (del 12 %). Por ello están implicados en la alteración del pescado salado, en el que se originan manchas características rojas o rosas. Las halobacterias producen manchas características en común

con las *Pseudomonas*, mientras que los halococos se han comparado con los micrococcos. Son coxos que a bajas concentraciones de sal mueren, carecen de pared celular y son proteolíticos.

10.2.4. Bacterias corrosivas.

La corrosión bacteriana es un fenómeno de destrucción en el cual los microorganismos actúan directamente o por medio de sustancias provenientes de su metabolismo, este desempeña un papel importante al acelerar el proceso ya establecido o el de crear condiciones favorables.

Los factores que influyen en la corrosión bacteriana son principalmente el estado en el que se encuentra el material, la higiene del medio y la acción de los microorganismos.

10.2.4.1 Ferrobacterias.

El hierro se presenta en dos estados de oxidación fácilmente interconvertibles, ferroso ($+II$) y férrico ($+III$). La forma en la que se encuentra el hierro en la naturaleza está influida en gran manera por el pH y el potencial de oxidorreducción. A pH neutro, el hierro ferroso se oxida espontáneamente con el aire a hierro férrico, el cual forma hidróxido férrico muy insoluble. La reducción del hierro de férrico a ferroso se da por medio de la acción de microorganismos. En las bacterias oxidadoras del hierro son acidófilos estrictos, son muy comunes en aguas ácidas de minas, manantiales ácidos, charcas, pantanos, etc. causando perforaciones en las tuberías y taponamiento.

Entre las ferrobacterias se encuentran la *Gallionella* y el *Thiobacillus ferrooxidans*.

10.2.4.1.1. *Gallionella*

Bacteria bacilar, acuática, no filamentosas, generalmente adheridas al sustrato por medio de un pedúnculo, o a falta del mismo, son móviles, flotantes sobre la superficie del agua en masas.

Generalmente el pedúnculo de hidróxido férrico es retorcido helicoidalmente; cuando se encuentra en aguas ferruginosas las bacterias hijas son móviles.

10.2.4.1.2. *Thiobacillus ferrooxidans*

Bacterias esféricas embebidas en gruesas cápsulas mucilaginosas en las que pueden depositarse compuestos de hierro o azufre libres o adheridas a objetos sumergidos en aguas dulces.

A pH ácido, el hierro ferroso se oxida lentamente al estado férrico. Sin embargo, la bacteria autótrofa del azufre y del hierro *Thiobacillus ferrooxidans* oxida el hierro ferroso como proceso primario generador de energía en la fijación de CO₂ y precipita grandes cantidades de hidróxido férrico, más sin embargo estos microorganismos deben oxidar grandes cantidades de hierro para crecer y, consecuentemente, incluso un número pequeño de bacterias puede ser el causante de la precipitación de grandes cantidades de hierro. En el suelo y en el agua toleran pH alrededor de dos, cuando oxidan el azufre producen ácido sulfúrico.¹⁴

10.2.4.2. Bacterias sulfatorreductoras.

El sulfato es uno de los aniones más comunes del agua, y está presente en grandes cantidades en el agua de mar. La mayor parte de los microorganismos y de las plantas pueden usar los sulfatos como única fuente de azufre.

El sulfuro de hidrógeno es producido microbiológicamente por dos sistemas diferentes: por la descomposición de compuestos orgánicos que contienen azufre ($R-SH \rightarrow R + H_2S$), proceso llamado putrefacción, y por la reducción del sulfato ($SO_4^{2-} \rightarrow H_2S$).

Los organismos responsables de la reducción del sulfato son anaerobios estrictos, habitualmente miembros del género *Desulfovibrio*, y usan sulfato como aceptor de electrones en vez de O₂.

Bajo el término sulfatorreductores se agrupan aquellos microorganismos que tienen en común reducir los sulfitos a sulfuros y en este grupo se encuentran el *Thiobacillus oxidans* que es una bacteria bacilar, recta, que oxida los compuestos sulfurados y que puede depositar gránulos de azufre al exterior de la célula, esta bacteria se puede denominar como bacteria sulfúrea incolora, no filamentosas, que se puede encontrar en el suelo o en el agua.

Otra de estas bacterias es el *Clostridium perfringens*, que posee una de las actividades más sulfitorreductoras más acusadas, no olvidando que existen microorganismos aeróbios no esporulados que tienen también esta propiedad encontrando entre ellas al *Proteus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, etc.⁶¹

Las bacterias oxidadoras del azufre intervienen en la formación de depósitos económicamente importantes es este elemento.

10.2.4.2.1. Sulfobacterias

En este grupo de bacterias se encuentra el *Chlorobium*, que es una bacteria sulfúrea verde, contienen "clorofila de chlorobium", pigmento fotosintetizante, diferente de otras formas de clorofila, el dador de hidrógeno en la fotosíntesis es el hidrógeno sulfurado (o algunos compuestos inorgánicos de azufre); generalmente no depositan el azufre en el interior de la célula, pero con frecuencia lo depositan extracelularmente, en fuentes de aguas sulfuradas y en aguas estancadas.

10.2.4.2.2. Bacterias oxidantes del hidrógeno.

En este grupo de bacterias se encuentra las *Hydrogenomonas* que oxidan el oxígeno y las *Methanomonadaceae* que son organismos bacilares que obtienen su energía de la oxidación de compuestos sencillos de hidrógeno y carbono, se pueden encontrar en el agua y en el suelo

10.2.4.2.3. Bacterias carbonoreductoras.

Las bacterias oxidadoras de metano utilizan este y otros compuestos monocarbonados como únicas fuentes de energía y carbono. Estas bacterias son todas aerobias y están extendidas en la naturaleza en el suelo y en el agua, presentan una gran diversidad de tipos morfológicos que solo están relacionados con su capacidad de oxidar el metano. En este grupo de bacterias se encuentran las *Carboxymonas* que oxidan el monóxido de carbono y las *Methanomonas* que oxidan el metano.

10.2.5. Otros géneros bacterianos Gram - de importancia en alimentos.

10.2.5.1. *Brucella*.

Es un bacilo Gram -, es microaerófilo, mesófilo y patógeno para el hombre, no causa alteraciones al alimento, generalmente se adquiere al consumir leche sin pasteurizar o productos lácteos. Causa fiebres altas y provoca el aborto en animales pero no en el humano, también provoca problemas del corazón, etc.

11. MICOLOGIA.

En el mundo se conoce el crecimiento de los mohos en los alimentos, caracterizado por un crecimiento aterciopelado o algodonoso, a veces coloreado; generalmente este alimento emmohecido se desecha por ser inadecuado para el consumo humano, ya que el efecto pernicioso de estos contaminantes estriba tanto en defectos de aspecto, por la simple presencia de las colonias, como en su incidente metabolismo que puede ocasionar modificaciones del valor nutritivo, de los caracteres organolépticos y dificultades de conservación.

Si bien es cierto que los mohos son los responsables de la alteración de algunos alimentos, otros son útiles para la elaboración de diferentes alimentos o de sus ingredientes. Así, algunos tipos de quesos sufren una maduración fungica, quesos azules, Roquefort, Camembert, Brie, etc., interviniendo también los mohos en la fabricación de diferentes alimentos orientales tales como la salsa de soya, "miso", "sonti", y otros.

11.1. Características fisiológicas.

Humedad. Los hongos necesitan en general menos cantidad de humedad que las bacterias y las levaduras. Según estudios los mohos no crecen en alimentos con una humedad por debajo del 14 -15 %, ya que estas evitan ó disminuyen en gran medida su crecimiento.

Temperatura. La mayoría de los mohos se consideran mesófilos, es decir crecen a temperatura ambiente. La temperatura óptima para su crecimiento es de 25 a 30 °C, pero algunos crecen bien a 35 - 37 °C (ejemplo: *Aspergillus*). Cierta número de mohos son psicrofílos, esto es crecen a temperaturas de congelación o ligeramente superiores, no faltando los que crecen a temperaturas por debajo de cero grados, se han señalado casos de crecimiento de hongos a temperatura de -5 a -10 °C.

Necesidades de oxígeno y pH. Los hongos son aeróbios, al menos los que crecen en

alimentos. La mayoría de los mohos crece en un intervalo de pH muy amplio (2 a 8.5), pero casi todos lo hacen mejor a un pH ácido.

Necesidades nutritivas. Los mohos necesitan diversos alimentos, tanto sencillos como complejos. Generalmente contienen gran cantidad de enzimas hidrolíticas y algunas se cultivan para obtener amilasas, pectinasas, proteinasas, etc.

Inhibidores. Ciertos mohos producen sustancias (metabolitos secundarios) que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, como la Penicilina del *Penicillium chrysogenum* y la Clavacina del *Aspergillus clavatus*. Algunos compuestos químicos son micostáticos, es decir inhiben el crecimiento de los hongos, tal ocurre con el ácido sorbico, propionatos y acetatos, otros son específicamente fungicidas, pues matan a los mohos.^{4,5}

11.2 Clasificación e identificación de los Hongos o Mohos.

Los hongos se define como un grupo comprendido entre los microorganismos eucarióticos que tienen paredes celulares rígidas, que pertenecen al grupo de las Talofitas, carecen de pigmento fotosintético verde (clorofila), no están diferenciados en raíces, tallos y hojas. Presentan múltiples formas, incluidas setas, mohos y levaduras.

El término moho se emplea para describir ciertos hongos multicelulares que forman un entramado filamentosos conocido como micelio. Este se compone de filamentos individuales llamados hifas. Puede crecer sumergido en los alimentos o superficialmente, en cuyo caso el crecimiento se caracteriza por tener un aspecto veloso o algodonoso. Las hifas se clasifican en vegetativas, cuya misión fundamental es la incorporación de nutrientes y fértiles, que poseen las estructuras reproductoras en soportes aéreos.

Cuando se comparan con las bacterias, los hongos en general tienen requerimientos nutritivos extraordinariamente simples y sus procesos metabólicos y biosintéticos no son particularmente distintos.⁶

La reproducción de los hongos tienen lugar principalmente por esporas asexuales, pero también puede ocurrir por esporas sexuales. Las esporas asexuales, cuya función es propagar la especie, se producen un gran número y son pequeñas, ligeras y resistentes a la desecación. Por lo tanto, son fácilmente dispersables en el aire y cuando llegan a un material nutritivo conveniente, bajo condiciones favorables dan lugar al crecimiento fúngico nuevo.

Los mohos que elaboran esporas asexuales, se clasifican atendiendo a la forma en que éstas se originan y el tipo de esporas producido.

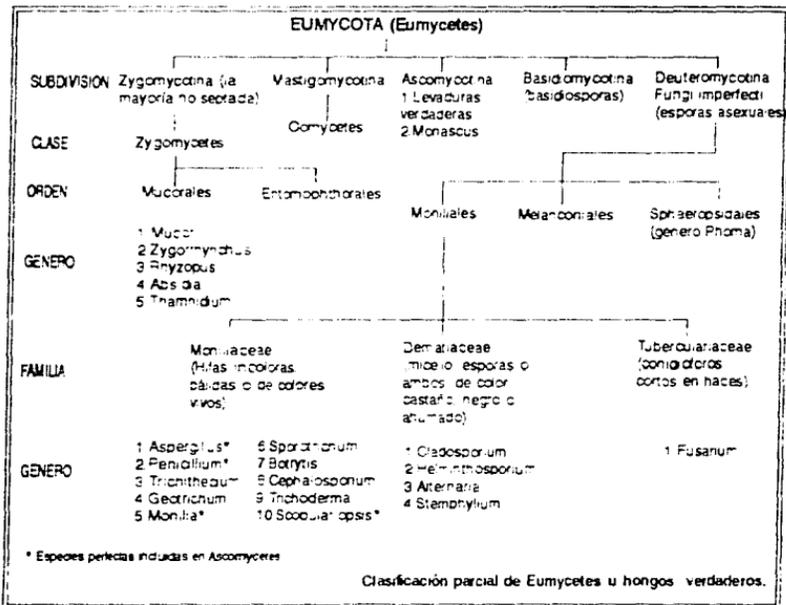
Los hongos se encuentran dentro de los Unicetos y se clasifican en las siguientes subdivisiones, ver en la figura 11.2:

Phycomycetos

Ascomycetos

Hongos imperfectos

TABLA 11.2 Clasificación de Hongos.



11.2.1. **Phycomycetos.**

Producen hifas que no están divididas en las típicas células unimucleadas y por lo tanto, carecen de tabiques transversales (septos); estas hifas no septadas, poseen núcleos que se distribuyen en toda su longitud. La reproducción asexual se realiza mediante la producción de esporas en el interior de una estructura especial, denominada esporangio; la hifa en la que se desarrolla este cuerpo fructífero se llama esporangióforo. Los ficomicetos encontrados corrientemente en los alimentos, pertenecen a la subclase *Zigomicetos*, poseen hifas, que aunque aparentemente iguales, pueden conjugarse (esto es fusionarse sexualmente) para formar la *Zigospora*. Las zigosporas se rodean de una fuerte pared y en consecuencia son muy resistentes a la desecación. Forma parte de este grupo el género *Rhizopus*, llamado moho del pan.

A continuación se mencionan dentro de la clase de los zigomicetes, perteneciendo al orden de los mucorales los siguientes géneros de mohos de esta subdivisión (ver la tabla 11.2.1).

11.2.1.1. **Macor.**

Estos hongos presentan un micelio no septado, apartir del cual se elevan los conidióforos, naciendo de estos últimos la columela y el esporangio. Las esporas son pequeñas, regulares y se forman dentro del esporangio. Generalmente se les puede encontrar proliferando sobre un gran número de alimentos.

11.2.1.2. **Rhizopus.**

Estos mohos tienen el micelio no septado y presentan estolones y rizoides. Los esporangióforos nacen de las raicillas y en su extremo se forma la columela y el esporangio. Las esporas son de color negro y se forman en el interior del esporangio. Al igual que el *Penicillium*, se encuentran ampliamente distribuido en la naturaleza y se pueden hallar en alimentos como las frutas, pasteles, compotas y pan. La especie *R.*

stolonifer frecuentemente es conocida con el nombre de "moho del pan". Ciertas especies se han empleado en la fermentación alcohólica del almidón.

Estos hongos tienen la habilidad de crecer rápidamente a temperaturas que van de 30 a 42 °C, su crecimiento es visible en 12 hrs. de incubación y frecuentemente se completa entre 12 y 18 hrs. No fermentan la sacarosa y tienen una alta actividad enzimática, principalmente proteolítica, que da como resultado la liberación de nitrógeno libre dentro de las 48 a 72 hrs. de haber iniciado una fermentación.11

11.2.1.3. *Thamnidium*.

Estos organismos presentan un micelio no tabicado del que nacen los esporangióforos con un gran esporangio en su extremidad y esporangiolos laterales próximos a su base. A veces se encuentran en carnes refrigeradas, especialmente en los cuartos traseros conservados durante largos períodos de tiempo, en los que determinan una alteración frecuente se conoce con el nombre de barbas. Se puede encontrar en huevos y en otros alimentos en estado de descomposición.

11.2.2. *Ascomicetos*.

Son hongos con hifas septadas que se multiplican asexualmente por separación de los extremos de las hifas fértiles (conidióforos) que producen esporas llamados conidios; los conidios se forman independientemente en cadenas o en grupos irregulares en los conidióforos y precisamente estas disposiciones características ayudan a la identificación de las distintas especies.

En los ascomicetos las esporas sexuales se denominan ascosporas. Se forman por la unión de dos células del mismo micelio o de dos micelios distintos. Después se forma un saco conocido como Asca en cuyo interior están las ascosporas. generalmente.10

11.2.3. Hongos imperfectos.

Muchos hongos que se creían eran ascomicetos se incluyen en los hongos imperfectos porque carecen de fase sexual, es decir, no originan ascosporas. Como los ascomicetos, los hongos imperfectos producen característicos conidióforos y conidios. Por lo tanto, y puesto que el mismo mohó puede clasificarse atendiendo a sus estructuras sexuales (si las posee) o asexuales, un mohó dado podría incluirse en las ascosporas o en los hongos imperfectos; en tal situación la misma especie podría recibir dos nombres distintos. Las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, son ejemplo de hongos imperfectos muy corrientes.

Dentro de los hongos imperfectos se encuentran tres ordenes, la de los Moniliales, los Melanconiales y los Spharopsidales, siendo de gran importancia para nuestro fin (estudio de la Microbiología Aplicada a los Alimentos) la orden de los Moniliales la cual se subdivide en tres familias:

Moniliaceae
Dematiaceae
Tuberculariaceae

de las cuales se hablara a continuación, detallando de cada una de éstas los géneros de mayor importancia.

A continuación se hablará de los géneros pertenecientes al grupo de los moniliaceae que es una orden característica de la subdivisión de los hongos imperfectos. (ver la tabla 11.2.1.)

11.2.3.1 Moniliaceae

11.2.3.1.1. *Aspergillus*.

Estos hongos producen conidióforos que terminan en una protuberancia globosa ó mazuda. Las conidias son esféricas, están formadas por una sola célula y en conjunto

presentan distintos colores. Estos hongos crecen sobre muchos alimentos determinando coloraciones amarillentas, verdosas u oscuras. Presentan micelio tabicado; ciertas especies de este género producen aflatoxinas carcinogénicas, mientras otras especies de este mismo género se emplean como elaboradores de proteasas y ácido cítrico.

Algunas especies como el *Aspergillus candidus* y *A. Flauvius*, que crecen a humedades superiores al 16.5 %, son capaces de elevar la temperatura del grano 50 - 55 °C, cuando encuentran condiciones favorables para su crecimiento. La actividad del hongo también aumenta la humedad del grano.⁴⁴

11.2.3.1.2. Botrytis.

Estos organismos producen conidióforos largos, delgados y frecuentemente pigmentados. El micelio es tabicado y las conidias se disponen en posición epical. Las conidias son unicelulares y en conjunto de color grisáceo. Con frecuencia produce esclerocios irregulares de color negro. Pueden causar un enmohecimiento gris en las plantas y vegetales comestibles. Determinan importantes enfermedades o alteraciones comerciales en las frutas y verduras.

11.2.3.1.3. Cephalosporium.

Estos hongos tienen el micelio tabicado y los conidióforos simples, delgados o engrosados. Las microsporas de ciertas especies de *Fusarium* son, en muchos aspectos, similares a éstas.

11.2.3.1.4. Geotrichum. (oidium)

Hongos parecidos a las levaduras, que presentan diversos colores, de los que el más frecuente es el blanco. El micelio es tabicado y la reproducción tienen lugar por fragmentación del micelio en artoesporas. En algunas ocasiones a estos organismos se les ha denominado " hongos de lechería ", ya que son los responsables del aroma y del sabor

de muchos tipos de quesos.

11.2.3.1.5. *Gloesporium*.

Estos hongos presentan conidióforos sencillos y de longitud variable. Las conidias son unicelulares y a veces curvadas. En las plantas producen antracnosis. Se puede considerar también un hongo de campo que puede causar diferentes enfermedades en cereales de grano pequeño en su desarrollo. No se considera hongo toxigénico.

11.2.3.1.6. *Penicillium*.

Estos organismos tienen el micelio septado, del que se forman los conidióforos, que se ramifican cerca de su extremidad para formar un dispositivo parecido a un pincel del que van surgiendo las conidias. Las conidias se forman a partir de las filidies. Sobre los alimentos producen colores típicos como azul o verde azulado. Estos hongos son importantes en la elaboración de ciertos quesos, otros tipos tienen interés en la producción de antibióticos (por ejemplo Penicilina). Se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, aire, polvo y otros muchos lugares, y se pueden hallar en alimentos como el pan, pasteles, frutas y compotas. Algunas especies producen la "podredumbre blanca de las frutas".

Estos hongos pueden crecer a temperaturas relativamente bajas, inclusive bajo cero. A ciertas especies se les considera hongos toxigénicos, capaces de producir ciertas micotoxinas entre ellas: acratoxina, citrinina y ácido penicílico. En Japón se ha sugerido que el consumo de arroz, en el que ha crecido *Penicillium*, es causa de intoxicación en el hombre.⁴⁴

11.2.3.1.7. *Monilia*.

Estos hongos tienen un micelio blanco o gris del que nacen conidióforos ramificados. En conjunto, las conidias son de color rosa o canela. Ciertas especies constituyen estados

imperfectos de Neurosporas. Otras, cuyos estados perfectos son *Monilinia* ó *Sclerotinia spp.*, producen manchas oscuras en frutas.

11.2.3.1.8. *Sporotrichum*.

Estos hongos presentan un micelio septado que da lugar a conidióforos, de los que nacen las esporas en un lugar próximo a su extremo. Las conidias fijadas apicalmente a los lados del conidióforo son hialinas, unicelulares y de forma esférica u oval. Se ha señalado que son capaces de crecer a temperaturas inferiores a 0 °C. Algunas producen sobre la carne de vaca manchas blancas.

11.2.3.1.9. *Trichothecium* (*Cephalothecium*).

Estas formas presentan micelios septados del que nacen conidióforos simples, delgados y largos. Las conidias son simples y se fijan apicalmente, aunque a veces forman cadenas. Algunas especies producen en frutas y verduras coloraciones rosáceas.

11.2.3.2. *Dematiaceae*.

11.2.3.2.1. *Alternaria*.

Estos hongos presentan el micelio tabicado, con conidióforos y conidias oscuras. Las conidias son de formas variadas y tienen septos transversales y longitudinales. Deterioran activamente los productos vegetales.

11.2.3.2.2. *Cladosporium*.

Este género se caracteriza por la presentación de micelio tabicado con conidióforos oscuros que se ramifican varias veces cerca del vertice. Las conidias también oscuras, con 1 ó 2 células y a veces tienen forma de limón. el *C. herbarium* es una especie que produce manchas negras en la carne de vaca.

11.2.3.2.3. *Helminthosporium*.

Estos hongos presentan, en los cultivos, un micelio debicado y obscuro. Los conidióforos pueden ser cortos o largos, tabicados, sencillos o ramificados. Las conidias nacen unas tras otras, sobre los nuevos brotes que van creciendo en un micelio; son oscuras y casi siempre contienen más de tres células. Crecen en gran escala a nivel del campo.

11.2.3.3. Tuberculariaceae.

11.2.3.3.1. *Fusarium*.

Estos mohos producen un extenso micelio, que en los cultivos aparece algodonoso con tonalidades rosas, púrpuras o amarillentas. Las conidias tienen forma de caña, pudiendo encontrarse aisladas o formando cadenas. Estos hongos tienen importancia en el deterioro de muchas frutas y verduras. Se encuentran asociados con la alteración de los plátanos denominadas manchas de pendunculo.

11.3. Estudios realizados sobre la utilización de los Hongos.

En la actualidad se han realizado diversos estudios sobre los hongos y los efectos que tienen estos cuando están presentes en los alimentos; uno de estos estudios se llevó a cabo en el campo ya que diversos productos agrícolas son invadidos por microorganismos, siendo los hongos los más abundantes y la causa principal de enfermedades, ocasionando pérdidas económicas.

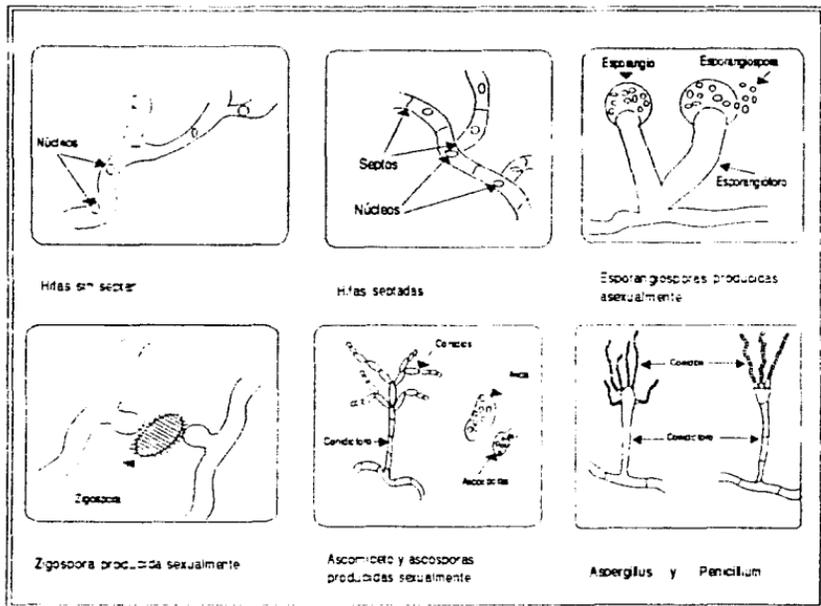
En particular los granos y semillas son invadidos por diversos hongos en el campo aunque también las frutas y verduras se ven afectadas por estos mismos. Entre los hongos que afectan a las semillas en el campo se encuentran el *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, y muchos otros que causan enfermedades a las plantas y que son transmitidos de un ciclo a otro a través de las semillas.

También hay los llamados hongos de almacén entre los cuales se encuentran el *Penicillium* y el *Aspergillus*, estos hongos requieren humididades relativas de 65 - 90 % para crecer, mientras que los de campo requieren humididades relativas de 95 - 100 %. Son importantes los estudios que se llevan a cabo sobre estos hongos ya que son los causantes de grandes problemas pues algunas especies de estos mismos producen sustancias tóxicas tanto para animales como para el ser humano. Uno de estos hongos es el *Fusarium* que es muy común encontrarlo en los cultivos agrícolas principalmente en los cereales. 44

Otro de los estudios que se ha llevado a cabo en la actualidad es la obtención de enzimas pécicas apartir de hongos filamentosos aislados de frutas ,las especies de mayor utilización son el *Aspergillus*, *Penicillium* y el *Rhizopus* obteniendo una mayor cantidad de pectinasas apartir de la siembra de *Aspergillus* en sustratos como lo es la cáscara de naranja, lo cual se hace atractivo para darle uso a estos subproductos y obtener productos de mayor valor agregado. 107

También se llevan a cabo estudios sobre las especies que se encuentran presentes en el aire tomando en cuenta los factores ambientales, teniendo como resultado que las especies encontradas con mayor frecuencia son: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Rhizopus* y *Aspergillus*.

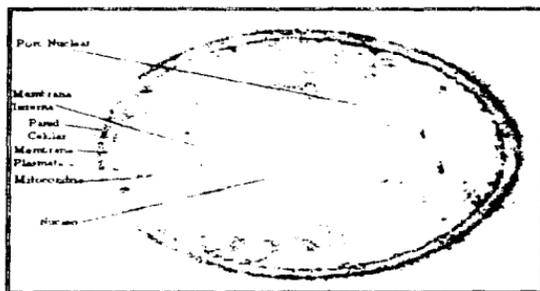
FIGURA 11.1 Estructuras de hongos.



12. LEVADURAS.

Las levaduras son organismos microscópicos que se diferencian de las bacterias por su gran tamaño, que varía de 5 - 8 micras de diámetro, aunque otras pueden llegar incluso hasta las 100 micras de longitud. Son células eucarióticas que cuentan con núcleo verdadero. Presentan diversos grados de localización de funciones en estructuras intracelulares membranosas características llamadas orgánulos celulares. (Ver la figura 12.1).

FIGURA 12.1 Estructura celular de una levadura



FUENTE: Brock * Microbiología * 1987

También tienen diferentes formas que varían desde forma de huevo y elongadas hasta esféricas. Ver en la figura 12 las diferentes estructuras de las levaduras.

Las levaduras pueden crecer en amplios márgenes de pH (3.0 - 3.5 --- > 7.0), en presencia de sacarosa al 55 % o a concentraciones superiores. Estos organismos producen

pigmentos, siendo los más comunes el color crema, amarillo, rojo, café y negro.

Su reproducción puede ser asexual por ascosporas o sexual por gemación. La observación microscópica de las células de levaduras en crecimiento permite ver formas en diversos estados, algunas de ellas con varias yemas. Las levaduras verdaderas o ascospóricas se reproducen sexualmente.

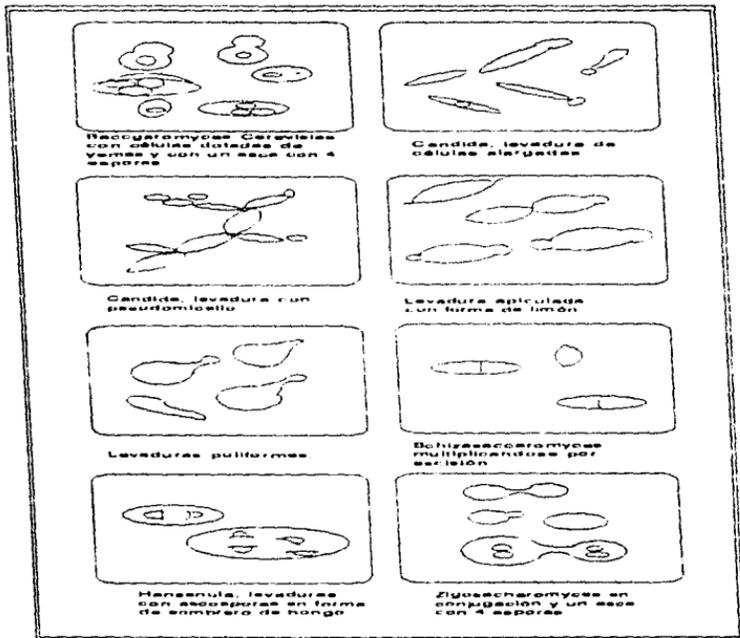
Las levaduras en condiciones óptimas tiene una velocidad de crecimiento rápido (20-30 min.) a temperaturas entre 16 y 18 °C, la levadura transforma los carbohidratos en sus catabolitos, alcohol y dióxido de carbono. Estos procesos son conocidos como fermentación y puede suceder a temperaturas tan bajas como 6 - 8 °C aunque lentamente. Algunas levaduras se desarrollan de igual manera en presencia o ausencia de oxígeno.

La característica particular de la levadura para metabolizar el azúcar, utiliza en la manufactura de diversos productos como lo son la cerveza, el vino, productos de panadería, alcoholes obtenidos por fermentación y no por síntesis química.

Son unas 350 especies reconocidas hasta el momento y se clasifican en 39 géneros, la clasificación se basa principalmente en sus características morfológicas de cultivo, sexuales y fisiológicas.

Las levaduras intervienen en el deterioro de alimentos particularmente los que contienen azúcares, alimentos en salmuera y frutas. Algunas variedades son importantes en la fermentación de bebidas alcohólicas, en la industria pastelera, en la producción de proteínas, y en el tratamiento de aguas residuales.

FIGURA 12 Estructuras de diversas levaduras.



12.1. Géneros de levaduras de importancia en alimentos.

12.1.2. *Brettanomyces*.

Son levaduras asporógenas, productoras de acidez, que presentan células ovales, alargadas, o esféricas. La reproducción es por gemación multipolar, que frecuentemente conduce a la formación de cadenas de células. Ciertas especies llevan a cabo una fermentación tardía en determinadas cervezas europeas, mientras que otras se han aislado en encurtidos alterados.

12.1.2. *Candida*.

Son organismo levaduriformes que, en algunas ocasiones, se han incluido en los hongos imperfectos, concretamente dentro de la familia *Moniliaceae*, junto con los géneros *Trichothecium* y *Geotrichum*. (Ver la figura 12)

12.1.3. *Debaromyces*.

Se trata de levaduras asporógenas que, en ocasiones producen un pseudomicelio. En general, se reproducen por gemación multipolar y también de forma sexual. Este género se encuentra con frecuencia en la superficie de alimentos alterados. Es muy halófila, pudiendo desarrollarse en salmueras que son usadas en la elaboración de quesos que contienen hasta un 24 % de sal.

12.1.4. *Hansenula*.

Son levaduras ascosporógenas que presentan células ovales, alargadas o esféricas y con frecuencia un pseudomicelio. Se reproducen por gemación multipolar y de forma sexual. En este último caso, las esporas en forma de " sombrero " se producen en el interior del asca (Ver la figura 12). Comúnmente se encuentran en los cítricos, uvas y productos derivados. Es una levadura formadora de película (principalmente en la superficie de los

jugos), crece en productos de superficie ácida tales como los encurtidos, oxidan los ácidos orgánicos y facilitan el desarrollo de organismos menos tolerantes que continúan la alteración del producto, tolera grandes concentraciones de alcohol.

12.1.5. *Mycoderma*.

Se trata de levaduras asporógenas que normalmente crecen en la superficie de las cervezas, encurtidos salados, jugos de fruta, vinagre y otros productos similares, sobre los que producen una gruesa capa o película. Una de estas especies, está relacionada con la calidad del vino, vinagre y otros productos afines.

12.1.6. *Rhodotorula*.

Son levaduras asporógenas que algunas veces producen un pseudomicelio de tipo primitivo. Se reproducen por gemación multipolar. Muchas especies producen pigmentos rojos, tanto en los medios de cultivo como en los diversos tipos de alimentos. Están ampliamente distribuidas en el ambiente.

12.1.7. *Saccharomyces*.

Son levaduras asporógenas que producen células alargadas, ovoides o esféricas. Se reproducen por gemación multipolar o por formación de ascas, en la que se encuentran de 1 - 4 esporas. Este grupo representa a las levaduras de mayor importancia industrial, entre las que se halla *S. cerevisiae*, (Ver la figura 12) empleada en la elaboración de la cerveza, del pan y en las industrias de destilación. Estos organismos están ampliamente extendidos en las frutas (especialmente en las uvas) y en las verduras, en las que producen la fermentación de los azúcares con desprendimiento de CO₂ y liberación de etanol. Son levaduras osmófilas (*Saccharomyces rouxi* y *S. mellis*) crecen bien en medios con presión osmótica elevada, así como en concentraciones altas de azúcar , sal o otros solutos, dando lugar a alteraciones en productos secos, zumos de frutas concentrados, miel, jarabes de azúcar u otras soluciones fuertemente azucaradas.

12.1.8. Schizosaccharomyces.

Se trata de levaduras asporógenas que dan lugar a células que se reproducen por fisión, artosporas o por métodos sexuales. En este último caso, las ascas contienen 4 - 6 esporas ovales, esféricas o arruinadas. Se encuentran en el azúcar y otros productos afines.

12.1.9. Torulopsis (torula).

Se trata de levaduras esporógenas que dan lugar a células esféricas u ovales. Se reproducen por gemación multipolar y a veces son capaces de formar un pseudomicelio de tipo primitivo. Ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden crecer en alimentos refrigerados de diversas clases, en algunos casos producen pigmentos rojos.

12.1.10. Pichia.

Son levaduras ovales o cilíndricas que pueden formar pseudomicelio. Ascosporas redondas de forma de sombrero en número de 1 - 4 por asca. Forman película en los líquidos, así como por ejemplo, *P. membranaefaciens* forma película sobre la cerveza y el vino. También crece en productos ácidos tales como encurtidos, tolera grandes concentraciones de alcohol. Algunas especies de Pichia se les hace crecer en vinos Jerez y Arbois, a los que imparte aromas característicos.

12.1.11. Hanseniaspora.

Son levaduras epiculares (forma de limón) crecen en jugos de frutas. Las levaduras son del genero Nadsonia son grandes u con forma de limón. (Ver la figura 12)

12.1.12. Kloeckera.

Levaduras epiculadas o de forma de limón. *K. apiculata* es una especie que con frecuencia se encuentra en las frutas, las flores y el suelo.

12.1.13. Trichosporum.

Forman yemas, artrosporas. Crecen mejor a temperaturas bajas, se encuentran en las cervcerías y en las carnes refrigeradas. Crece en la superficie de los productos ácidos tales como encurtidos, oxidan los ácidos orgánicos y facilitan el desarrollo de microorganismos menos ácido tolerantes que continúan la alteración de los alimentos.

12.1.14. Kluyveromyces.

Estos organismos se reproducen por gemación multilateral, las células pueden ser esféricas, alargadas ó cilíndricas. Algunas especies producen pigmento rojo, pero las colonias son blancas, gris, amarillas, algunas con matices rosados. Los organismo pueden fermentar, crecen a una temperatura comprendida entre 5- 46 °C

Las especies que fermentan la lactosa, como *K. lacti*, se encuentran en productos lácteos, algunas especies son osmófilas y algunas especies son consideradas como fuentes de la enzima poligalacturonasa.

13. PARASITOS.

El termino parásito se usa para designar a los organismos que de una u otra manera, se nutren de otro organismo vivo (hospedero). Tienen dependencia metabólica y por lo tanto causan daño al organismo que los aloja.

En forma muy amplia, los seres vivos se comportan como parásitos, generalmente son microscópicos y están constituidos por grupos moleculares (virus), por una sola célula (bacterias, hongos y protozoos), o por muchas células agrupadas en tejidos, órganos y sistemas, como en el caso de los helmintos y artrópodos.

El estudio de todos los seres vivos sería muy amplio para una sola persona, si es que se requiere profundizar en su conocimiento, por lo que a través del tiempo y para facilitar la investigación de los mismos, se han agrupado tradicionalmente en varias disciplinas:

- 1.- Bacteriología que se encarga del estudio de las bacterias.
- 2.- Micología estudio de los hongos
- 3.- Virología, estudio de los virus
- 4.- Parasitología que se encarga del estudio de los parásitos (protozoos, helmintos y artrópodos).

Los parásitos son microorganismos eucarióticos; y la mayoría de ellos caen dentro del grupo de los heterótrofos (que utilizan sustancias nutritivas previamente elaboradas como son los azúcares, proteínas, grasas, etc., para nutrirse las cuales obtienen de su medio ambiente (huésped).

Muchos alimentos actúan como vectores de parásitos que, al ser ingeridos por el hombre, le ocasionan infecciones. Los parásitos responsables presentan características distintas y muchos poseen ciclos vitales complejos pasando por diferentes fases en hospedadores (animales distintos). Generalmente exhiben una vida libre, en el suelo o en el agua y otra parasitaria interna, en el intestino del hombre y de los animales.

Para entender mejor la relación existente entre un parásito y el hombre a continuación se hablará de tres grupos en los cuales se trata de dar una visión general de los parásitos que son de relevancia por ser transmitidos por alimentos.

1.- Protozoos

2.- Helmintos

Plathelminths

Nemathelminths

13.1. Protozoos

Muchos parásitos son protozoos, organismos pequeños y unicelulares como por ejemplo la amiba, estos organismos carecen de una pared celular verdadera y obtienen su alimento fagotróficamente. Los protozoarios se encuentran en una amplia gama de habitats de agua dulce y marina; muchos son parásitos de otros animales. En general los protozoarios se alimentan ingiriendo partículas o sustancias macromoleculares, por lo que son de real importancia para el género humano.

Los protozoarios son un grupo unicelular protista eucariótico, típicamente móvil y no fotosintético, se clasifican en flagelados, amibas, esporozoarios y ciliados. Estos protozoarios se reproducen generalmente por fisión binaria, no siendo así para el caso de los esporozoarios, en los que usualmente están esporas.

Dentro del grupo de los protozoarios se encuentran los siguientes parásitos:

13.1.1. *Entamoeba histolytica*.

La *Entamoeba histolytica* se puede encontrar en forma trofozoíta o de quiste, en los alimentos crudos se encuentra en forma de quiste, se disemina por defecación al aire libre o por agua contaminada (aguas negras o aguas no tratadas). Los quistes entran por vía oral. El paciente con amebiasis intestinal elimina los parásitos en las materias fecales. Los

trofozoitos son destruidos en el medio ambiente, mientras que los quistes son más resistentes. (Ver la figura 13.1.1). Los trofozoitos son las formas móviles y los quistes son la formas inmóviles de estos parásitos.

Se conoce generalmente como la amibiasis intestinal aguda, en la cual produce la destrucción de los tejidos rápidamente. La amibiasis puede ser intestinal o extraintestinal ya que las amibas se pueden establecer en hígado, cerebro, riñón, páncreas , etc., produciendo cuadros clínicos con síntomas y signos no característicos que hacen difícil su diagnóstico, por lo cual cuando es detectada debe aplicarse el tratamiento adecuado lo más pronto posible; generalmente el tratamiento que se da es a base de metronidazol, tinidazol etc., la dosis depende de la edad principalmente ya que deben tomarse precauciones, con base a los efectos colaterales, la toxicidad etc, producida por el uso de estas drogas.¹²

FIGURA 13.1.1 *Eutamoeba histolytica*.



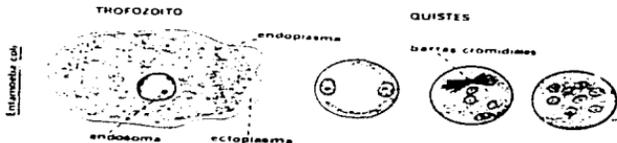
FUENTE Tay " Parasitología Médica " 1982

13.1.2. Entamoeba coli.

La *Entamoeba coli* es una ameba patógena que muchas veces se confunde con *E. histolytica*, aunque esta en promedio es un poco mayor en su tamaño. Se puede encontrar en forma trofozoita midiendo generalmente de 20 a 25 micras. Su citoplasma es granuloso y contiene muchas vacuolas con bacterias en su interior.

Los quistes son redondos y ovales de tamaño entre 15 y 25 micras. Puede contener de 1 a 8 núcleos. La ameba desintérica se alimenta con hemáticas y células intestinales, a las que destruye, su presencia se debe principalmente a la falta de higiene, produce diarreas severas, produciendo ya en un grado avanzado evacuaciones mucosanguinolentas, dolor abdominal, deshidratación etc. El tratamiento que se le da a esta parasitosis es a base de Nitroimidazoles, se utiliza una dosis de 2 gm diarios por, vía oral. La dosis se fracciona en tres tomas administradas con las comidas. La duración del tratamiento es de 5 - 10 días.

FIGURA 13.1.2 Entamoeba coli



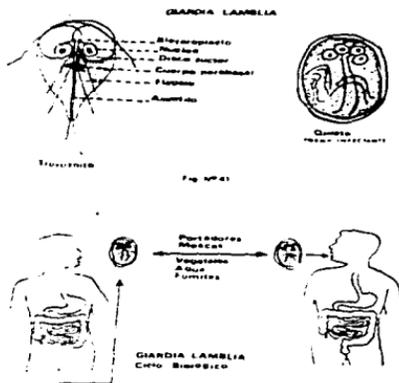
FUENTE: Tay "Parasitología Médica" 1982.

13.1.3. Giardia lamblia.

La giardiasis es producida por *Giardia intestinalis* (*Giardia lamblia*), es predominante en niños y presenta en la actualidad una prevalencia creciente tanto en países tropicales como no tropicales. El parásito fué descubierto por *Leeuwenhoek*, inventor del microscópio, quien lo observó en 1681, en sus propias materias fecales.¹⁷

La *Giardia* produce gases, diarrea, dolor de estómago, generalmente después de comer; produce quistes en el hígado, causando la colitis y en algunas ocasiones anemias. Ver la Figura 13.1.3

FIGURA 13.1.3 Giardia lamblia.



FUENTE: *Text. "Parasitología Médica", 1982*

El protozoo posee una fase de trofozoito y una de quiste, en la primera mide de 9 a 20 micras de longitud por 5 a 12 de ancho, se adquiere por ingestión de quistes eliminados en heces, siendo de gran importancia por su ingestión el consumo de agua contaminada, el tiempo de incubación es de 10 días aproximadamente, los trofozoitos se establecen y reproducen en el intestino delgado, especialmente en el duodeno.^{10,12}

La mejor medida para prevenir la giardiasis es la higiene personal, con el propósito de evitar la contaminación del agua y de los alimentos. También se recomienda efectuar una limpieza frecuente de los depósitos de agua que se usa para consumo doméstico.

13.2 Helmintos

Son organismos multicelulares; gusanos planos redondos y flagelados. La proliferación de estos parásitos coinciden con las épocas de mayor temperatura y humedad.

Muchos helmintos, en especial las formas larvianas, poseen glándulas que secretan sustancias lípidas que facilitan la penetración de los tejidos, las cuales son excretadas por un sistema generalmente sencillo, constituido por tubos colectores que desembocan al exterior del parásito. Cuenta con un sistema nervioso simple y sirve para originar el movimiento y la respuesta a los estímulos. No hay propiamente un aparato locomotor, excepto en algunas larvas que lo han desarrollado en diferentes formas.

Algunos helmintos tienen la capacidad de trasladarse por movimientos reptantes. No hay un sistema circulatorio propiamente dicho y carecen de aparato respiratorio; la mayoría son anaerobios facultativos.¹²

Dentro de este grupo de parásitos hay dos subdivisiones basadas en la forma de los mismos siendo unos los gusanos planos (Plathelminthos) y otros los gusanos redondos o cilíndricos (Nematelminthos) de los cuales hablaremos más adelante con más detalle sobre las características propias de cada grupo:

13.2.1. Planteelmintos.

Son organismos multicelulares; gusanos planos e invertebrados. Los gusanos planos son los conocidos comúnmente como Taenias, algunas de las cuales pueden tener varios metros de longitud. En el intestino humano, las secciones de las cuales está formada se desarrollan a partir de la cabeza y los segmentos terminales contienen huevos fecundados, los cuales se desprenden en las heces fecales.

Los gusanos planos absorben directamente el alimento a través de la piel, se adhieren fácilmente a la pared del intestino con ayuda de succionadores de sus cabezas y a veces también con ganchos. (el tamaño y número de ganchos se característico de cada especie).

Los parásitos que se encuentran dentro de esta clasificación son principalmente los siguientes:

- *Taenia saginata* (Cisticercosis bovina)
- *Taenia solium* (Cisticercosis porcina)
- *Diphyllobotrium latum* (Cisticercosis del pescado)

13.2.1.1. *Taenia solium*.

Es un céstodo armado ya que posee un escólex, y una doble corona con ganchos grandes y chicos (entre 22 y 32 , ver la figura 13.2.1.1), además presenta cuatro ventosas en forma de copa. Todo el parásito completo mide de 2 a 5 mts de longitud. Después del escólex se encuentra el cuello después del cual están los proglótidos inmaduros, maduros y grávidos que en un número de 800 a 1000 forman la larga cadena. En los proglótidos se encuentran los huevecillos que miden de 20 a 30 micras de diámetro.

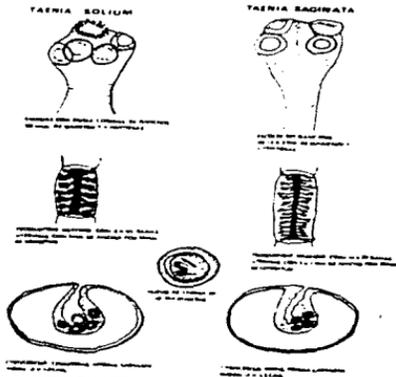
Cuando el cerdo ingiere materia fecal con proglótidos, en el tubo digestivo se disuelven las paredes del mismo y este penetra a la mucosa intestinal y por vía hematogena es llevada a diferentes órganos, pero principalmente al musculo, que es donde se transforma en una vesícula blanquecina llena de líquido con el escólex invaginado, que mide de 0.5 a 0.8 cm

de diámetro y que no es otra cosa que la forma larvaria o sea el *Cisticercus cellulosae*.

Cuando el hombre ingiere carne de cerdo con cisticercos (ver la figura 13.2.1.1) entonces éstos se invaginan en el intestino delgado, con sus ventosas y ganchos se fijan a la mucosa intestinal y de 2 a 3 meses después de la ingestión se empiezan a eliminar proglóticos en las materias fecales. Los gusanos pueden vivir más de 25 años en el intestino humano.

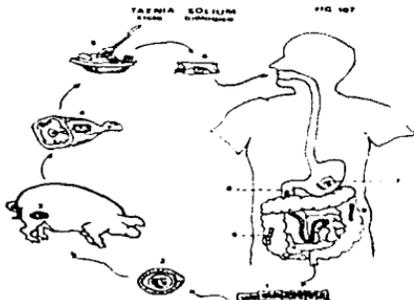
En el intestino puede causar una irritación en el lugar donde de adhiere a la mucosa. Cuando está en órganos vitales o tejidos, se producen secuelas agudas o en ocasiones fatales.

FIGURA 13.2.1.1 *Taenia solium* y *Taenia saginata*.



FUENTE: Tay "Parasitología Médica" 1982.

FIGURA 13.2.1.1.1 Ciclo biológico de la *Taenia Solium*.



FUENTE: Tay " Parasitología Médica " 1982.

En la figura anterior se muestra 1) los proglótidos grávidos en materias fecales, 2) Huevo en forma infectante, 3) Cerdo infectado con *Cisticercus cellulosae*, 4) Carne de cerdo infectada, 5) Consumo de carne de cerdo infectada, 6) Antojos (tacos) con carne de cerdo infectada por *Cisticercus cellulosae* forma infectante para el hombre que origina *T. solium*, 7) *T. solium* en intestino delgado, 9) Proglótidos grávidos.

13.2.1.2. *Taenia Saginata*.

Es similar al de *T. solium* con la diferencia de que la infección la adquiere el hombre al ingerir carne de res infectada por *Cisticercus bovis* (forma larvaria de *Taenia saginata*) con lo cual se adquiere la Teniasis .En la figura 13.2.1.2 las características de la *T. saginata*

Generalmente para estudiar la incidencia de este parásito, se realiza principalmente en las áreas rurales y ganaderas, ya que no es raro encontrar el ganado vacuno (hospedador intermediario) en convivencia con la población humana, ya que se carecen de lugares adecuados para su permanencia, de tal manera que tanto heces fecales como heces humanas son arrastradas por el agua y por el aire contaminando principalmente el agua que muchas veces desemboca en ríos o lagunas, lo cual provoca un círculo de desarrollo de este parásito.⁴⁰

13.2.1.3. *Diphylobothrium latum*.

Es el céstodo que necesita un huésped definitivo (el hombre) y dos huéspedes intermediarios. Cuando los huevos salen con las materias fecales y caen al agua, maduran y el embrión es liberado de la cápsula del huevo y como embrión ciliado nada en el agua. El coracidio debe de ser ingerido por un crustáceo (primer huésped intermediario), en el intestino de este se convierte en larva. El copépodo (crustáceo) que se encuentra infectado por la larva es ingerido por un pez (segundo huésped intermediario), la larva se transforma ya en el pez en una larva más desarrollada. Una vez en el pez (generalmente perca común, salmón, trucha lustre, pez blanco, etc.) y al ser ingerido por el hombre (huésped definitivo), éste desarrollará un parásito adulto.

Este parásito adulto llega a medir de 3 - 10 metros de longitud; aunque infecte al hombre, sólo el 50 % de huevos son viables; en el hombre provoca deficiencia de vitamina B₁₂ (anemia), ya que éste parásito prefiere las vitaminas en su ingesta de nutrientes, en otros casos los proglótidos se introducen en la luz del apéndice, lo irritan provocando muchas veces apendicitis.^{12,14}

El tratamiento que se le da a cualquier infección por céstodo adulto es a base de Niclosamida (pastillas, aplicadas en ayuno durante 4 horas, carece de sabor, aunque en algunos casos, principalmente en niños provoca intolerancia, los parásitos en su mayor parte son expulsados intactos. También se le puede dar tratamiento como una teniasis.

13.2.1.4. Teniasis como enfermedad. (Cisticercosis)

Después de 2 ó 3 meses después de la ingestión de los cisticercos se empiezan a desarrollar los síntomas que son variables dependiendo del huésped entre los síntomas generales se presenta un aumento del apetito, pero con mayor frecuencia anorexia y baja de peso, síntomas digestivos como diarrea, sensación de hambre etc.

El tratamiento que se les da a los pacientes que presentan teniasis es muy importante ya que se debe conseguir que el individuo elimine el parásito adulto por el peligro que representa poder adquirir cisticercosis. La cisticercosis se adquiere una vez que el huevo es absorbido por la mucosa intestinal alcanza los vasos mesentéricos, siendo arrastrados al torrente sanguíneo y llevados a cualquier órgano o tejido, se quedan en los capilares y de 60 a 70 días la larva está completamente desarrollada. En esta forma se puede encontrar o desarrollar en tejido celular subcutáneo, muscular, en las mucosas en el ojo, y principalmente en el sistema nervioso central (afectan los nervios craneales por mecanismo compresivo, pero si la larva muere se pueden presentar alteraciones inflamatorias y meningitis basal crónica que frecuentemente causa la muerte). El tratamiento que se le da es principalmente quirúrgico, mediante el cual se extirpan las larvas.

En la actualidad se usa Niclosamida o el clorosalicilamida, que inhiben la fosforilación oxidativa de las mitocondrias, lo que hace que el parásito muera en contacto con el medicamento, se desprendan y sea eliminado. Tiene el inconveniente de que los proglótidos se pueden empezar a digerir si no son eliminados rápidamente, lo que en el caso de *Taenia solium* provocaría una autoinfección interna y la cisticercosis.

Se puede evitar cocinando bien los alimentos (tiempo prolongado más de 30 min.) y modificando los hábitos de higiene en el ser humano con el fin de romper el ciclo y evitar así la infección tanto de animales como del hombre.

13.2.2 Nematelminetos.

Los nematodos con amplia distribución mundial, son gusanos cilíndricos de simetría bilateral y radial, no segmentados. Los nematodos generalmente son dioicos, es decir

presentan sexos separados y los adultos o sus formas larvarias pueden parasitar lengua, tubo digestivo, hígado, pulmones, ojos o cavidades, donde en ocasiones desencadenan alteraciones tan severas que pueden llevar al paciente a la muerte.

Dentro de esta clasificación podemos encontrar a los siguientes parásitos:

Trichinella spiralis
Trichuris trichiura
Ascaris lumbricoides

13.2.2.1 *Trichinella spiralis*.

Es uno de los parásitos más peligrosos, se encuentra enquistado en la carne de cerdo (músculos). (Ver figura 13.2.2.1.) Este parásito se desarrolla normalmente en un lapso de 2 a 28 días dependiendo del huésped. Esta enfermedad es conocida comúnmente como la Triquinosis y puede afectar a una gran cantidad de especies de vertebrados fundamentalmente carnívoros. En el humano provoca náuseas, vómitos, diarrea, dolores musculares, fiebre, respiración fatigosa etc. Las medidas usadas para prevenir es congelar la carne y productos cocinados de cerdo a -15°C durante 30 días ó a -23°C por un lapso de 20 días y a -29°C por 12 días.

En la figura 13.2.2.1 se muestra el ciclo biológico de este parásito, donde los cerdos infectados con larvas en la carne, se come poco cocida o es ingerida semicruda, lo cual causa una infección en el hombre.

La carne con las larvas pasa por el estómago, posteriormente en el intestino delgado se desarrollan adultos machos y hembras, estas últimas liberan embriones, los que migran a los músculos principalmente. Las larvas se pueden enquistar en los músculos. También la rata puede ser infectada por este parásito.

FIGURA 13.2.2.1 *Trichinella spiralis*.

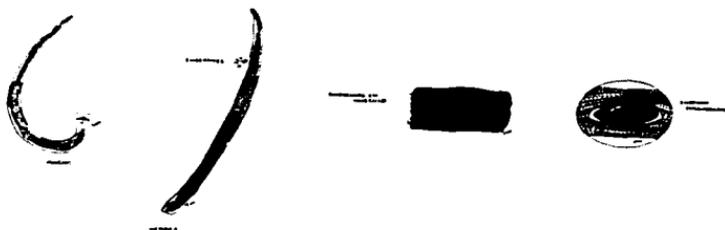
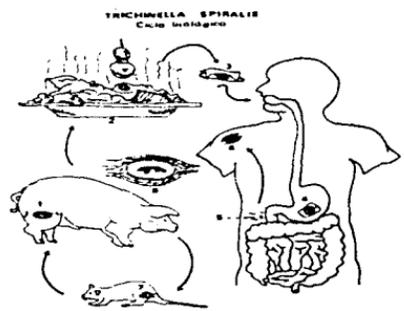


FIGURA 13.2.2.1.1 Ciclo biológico de la *Trichinella spiralis*.



FUENTE: Tey "Parasitología Médica" 1982.

13.2.2.2. *Trichuris trichiura*.

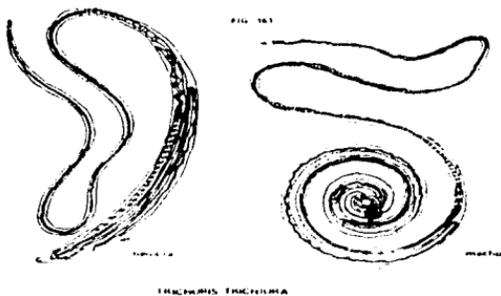
Conocida comúnmente como tricefalosis, enfermedad parasitaria producida por *Trichuris trichiura*, este gusano mide de 30 - 45 mm el macho y de 35 - 50 mm la hembra. (Ver la figura 13.2.2.2) se adhiere con su estrecha cabeza a la pared del intestino grueso donde toma sus alimentos de las células de la mucosa, ocasiona lesiones en el intestino que pueden constituir la puerta de entrada de infecciones bacterianas. Los huevos que deposita la hembra, no están embrionados en el momento de ser expulsados (en las materias fecales), sino al cabo de diez días teniendo una humedad, temperatura y características del suelo favorables se desarrolla el embrión que llega hasta la primera fase del estadio larval, constituyéndose en este momento la forma infectante del hombre.

La parasitosis se inicia con la ingestión de los huevos en los alimentos contaminados. En el intestino se digieren las cubiertas protectoras y emerge la larva pasando después al intestino grueso que es su hábitat definitivo, se convierte en gusano adulto y comienza la fecundación, un Tricefalo hembra pone en promedio de 3000 a 5000 huevos.

Cuando el parásito se fija en la mucosa intestinal, segrega unas sustancias que originan una irritación de las terminaciones nerviosas provocando el aumento en el peristaltismo intestinal. Provoca en casos severos un prolapso rectal debido entre otras cosas por la disminución del tono muscular que ocurre durante los períodos de diarrea crónica y por el pujo durante la disenteria. También es causante de una anemia secundaria.

Es la parasitosis más difícil de tratar. De los fármacos que en los últimos años se venían utilizando como la Ditiазanina y el Tiabendazol, hay una tendencia a abandonarlos, la primera por su toxicidad y la segunda por su poca eficacia. Más recientemente se han visto buenos resultados con el Mebendazol, pero solo cuando la infección es de mediana intensidad. En tricefalosis severas aun se prescriben los enemas de Hexilresorcinol, que aplicados cuidadosamente curan una gran cantidad de casos. Otros medicamentos como el albendazol y la Difertezona continúan en experimentación.

FIGURA 13.2.2.2 *Trichuris trichiura*.



FUENTE: Tay "Parasitología Médica" 1982.

13.2.2.3. *Ascaris lumbricoides*.

Esta parasitosis es la más frecuente y cosmopolita de todas las helmintiasis humanas. El agente causal por su gran tamaño, fué reconocido desde la antigüedad cuando se

comparaba con la lombriz de tierra, *Lumbricus terrestris*, la cual tiene forma y tamaño similares. Con base en esto se origino el nombre de especie *lumbricoides*, para el género *Ascaris* que afecta al hombre. (Ver la figura 13.2.2.3).

El *Ascaris lumbricoides* es uno de los parásitos el cual puede alcanzar 40 cm. de longitud. Se transmite por huevecillos causando perforaciones intestinales ó peritonitis, provocando en general trastornos digestivos; este parásito es muy parecido a la *Taenia saginata*, siendo que los huevecillos de este parásito se desarrollan y son viables a temperaturas menores a los 20 ° C. Este parásito puede provocar insuficiencia pulmonar, bronconeumonía, dolor abdominal, náuseas y vómito y en algunos casos puede salir por boca o nariz.

El cuadro clínico que presenta el individuo infectado es: pérdida de peso, palidez y cuadro convulsivo. Interviene con el aprovechamiento de proteínas.

Todo esto se evitaría si la población rural se preocupará por tener hábitos alimenticios y de higiene, lo cual resulta difícil, pues muchas veces no se cuenta con los medios ni la educación necesaria para hacerlo. (6)

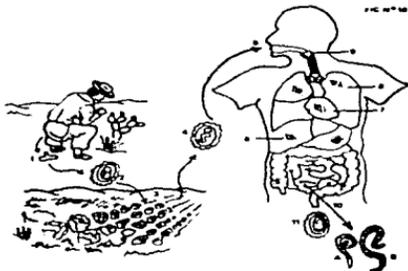
En estudios realizados se comprueba que la parasitosis por helmintos se presenta generalmente en provincia donde estas enfermedades de tipo infeccioso dependen del grado higienico de la persona y de la comunidad que generalmente se esfuerza menos por desarrollar medidas sanitarias preventivas.

Ciclo biológico del *Ascaris lumbricoides*:

- 1) Expulsión de huevos con las materias fecales
- 2) Huevo inmaduro de *Ascaris lumbricoides*.
- 3) Contaminación del suelo, verduras, agua, alimento, etc., con huevos, los cuales de 2 a 4 semanas después de expulsados se tornan infectantes para el hombre.
- 4) Huevo larvado infectante.
- 5) Ingestión de huevos infectados.
- 6) Los huevos después de llegar al intestino delgado, salen las larvas y llegan al hígado por vía hematogena.
- 7) Llegada de larvas al corazón.
- 8) Paso de larvas por pulmones.
- 9) Deglución de las larvas

- y llegada por 2a. vez al intestino. 10) Establecimiento de adultos en el intestino.
11) Salida de huevos al nuevo huésped; A) Adulto macho del *Ascaris lumbricoides*.
B) Adulto hembra de *A. lumbricoides*.

FIGURA 13.2.2.3 Ciclo biológico del *Ascaris lumbricoides*.



FUENTE: Tay * Parasitología Médica * 1982.

14. VIROLOGÍA.

Los virus son de tamaño ultramicroscópico y varían entre 10 y 450 nm. por eso tienen una gran capacidad de atravesar los filtros bacterianos, existen filtros de membrana de un diámetro de poro de 0.22 μm los cuales están diseñados especialmente para retener virus. * Los virus no pueden ser vistos al microscopio óptico, sólo en el electrónico debido a su tamaño.*

La palabra " Virus " que originalmente era la designación latina para veneno, se viene empleando desde hace años.¹⁵

El virus para reproducirse necesitan de un hospedero susceptible (personas, animales, plantas o bacterias) y su especificidad depende estrictamente del mismo.

Los virus tienen una parte central con un solo DNA o bien un RNA y generalmente una cubierta proteica. Estas partículas víricas son metabólicamente inertes y no realizan funciones respiratorias o biosintéticas por lo cual requiere de una célula viva para crecer.

Para reproducirse, los virus deben de alguna manera inducir a la célula viva a fabricar componentes esenciales de la partícula vírica, esos componentes deben reunirse en un orden adecuado, y las nuevas partículas víricas deben escapar de la célula para infectar nuevas células. Las diversas partes de multiplicación se dividen en 6 pasos:

- 1) Fijación (adsorción) de la partícula vírica a la célula sensible
- 2) Penetración del virus o de su ácido nucleico en la célula.
- 3) Replicación del ácido nucleico del virus.
- 4) Producción de los capsómeros de proteína y de otros constituyentes esenciales.
- 5) Reunión del ácido nucleico y de los capsómeros para formar partículas víricas. (ensamble).
- 6) Liberación de las partículas víricas maduradas de la célula para infectar a nuevas células.¹⁷

14.1. Virus transmitidos por alimentos.

Los virus no alteran los alimentos, pero si enferman animales o al hombre.. Generalmente son habitantes del intestino, pasan de la materia fecal al alimento (los virus intestinales sólo tienen RNA). La vía de entrada es bucal (boca - faringe) afecta a la médula espinal y en algunos casos llega a las neuronas.

Numerosas infecciones víricas pueden causar la muerte de animales, o el aniquilamiento de plantas. Muchos virus pueden causar diversas enfermedades entre las comunes nos encontramos:

Hepatitis

Poliomielitis

Rotavirus (Diarrea)

Se ha comprobado que hay brotes víricos, cuya transmisión es por alimentos. Los principales son los Enterovirus (que son virus intestinales) que contaminan los alimentos tan fácilmente y frecuentemente como las bacterias entéricas, ya que siguen la misma ruta de contaminación y diseminación.

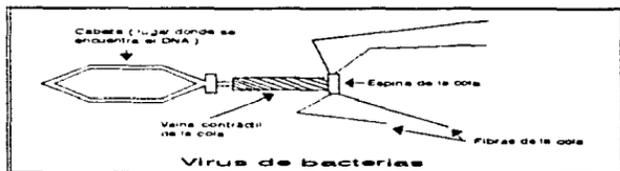
Algunos virus presentan termoresistencia y persisten durante la fase de almacenamiento, en algunos casos son más resistentes que algunas esporas bacterianas.

En la actualidad es difícil identificar en el laboratorio virus debido a la escasa metodología de que se dispone para aislarlos.

Así como existen virus que provocan infecciones al ser humano, también existen virus que atacan a las bacterias. " Los virus bacterianos de denominan bacteriofagos".³⁴ Ver figura 14.1.

A continuación veremos algunos de los virus que se presentan más frecuentemente causando problemas al ser humano.

FIGURA 14.1 Bacteriófago.



FUENTE: Ketchum " Microbiology " 1988.

14.1.1. Hepatitis.

Penetra al organismo humano por vía oral como consecuencia de la contaminación fecal del agua o de los alimentos. El período de incubación (hasta el comienzo de los síntomas) 10-15 días. Pueden dar lugar a complicaciones graves de tipo hepático, se originan por ostras en aguas polucionadas, ya que las ostras y almejas al alimentarse filtran agua. También están implicados los alimentos como la leche cruda, ensalada de patatas, sandwich y fiambres.

Provoca inflamación en Hígado (Rico en carbohidratos)

14.1.2. Poliomiелitis.

Los casos de polio transmitida por alimentos son escasos debido a las campañas de vacunación que sirven como medidas preventivas para el ataque de este virus. Los casos

registrados se presentan principalmente en niños y se debieron al consumo de la leche (pasteurizada y cruda), limonada y pasteles rellenos de crema.

Los virus son generalmente resistentes al calor, pero el virus de la polio se inactiva con la pasteurización.

El tiempo de incubación es de 5 - 35 días, los síntomas son vómitos, fiebre, cefalea, dolores en grupos musculares, parálisis, etc.

Se previene cuidando la higiene de los alimentos, desinfectando el agua y cuidando el contacto de las moscas con los alimentos.

14.1.3. Gastroenteritis bacteriana aguda.

Se produce por el virus *Caxackie* y *Echo*, además de otros agentes víricos no identificados. Se transmite posiblemente por alimentos aunque no se ha demostrado el mecanismo, en promedio el período de incubación es de 27 - 60 hrs. Provoca fiebre, cefalea, dolor abdominal, vómito y diarrea.¹⁴

14.1.4. Rotavirus.

Provoca diarreas muy severas, principalmente en lactantes humanos y en animales jóvenes, incluyendo becerros, lechones. Entre los rotavirus se encuentran agentes de la diarrea infantil humana, lo cual trae consigo la deshidratación.

El rotavirus infecta a las células en las vellosidades del intestino delgado. Se replican en el citoplasma de los enterocitos y alteran los mecanismos de transporte. Las células afectadas pueden descargar dentro de la luz intestinal una gran cantidad de virus, los cuales aparecen en las heces.

En general este virus provoca lo que actualmente se conoce como gastroenteritis aguda. El tratamiento que se le da es principalmente de apoyo, para corregir la pérdida de agua

¹⁴ Compendio Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos *

y de electrolitos, la cual provoca deshidratación, acidosis, choque y muerte. El tratamiento de agua potable y la higiene personal son medida de control importante.»

ANEXOS

Anexo 1.

Grupos de bacterias de importancia en Microbiología en Alimentos.

Las bacterias de interés alimentario se clasifican a menudo basándose en algunas propiedades comunes sin prestar atención a su ordenación sistemática. Es obvio señalar que algunas especies bacterianas podrían incluirse en dos o más de estos grupos. A continuación se mencionan algunos ejemplos de los grupos generalmente admitidos en el área de alimentos.

Bacterias lácticas o productoras de ácido láctico.

Su característica más importante reside en su capacidad de fermentar los azúcares para dar ácido láctico. Puede ser beneficioso en la elaboración de queso, pero resulta un inconveniente en la elaboración de vinos. En este grupo se incluyen las especies de las familias *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae*, pero sobre todo los pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Pediococcus*.

Bacterias acéticas o productoras de ácido acético.

La mayor parte de las bacterias acéticas pertenecen a uno de los dos géneros, *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Ambas oxidan el alcohol etílico a ácido acético, aunque el *Acetobacter* es capaz de oxidar finalmente el ácido acético a dióxido de carbono.

Bacterias butíricas o productoras de ácido butírico.

La mayor parte de las bacterias de este grupo son anaerobias esporuladas del género de *Clostridium*.

Bacterias propiónicas o productoras de ácido propiónico.

La mayor parte de las bacterias de este grupo están integradas en el género de cocos propiónicos.

Bacterias proteolíticas.

Esta constituido por un grupo heterogéneo de bacterias fuertemente proteolíticas, que producen proteinasas extracelulares y denominadas así porque las enzimas se difunden fuera de la célula. Las bacterias proteolíticas se dividen en aeróbicas o facultativas de carácter esporulado o no esporulado y en anaeróbicas y esporulas. Muchas especies de *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Proteus* son proteolíticas.

Bacterias lipolíticas.

Corresponde a un grupo heterogéneo de bacterias que producen lipasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de las grasas a ácidos grasos y glicerol. Muchas bacterias aeróbicas y proteolíticas son también lipolíticas; como por ejemplo, las *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Serratia* y *Micrococcus* tienen especies lipolíticas.

Bacterias sacarolíticas.

Hidrolizan los disacáridos o polisacáridos a azúcares sencillos. Un número limitado de especies bacterianas son amilolíticas, esto es, poseen una amilasa que hidroliza el almidón extracelular. *El Bacillus subtilis* y *Clostridium butyricum* son algunas especies amilolíticas.

Bacterias pectinolíticas.

Las pectinas son carbohidratos complejos que forman parte de las frutas y hortalizas. Las bacterias pecticas, son compuestas por varias enzimas pectinolíticas, que pueden dar lugar al hablandamiento de los tejidos vegetales o a la pérdida de la capacidad de

gelificación de los zumos de frutas. Se comportan como pectinolíticas las especies *Erwinia*, *Bacillus* y *Clostridium*, así como ciertos mohos.

Bacterias termófilas.

Estas bacterias tienen una temperatura de crecimiento óptima entre 45 y 55 °C o superior y son importantes en el caso de alimentos mantenidos a elevadas temperaturas. El *Bacillus spp.* causa la fermentación ácida de algunos alimentos enlatados y el *Clostridium thermosaccharolyticum* da lugar a una alteración gaseosa. El *Lactobacillus thermophilus* es un microorganismo ácido láctico y termófilo obligado.

Bacterias psicrótrofas.

Estas bacterias se pueden desarrollar a temperaturas no muy por encima de las de congelación, teniendo un rango de crecimiento entre 0 y 35 °C y tienen importancia en alimentos refrigerados principalmente. Las bacterias psicrótrofas se encuentran principalmente en los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Alcaligenes*, aunque también se pueden encontrar especies como el *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacter* y otros. Estos microorganismos constituyen un grupo importante dentro de la microflora de los vegetales generalmente son no fermentadores y Gram -.

En la actualidad se están realizando pruebas con antibióticos para eliminarlos de los alimentos, aunque como se dijo anteriormente no está permitido su uso en alimentos ya que en los mismos dejan residuos, y esto puede propiciar que los microorganismos creen una resistencia o tolerancia a los mismos.¹⁵

Bacterias psicrófilas.

La temperatura de crecimiento óptima está entre 10 y 15 °C. Se multiplican muy lentamente en cualquier punto entre -12 y +20 °C. Su actividad cesa en demasía a temperaturas por abajo o por encima de las temperaturas ya mencionadas.

Bacterias mesófilas.

Crecen mejor entre 30 y 35 °C. Pueden sin embargo existir en cualquier punto entre 10 y 45 °C. Debe considerarse el hecho de que algunos mesófilos forman endosporas de considerable resistencia térmica, mientras que las células vegetativas pueden ser fácilmente destruidas a 100 °C, las endosporas resisten mucho más altas temperaturas durante largos períodos de tiempo.

Bacterias halófilas.

Las bacterias halófilas necesitan para su crecimiento determinadas concentraciones de NaCl (Cloruro de sodio). Los requerimientos de sal son menores para las bacterias moderadamente halófilas (5 - 20 %) que para las halófilas extremas (20 - 30 %). Las bacterias halotolerantes pueden crecer en medios sin sal o con sal. Tanto las bacterias halotolerantes como las halófilas tienen importancia en los alimentos conservados en sal o salmuera. Pertenecen a los géneros *Halobacterium*, *Sarcinas*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Pediococcus* y *Alcaligenes*.

Bacterias osmófilas ó sacarófilas.

Son aquellas que necesitan concentraciones de azúcar para su desarrollo, pero se ha declarado que la mayoría de ellas son únicamente tolerantes frente a los azúcares, como por ejemplo las especies de *Leuconostoc*.

Aviso 2.**Destrucción térmica de los Microorganismos.**

En el proceso mediante el cual se lleva a cabo lo que se conoce como esterilización comercial es importante el tener conocimiento de términos que son importantes para la conservación de alimentos y en base a estos lograr alargar la vida de anaquel de estos mismos. La calidad de los alimentos se ve influida por el número de microorganismos que se encuentre presente en el alimento al final de algún proceso, es por eso que se debe poner especial cuidado en su elaboración.

Para conocer mejor la destrucción térmica de los microorganismos, en relación a la conservación y enlatado de los alimentos, es necesario tener conocimiento de ciertos conceptos básicos asociados a esta tecnología.

1) Tiempo de destrucción térmica. (TDT).

Es el tiempo necesario para matar un número dado de microorganismos, a una temperatura determinada. Para ello, la temperatura se mantiene constante, y se hace la determinación del tiempo preciso para matar todas las células. El punto de muerte térmica, es la temperatura necesaria para matar un número dado de microorganismo en un tiempo fijo, normalmente de 10 min.

Para determinar le TDT se han propuesto los siguientes 7 métodos: técnicas del tubo, lata, tanque, frasco, termoresistómetro, tubo abierto y tubo capilar.

El procedimiento general para determinar le TDT, por cualquiera de estos métodos, consiste en situar un número conocido de células o esporas en una serie de recipientes cerrados, con el fin de conseguir un número de organismos supervivientes en cada período ensayado.

2) Valor D.

Es el tiempo de reducción decimal, o el tiempo necesario para destruir el 90 % de los organismos. Este valor es numéricamente igual al número de minutos necesarios para que la curva de supervivencia atraviese un ciclo logarítmico. Matemáticamente es igual al recíproco de la pendiente de la curva de supervivencia y mide la rapidez con que un organismo muere. Cuando D se calcula a 250 °F frecuentemente se expresa como D₂₅₀.

Resistencia al calor de las esporas de organismos termófilos y mesófilos productores de alteraciones se pueden comparar a la vista con sus valores de D₂₅₀:

<u>B. stearothermophilus</u>	4.0 - 5.0
<u>C. thermosaccharolyticum</u>	3.0 - 4.0
<u>C. nigricans</u>	2.0 - 3.0
<u>C. botulinum (tipos A y B)</u>	0.10 - 0.2
<u>C. sporogenes</u>	0.10 - 1.5
<u>B. coagulans</u>	0.10 - 0.07

3) Valor Z.

El valor z hace referencia a los grados Fahrenheit necesarios para que la curva de destrucción térmica alcance un ciclo logarítmico. Matemáticamente, este valor es igual al recíproco de la pendiente de la curva de TDT.

4) Valor F.

Este valor es el equivalente en tiempo, minutos a 250 °F, de todo el calor necesario para destruir las esporas o células vegetativas de un organismo en particular. El valor letal integrado del calor recibido de todos los puntos del recipiente durante el tratamiento se denomina F₀ o F_z. Representa la medida de la capacidad de un tratamiento térmico para reducir el número de esporas o células vegetativas de un organismo dado por recipiente. Si suponemos el calentamiento y el enfriamiento instantáneo de todas las partes del

recipiente con esporas, células vegetativas, o alimentos, F_0 se puede obtener de la siguiente forma.

$$F_0 = D, (\log a - \log b)$$

donde a = número de células de la población inicial

b = número de las células de la población final

5) Curva de tiempo de muerte térmica.

Un sistema para obtener datos y trazar las curvas de TDT es el denominado método del crecimiento-no crecimiento. En la tabla se relacionan a modo de ejemplo, un conjunto de datos obtenidos por este procedimiento, empleando una variable de 6 tubos ó viales a diferentes tiempos. A temperatura de 110°C durante 110 min., ninguno de los tubos tiene supervivientes, pero si los hay cuando el calentamiento dura 80 min. El tiempo de destrucción térmica a 110°C , en las condiciones específicas de la experiencia (número de esporas, calentamiento del medio, etc.) es superior a 80 minutos pero inferior a 110 min.

Los valores de TDT se marcan sobre papel semilogarítmico, tendremos como resultado una curva. Las temperaturas se sitúan en la gráfica como valores aritméticos y los tiempos (en minutos) como logaritmos a escala logarítmica.

La curva es esencialmente lineal, indicando que la destrucción de las bacterias por el calor es de tipo logarítmico y obedece a una ecuación de primer grado. Aunque es difícil hallar los tiempos fuera de los límites de la curva TDT, los cálculos del proceso en la industria conservera se basan en la forma logarítmica en que se destruyen los organismos

El concepto de 12-D.

El concepto de 12-D, hace referencia al proceso letal necesario en la industria conservera, e implica que el tratamiento térmico mínimo deberá reducir la probabilidad de supervivencia de las esporas de *C. botulinum* más resistentes a 10^{12} . Ya que el C.

botulinum no produce toxinas, ni germinación de esporas a pH 4.5, este concepto sólo será válido para alimentos con un pH superior a este valor.

Un ejemplo tomado por Stumbo (1965) ilustra este concepto desde el punto de vista de la tecnología del enlatado. Si suponemos que cada recipiente de alimentos contiene sólo una espora de *C. botulinum*, F_0 se puede calcular através de la ecuación de la curva general de supervivencia con los datos anteriormente anotados:

$$\begin{aligned}F_0 &= D (\log a - \log b) \\F_0 &\approx 0.21 (\log 1 - \log 10^{12}) \\F_0 &\approx 0.21 \times 12 = 2.52.\end{aligned}$$

Realizando un tratamiento de 2.52 min. a 250 °F, las esporas de *C. botulinum* se reducirán desde un billón (10¹²) a una sola espora. Se considera que ciertas esporas de la fermentación dulce tienen valores D, alrededor de 4.0 y que algunos alimentos enlatados reciben tratamientos de F_0 de 6.0 y 8.0, número potencial de esporas se reducen incluso más.

TABLA 15.2 .1 Datos correspondientes al tiempo de destrucción térmica.

Temperatura	Tiempo de calentamiento corregido minutos	Número de muestras	
		Calentadas	Positivas
110 °C(230 °F)	25	6	6
	40	6	6
	60	6	6
	80	6	5
	110	6	0
	140	6	0
115.6 °C(240 °F)	10	6	6
	14	6	6
	18	6	6
	22	6	2
	28	6	0
	36	6	0
121 °C(250 °F)	3	6	6
	4	6	6
	5.5	6	2
	7.5	6	0
	10	6	0
	13	6	0

CONCLUSIONES

Durante la recopilación de la información que forma parte del presente trabajo se pudo comprobar que el área de la Microbiología es muy extensa e importante, y con este trabajo se pretende aportar conocimientos generales sobre el tema que apoyen la información presentada en la Asignatura de Microbiología General.

En el presente Compendio Básico de Microbiología Aplicada a los Alimentos se pretendió realizar una recopilación de la información general acerca de los Microorganismos, teniendo como punto de referencia el Grupo de las bacterias, Mohos, Levaduras, Parásitos y Virus, de los cuales se presenta información sobre su morfología, fisiología y metabolismo; con el fin de que los alumnos amplíen sus conocimientos y su criterio de tal forma que apoye su desempeño en la Industria. Teniendo como base el conocimiento de los requerimientos nutricionales del microorganismo y los mecanismos por los cuales obtiene los nutrientes del medio, (alimentos ricos en proteínas, lípidos y carbohidratos) así como los mecanismos mediante los cuales los transforma y obtiene energía del medio para su posterior reproducción. El alumno de Ingeniería en Alimentos puede tener puntos de control sobre los microorganismos ya que en algunos casos puede manejarlos a su beneficio utilizando los metabolitos de desecho por estos liberados; en otros, sabrá como resolver problemas debido a la contaminación de los alimentos debido al efecto alterante de los microorganismos presentes en el y con base en sus características alterantes podrá proponer diversas maneras de control sobre los mismos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alcocer, L. M., 1984, " Estudio de materias primas para la formulación de los medios de cultivo utilizados en el desarrollo microbiano ", Tesis UNAM, Cuautitlán Izcalli, México.
- 2.- Alberts, B.; Bray, D., 1990, " Biología molecular de la célula " Ed. Omega, España.
- 3.- Alvarez, C. I., y Mendoza, S. E., 1994, " Manual básico de bacteriología " 1a. edición, UNAM, FESC: Veinte años de vida académica, Cuautitlán Izcalli, México.
- 4.- Anderson, P. M., 1982, " Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas ", Editado por el Centro Nacional de Alimentos y Nutrición, Madrid España.
- 5.- Archundia, G. A., 1983, " Educación quirúrgica ", Editor Francisco Mendez Cervantes, México.
- 6.- Badui, S. D., 1981, " Química de Alimentos ", 1a. edición, Ed. Alhambra, México.
- 7.- Balows, A.; Herman, L.K.; Isimbreg, H. H.; Shadomy, H. J., 1991, " Manal of Clinical Microbiology ", 5a. edición, Ed. America Society for Microbiology, Washington D.C. Estados Unidos.
- 8.- Banwart, G. J., 1982, " Microbiología básica de los Alimentos ", Ed. Bella Tierra, España.
- 9.- Bertaloff, A.; Bourguet, J.; Favard, P., y Lacroix, C., 1991, " Biología y fisiología celular "
- 10.- Biagi, F., 1985, " Enfermedades parasitarias " 2a. edición, Ed. Prensa Médica Mexicana, Tomo 1, Ed. Omega, Barcelona España.
- 11.- Blackwell Scientific Publications , 1988, " ICMFS / HACCP in Microbiological Safety an quality "
- 12.- Botero, D.; Restrepo, M., 1992, " Parasitosis humanas ", 2a. edición, Editada por Corporación Para Investigaciones Biológicas , Medellín Colombia.
- 13.- Breach, M. R., 1976, " Esterilización, métodos de control ", Ed. el Manual Moderno, S. A. México.
- 14.- Brock, T.; Smith, D. y Madigan, T., 1987, " Microbiología " 4a. edición, Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, S. A.

- 15.- Collard, P., 1985, " El desarrollo de la Microbiología ", Ed. Reverte, S. A., España.
- 16.- Contreras, P. M., 1993, " Análisis y diseño de elementos de control sanitario en la industria cárnica ", Tesis UNAM, Cuautitlán Izcalli, México.
- 17.- Cornejo, U. M., 1993, " Análisis y diseño de elementos de control sanitario en la industria cárnica ", Tesis UNAM, Cuautitlán Izcalli, México.
- 18.- Davis, D. B.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N., y Gilberg, A. S., 1983, " Microbiology ", 3a. edición, Ed. Harper and Row, USA.
- 19.- Dellat, A. N., 1985, " Microbiología ", 2a. edición, Ed. Interamericana, México.
- 20.- Devlin, T. M., 1988, " Bioquímica " Tomo I 2a. edición. Ed. Reverte, España.
- 21.- Fernández, J.B., 1981, " Limpieza y desinfección en la industria cárnica ", Editado por CITECA., Buenos Aires Argentina.
- 22.- Frazier, W. C.; Westhoff, D.C., 1985, " Microbiología de los alimentos ", 3a. edición, Ed. Acribia, Zaragoza España.
- 23.- Galicia, E. C., 1995, " Utilización del *B. stearothermophilus* como índice para determinar la capacidad de esterilización de un proceso industrial. " Tesis UNAM, Cuautitlán Izcalli, México.
- 24.- Gardner, E. J., 199, " Principios de Genética ", Ed. Limusa, México, D. F.
- 25.- Giese, A. C., 1984, " Fisiología celular y general " 5a. edición, Ed. Interamericana, México, D. F.
- 26.- Gebhardt, L. P.; Nicholes, P.S., 1990, " Microbiology Laboratory Manual", 2a. edición.
- 27.- Hawer, L. E., 1964, " Elementos de Microbiología general ", Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- 28.- Hayes, P. R., 1993, " Microbiología e higiene de los Alimentos ", Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- 29.- Herson, A. C.; Hulland, E. D., 1974, " Conservas alimenticias ", 2a edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- 30.- Hobbs, B. C.; Gilbert, R. J., 1986, " Higiene y toxicología de los Alimentos ", 2a. edición, Ed. Acribia, Zaragoza, España.

- 31.- Jagnow, G., 1991, " Biotecnología " Ed. Acribia, Zaragoza España.
- 32.- Jay, J. M., 1992, " Modern Food Microbiology ", 4a edición, Ed. New York, USA.
- 33.- Jawest, E., 1985, " Microbiología Médica ", 11ava. edición, Ed. El Manual Moderno, México.
- 34.- Junquera, L. C.; Carnero, J.; López- Sáez, J. F., 1986, " Biología celular ", 4a. edición. Editorial Prensa Médica Mexicana, México.
- 35.- Ketchum, A. P., 1988, " Microbiology Concepts and Application", Impreso en USA.
- 36.- Kingsburg, D. T.; Wagner, G. E.; Segal, G. P., 1991 " Manual de Microbiología Médica ", Tomo I, 1a. edición, Ediciones Orientación, S.A. de C.V. México.
- 37.- Lenninger, A.L., 1981, " Biochemistry " 2a. edición, Ed. Worth Publisher, INC. Impreso en USA.
- 38.- Martín, D. W.; Rodwell, V. W.; Mayes, P. A.; Granner, D. H., 1986, " Bioquímica de Harper " 10a edición, Editado por Blackwell Scientific Publications, Oxford London.
- 39.- Mandelstam, J.; Mc Quillen, K., 1978, " Biochemistry of Bacterial Growth ", 2a. edición, Editado por Blackwell Scientific Publications, Oxford London.
- 40.- Mora, P. M., 1990, " Manual de desinfección corriente térmica y preventiva aplicable en el centro de producción agropecuaria de la FESC. Tesis UNAM, Cuauhtlán Izcalli, México.
- 41.- Montgomery, R.; Conway, T. W.; Spector, A. A., 1992 " Bioquímica " Editorial Times Miror de España, S. A. España.
- 42.- Neidhart, F. C.; Ingrand, J.; Schaechter, M., 1990 " Physiology of the bacterial cell" A molecular approach. Sinauer Associates, inc. Publishers, Prainter in USA.
- 43.- Nickerson, J. T., 1978, " Microbiología de los alimentos y sus procesos de elaboración ", Ed. Acribia, Zaragoza España.
- 44.- Norris, J.R.; Ribbons, D. W., 1971, " Methods in Microbiology ", Edit. Academic Press Inc. (London). Gran Bretaña.
- 45.- Pascual, M. R., 1992, " Microbiología Alimentaria ", Ed. Díaz Santos S. A. Madrid España.

- 46.- Post, F. J., 1988, *A Laboratory Manual for Food Microbiology and Biotechnology* Editorial Company Star, Balmont California, USA.
- 47.- Potter, N. N., 1978, "La ciencia de los Alimentos", Editado por Edotex, S. A., México D. F.
- 48.- Robinson, D. S., 1993, "Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos", Ed. Acribia, Zaragoza España.
- 49.- Rose, A. H., 19... "Microbiología química", 3a. edición, Ed. Reverte S. A. México.
- 50.- Sinell, H. J., 1981, "Introducción a la higiene de los alimentos", Ed. Acribia, Zaragoza España.
- 51.- Stryer, L., 1994, "Bioquímica", Tomo 1, 3a. edición, Ed. Reverte, S. A., México.
- 52.- Tatcher, F. S.; Clark, D. S. 1972, "Análisis Microbiológico de los Alimentos" Editorial Acribia, Zaragoza España.
- 53.- Tay, J. Z.; Lara, R. A.; Velasco, O. C.; Gutiérrez, M. Q., 1982, "Parasitología Médica" Editor Francisco Méndez Cervantes, México.
- 54.- Tortora, G. J.; Anagnostakos, N. P., 1977, "Principios de Anatomía y Fisiología", Ed Harla S.A de C.V., México.
- 55.- Walter, G. W.; McBee, R. H.; and Temple, K. L.; 1984, "Introducción a la Microbiología", Editorial Continental S.A de C.V. México.
- 56.- Witton's, "Microbiología", 1972, 4a. Edición, Edit. Continental S.A de C.V., México.
- 57.- Ville, C. A., 1990, "Biología", 7a. edición, Ed. Mc. Graw Hill, México.

BIBLIOGRAFIA

- 58.- Aguirre, M.; Collins, M.D., "Lactic acid bacteria and human clinical infection", *J. Appl. Bacteriology*, 75: 95 - 107, 1993.
- 59.- Aobo, S.; Andersen, J. K., y Olsen, J. E., "Research note: Detection of Salmonella in minced meat by polymerase chain reaction method", *Lett. Appl. Microbiology*, 21: 180-182, 1985.

- 60.- Alsina, M.; Lacena, F., " Evaluación de los medios sulfitorreductores. Equivalencia de los Clostridios sulfitorreductores y esporos de Clostridios perfringens en aguas naturales " Alimentaria, Octubre: 63 - 67, 1988.
- 61.- Apello, M. C.; González, S. N.; Narder de Macías, M. E.; Romero, N., y Oliver, G., " Invitro studies on the inhibition of the grow of Shigella sonnei by Lactobacillus casei and L. acidophilus ". J. Appl. Bacteriology, 73: 480 - 483, 1992.
- 62.- Beuchat, L. R.; Nail, B. V.; Brackert, R. E., y Fox, T. L., "Comparision of the Petrifilm yeast and mold culture film method to convectional methods for enumerating yeast and molds in foods ", Journal Food, 54: 443 - 447, 1991.
- 63.- Bigelow, W. C.; " Heat penetration inprocessing canned foods " N.C. A. Bull 16 L.
- 64.- Brauns, L. A.; Hundson , M.C.; Oliver, J. D., " Use of polymerasa chain reaction in detection of culturable (Vibrio vulnificus cells) ". Appl. and Enviromental Microbiology, 57(9): 2651 - 265 5, 1991.
- 65.- Castañeda, M. T.; Centeno, B. G.; " Estudio microbiológico de mohos en interiores y exteriores fr la UAM ", UAM Azcapotzalco, México D. F., 1995.
- 66.- Castillo, M. F.; Medina, L. M., y Jordano, R., " Calidad microbiológica de productos derivados del surimi ". Alimentaria, Mayo: - , 1995.
- 67.- Cheng, I. W.; Cook, D. L., y Kirk, J. R., " Use of chlorine compounds in the food industry ". Food tecnology, Enero: 107 - 113, 1985.
- 68.- DANONE, " Campaña de comunicación sobre los beneficios fisiológicos del yogurth ", Alimentaria, Septiembre: 111 - 112, 1995.
- 69.- Demeyer, D., " Calidad y seguridad de productos cárnicos fermentados ", Alimentaria, Septiembre: 110 - 111, 1995.
- 70.- Fente, C. A.; Vázquez, B. I.; Franco, C. M.; Quinto, E. J.; Rodríguez, J. L., "Métodos de estudio de los contaminantes fúngicos en productos lácteos ", Alimentaria, Junio: 77 - 88, 1995.
- 71.- Fernández, A. A.; Hijarrubia, M. J.; Hernández, M.; Arana, M., y Suñen, E., " Desinfectant tolerance and antibiotic resistance in psychrotrophic Gram negative bacteria isolated from vegetables " Lett. Appl. Microbiology 5: 308 - 311, 1995.
- 72.- Gómez, R. A.; Rosic O. F.; Olan, M. C., " Proteasa obtenidas vía microbiana en sustratos quitinosos " Div. Acad. Ces. Básic. U. Tabasco, México 1995.

- 73.- Herrero, M. S. . " La calidad de carnes frescas picadas de bovino, ovino, porcino y similares ". Alimentaria, 265: 83- 85, 1995.
- 74.- Higashi, G. I., " Foodborne parasites transmitted to man from fish and other aquatics foods ". Food Tecnology, Marzo: 67 - 74, 1985.
- 75.- Kuriyama, H., and Slaughter, " Control of cell morphology of yeast *Saccharomyces cerevisiae* by nutriente limitation in continuous culture ". Lett. Appl. Microbiology, Mayo: 308 - 311, 1995.
- 76.- Lemus, H. E., "Obtención de proteínas heterologas ", Facultad de Química, UNAM: 1995.
- 77.- Lorenzo, P., y Pino, J., " Efecto de las radiaciones Gamma de Co - 60 sobre las propiedades organolépticas del arroz ", Alimentaria, Marzo: 260: 37 - 40, 1995.
- 78.- Lund, B. M., " Bacterial spoilage, in post-harvest pathology of fruits and vegetables ". Ed. London Academic Press, p.p. 219 - 254, 1983
- 79.- Lund, F., " Differentiating penicillium species by detection of indole metabolites using a filter paper method ", Lett. Appl. Microbiology, 20: 226 - 231, 1995.
- 80.- Manuñ, M.; Williger, B., " Comparación de three rapid methods for identification of Salmonella spp. ", Lett. Appl. Microbiology, 19: 328 - 331, 1994.
- 81.- Manzanero, C. P.; Marin, D. M.; Paredes, P. G., " Control higiénico sanitario de superficies en industrias cárnicas del area III de salud de la región de Murgia ". Alimentaria, Mayo: 19 - 21, 1995.
- 82.- Moreno, B., " Posibilidades actuales y futuras para el control y prevención por parte de las industrias de las enfermedades transmitidas por alimentos ". Alimentaria, Junio, 263: 41-52, 1995.
- 83.- Moreno, E.; González, B.; Fernández, D. C., " Estudio de las bacterias psicrotrofas en helados ", Alimentaria, Septiembre: 87 - 90, 1987.
- 84.- Moreno, M. E., Almacenamiento y conservación de granos y semillas (Hongos en granos almacenados) Memorias del PUAL, 1995.
- 85.- Negra, T.; Jacas, M.; Alvarez, M. S.; Juste, J., y Armengou, J. M., " Vigilancia sanitaria de pastelerías y similares ". Alimentaria, Septiembre, 265: 79 - 82, 1995

- 86.- Otero, M.; Rodríguez, I.; Camejo, J., y Cardoso, F., " Bebida lactera fermentada", *Alimentaria*, Marzo, 260: 93 - 95, 1995.
- 87.- Patterson, M. F., " Sensitivity of *Campylobacter* spp. to irradiation in poultry meat ", *Lett. Appl. Microbiology*, 20: 338 - 340, 1995.
- 88.- Pham, Q. T., " Cálculo del proceso térmico letal por conducción de calor a los alimentos ", *Journal of Food Science*, 52: 967 - 974, 1987.
- 89.- Reyes, R., C.; Quiroz, R. I.; Jimenez, M., " Evaluación de la actividad antifúngica de productos naturales de origen vegetal ", *Instituto de Química, UNAM*, 1995.
- 90.- Rivera, F. A.; Acevedo, C. C., y Alcocer, J. D., " Capacidad de eliminación de helmintos parásitos en una laguna de estabilización en Sto. Tomás Atzingo ", *Rev. Lat. - Amer. Microbiol.*, 27: 335 - 340, 1985.
- 91.- Robertson, G. L., y Miller, S. L., " Inseguridades asociadas con la estimación de los valores F_0 (letalidad) en latas por calentamiento por conducción ", *Journal of Food Technology*, 19: 260 - 263, 1984.
- 92.- Rodríguez, C.; Martín, C.; Centrich, F., " Aplicaciones de las técnicas inmunológicas al análisis de los alimentos" *Alimentaria*, Septiembre, 1990.
- 93.- Romero, D. A., " Las bacterias como fuentes potenciadores del sabor", *Journal of Food Technology*, Noviembre, 1992.
- 94.- Sanjujo, B. M., " La penicilina pionero en la era de los antibióticos ", *Facultad de Química, UNAM*, 1995.
- 95.- Santana, C.; Segura, D. Y Sanchez, S., " Síntesis, Función y origen evolutivo de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos ", *Rev. Lat.-Amer Microbiology*, 36: 139-158, 1994.
- 96.- Sharpe, A. N., " Detection of foodborne microorganisms and their toxins, the future developing methodology ", Eds. Marcel Dekker, New, York and Basel, 453 - 461, 1986.
- 97.- Sofos, J. N., " Current microbiological considerations in food preservation " *Mini Review International J. of Food Microbiology*, 87- 108, 1993.
- 98.- Tamime, A. Y., y Robinson R. K., " *Journal of Food Diary Reseach* 55: 281 - 307, 1988.

- 99.- Troller, J. A., " Influence of water activity on Microorganisms in Foods ", Food Technology, Mayo, 34: 1980.
- 100.- UNAM, Noticiee PUA/1, " Métodos actuales para la detección de microorganismos en alimentos " 3 : 1993.
- 101.- UNAM, " Desinfección y desinfectantes en medicina veterinaria ", Memorias del curso de actualización, F. M. V. y Z., Octubre, 1985
- 102.- Uscanga, I. P.; Fernández, E. R., y Mota, L. G., " Investigación de la presencia de Staphylococcus aureus en jamón cocido empleando tres métodos de estudio preliminar ", Revista Lat. - Amer. Microbiology 39: 191 - 196, 1994.
- 103.- Vaheri, A. T.; Balows, R. C., " Rapid methods and automation in microbiology and immunology ", Springer - Verland, 1991.
- 104.- Valdivia, M. T., " Efecto del (H₂O₂) y del bicarbonato de sodio (NaHCO₃) para reducir el contenido de aflatoxinas en maíz ", Universidad La Salle - Universidad de Arizona, México 1995.
- 105.- Ward, L. J.; Brown, J. C.; Davey, G. P., " Detection of dairy Leuconostoc strain using the polymerase chain reaction", Lett. Appl. Microbiology, 20: 204 - 208, 1995.
- 106.- Yezpe-Mulía, L., y Ortega-Pierres, M. G., " Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la triquinelosis " Rev. Lat.-Amer. Microbiology, 36: 127-138, 1994.
- 107.- Zapate, V. A.; Suárez, M. A., " Producción de enzimas pépticas " Facultad de Química, UNAM, 1995.